

Produção de biocombustíveis usando hidratos de carbono
de microalgas

Patrícia Cunha da Glória

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

Professor Doutor Raúl José Jorge de Barros

2018

Produção de biocombustíveis usando hidratos de carbono
de microalgas

Patrícia Cunha da Glória

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Trabalho efetuado sobre a orientação e co-orientação de:

Professora Doutora Sara Isabel Cacheira Raposo

Professor Doutor Raúl José Jorge de Barros

2018

Produção de biocombustíveis usando hidratos de carbono de microalgas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Patrícia Cunha da Glória

(Patrícia Cunha da Glória)

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Doutora Sara Raposo por ter aceite ser minha orientadora, por todo o apoio, paciência, conhecimento e pelo interesse demonstrados ao longo deste tempo.

Ao Professor Doutor Raul Barros, por ter aceite ser meu co-orientador.

À Mestre Ana Constantino e à Mestre Brígida Rodrigues, que foram as minhas mães durante todo este percurso, que se mostraram sempre disponíveis para me ajudar em qualquer situação.

À minha amiga e colega de laboratório Beatriz Ornelas, por todo o apoio durante as crises de ansiedade, stress e completo desespero, obrigada foste sem dúvida o meu grande apoio.

Aos meus amigos, por estarem lá para mim, mesmo quando apenas queria descarregar.

Aos meus pais, por nunca me deixarem desistir.

À minha tia Belmira, que apesar de estar longe, apoio-me de todas as formas que conseguiu.

Às minhas duas avós, que apesar de não me terem acompanhado fisicamente, sem elas nunca teria chegado onde cheguei hoje.

RESUMO

As microalgas apresentam-se como uma fonte sustentável para a obtenção e valorização de produtos com diversas aplicações. As atuais fontes de energia baseiam-se ainda nos combustíveis fósseis, havendo a necessidade de se desenvolverem fontes de energia sustentáveis. Observou-se um aumento do interesse no desenvolvimento de biocombustíveis, gerados a partir de material biológico, pois estes apresentam um elevado potencial na sustentabilidade e redução das emissões dos gases de efeito estufa.

Com este intuito, o presente trabalho tem como foco, a produção de biomassa algal como matéria-prima para obtenção de açúcares fermentáveis para a produção de bioetanol.

Foram utilizadas diferentes espécies de microalgas, *Chlorella sorokiniana* e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, crescidas em condições de mixotrofia, em meio líquido TAP sob luz contínua e arejamento. O crescimento foi acompanhado através da densidade óptica e da biomassa seca. No caso da *Chlorella sorokiniana* atingiram-se valores de 4,07 e 4,47 g/L, para a estirpe não axénica e axénica, respetivamente, verificando-se um crescimento inferior com a *Chlamydomonas* sp. com apenas 2,42 g/L de biomassa seca. Realizou-se também a análise dos carotenoides, e mais uma vez se verificou que a *Chlorella sorokiniana*, obteve os valores mais altos com cerca de 0,269 mg/L.d. Após a obtenção da biomassa, esta foi sujeita a um pré-tratamento e diferentes tratamentos de hidrólise ácida e enzimática para conversão do amido em glucose. O amido acumulado, foi quantificado em unidades equivalentes de glucose após hidrólise destacando-se a quantidade de amido acumulada na *C. sorokiniana* não axénica de 88,93% em condições de limitação

Os resultados obtidos sugerem que estas estirpes de microalgas apresentam características bastante promissoras como matéria-prima para a obtenção de bioetanol, destacando-se a *Chlorella sorokiniana* não axénica, uma vez que das três espécies em estudo é aquela que apresenta os melhores resultados, podendo ser uma alternativa sustentável.

Palavras-chave: Microalgas; Biocombustíveis; Biotecnologia Azul; Hidratos de Carbono; Hidrólise

ABSTRACT

Microalgae present themselves as a sustainable source for the obtaining and valorization of products with diverse applications. Existing energy sources are still based on fossil fuels, with the need to develop sustainable energy sources. There was increased interest in the development of biofuels, generated from biological material, as these have a high potential for sustainability and reduction of greenhouse gas emissions.

With this aim, the present study focuses on the production of algal biomass as a raw material to obtain fermentable sugars to produce bioethanol.

Different species of microalgae, *Chlorella sorokiniana*, and *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, grown under mixotrophy conditions, were used in TAP liquid medium under continuous light and aeration. Growth was monitored by optical density a and dry biomass. In the case of *Chlorella sorokiniana*, values of 4.07 and 4.47 g / L were reached for the non-axenic and axenic strains, respectively, with a lower growth with *Chlamydomonas* sp. with only 2.42 g / L of dry biomass. The analysis of carotenoids was also carried out, and again it was verified that *Chlorella sorokiniana* obtained the highest values with about 0.269 mg / L.d. After obtaining the biomass, it was subjected to a pre-treatment and different treatments of acidic and enzymatic hydrolysis for conversion of the starch to glucose. The accumulated starch was quantified in equivalent units of glucose after hydrolysis, standing out the amount of starch accumulated in non-axenic *Chlorella sorokiniana*, of 88.93% under conditions of limitation.

The results obtained suggest that these microalgae strains have very promising characteristics as a raw material to produce bioethanol, especially *Chlorella sorokiniana* non-axenic, since of the three species under study it is the one that presents the best results and can be a sustainable alternative.

Key words: Microalgae; Biofuels; Blue Biotechnology; Carbohydrates; Hydrolysis

PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

Glória, P., Constantino, A., Rodrigues, B., Barros, R., Raposo, S. (maio, 2018). *Aproveitamento da biomassa de microalgas para obtenção de açúcares fermentáveis*. Resumo publicado em IX Jornadas de Acuicultura en el Litoral Suratlántico, Cartaya (Huelva)

Constantino, A., Glória, P., Rodrigues, B., Leon, R., Barros, R., Raposo, S. *Biofuels Production By Chlorella Sorokiniana In A Biorefinery Perspective*. Trabalho submetido ao ALGAEUROPE 2018 INTERNATIONAL CONFERENCE, a realizar entre 4 e 6 de dezembro de 2018

LISTA DE ABREVIACÕES

AACC – *American Association of Cereal Chemists*

Abs – Absorvância

AOAC – *Association of Analytical Communities*

C_a – Clorofila a

C_b – Clorofila b

C_C – Carotenoides

CIMA – Centro de Investigação Marinha e Ambiental

CO₂ – Dióxido de Carbono

CR-ACS2 – *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2

CSA – *Chlorella sorokiniana* axénica

CSNA – *Chlorella sorokiniana* não axénica

C_T – Clorofila Total

d – Dias

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GEE – Gases de Efeito Estufa

g/L – Gramas por litro

g/(L.dia) – Gramas por litro dia

GOPOD – Reagente de Glucose oxidase/peroxidase

h – Horas

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

H₃PO₃ – Ácido Fosforoso

HCl – Ácido Clorídrico

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

IR – Índice de Refração

L – Litro

LEBA – Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental

M – Molar

mg – Miligramas

mL – Mililitro

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – Nanómetro

PBS – Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline)

PS_f – Peso Seco final

PS_i – Peso Seco inicial

PS_{máx} – Peso Seco Máximo

rpm – Rotações por minuto

TAP – Tris Acetate Phosphate

t_f – Tempo Final

t_{máx} – Tempo Máximo

UF – Unidades de fluorescência

μ – Taxa específica de crescimento

μm – Micrómetro

W – Watts

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO	VII
LISTA DE ABREVIACÕES	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Biotecnologia	1
1.2 Enquadramento teórico	2
1.3 Biocombustíveis	3
1.3.1 Biocombustíveis de 1ª geração	5
1.3.2 Biocombustíveis de 2ª geração	5
1.3.3 Biocombustíveis de 3ª geração	6
1.4 Microalgas	8
1.4.1 Fotossíntese	9
1.4.2 Hidratos de carbono nas microalgas	9
1.5 Hidrólise	11
1.5.1 Hidrólise química	12

1.5.2 Hidrólise enzimática	13
1.6 Produção de bioetanol	19
1.7 Biorrefinaria.....	19
1.8 Objetivos.....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Microrganismos	22
2.2 Meio de cultura	22
2.3 Condições de manutenção das microalgas	23
2.4 Ensaio experimentais com as microalgas.....	24
2.4.1 Preparação do pré-inóculo.....	24
2.4.2 Ensaio experimental	24
2.4.3 Ensaio experimental em condições de limitação de azoto.....	25
2.5 Liofilização da cultura de microalgas.....	26
2.6 Métodos analíticos	26
2.6.1 Determinação da densidade ótica.....	26
2.6.2 Determinação da biomassa	26
2.6.3 Correlação entre a densidade ótica e o peso seco	27
2.6.4 Análise do ácido acético por HPLC	27
2.6.5 Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides	28
2.6.6 Quantificação do teor de lípidos neutros.....	28
2.6.7 Análise de amido pelo <i>kit</i> da <i>Megazyme</i>	29
2.6.8 Análise do amido com ácido perclórico	31
2.7 Parâmetros cinéticos de crescimento	31
2.7.1 Taxa específica de crescimento.....	31
2.7.2 Produtividade total da biomassa.....	32
2.7.3 Produtividade máxima de biomassa	32

2.7.4 Produtividade específica máxima	32
2.8 Tratamento de dados.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.1 Ensaio de crescimento das microalgas.....	34
3.2 Efeito da limitação em azoto na produção de metabolitos.....	40
3.2.1 Lípidos	40
3.2.2 Amido.....	41
3.2.2.1 Análise do amido pelo ao kit da Megazyme	42
3.2.2.2 Análise do amido pelo método do ácido perclórico	43
4. CONCLUSÃO.....	47
5. BIBLIOGRAFIA	49
6. ANEXOS	60
I. Complemento ao Meio de Cultura TAP	60
II. Preparação da mistura concentrada de Antrona e H ₂ SO ₄	61
III. Determinação da curva padrão, para a quantificação de amido.....	62
IV. Determinação da reta de calibração, para a determinação do consumo de acetados.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Esquemática das aplicações tecnológicas da Biotecnologia Marinha (adaptado de Blue Biotechnology, 2014).....	1
Figura 1.2 - Processo de transesterificação. R1, R2, R3 correspondem às cadeias de ácidos gordos (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010).....	4
Figura 1.3 - Tipos de biocombustíveis e as suas origens de produção.....	4
Figura 1.4 – Processo de produção de biodiesel e bioetanol a partir de microalgas. Adaptado de (Dragone, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2010).....	6
Figura 1.5 – Equação geral do processo fotossintético (Adaptado de Colling Klein et al., 2017).....	9
Figura 1.6 – Fluxos de massa e energia das microalgas numa biorrefinaria (Adaptado de Zhu, 2014).....	20
Figura 2.1 - Montagem do ensaio de crescimento em mixotrofia para <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica, <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2.....	25
Figura 3.1 – Culturas de diferentes estirpes de microalgas, em placa com meio TAP sólido, em condições de mixotrofia. (A) <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica; (B) <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica; (C) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2.....	34
Figura 3.2 – Produção de biomassa (g/L) das diferentes espécies de microalgas, a Abs 750 nm, ao longo do ensaio, em condições de mixotrofia. (●) <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica; (■) <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica; (▲) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2.....	35
Figura 3.3 – Comparação entre as concentrações de Clorofila a (Ca), Clorofila b (Cb), Clorofila total (CT) e carotenoides (Cc), entre as diferentes estirpes de microalgas. (CSNA) <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica; (CSA) <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica; (CR-ACS2) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2. (●) Ca; (●) Cb; (●) CT; (●) Cc.....	38

Figura 3.4 – Percentagem mássica de amido determinada pelo *kit* da *Megazyme*, para as diferentes microalgas em meio não limitado e após 4 dias de exposição em meio sem azoto. (CSNA) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (CSA) *Chlorella sorokiniana* axénica; (CR-ACS2) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2. (●) Com azoto; (◐) Sem azoto.....42

Figura 3.5 – Amostras de glucose com diferentes concentrações, usadas para determinar a curva padrão para a quantificação de amido pelo método espectrofotométrico pela quantificação com a antrona em ácido sulfúrico a 72%.....44

Figura 3.6 - Percentagem mássica de amido, determinada pelo método de ácido perclórico, para as diferentes microalgas em meio não limitado e após 4 dias de exposição em meio sem azoto. (CSNA) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (CSA) *Chlorella sorokiniana* axénica; (CR-ACS2) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2. (●) Com azoto; (◐) Sem azoto.....45

Figura 0.1 – Curva padrão para quantificação de amido. Absorvância a 625 nm para diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y = 6.1991 x + 0.0147$, $R^2 = 0,9997$62

Figura 0.2 – Reta de calibração para a determinação do consumo de acetatos. Reta de regressão linear obtida: $Y = 1284.4x + 9013.3$63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Comparação do bioetanol de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a geração (adaptado de Jambo et al., 2016).....	7
Tabela 0.1 – Percentagem de hidratos de carbono de algumas espécies de microalgas (Adaptado de (Markou, Angelidaki, & Georgakakis, 2012)).....	10
Tabela 0.2 – Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de hidrólise (Adaptado (Ho et al., 2013)).....	12
Tabela 1.4 – Condições ótimas de hidrólise de diferentes espécies de microalgas.....	15
Tabela 2.1 - Composição do meio TAP (adaptado de Gorman & Levine, 1965).....	23
Tabela 3.3 – Parâmetros cinéticos determinados para a cultura das diferentes estirpes, em condições de mixotrofia, em erlenmeyers, a 30 °C sem agitação, com arejamento, durante 360 horas, sob luz contínua. (CSNA) <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica; (CSA) <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica; (CR-ACS2) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2...36	36
Tabela 3.2 – Produtividades máximas dos pigmentos totais determinadas para a cultura das diferentes estirpes, em condições de mixotrofia, em erlenmeyers, a 30 °C sem agitação, com arejamento, durante 360 horas, sob luz contínua. (CSNA) <i>Chlorella sorokiniana</i> não axénica; (CSA) <i>Chlorella sorokiniana</i> axénica; (CR-ACS2) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CR-ACS2.....	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biotecnologia

A Biotecnologia pode ser definida como, a aplicação de organismos vivos, sistemas ou processos para o desenvolvimento de um produto comercial ou serviço (Thakur & Thakur, 2006). Esta por sua vez, divide-se em cinco grupos principais: Vermelha (saúde e bem-estar humano e animal); Verde (agro-alimentar); Cinzenta (ambiente); Azul (marinha e aquática); Branca (industrial).

Quando falamos da Biotecnologia Marinha (azul), não nos estamos a referir só à exploração dos oceanos para o desenvolvimento de aplicações tecnológicas dos organismos marinhos, mas como também ao seu grande papel no avanço de biomateriais, aquacultura, biorremediação e biocombustíveis, o que se encontra esquematizado na Figura 1.1 (Freitas, Rodrigues, Rocha-Santos, Gomes, & Duarte, 2012; Thakur & Thakur, 2006).



Figura 1.1 – Esquematização das aplicações tecnológicas da Biotecnologia Marinha (adaptado de Blue Biotechnology, 2014)

1.2 Enquadramento teórico

Atualmente as fontes de energia mais utilizadas, baseiam-se em combustíveis fósseis. Sabe-se que cerca de 90 % das necessidades energéticas mundiais, provêm principalmente do petróleo, do carvão e do gás natural (Baicha et al., 2016; C. Y. Chen et al., 2013; Mulders, Lamers, Martens, & Wijffels, 2014; Sivakumar et al., 2010).

Com o atual consumo de combustíveis fósseis, prevê-se que estes se esgotem nos próximos 55 a 75 anos, pois o elevado crescimento da população mundial e a rápida industrialização levaram a um aumento do consumo energético, o que contribuiu para uma crise energética global (Baicha et al., 2016; Ho et al., 2013; Jambo et al., 2016).

A contínua utilização de combustíveis fósseis tem levado a problemas como, o esgotamento das reservas, o aumento do preço do petróleo, e impactos ambientais negativos, tais como as alterações climáticas. (Burkart & Mayfield, 2013; C. Y. Chen et al., 2013; Ho et al., 2013; Jambo et al., 2016). O aquecimento global é um impacto ambiental de grande importância, causado principalmente pelo aumento da concentração dos gases de efeito estufa (GEE), como o dióxido de carbono (CO₂) (Amin, 2009; Razzak, Ali, Hossain, & DeLasa, 2017). A combustão de combustíveis fósseis é responsável por 73 % da produção de CO₂ (I. Kumar, Ramalakshmi, Sivakumar, Santhanakrishnan, & Zhan, 2011; Verma, Mehrotra, Shukla, & Mishra, 2010). Reduzir o CO₂ atmosférico acumulado é de extrema importância e pode ser conseguido, através da captação do CO₂ emitido pela combustão de combustíveis fósseis antes destes entrarem na atmosfera. A quantidade de CO₂ acumulado pode ser diminuída pela redução do uso de combustíveis fósseis e com a utilização de fontes de energia limpa (Amin, 2009; Razzak et al., 2017). Em resposta a estas questões, vários países direcionaram a sua atenção, para o desenvolvimento de fontes de energia renováveis, quer sejam elas económicas e também amigas do ambiente

No sentido de minimizar os efeitos dos GEE, o Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia lançaram o Decreto-Lei n.º 91/2017, que procede, à transposição para o direito interno da Diretiva (UE) n.º 2015/652, do Conselho, de 20 de abril de 2015. O Decreto-Lei n.º 91/2017 de 28 de julho, estabelece as normas referentes às especificações técnicas aplicáveis ao propano, butano, GPL auto, gasolinas, petróleos, gasóleos rodoviários, gasóleo colorido e marcado, gasóleo de aquecimento e fuelóleos, definindo as regras para o controlo de qualidade dos

carburantes rodoviários e as condições para a comercialização de misturas de biocombustíveis, com gasolina e gasóleo, para a propulsão de veículos. O referido decreto-lei, determina igualmente a obrigatoriedade de apresentação de relatórios anuais sobre as emissões de GEE dos combustíveis e de energia fornecidos, que permitam a redução até 10 % das emissões GEE até 31 de dezembro de 2020, sendo 6 % uma meta obrigatória e os restantes 4 % adicionais (Diário da República n.º 145/2017, 2017)

1.3 Biocombustíveis

O acesso limitado de combustíveis fósseis, tornou essencial o uso de fontes de energia alternativa (Markou & Nerantzis, 2013), aumentando conseqüentemente o interesse na produção e uso de combustíveis provenientes de plantas e matéria orgânica (Naik, Goud, Rout, & Dalai, 2010; Tulashie & Salifu, 2017). Surgindo os biocombustíveis, que o têm potencial de fornecer parte da energia requerida pela população mundial de forma sustentável (Parsaeimehr, Sun, Dou, & Chen, 2015; Randhawa, Relph, Armstrong, & Rahman, 2017).

O uso de biocombustíveis quando comparado com combustíveis derivados de petróleo, tem um balanço de carbono praticamente neutro (R. A. Lee & Lavoie, 2013). Esta sinergia entre todos os elementos, tem o potencial de reduzir as emissões de CO₂, pois as plantas usam-no durante o seu crescimento, logo se o CO₂ libertado for igual ao CO₂ capturado pelas plantas durante a fotossíntese, não levará a um aumento do CO₂ atmosférico (Naik et al., 2010).

Existem diversos tipos de biocombustíveis, como biodiesel, bioetanol e biogás, porém o biodiesel, é o biocombustível mais comum na Europa, sendo este produzido a partir de culturas oleaginosas através de uma reação transesterificação, como se pode observar na Figura 1.2. O óleo, pelo auxílio do metanol, reverte a esterificação, que cliva o glicerol dos ácidos gordos, permitindo a utilização destes na produção de biodiesel (An et al., 2011; Gressel, 2008). De seguida, temos o bioetanol que é produzido a partir da fermentação de açúcares, predominantemente glucose, provenientes principalmente da cana-de-açúcar (R. A. Lee & Lavoie, 2013). Por fim, o biogás pode ser produzido a partir de materiais residuais biodegradáveis, ou através da alimentação de culturas energéticas em digestores anaeróbicos (An et al., 2011).

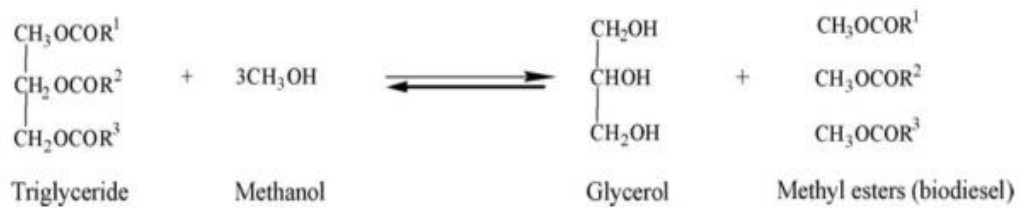


Figura 1.2 - Processo de transesterificação. R1, R2, R3 correspondem às cadeias de ácidos gordos (Naik et al., 2010)

Podemos classificar os biocombustíveis em três gerações, dependendo da sua origem de produção (Figura 1.3).

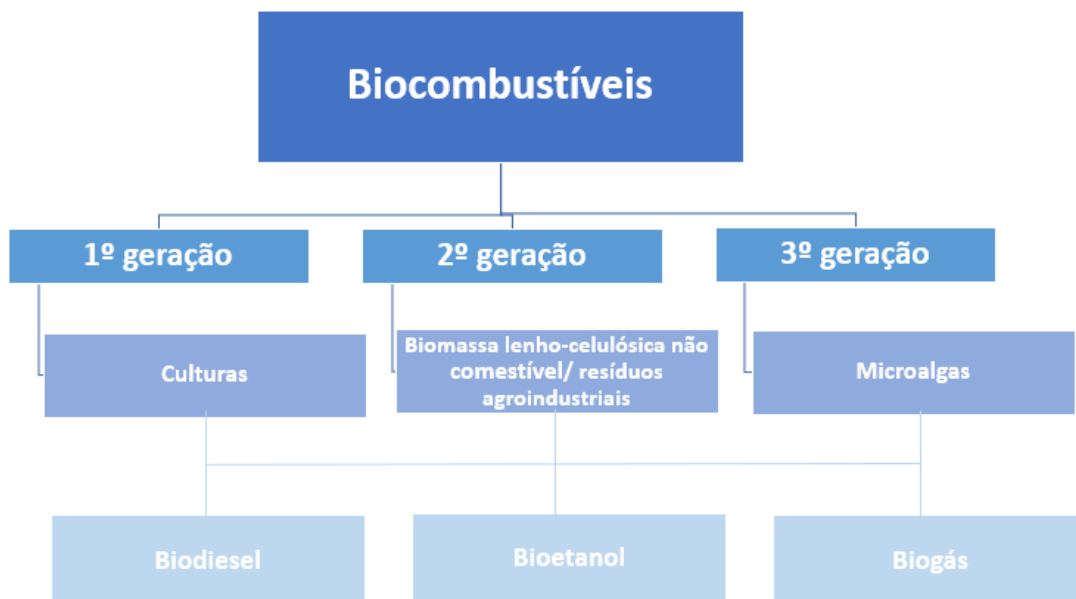


Figura 1.3 - Tipos de biocombustíveis e as suas origens de produção

1.3.1 Biocombustíveis de 1ª geração

O biodiesel, o bioetanol e o biogás de 1ª geração, estão diretamente relacionados com biomassa, proveniente de culturas alimentares, ou seja, o que é frequentemente consumido pelo ser humano (açúcar, amido, culturas oleaginosas, gorduras animais) (An, Wilhelm, & Searcy, 2011; Gressel, 2008; Lee & Lavoie, 2013; Mondal et al., 2017)

Os biocombustíveis de 1ª geração podem oferecer alguns benefícios relativamente à mitigação do CO₂, no entanto a sua exploração levanta alguns problemas éticos, sociais, ambientais e económicos. A sua principal desvantagem é a controvérsia “alimentos *versus* combustíveis”, uma vez que as culturas alimentares são utilizadas na produção de biocombustíveis, implicando o aumento do preço dos produtos alimentares. (Naik et al., 2010; Singh, Nigam, & Murphy, 2011)

1.3.2 Biocombustíveis de 2ª geração

Os biocombustíveis de 2ª geração são produzidos a partir da biomassa de forma mais sustentável, são definidos como combustíveis produzidos a partir de uma ampla gama de matérias-primas não alimentares (resíduos de culturas e resíduos florestais), em especial, a biomassa lenho-celulósica não comestível (Chen et al., 2013; Ishika, Moheimani, & Bahri, 2017; Lee & Lavoie, 2013; Naik et al., 2010).

Estes, pretendem reduzir a intensidade dos GEE, de forma a evitarem alguns problemas de sustentabilidade, como a competição alimentos *versus* combustíveis que se verifica nos biocombustíveis de 1ª geração (Kendall & Yuan, 2013). No entanto, devido à baixa energia e elevado consumo de água e nutrientes, a sua sustentabilidade económica e viabilidade são questionáveis (Ishika, Moheimani, & Bahri, 2017; Sims, Mabee, Saddler, & Taylor, 2010; Su et al., 2017)

Neste tipo de biocombustíveis, está incluído o etanol celulósico produzido a partir de biomassa de plantas, um dos recursos biológicos mais abundantes e menos utilizados no planeta. O material lenho-celulósico não comestível é constituído por celulose e hemicelulose, que após a conversão a açúcares simples, poderão ser convertidos em etanol através de fermentação (Kendall & Yuan, 2013; Naik et al., 2011).

1.3.3 Biocombustíveis de 3ª geração

Os biocombustíveis de 3ª geração usam biomassa algal como matéria-prima (Baicha et al., 2016; Barros et al., 2015; Dragone, Fernandes, Vicente, & Teixeira, 2010; Faried et al., 2017; Jambo et al., 2016; Lee & Lavoie, 2013). Quando comparados com os biocombustíveis de 1ª e 2ª geração, estes apresentam inúmeros benefícios, tanto económicos como ecológicos, na Tabela 1.1 encontra-se uma comparação do bioetanol nas três gerações de biocombustíveis (Baicha et al., 2016; Barros et al., 2015; Dragone et al., 2010; Markou & Nerantzis, 2013).

As microalgas podem ser usadas na produção de biodiesel de 3ª geração (Figura 1.4), através do seu crescimento em autotrofia, explorando a sua capacidade fotossintética (Faried et al., 2017). Também podem ser usadas na produção de bioetanol (Figura 1.4), por acumularem elevadas quantidades de hidratos de carbono e por hidrólise dos constituintes das paredes celulares. As microalgas são uma matéria prima com baixos teores em lignina, o que facilita os processos de pré-tratamento e hidrólise, para disponibilização dos açúcares fermentáveis. (Baicha et al., 2016; C. Y. Chen et al., 2013).

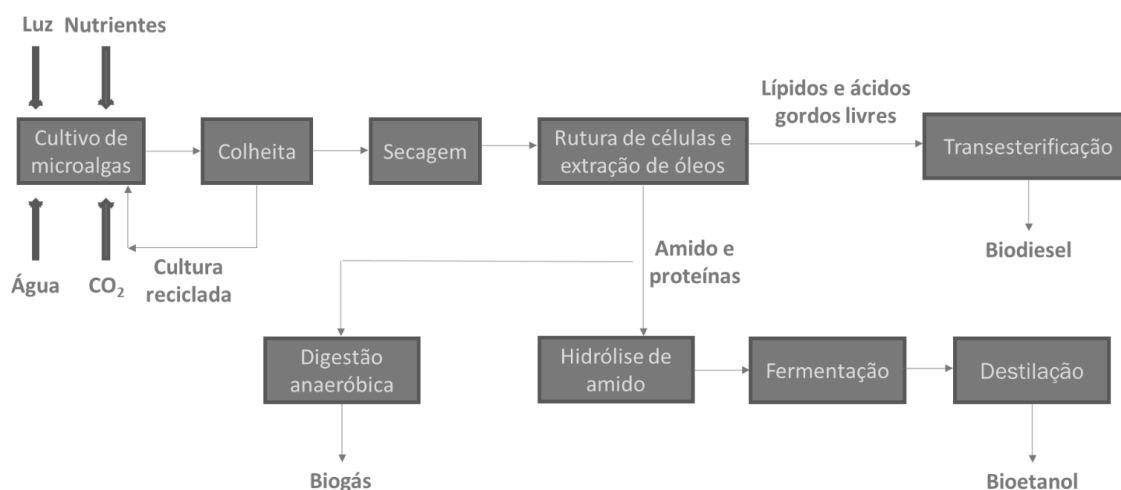


Figura 1.4 – Processo de produção de biodiesel e bioetanol a partir de microalgas.

Adaptado de (Dragone et al., 2010)

Tabela 1.1 – Comparação do bioetanol de 1^a, 2^a e 3^a geração (adaptado de Jambo et al., 2016).

Comparação	1^a Geração	2^a Geração	3^a Geração
Fonte de matéria-prima	Culturas combustíveis	Culturas não combustíveis (material lenho-celulósico)	Biomassa algal
Uso de terreno para cultivo	Cresce em terra arável	Cresce em terra arável e não arável	Água salgada, água fresca, água residual
Tecnologias de conversão	Extração de açúcares, fermentação, destilação	Pré-tratamento, hidrólise, fermentação, destilação	Pré-tratamento, hidrólise, fermentação, destilação
Produtividade de Bioetanol	Baixa	Média	Alta
Impacto Ambiental	Baixa contribuição para a mitigação do CO ₂	Alta contribuição para a mitigação do CO ₂	Alta contribuição para a mitigação do CO ₂
Vantagens	Processo de conversão relativamente simples	Não há competição com os recursos alimentares	Elevada taxa de crescimento
Desvantagens	Comida versus combustível	Estruturas recalcitrantes da matéria-prima	Investimentos limitados

1.4 Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos, unicelulares ou multicelulares, microscópicas (2 – 200 µm), polifiléticas, e são capazes de viver e proliferarem em ambientes com condições adversas (Odjadjare, Mutanda, & Olaniran, 2017; Show et al., 2017).

As suas paredes celulares são constituídas por uma camada interna e por uma camada externa, sendo que esta última geralmente é constituída por polissacarídeos específicos, como pectina, ágar e alginato, enquanto que a camada interna é composta principalmente por celulose, hemicelulose e glicoproteína (C. Y. Chen et al., 2013). A sua classificação, é normalmente feita pela sua pigmentação, ciclo de vida e estruturas celulares (Odjadjare et al., 2017)

As microalgas podem ser classificadas como autotróficas, heterotróficas, ou mixotróficas, com base nos seus requerimentos nutricionais, assim como no seu modo de crescimento. Os organismos fotossintéticos usam a fotossíntese como o seu processo metabólico principal. Uma cultura de microalgas autotróficas necessita apenas de sais minerais, vitaminas e iluminação, uma vez que utiliza a luz solar e o CO₂ atmosférico como a sua fonte de carbono. As culturas em heterotrofia utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono. E por fim, as culturas mixotróficas combinam os dois sistemas anteriores (Show et al., 2017).

Os fatores que em condições de autotrofia podem favorecer o crescimento das microalgas são os seguintes (Faried et al., 2017):

- Luz: são organismos fotossintéticos, devem ser iluminadas por luz artificial (LED), luz solar ou ambos.
- CO₂: fonte de carbono para a fotossíntese, podem ser alimentadas com gases resultantes da queima de combustíveis fósseis, para aumentar significativamente a produtividade.
- Temperatura: idealmente entre 20 e 24°C, no entanto, algumas espécies são adaptáveis e crescem em temperaturas entre 25 e 50°C.
- pH: para a maioria das espécies o pH deve estar entre 7 e 9.

1.4.1 Fotossíntese

A fotossíntese é um processo, onde plantas clorofiladas usam a energia da luz solar, CO₂ e água para produzir hidratos de carbono (Figura 1.5). A estes organismos que realizam este processo damos a designação de autotróficos (Demirbas, 2017).



Figura 1.5 – Equação geral do Processo fotossintético (Adaptado de Colling Klein et al., 2017)

Ao longo do processo fotossintético, o CO₂ absorvido da atmosfera é convertido em materiais de reserva, que podem ser usados como fonte de energia como os lípidos e o amido (Markou & Nerantzis, 2013).

O CO₂ é um fator limitante para o crescimento algal, e o seu excesso aumenta significativamente a produtividade fotossintética (Zhan, Rong, & Wang, 2017). A adição de CO₂, como a principal fonte de carbono nos cultivos de microalgas, é de extrema importância para a otimização do processo (Colling Klein et al., 2017).

As microalgas, através da fotossíntese, são capazes de fixar carbono a partir de várias fontes, sendo que a sua capacidade de fixação é 10 a 50 vezes superior quando comparada à das plantas, o que poderá ajudar na diminuição da poluição ambiental (Colling Klein et al., 2017; Zhan, Rong, & Wang, 2017).

1.4.2 Hidratos de carbono nas microalgas

A biomassa algal contém diferentes quantidades dos principais grupos orgânicos, sendo que o mais energético são os lípidos, seguido das proteínas e por fim temos os hidratos de carbono, estes últimos são o substrato principal para vários processos de produção de biocombustíveis (Markou et al., 2012) Quando falamos em hidratos de carbono, estamos a referir-nos a monómeros, polímeros de açúcar e os seus

derivados, sendo que os polímeros podem ter uma função estrutural e/ou de armazenamento (Templeton, Quinn, Van Wychen, Hyman, & Laurens, 2012).

Algumas microalgas contêm uma grande quantidade de hidratos de carbono na parede celular, na forma de celulose e polissacarídeos solúveis, e nos plastídeos, na forma de amido. Os hidratos de carbono são o produto principal da fotossíntese e do metabolismo da fixação de carbono (Ciclo de Calvin), no entanto a sua composição e metabolismo pode variar de espécie para espécies, sendo de grande importância selecionar aquelas que apresentem uma elevada produtividade (C. Y. Chen et al., 2013). Na tabela 1.2, podemos observar as percentagens, de variados hidratos de carbono, em diferentes espécies de microalgas.

Tabela 1.2 – Composição em hidratos de carbono de algumas espécies de microalgas (Adaptado de (Markou et al., 2012))

Microalga Açúcar	<i>Chlorococcum</i> <i>sp.</i>	<i>Spirulina</i> <i>platensis</i>	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i>	<i>Nitzschia</i> <i>ciosterium</i>	<i>Phaeodactylum</i> <i>tnicornutum</i>	<i>Dunaliella</i> <i>tertiolecta</i>
Xilose (%)	27	7,0	-	7,0	7,5	1,0
Manose (%)	15	9,3	2,3	16,8	45,9	4,5
Glucose (%)	47	54,4	74,9	32,6	21,0	85,3
Galactose (%)	9	-	4,5	18,4	8,9	1,1
Ramnose (%)	-	22,3	1,5	7,7	8,6	5,5
Referências	(Harun & Danquah, 2011)	(Shekharam, et al. 1987)	(Choi, Nguyen, & Sim, 2010)	(Brown, 1991)	(Brown, 1991)	(Brown, 1991)

Os hidratos de carbono presentes nas microalgas podem ser usados em vários tipos de tecnologia de conversão de biomassa, para a produção de biocombustíveis, como a digestão anaeróbica, a fermentação anaeróbica e a produção de bio-hidrogénio.

Estes hidratos de carbono podem ser usados para a produção de bioetanol, no entanto, têm de ser hidrolisados a monómeros através de sacarificação, antes de poderem ser fermentados para etanol (Markou et al., 2012).

Em condições ótimas, as microalgas contêm entre 15 – 25 % de hidratos de carbono (Hernández, Riaño, Coca, & García-González, 2015). Estudos realizados por C. Y. Chen et al., (2013) demonstram que, a *Chlorella vulgaris* pode acumular entre 37 – 55 % de hidratos de carbono. No mesmo estudo, as espécies *Chlamydomonas reinhardtii* e *Scenedesmus obliquus* também têm potencial para a produção de biocombustíveis, devido ao seu elevado conteúdo de hidratos de carbono que ronda os 45 – 60 % (ref).

1.5 Hidrólise

Como referido no ponto anterior, a exposição dos componentes intracelulares das microalgas, como os hidratos de carbono, pelo uso da hidrólise, é crucial para a produção de bioetanol, sendo a parede celular a estrutura principal, com necessidade de ser despolimerizada, de forma a que seja possível extrair os polissacarídeos (Jambo et al., 2016). Esta fragilização, da parede celular, para que ocorra a exposição do conteúdo celular, pode ser feita através do processo de liofilização, o qual tem o objetivo de diminuir a atividade da água por um processo de congelação, sublimação, secagem a vácuo (Ribeiro, 2012). Após a liofilização das células, procede-se ao processo de hidrólise, onde os hidratos de carbono, são hidrolisados a monómeros, ou seja, açúcares simples que podem ser fermentados a bioetanol. Geralmente a hidrólise química é método mais usado para hidrolisar os polissacarídeos. Por outro lado, a hidrólise enzimática é uma abordagem mais recente, mas que tem vindo a ganhar bastante interesse (Jambo et al., 2016).

As hidrólises, química e enzimática, apresentam tanto vantagens como inconvenientes (Tabela 1.3). Assim sendo, na seleção dos processos de hidrólise é necessário ponderar a relação custo-benefício e toda a rentabilidade do processo, de forma a que este ao ser implementado em larga escala seja economicamente viável.

Tabela 1.3 – Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de hidrólise (Adaptado (Ho et al., 2013))

	Hidrólise Enzimática	Hidrólise Ácida
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Podemos obter elevados rendimentos sem a produção de produtos inibitórios 	<ul style="list-style-type: none"> • Mais rápido • Mais fácil • Menos dispendioso
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Mais lento • Mais dispendioso devido ao custo das enzimas 	<ul style="list-style-type: none"> • As suas condições acídicas podem levar à decomposição dos açúcares, e formação de subprodutos inibitórios do processo fermentativo • Exige pré-tratamentos físicos e químicos, que consomem energia da biomassa para melhorar a eficiência

1.5.1 Hidrólise química

A libertação de açúcares a partir de polissacarídeos, por quebra das cadeias longas, pode ser significativamente melhorada pelo uso de agentes químicos como ácidos, onde o ácido sulfúrico (H₂SO₄) tem apresentado resultados bastante promissores relativamente aos outros ácidos (Jambo et al., 2016). Estes tratamentos são habitualmente realizados a elevadas temperaturas, para ajudar a quebra das ligações moleculares (C. Y. Chen et al., 2013).

Na definição de um processo de hidrólise devem ser considerados alguns fatores, que podem condicionar o rendimento de conversão. Os fatores mais importantes são o rácio da superfície/volume, concentração do ácido, temperatura e tempo de reação. O primeiro é especialmente importante, pois permite determinar a magnitude do

rendimento de conversão dos açúcares, logo, quanto menores as partículas mais eficiente será a hidrólise (Naik et al., 2010).

Na Tabela 1.4, encontram-se compilados alguns dos estudos realizados em hidrólise de microalgas. É possível verificar, que com as culturas mistas *S. obliquus*, *C. vulgaris*, *C. reinhardtii* se obteve um elevado rendimento de hidrólise, acima dos 80 %. Este valor foi atingido realizando dois tipos de hidrólise química, primeiro ácida onde se usou H₂SO₄, HCl e H₃PO₃ com as concentrações de 0,5, 1 e 2 M respectivamente e por último básica onde se usou NaOH com as mesmas concentrações da ácida (Shokrkar, Ebrahimi, & Zamani, 2017). A espécie *Scenedesmus dimorphus* UTEX 1237 obteve uma percentagem de hidrólise de 89,4 %, o que é um valor bastante elevado, no entanto, é importante frisar que a quantidade de microalga usada é bastante pequena (1,47 g/L), fazendo com que esta microalga não seja viável para a produção a larga escala de biocombustível.

1.5.2 Hidrólise enzimática

Apesar de diferentes tecnologias de hidrólise terem sido estudadas para a conversão da biomassa das microalgas, a hidrólise enzimática continua a ser o método mais promissor, e tem sido usado vastamente na fermentação de bioetanol a partir de matérias-primas ricas em amido, como as membranas e as paredes celulares (Qin, Müller, & Cooper, 2011). Este método é o mais eficiente, uma vez que as enzimas usadas são caracterizadas pela sua elevada seletividade e especificidade (Nagarajan, Lee, Kondo, & Chang, 2017).

As celulasas, são as enzimas mais usadas para a degradação de polissacarídeos e podem ser categorizadas em três tipos principais, as endoglucanases, as exoglucanases e as β-glucosidases. As endoglucanases têm a capacidade de hidrolisar açúcares complexos de matérias-primas, atacando as partes interiores a região amorfa da celulose; já as exoglucanases, degradam a celulose clivando unidades de celobiose, desativando o ataque enzimático; e por fim, as β-glucosidases, separam os resíduos de celobiose em duas unidades de glucose. A conversão de açúcares complexos, para a sua forma simples, é conseguida com uma taxa de conversão de 80 %, o que torna a abordagem de hidrólise enzimática mais atrativa para a aplicação na produção de bioetanol (Jambo et al., 2016; Qin et al., 2011). Como é possível observar na Tabela 1.4,

usando a hidrólise enzimática quase todas as espécies de microalgas obtiveram elevados rendimentos de hidrólise, confirmando assim que este método é bastante eficiente. Contudo, deve ser referido que em alguns dos casos com elevado rendimento, a microalga sofreu um pré-tratamento com uma hidrólise química, havendo assim uma combinação dos dois métodos, como é o caso *Chlorococum humicola* e *Dunaliella tertiolecta*, onde se obteve um rendimento de 68,2 e 80,9 %, respetivamente.

Tabela 1.4 – Condições ótimas de hidrólise de diferentes espécies de microalgas.

Espécie Microalga	Bm ¹ (g/L)	Composição da parede celular (%)	Pré-tratamento	Enzima	HC ² (%)	Ext Lip ³	RH (%) ⁴	T (°C)	pH	Ref. ⁵
<i>Chlorococum humicola</i>	10	Xilose (9,54) Manose (4,87) Glucose (15,22) Galactose (2,89) Amido (11,32) Outros (56,16)	1 % (v/v) ácido sulfúrico a 140 °C por 30 min	Celulase (0.02 g enzima/g)	32,5	Não	68,2	40	4,5	(Harun & Danquah, 2011)
<i>Chlamydomonas fasciata</i> Ettl 437	100	-	30 min de ultrasonicação	Glutase	43,5	Não	80	40	5	(Asada, Doi, Sasaki, & Nakamura, 2012)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	50	Proteínas (9,2) Amido (43,6) D-Glucose (44,7) L-Fucose (0,4) L-Rhamnose (0,9) D-Arabinose (1,9) D-Galactose (2,7) D-Mannose (1,4) Outros (31,1)	liquefação 0,005 % α -amilase 90 °C, 30 min	α -amilase e amiloglucosidase	59,7	Não	94	50-65	4,5-5,5	(Choi et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	Glucano (9,5)	-	Celulasas e β -glucosidases	-	Sim	85,3	50	4,8	(Cho, Oh, Park, Lee, & Park, 2013)

¹ Bm: **Biomassa (g/L)**

² HC: **Hidratos de carbono (%)**

³ Ext Lip: **Extração de lípidos**

⁴ RH (%): **Rendimento de Hidrólise (%)**

⁵ Ref.: **Referências**

Tabela 1.4 – Condições ótimas de hidrólise de diferentes espécies de microalgas (continuação)

Espécie Microalga	Bm ¹ (g/L)	Composição da parede celular (%)	Pré-tratamento	Enzima	HC ² (%)	Ext Líp ³	RH (%) ⁴	T (°C)	pH	Ref. ⁵
<i>Scenedesmus dimorphus</i> UTEX 1237	1,47	Lípidos (12) Proteínas (17,4) Celulose PC unicelular Armazena amido	-	Amiloglucosidase	53,7	Sim	89	55	4,5	(Chng, Lee, & Chan, 2017)
<i>Scenedesmus dimorphus</i> UTEX 1237	1,47	Lípidos (12) Proteínas (17,4) Celulose PC unicelular Armazena amido	-	Hidrólise ácida Ácido sulfúrico, 125 °C, 15min	53,7	Sim	89,4	-	-	(Chng et al., 2017)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	50	Lípidos (20,6) Proteína (25,5) Outros (16,1)	0,5 M HCl, 121 °C, 15 min	Amiloglucosidase	37,8	Sim	80,9	55	5,5	(O. K. Lee et al., 2013)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	-	-	Células lavadas com etanol refrigerado 95 % (v/v)	Celulases, xilanases, e amilases	-	Não	19,3	50	4,8	(Rodrigues & Bon, 2011)
<i>Chlorella homosphaera</i>	-	-	Células lavadas com etanol refrigerado 95 % (v/v)	Celulases, xilanases, e amilases	-	Não	24,5	50	4,8	(Rodrigues & Bon, 2011)

¹ Bm: **Biomassa (g/L)**

² HC: **Hidratos de carbono (%)**

³ Ext Lip: **Extração de lípidos**

⁴ RH (%): **Rendimento de Hidrólise (%)**

⁵ Ref.: **Referências**

Tabela 1.4 – Condições ótimas de hidrólise de diferentes espécies de microalgas (continuação)

Espécie Microalga	Bm ¹ (g/L)	Composição da parede celular (%)	Pré-tratamento	Enzima	HC ² (%)	Ext Líp ³	RH (%) ⁴	T (°C)	pH	Ref. ⁵
<i>Chlorella vulgaris</i>	-	Proteínas (63,4) Lípidos/Outros (4,8) Hemicelulose	-	Carboidrase, Viscozyme, Pectinase e Alcalase	25,7	Não	84	50	5; 5,5; 4,5; 8	(Mahdy, Mendez, et al., 2016)
<i>Scenedesmus sp.</i>	-	Proteínas (33,13) Lípidos/Outros (21,8) Hemicelulose	-	Carboidrase, Viscozyme, Pectinase e Alcalase	34,6	Não	36	50	5; 5,5; 4,5; 8	(Mahdy, Mendez, et al., 2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	32	Proteína (33,3) Lípido/Outro (15,7)	-	Alcalase e Viscozyme	39,6	Não	54,7 – 28,4	50	8; 5,5	(Mahdy, Ballesteros, & González- Fernández, 2016)
Cultura Mista	50	Celulose e amido	Enzimas termoestáveis	Celulases/ β - glucosidases e α - amilases	20,1	Não	97,6	55	5,5	(Shokrkar et al., 2017)
Cultura Mista	50	Celulose e amido	MgSO ₄ e CaCl ₂ Autoclave, 121 °C (10, 20, 30 e 40 min)	Hidrólise ácida <u>H₂SO₄</u> , <u>HCl</u> , <u>H₃PO₃</u> (0,5, 1, 2M) 121 °C, 10, 20, 30, e 40 min	20,1	Não	86	-	-	(Shokrkar et al., 2017)
Cultura Mista	50	Celulase e amido	MgSO ₄ e CaCl ₂ Autoclave, 121 °C (10, 20, 30 e 40 min)	Hidrólise básica <u>NaOH</u> (0,5, 1, 2 M) 121 °C, 10, 20, 30, e 40 min	20,1	Não	86	-	-	(Shokrkar et al., 2017)

¹ Bm: **Biomassa (g/L)**

² HC: **Hidratos de carbono (%)**

³ Ext Lip: **Extração de lípidos**

⁴ RH (%): **Rendimento de Hidrólise (%)**

⁵ Ref.: **Referências**

Tabela 1.4 – Condições ótimas de hidrólise de diferentes espécies de microalgas (continuação)

Espécie Micralga	Bm ¹ (g/L)	Composição da parede celular (%)	Pré-tratamento	Enzima	HC (%) ₂	Ext Líp ₃	RH (%) ⁴	T (°C)	pH	Ref. ⁵
<i>Tetraselmis suecica</i> UTEX LB 2286	30-40	Ácido galacturónico Galactose Kdo Dha Glucose	-	Pectinase (0,005 g/g)	45	Não	-	35	4	(Kermanshahipour, Sommer, Anastas, & Zimmerman, 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	10-40	-	Sonicação, Autoclave 121 °C	Celulases e amilases	51	Não	90,4	45	6	(Ho et al., 2013)
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	10-80	-	Liofilização	Ácido sulfúrico 0.1–5.0 % (v/v), 121 °C, 20 min	51	Não	96	-	-	(Ho et al., 2013)
<i>C. vulgaris</i> (KMMCC-9; UTEX 26)	-	Glucose (5,9) Galactose (5,1) Manose (1,1) Ramnose (2,4) Arabinose (0,8) Xilose (0,7)	Autoclave, sonicação, e bead-beating	Pectinase (0,24–9,4 mg proteína/g)	22,3	Não	79	50	4,8	(K. H. Kim, Choi, Kim, Wi, & Bae, 2014)

¹ **Bm:** Biomassa (g/L)² **HC:** Hidratos de carbono (%)³ **Ext Lip:** Extração de lípidos⁴ **RH (%):** Rendimento de Hidrólise (%)⁵ **Ref.:** Referências

1.6 Produção de bioetanol

O que torna as microalgas boas candidatas para o processo de produção de bioetanol, é a sua capacidade de sintetizar e acumular elevadas quantidades de hidratos de carbono, que podem facilmente ser hidrolisados e convertidos em açúcares fermentáveis com elevado rendimento (John, Anisha, Nampoothiri, & Pandey, 2011).

As microalgas podem ser usadas para a produção de bioetanol obtendo até 50 % do seu peso seco em hidratos de carbono, que poderão ser usados para a produção de etanol após a hidrólise. Os hidratos de carbono mais comumente presentes nas microalgas, e que são usados para a produção de bioetanol, são o amido e a celulose. O amido é uma das maiores fontes de carbono nas microalgas, importante para a produção de bioetanol (os cereais, ricos em amido, são usados como matéria-prima para a produção de bioetanol após a hidrólise enzimática e fermentação). A celulose, presente nas paredes celulares das microalgas, pode também ser usada para esta mesma produção (de Farias Silva & Bertucco, 2016; John et al., 2011).

Estudos realizados por *Chng et al.*, (2017), sugerem que a espécie *Scenedesmus dimorphus* pode, potencialmente, ser usada para a produção de bioetanol devido à sua capacidade de acumulação de hidratos de carbono, tendo sido obtido 1.47 g/L de biomassa e 53.7 % de conteúdo de hidratos de carbono.

1.7 Biorrefinaria

O termo "Biorrefinaria" foi introduzido em 1990 para a utilização de biomassa, para a produção de combustíveis e outros bioprodutos. Este termo refere-se a uma instalação que combina a produção de materiais, produtos químicos ou de combustível, para a produção de energia. Este sistema é baseado na entrada de biomassa para o seu processamento (matéria-prima), para a produção de múltiplos produtos de base biotecnológica, com recurso a sistemas vivos (Figura 1.6). O conceito base produzir biocombustíveis a partir da biomassa, e tem como objetivo a biomassa em produtos úteis (Naik et al., 2010).

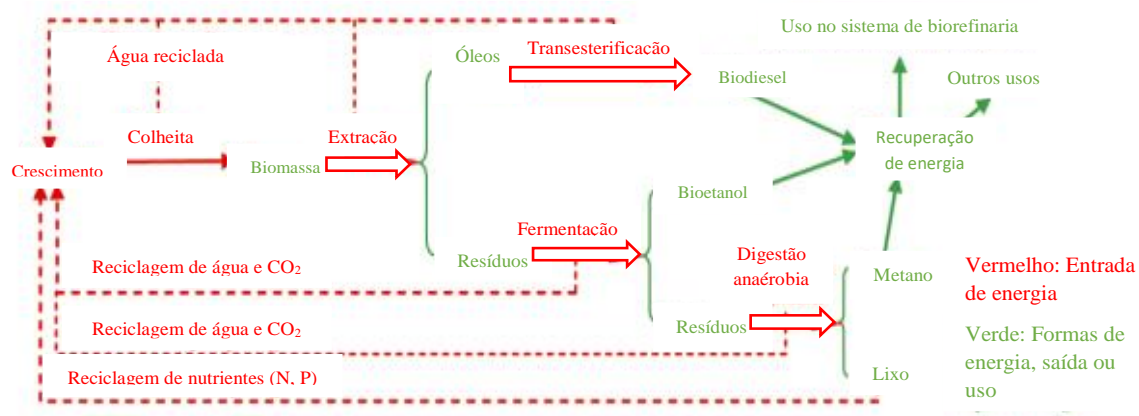


Figura 1.6 – Fluxos de massa e energia das microalgas numa biorrefinaria (Adaptado de Zhu, 2014)

Uma biorrefinaria usa a maior parte da microalga possível, pigmentos, hidratos de carbono, enzimas ou outras moléculas úteis encontradas na célula, esta extração pode compensar os custos da produção de biodiesel para melhorar a sustentabilidade geral do sistema (Dickinson et al., 2017).

1.8 Objetivos

Esta dissertação de mestrado foi realizada no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental (LEBA), pertencente ao Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Algarve (CIMA). O trabalho foi desenvolvido em parceria com a Universidade de Huelva, no âmbito do projeto ALGARED+ programa INTERREG V A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020

Este trabalho teve como objetivo principal a produção de biomassa algal como matéria-prima para obtenção de açúcares fermentáveis, para a potencial produção de biocombustíveis, usando hidratos de carbono de diferentes espécies de microalgas.

Os objetivos específicos:

- Avaliação do crescimento das microalgas
- Avaliação do teor em amido e lípidos após a limitação em azoto
- Avaliação do conteúdo de carotenoides

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

As estirpes de microalgas usadas para a realização deste trabalho experimental, foram a *Chlorella sorokiniana* axénica, a *Chlorella sorokiniana* não axénica e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, gentilmente cedidas pela Professora Doutora Rosa Leon, do Departamento de Química, Área de Bioquímica da Universidade de Huelva, no âmbito do Programa INTERREG V A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020.

2.2 Meio de cultura

Foi usado o meio Tris Acetate Phosphate (TAP), para o crescimento da *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, em condições de mixotrofia e de esterilidade. Na tabela 2.1 encontra-se a composição de meio TAP, usada no presente estudo.

Tabela 2.1 - Composição do meio TAP (adaptado de Gorman & Levine, 1965)

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)
1 M Tris Base ^(a)	20
Solução Tampão Fosfato (para 200 mL)	
23 g K ₂ HPO ₄	1
1.2 g KH ₂ PO ₄	
Solução <i>Beijerinck's</i> (para 200 mL)	
1 g CaCl ₂ .2H ₂ O	10
2 g MgSO ₄ .7H ₂ O	
8 g NH ₄ Cl	
Solução <i>Hunter's Trace</i> ^(b)	5
Ácido acético glacial	0.95

^(a) Preparação da solução Tris (Anexo I);

^(b) Preparação da solução *Hunter's Trace* (Anexo I)

2.3 Condições de manutenção das microalgas

As culturas de microalgas encontravam-se inicialmente em meio sólido TAP em placas de Petri, em condições de mixotrofia. As placas foram mantidas com luz artificial fluorescente de 18 W a 100 mE m⁻² s⁻¹, a temperatura ambiente em bancada num local seco, tendo estas sido repicadas com regularidade, de 3 em 3 semanas.

2.4 Ensaios experimentais com as microalgas

2.4.1 Preparação do pré-inóculo

O meio do pré-inóculo foi preparado em duplicado, em *erlenmeyers* de 100 mL, contendo 50 mL de meio TAP, para cada uma das espécies de microalgas. Os meios líquidos foram inoculados com as colónias de microalgas, que se encontravam em crescimento, em placas de Petri em meio sólido. Depois da sua inoculação foram colocados numa agitadora, a 30 °C, com exposição a luz contínua fluorescente de 18 W a 100 mE m⁻² s⁻¹, durante 3 a 4 dias.

2.4.2 Ensaio experimental

Posteriormente, realizou-se um aumento de escala com 15 % (v/v) do pré-inóculo inicial, para a inoculação de *erlenmeyers* de 500 mL, contendo um volume de 250 mL de meio TAP, com objetivo de se obter inóculo suficiente para se dar início ao ensaio experimental. O crescimento dos diferentes tipos de microalgas foi avaliado em condições experimentais, de arejamento, sem agitação e com exposição a luz contínua fluorescente de 18 W a 100 mE m⁻² s⁻¹. Foi montado um sistema de *erlenmeyers* com ligação a um compressor de ar que fornecia ar às microalgas, como representado na Figura 2.1. O ar era filtrado por um filtro de ar (Whatman®, ReZist 50mm/0,2 um PTFE), colocado antes da entrada de cada *erlenmeyer*. O crescimento de cada espécie de microalga foi realizado em triplicado nas mesmas condições e em condições de esterilidade, recorrendo-se ao uso de material estéril e ao seu manuseamento numa câmara de fluxo laminar. A inoculação de cada espécie de microalga foi realizada em *erlenmeyers* de 500 mL, contendo um volume final de 250 mL. Após a sua inoculação, os *erlenmeyers* foram colocados numa estante sem agitação, com exposição a luz contínua fluorescente.



Figura 2.1- Montagem do ensaio de crescimento em mixotrofia para *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2.

O ensaio do crescimento das diferentes espécies de microalgas teve uma duração de 360 horas, onde se procedeu à recolha de amostras diariamente. De cada *erlenmeyer*, foi retirado cerca de 6 mL de amostra para a determinação da densidade celular por leitura da absorvância, biomassa seca, quantificação dos pigmentos totais, clorofila e carotenoides.

2.4.3 Ensaio experimental em condições de limitação de azoto

No final do ensaio de crescimento, a biomassa foi passada para meio de cultura com limitação em azoto, a fim de potenciar a produção de metabolitos de interesse e acumular amido, para isso, a cultura de microalgas de cada *erlenmeyer* foi centrifugada em condições de esterilidade (Hettich, Universal 320), a 5000 rpm durante 10 min em tubos de centrifuga de 45 mL, descartando-se o sobrenadante. Os *pelletts* foram ressuspendidos em 250 mL de meio TAP sem cloreto de amonio (NH_4Cl), a sua principal fonte de azoto.

O ensaio, em meio sem azoto, foi realizado em triplicado para cada uma das espécies de microalgas, e decorreu durante um período de cerca de 4 dias, nas mesmas condições de arejamento, temperatura e irradiação de luz referidas no ponto 2.4.2. No

entanto não se procedeu à recolha de amostras diárias, como no ensaio anterior, apenas se recolheu amostras no início do ensaio e no final, para a quantificação lipídica e de amido.

2.5 Liofilização da cultura de microalgas

A biomassa das microalgas foi recolhida por centrifugação (Hettich, Universal 320), e a massa celular obtida no final liofilizada. A massa celular foi congelada *overnight* a – 21 °C, sendo depois colocada num liofilizador (Liofilizador Labconco) a – 52 °C. A biomassa seca obtida no final, foi armazenada à temperatura ambiente.

2.6 Métodos analíticos

Ao longo dos ensaios realizados, o crescimento das microalgas foi acompanhado com a recolha de amostras que foram analisadas com base nos métodos abaixo apresentados.

2.6.1 Determinação da densidade ótica

O crescimento celular das microalgas foi medido por espectroscopia, medindo a absorvância da suspensão celular em triplicado, num espectrofotómetro (GBC *Scientific Equipment Ltd.*, Cintra 202 -UV- Visible Spectrometer) no comprimento de onda de 750 nm, utilizando cuvettes de 1cm de percurso ótico. Utilizou-se como branco o meio de cultura antes da inoculação. Sempre que necessário, de modo a obter leituras dentro da gama de linearidade de absorvância, as amostras e o branco foram diluídos.

2.6.2 Determinação da biomassa

A determinação da biomassa foi obtida através dos pesos secos da suspensão celular. Para esse efeito, retiraram-se amostras de cada *erlenmeyer* em triplicado, diariamente ao longo de todo o ensaio. Retirou-se 1,5 mL para *ependorfs*, esterilizados e previamente pesados. As amostras foram colocadas numa centrífuga (Eppendorf, 5415D) a 10000 rpm, durante 10 minutos, separando o sobrenadante e guardando-o para

posteriormente se determinar o consumo de ácido acético no meio. Os *eppendorfs* com a biomassa foram secos numa estufa (Binder, FD53) durante 48 horas a 60 °C. Depois de arrefecidos à temperatura ambiente, estes foram pesados numa balança analítica de precisão (Precisa XB, 120A). Este peso foi então subtraído ao peso do *eppendorf*, pesado anteriormente, obtendo-se o peso da biomassa em peso seco (g/L).

2.6.3 Correlação entre a densidade ótica e o peso seco

Para cada uma das espécies em estudo, foi possível obter uma equação da reta que correlaciona os dados obtidos da densidade ótica, com os da determinação da biomassa seca (g/L). As equações obtidas foram: *Chlorella sorokiniana* não axénica ($Y = 0.2828x - 0.1592$; $R^2 = 0.8951$); *Chlorella sorokiniana* axénica ($Y = 0.2496x - 0.1306$; $R^2 = 0.9725$); *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 ($Y = 0.4415x + 0.4623$; $R^2 = 0.7197$). Tendo em conta as equações obtidas, os pesos secos presentes nos resultados do presente trabalho foram calculados a partir destas correlações.

2.6.4 Análise do ácido acético por HPLC

A análise do ácido acético foi efetuada pela técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Foram analisadas amostras de cada uma das espécies em estudo em triplicado no tempo 0, 192 e 336 h, que correspondem respetivamente, ao princípio, meio e fim do ensaio experimental de crescimento das microalgas. As quantificações a analisar tiveram de ser selecionadas devido ao elevado número de amostras de cada ensaio.

Para esta determinação, recorreu-se auxílio de uma curva padrão, usando-se concentrações conhecidas de acetato (0,4 – 1,2 g/L) em triplicado que se encontra em anexo (Anexo IV).

Utilizou-se uma coluna Rezex ROA - Organic Acid H⁺ (8 %) 300 x 7,80 mm (Phenomenex) acoplada ao HPLC (VWR Hitachi Elite LaChrom) constituído por um forno (L-2300), um auto injetor (L-2200), um detetor de índice de refração (IR L2490) e uma bomba (L-2130). As amostras foram previamente filtradas com filtros de seringa de 0,2 µm (Milipore) para um vial. As análises foram realizadas utilizando como eluente uma solução de 4 mM H₂SO₄, a um fluxo de 0,6 mL/min e um forno à temperatura de 63 °C.

2.6.5 Quantificação de pigmentos totais, clorofilas e carotenoides

Com base no método descrito por Arnon, (1949) e Lichtenthaler, (1987), realizou-se a extração e quantificação por espectroscopia dos pigmentos totais, da clorofila a e b, assim como dos carotenoides, utilizando para tal um espectrofotômetro (GBC *Scientific Equipment Ltd.*, Cintra 202 -UV- Visible Spectrometer) a diferentes comprimentos de onda. Centrifugou-se 1,5 mL de amostra de suspensão celular, de cada um dos triplicados, numa centrífuga (Hettich, Universal 320), durante 5 minutos a 4500 rpm, e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de acetona 100 % e colocado num banho de ultrassons durante 1 h. Ao fim de uma hora, centrifugou-se novamente, e guardou-se o sobrenadante. Estes passos foram repetidos quantas vezes o necessário, até que o *pellet* apresentou uma coloração branca. Com o sobrenadante obtido da extração de cada uma das amostras, efetuou-se a leitura da absorvância em triplicado, a vários comprimentos de onda 662, 645 e 470 nm em cuvetes de quartzo. Os valores registados foram substituídos nas seguintes equações, desenvolvidas por Lichtenthaler, 1987, obtendo-se assim o valor em mg/L de clorofila a (C_a), clorofila b (C_b), clorofila total (C_T) e carotenoides (C_c):

$$C_a = 11,24 \times A_{662nm} - 2,04 \times A_{645nm} \quad \text{Equação 1}$$

$$C_b = 20,13 \times A_{645nm} - 4,19 \times A_{662nm} \quad \text{Equação 2}$$

$$C_T = 7,05 \times A_{662nm} + 18,09 \times A_{645nm} \quad \text{Equação 3}$$

$$C_c = \frac{1000 \times A_{470nm} - 1,90 \times C_a - 63,14 \times C_b}{214} \quad \text{Equação 4}$$

2.6.6 Quantificação do teor de lípidos neutros

A quantificação de lípidos neutros foi feita por espectroscopia de fluorescência com base no método descrito por *W. Chen et al.*, (2009), e adaptado às microalgas em estudo. Foi usado um fluorocromo solúvel, vermelho de Nilo (9-dietilamino-5H-benzo[α]-fenoxazina-5-ona), usado frequentemente para avaliar o teor de lípidos em diversos microrganismos (bactérias, leveduras, microalgas, entre outros).

Este método consiste na leitura da fluorescência medida por um leitor de placas (Plate Reader Infinite M200 TECAN), cujo comprimento de onda de excitação foi 488 nm e o comprimento de onda de emissão variou entre os 520 e 600 nm. Numa microplaca (Tecan Microplate) colocou-se em cada poço, 185 µL de PBS (Anexo II), 5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), e 20 µL de amostra e incubou-se durante 10 minutos a 40 °C, prosseguindo-se à leitura para se obter o branco. De seguida, adicionou-se 10 µL da solução de Vermelho de Nilo (0,1 mg de Vermelho de Nilo em 1 mL de acetona), a cada um dos poços e procedeu-se novamente à leitura da placa após 10 minutos de agitação a 40 °C. O valor da fluorescência corresponde à diferença da leitura das amostras na placa, com corante e sem corante, sendo os resultados expressos em unidades de fluorescência (UF).

Com base nos métodos descritos por W. Chen et al., 2009 e Isleten-Hosoglu, Gultepe, & Elibol, 2012, otimizou-se uma curva padrão que relaciona as unidades de fluorescência com a quantidade de lípidos neutros presentes na amostra. Esta curva foi feita com diferentes concentrações conhecidas de um lípido neutro padrão, a trioleína, que é um triacilglicerol constituído por moléculas de ácido oleico. As concentrações de trioleína variaram entre 0,1 a 0,5 g/L, preparada em triplicado e nas mesmas condições que a leitura das amostras.

2.6.7 Análise de amido pelo kit da Megazyme

Determinou-se o conteúdo de amido presente nas microalgas em estudo, por um método de hidrólise enzimática, recorrendo-se ao o *kit Megazyme Total Starch*, aceite pela AOAC - *Association of Analytical Communities* (Método Oficial 996.11) e pela AACCC - *American Association of Cereal Chemists* (Método 76.13), baseado no uso das enzimas termoestáveis α -amilase e amilglucosidade (Procedure & Method, 2011).

O protocolo disponibilizado pela *Megazyme* foi seguido e iniciado na alínea (d), pois referia-se à determinação do conteúdo total de amido, de amostras contendo amido resistente. Pesaram-se 10 mg de biomassa previamente liofilizada (Liofilizador Labconco) e moída, de cada uma das espécies em estudo. Adicionaram-se 0,2 mL de etanol a 80 % (v/v), e misturaram-se as amostras no *vortex*. Imediatamente, adicionou-se 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), misturou-se novamente no *vortex*, e colocou-se os tubos num banho-maria à temperatura de 100 °C durante 5 minutos. Retomou-se o

procedimento no passo 4 da alínea (a) do protocolo, como descrito no mesmo, tendo-se por isso adicionado 3 mL da enzima termoestável α -amilase diluída 1:30 ao tampão de acetato de sódio 100 mM a pH 5,0. Incubou-se num banho de água a ferver durante 6 min. De seguida deixou-se arrefecer ligeiramente, colocou-se a amostra num banho a 50 °C e adicionou-se 0,1 mL da enzima amilogucosidase 330 U. As amostras foram misturadas no *vortex* e incubadas a 50 °C durante 30 minutos. Todo o conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para balões volumétrico de 10 mL, perfazendo-se o volume com água destilada. Centrifugaram-se alíquotas das amostras a 3000 rpm por 10 minutos. Transferiu-se, em triplicado, 0,1 mL do sobrenadante de cada alíquota para novos tubos de ensaio. Adicionou-se 3 mL do reagente GOPOD a cada tubo, incluindo os controlos de D-glucose fornecido no *kit* e o branco (água) e, foram a incubar a 50 °C por 20 minutos. Por fim, leu-se a absorvância a 510 nm (GBC *Scientific Equipment Ltd.*, Cintra 202 -UV- Visible Spectrometer) de toda as amostras.

O cálculo do conteúdo de amido presente nas amostras das microalgas foi obtido a partir da fórmula (Equação 5) fornecida pelo *kit*, adaptada às quantidades de amostra usadas.

$$\% \text{ amido} = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

- ΔA = Absorvância lida
- $F = \frac{100 \mu\text{g de D-glucose}}{\text{absorvância para } 100\mu\text{g de D-glucose}}$
- FV = Volume final
- 0,1 = Volume de amostra analisado
- $\frac{1}{1000}$ = Conversão de μg para mg
- $\frac{100}{W}$ = Fator para expressar o amido em percentagem
- W = Peso em miligramas da amostra analisada
- $\frac{162}{180}$ = ajuste da D-glucose livre para D-glucose anidra

2.6.8 Análise do amido com ácido perclórico

Tomando por base o método descrito por *Brányiková et al., 2011*, determinou-se o conteúdo de amido presente nas microalgas em estudo, por um método de hidrólise ácida.

Pesaram-se 10 mg de biomassa previamente liofilizada (Liofilizador Labconco) e moída. Removeram-se as substâncias interferentes (pigmentos, açúcares solúveis, lípidos, etc) de cada uma das amostras, adicionando 4 mL de etanol a 80 % (v/v) e incubando-se num banho a 100 °C por 10 minutos. Após este tempo, centrifugou-se (Hettich, Universal 320) a 4500 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se este processo três vezes, até o *pellet* se encontrar branco. Para a hidrólise do amido adicionou-se 3,3 mL de ácido perclórico a 30 % a cada uma das amostras, incubou-se num banho a 25 °C por 15 minutos, seguindo-se de centrifugação (Hettich, Universal 320) a 4500 rpm por 10 minutos. No final da centrifugação é guardado o sobrenadante e, é repetido este processo três vezes.

A solução de amido solubilizado vai reagir com 2,5 mL de uma solução de antrona a 72% (Anexo II) que, permitirá quantificar a glucose existente, por método espectrofotométrico (GBC *Scientific Equipment Ltd.*, Cintra 202 -UV- *Visible Spectrometer*) a um comprimento de onda de 625 nm.

Para se determinar a concentração de glucose presente nas amostras foi necessário fazer uma curva de calibração (Anexo III), usando concentrações conhecidas de glucose, 0,005 – 0,1 g/L. A reta obtida foi $Y = 6,1991x - 0,0147$; $R^2 = 0,9997$.

Por fim, para obtermos a concentração de amido (mg/mL), a concentração de glucose é multiplicada pelo fator 0,9, pois este é que permite a conversão da glucose em amido, uma vez que 1 mg de glucose é igual a 0,9 mg de amido.

2.7 Parâmetros cinéticos de crescimento

2.7.1 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento, μ , foi determinada através do gráfico da relação do ln do peso seco obtido (g/L) em função do tempo (horas), para cada uma das estirpes, onde se calculou a equação da reta da fase exponencial de crescimento. O declive da reta representa o valor da taxa específica de crescimento, expressando-se em d^{-1} .

2.7.2 Produtividade total da biomassa

A produtividade total de biomassa é definida pela quantidade de peso seco inicial (PS_i), subtraída à quantidade de peso seco final (PS_f) por unidade de tempo final (t_f) e, foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade total de biomassa} = \frac{(PS_f - PS_i)}{t_f} \quad \text{Equação 5}$$

A quantidade de peso seco inicial (PS_i) e de peso seco final (PS_f) é expressa em g/L, e o tempo final (t_f) em h, sendo que a produtividade total da biomassa é expressa em g/(L.d).

2.7.3 Produtividade máxima de biomassa

A produtividade máxima de biomassa é definida pela quantidade de peso seco máximo ($PS_{m\acute{a}x}$), por unidade de tempo ($t_{m\acute{a}x}$), correspondente ao tempo em que se atinge a quantidade de peso seco máximo e foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade máxima de biomassa} = \frac{(PS_{m\acute{a}x})}{t_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equação 6}$$

A quantidade de peso seco máxima ($PS_{m\acute{a}x}$) é expressa em g/L, e o tempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$) em h, sendo que a produtividade total da biomassa é expressa em g/(L.d).

2.7.4 Produtividade específica máxima

Define-se a produtividade específica máxima de clorofila a como a concentração máxima de clorofila a obtida ($C_{a\ m\acute{a}x}$), expressa em mg/L, por unidade de tempo em que se registou esse máximo ($t_{C_{a\ m\acute{a}x}}$), em h. Pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\text{Produtividade } C_a = \frac{(C_{a\ m\acute{a}x})}{t_{C_{a\ m\acute{a}x}}} \quad \text{Equação 7}$$

A produtividade específica máxima de clorofila a é expressa em mg/(L.d).

O mesmo se define para a produtividade máxima de clorofila b, clorofila total e carotenoides. Que podem ser calculadas através das seguintes equações, respetivamente:

$$\text{Produtividade } C_b = \frac{(C_{b\text{máx}})}{t_{C_b\text{máx}}} \quad \text{Equação 8}$$

$$\text{Produtividade } C_T = \frac{(C_{T\text{máx}})}{t_{C_T\text{máx}}} \quad \text{Equação 9}$$

$$\text{Produtividade } C_C = \frac{(C_{C\text{máx}})}{t_{C_C\text{máx}}} \quad \text{Equação 10}$$

2.8 Tratamento de dados

Todos os dados calculados em cada ensaio, e as regressões lineares foram efetuadas no Microsoft Office Excel 2016.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de crescimento das microalgas

Sabe-se que muitas das microalgas, acumulam grandes quantidades de hidratos de carbono, como é o caso da *Chlorella* e da *Chlamydomonas* (Choi et al., 2010; Ho et al., 2013), e uma vez que se sabe que estes podem ser usados para a produção de biocombustíveis, realizaram ensaios com a *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, com o objetivo de se avaliar o seu crescimento celular. Com este intuito, determinou-se a densidade celular por leitura da absorvância, a biomassa formada, através da determinação do peso seco e quantificaram-se os pigmentos totais, clorofila e carotenoides, pelo método espectrofotométrico.

Antes de se iniciarem os ensaios em *erlenmeyers*, foram estabelecidas e continuamente mantidas, as diferentes estirpes de microalgas, em meio TAP em placa em condições de mixotrofia (Figura 3.1).

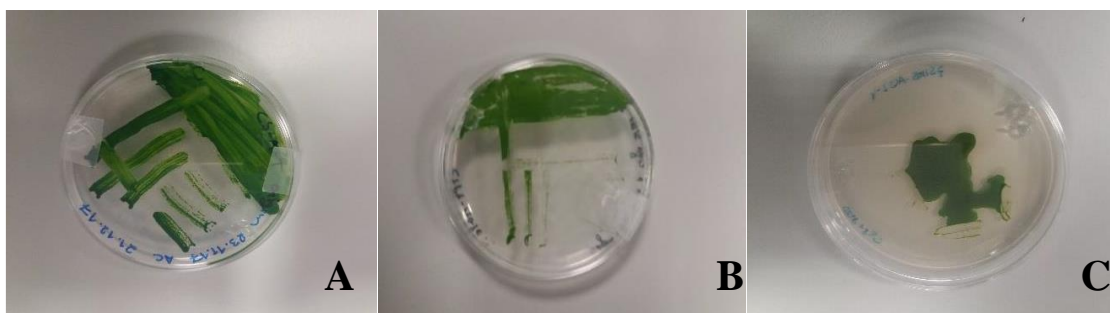


Figura 3.1 – Culturas de diferentes estirpes de microalgas, em placa com meio TAP sólido, em condições de mixotrofia. (A) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (B) *Chlorella sorokiniana* axénica; (C) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2

Após a passagem para meio líquido, as três espécies de microalgas, cresceram nas condições de cultivo de mixotrofia, em meio TAP, expostas a luz contínua e com arejamento. Durante o decorrer do ensaio, foram retiradas amostras diárias, que

permitiram obter curvas de crescimento, para cada uma das espécies, a partir da sua produção de biomassa (g/L) (Figura 3.2).

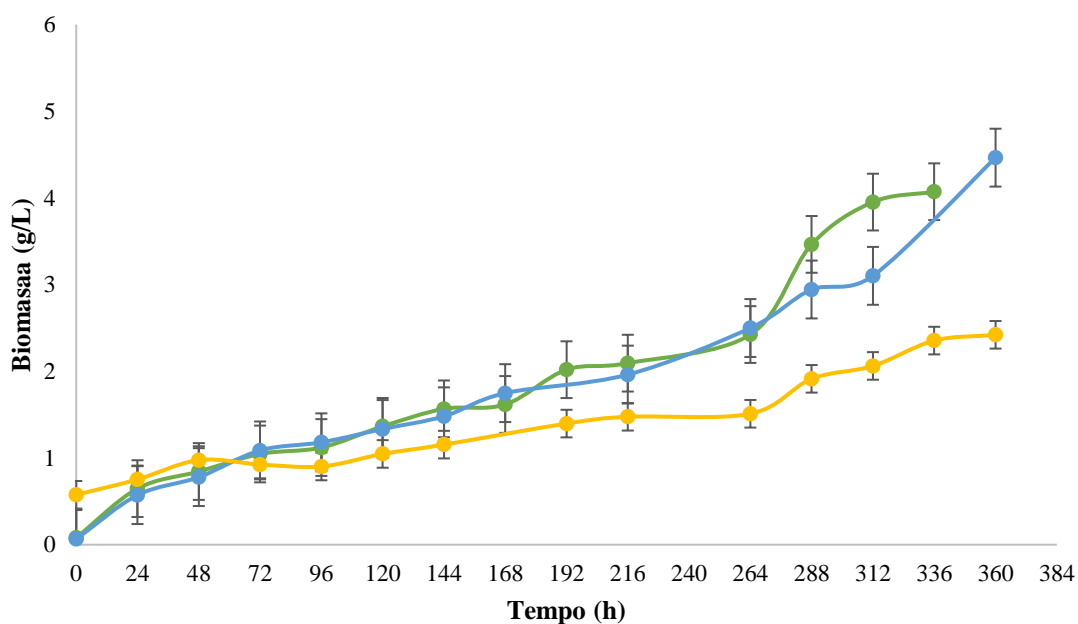


Figura 3.2 – Produção de biomassa (g/L) das diferentes espécies de microalgas, a Abs 750 nm, ao longo do ensaio, em condições de mixotrofia. (●) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (■) *Chlorella sorokiniana* axénica; (▲) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2

Observando-se o perfil de biomassa de cada uma das espécies, verificou-se que ambas as estirpes de *Chlorella sorokiniana* apresentaram uma produção de biomassa (g/L) superior (Figura 3.2), quando comparadas com a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 tendo sido obtidos valores 4,07, 4,47 e 2,42 g/L para a *Chlorella sorokiniana* não axénica, *Chlorella sorokiniana* axénica e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, respetivamente. Partindo dos valores obtidos na Figura 3.2, foi possível calcular a taxa específica de crescimento, assim como a produtividade máxima e produtividade total de biomassa de cada uma das estirpes (Tabela 3.1).

Podemos observar na Tabela 3.1 a determinação de diferentes parâmetros cinéticos, para as diferentes estirpes de microalgas. Mais uma vez é possível verificar a presença de diferenças relevantes entre a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 e as duas estirpes da *Chlorella sorokiniana*.

Tabela 3.1 – Parâmetros cinéticos determinados para a cultura das diferentes estirpes de microalgas crescidas em condições de mixotrofia, em *erlenmeyers*, a 30 °C, com arejamento, durante 360 horas, sob luz contínua. (CSNA) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (CSA) *Chlorella sorokiniana* axénica; (CR-ACS2) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2.

Parâmetros Cinéticos	CSNA	CSA	CR-ACS2
μ (d ⁻¹)	0,900	0,977	0,264
Produtividade Máxima Biomassa (g/L.d)	0,290	0,298	0,161
Produtividade Total Biomassa (g/L.d)	0,286	0,293	0,122

As taxas específicas de crescimento obtidas em condições mixotróficas da *Chlorella sorokiniana*, não axénica e axénica, foram respetivamente 0,900 e 0,977 d⁻¹, apresentando valores de quase duas vezes mais superiores, aos obtidos por *Kim et al.*, (2013) e , *Li, Zheng, Yu, & Chen*, (2014), onde nas mesmas condições de mixotrofia para a microalga *Chlorella sorokiniana*, obtiveram uma taxa específica de crescimento de 0,44 d⁻¹ e 0,63 d⁻¹, respetivamente, mostrando assim que as espécies apresentadas no presente estudo alcançaram um melhor crescimento. Em relação à microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, esta teve uma menor taxa específica de crescimento, 0,264 d⁻¹, e apesar destes dados serem ligeiramente inferiores aos descritos por *Vítová et al.*, (2011) que realizou estudos com culturas de *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, em condições de mixotrofia, sob luz contínua, alcançando valores de taxas específicas de crescimento de cerca de 0,336 d⁻¹, demonstrando que a microalga teve um crescimento semelhante ao descrito na literatura.

Quando calculadas as produtividades máxima e total de biomassa, os valores obtidos foram respetivamente 0,290 e 0,286 g/L.d para a *Chlorella sorokiniana* não axénica, 0,298 e 0,293 g/L.d para a *Chlorella sorokiniana* axénica, e 0,161 e 0,122 g/L.d para a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 (Tabela 3.1), uma vez que a espécie *Chlorella*, apresentou taxas específicas de crescimento superiores, era de esperar que as suas produtividades também o fossem, quando comparada com a outra espécie. *Li et al.*, (2014), obteve valores de produtividade em mixotrofia, para a *Chlorella. Sorokiniana* de 0,23 e 0,66 g/L.d, para produtividade total e máxima, respetivamente, quando comparados com os valores apresentados, a produtividade no seu total foi inferior aos obtidos no presente estudo, mostrando que num todo obtivemos mas biomassa da microalga *Chlorella. Sorokiniana*, do que aquela que se encontra descrita na literatura. Em relação à *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, segundo *Fields et al.*, (2018), a produtividade desta espécie, em condições de mixotrofia, varia entre 0,24 e 0,29 g/L.d, cerca de duas vezes mais da produtividade obtida no presente estudo, no entanto no mesmo estudo valor mais elevado de biomassa obtido foi de 2,08 g/L, mas mesmo com metade da produtividade, obtemos um valor máximo de biomassa de 2,42 g/L.

De seguida, procedeu-se à análise do consumo da fonte de carbono, o ácido acético, ao longo do crescimento, das espécies em estudo. No início do ensaio experimental, os meios de crescimento das microalgas *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica, e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 continham respetivamente 0,74, 0,66 e 0,64 g/L de ácido acético, porém observou-se que em todas as microalgas a fonte de carbono foi consumida, assim que começou a ocorrer o crescimento destas, sendo consumido na sua totalidade na primeira metade do ensaio, este facto verificou-se quando se analisou as amostras correspondentes ao meio de ensaio experimental.

Foram também determinadas e comparadas as concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofila total, e carotenoides, no fim do crescimento, para as diferentes estirpes em estudo (Figura 3.3).

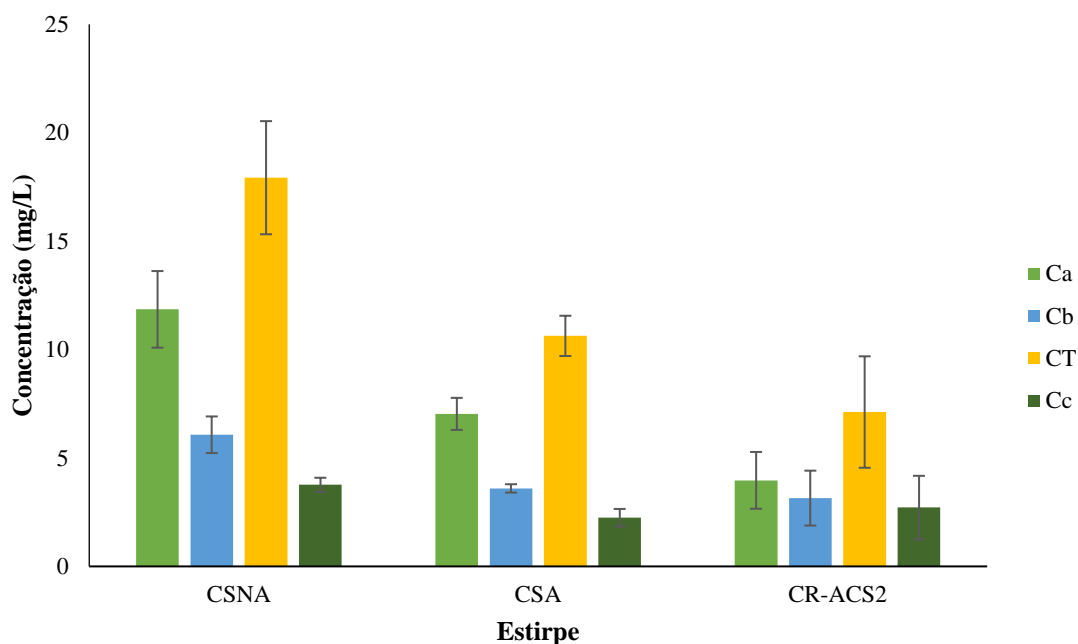


Figura 3.3 - Comparação entre as concentrações de clorofila a (**Ca**), clorofila b (**Cb**), clorofila total (**CT**) e carotenoides (**Cc**), entre as diferentes estirpes de microalgas. (**CSNA**) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (**CSA**) *Chlorella sorokiniana* axénica; (**CR-ACS2**) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2. (●) Ca; (●) Cb; (●) CT; (●) Cc.

Em relação aos valores referentes às clorofilas pode-se verificar, que quando comparamos os valores da clorofila a com os valores da clorofila b, os primeiros apresentam valores mais elevados, em qualquer uma das microalgas (Figura 3.3). Segundo *Mulders et al., (2014)*, a clorofila a é o pigmento mais abundante em organismos fotossintéticos, e a clorofila b é o segundo pigmento mais abundante em plantas e microalgas verdes, um facto que se verifica nos dados apresentados. Quando comparamos os valores das três estirpes, verificamos que *Chlorella sorokiniana* não axénica, apresenta sempre valores mais elevados que as restantes.

A partir das concentrações de clorofila a, clorofila b, clorofila total, e carotenoides obtidas, foi possível calcular as produtividades máximas de cada um dos pigmentos, de todas as espécies, valores esses que se encontram na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Produtividades máximas dos pigmentos totais determinadas para a cultura das diferentes estirpes, em condições de mixotrofia, em erlenmeyers, a 30 °C, com arejamento, durante 360 horas, sob luz contínua. **(CSNA)** *Chlorella sorokiniana* não axénica; **(CSA)** *Chlorella sorokiniana* axénica; **(CR-ACS2)** *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2.

Parâmetros Cinéticos	CSNA	CSA	CR-ACS2
Produtividade Máxima C_a (mg/L.d)	0,847	0,502	0,283
Produtividade Máxima C_b (mg/L.d)	0,434	0,257	0,226
Produtividade Máxima C_T (mg/L.d)	1,282	0,758	0,509
Produtividade Máxima C_C (mg/L.h)	0,269	0,161	0,194

Relativamente aos valores de produtividades, tanto dos pigmentos totais (clorofila a, clorofila b e clorofila total) como os valores dos carotenoides, a *Chlorella sorokiniana* não axénica, é a microalga que apresenta os valores mais elevados, com cerca de 1,282 mg/L.d de clorofila total e 0,269 mg/L.d de carotenoides. Seguindo-se a *Chlorella. sorokiniana* axénica, e por fim a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, no entanto esta última apresenta uma produtividade de carotenoides mais elevada que a primeira, 0,194 e 0,161 mg/L.h, respetivamente (Tabela 3.2). Nunes, (2014), em condições de mixotrofia sob luz contínuas com a espécie *Chlorella. sorokiniana*, obteve valores de produtividade máxima de 1,152, 0,264, 1,416 e 0,168 mg/L.d para C_a, C_b, C_T e C_C, respetivamente, quando comparado com valores apresentados de ambas a estirpes da espécie, verifica-se que o valor dos pigmentos é sempre inferior, isto poderá estar relacionado com a intensidade da luz, uma vez que quanto mais elevada a intensidade maior será a acumulação de pigmentos fotossintéticos (de-Bashan, Trejo, Huss, Hernandez, & Bashan, 2008). No entanto, em ambas as estirpes os valores dos carotenoides são sempre superiores aos descritos na literatura.

Como já foi referido a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, apenas apresentou 0,194 mg/L.dia de produtividade máxima de carotenoides, todavia Cordero *et al.*, (2011) refere que os valores máximos reportados para a mesma espécie rondam 1,425 mg/L.d.

3.2 Efeito da limitação em azoto na produção de metabolitos

Uma vez avaliado o crescimento celular das três microalgas em estudo, procedeu-se a um ensaio com limitação nutricional com o objetivo de maximizar a produção de alguns metabolitos tais como o amido e os lípidos, de forma a se poder avaliar o potencial das microalgas para a produção de biocombustíveis. Encontra-se descrito que a limitação da fonte de azoto induz a produção destes metabolitos (Dean, Sigee, Estrada, & Pittman, 2010; Dragone, Fernandes, Abreu, Vicente, & Teixeira, 2011a; Liu, Yuan, Hu, & Li, 2012). De forma a realizar um ensaio com limitação de azoto utilizaram-se as culturas crescidas do ponto 3.1 das diferentes espécies, em que a biomassa foi centrifugada e ressuspendida, em meio TAP, na ausência de fonte de azoto. O amido e os lípidos acumulados foram analisados antes da mudança do meio e após 4 dias de limitação.

3.2.1 Lípidos

Para a quantificação de lípidos, foram comparadas amostras das diferentes espécies em meio TAP normal, com amostras em meio TAP com limitação em azoto.

Tal como é referenciado na bibliografia *Y. Li et al., (2008)*, a limitação em azoto potencia a acumulação lipídica, isto reflete-se nos resultados obtidos, onde verificou-se que houve um aumento de cerca de 60,66% da acumulação de lípidos na *Chlorella sorokiniana* não axénica, quando em limitação de azoto, relativamente à cultura crescida sem limitação, no entanto a microalga *Chlorella sorokiniana* axénica não aumentou a sua acumulação de lípidos, uma vez que os valores obtidos em meio completo e em condições de limitação sem azoto foram bastante semelhantes. Em estudos realizados neste laboratório (LEBA) sabe-se que a *Chlorella sorokiniana* axénica não acumula lípidos, pensa-se que a contaminação residual da estirpe não axénica possa fornecer nutrientes essenciais que esta estirpe axénica não tenha acesso. Esta é uma suposição levantada por vários investigadores, levantando-se a questão de algumas vitaminas que possam ser fornecidas à microalga, promovendo a acumulação lipídica. Neste caso, a ligeira contaminação da microalga não axénica foi benéfica para a acumulação de lípidos.

A microalga *C. reinhardtii* CR-ACS2, em condições de limitação de azoto também não acumulou lípidos, sendo este facto contrário ao obtido por *Rengel et al., (2018)* com a mesma estirpe.

Segundo os resultados apresentados nos estudos realizados por *Widjaja et al., (2009)* e *Deng et al., (2011)*, quando em condições de limitação de azoto, a *Chlorella* sp., sofre um aumento na sua acumulação de conteúdo lipídico, chegando a ser dez vezes superior no segundo estudo referido. Este aumento na acumulação de lípidos, no presente estudo, apenas se verifica na *Chlorella sorokiniana* não axénica. Sabe-se que a limitação de azoto, é considerada uma forma importante e prática, de aumentar a acumulação de lípidos (*Yang et al., 2018*), no entanto, os resultados obtidos para a *Chlamydomonas. reinhardtii* CR-ACS2, não vão de acordo com resultados apresentados por *Yang et al., (2018)*, onde é utilizada a mesma espécie, em condições de limitação de azoto em meio TAP, esta espécie apresentou um aumento de 49,9 % na acumulação de lípidos, contrariamente ao que se verificou no presente estudo, o que poderá significar que as condições de cultivo usadas por estes poderão ser mais favoráveis à acumulação de lípidos nas células.

3.2.2 Amido

A acumulação de amido nas células das microalgas, vai depender da sua estirpe, variando de acordo com o meio em que se encontra e as suas condições (*Bohutskyi, Kula, et al., 2014; Bohutskyi, Liu, et al., 2014*). Diversas espécies de microalga foram descritas como sendo ideais para a produção de bioetanol, por produzirem grandes quantidades de amido sob privação de azoto (*Wang et al., 2016*)

A análise do amido foi feita por dois métodos, através do *kit* da *Megazyme* (K-TSTA, Megazyme), (*Procedure & Method, 2011*) e pelo método com o ácido perclórico (*Brányiková et al., 2011*). Escolheram-se estes dois métodos, uma vez que os dois se encontram bem referenciados em *Fernandes et al., (2012)* e para que pudessemos comparar um método enzimático com um método ácido.

3.2.2.1 Análise do amido pelo ao *kit da Megazyme*

O conteúdo de amido, de todas as espécies apresentadas no presente estudo, foi determinado a partir de um método de hidrólise enzimática, recorrendo-se ao uso de um *kit* produzido pela *Megazyme* (K-TSTA, Megazyme), referido no ponto 2.6.7, em condições onde o azoto está presente e em condições de limitação nutricional, em que a cultura esteve 4 dias num meio sem fonte de azoto.

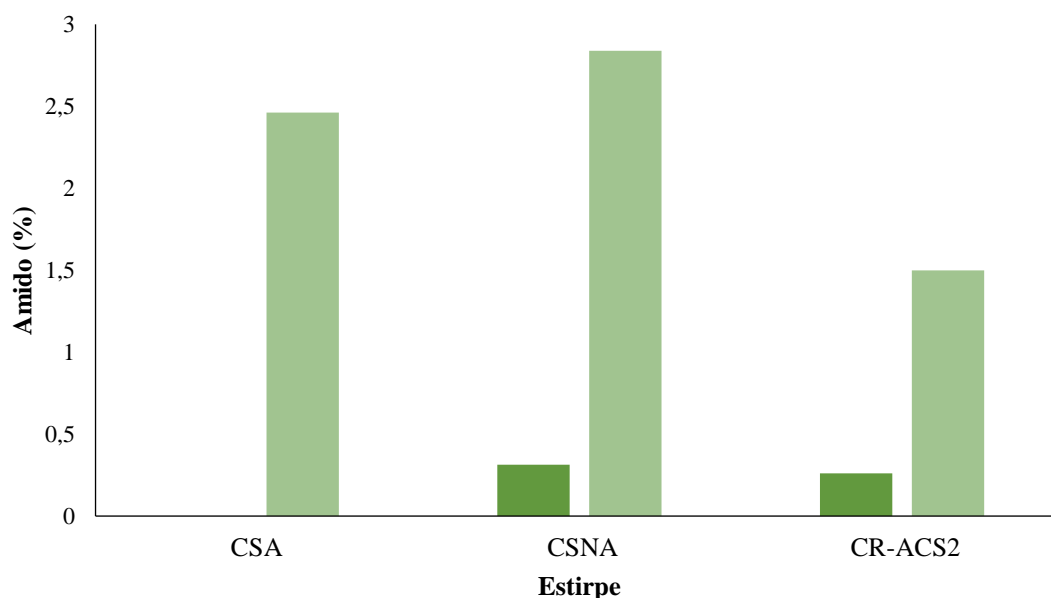


Figura 3.4 – Percentagem mássica de amido determinada pelo *kit da Megazyme*, para as diferentes microalgas em meio não limitado e após 4 dias de exposição em meio sem azoto. (CSNA) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (CSA) *Chlorella sorokiniana* axénica; (CR-ACS2) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2. (●) Com azoto; (○) Sem azoto.

É possível verificar na Figura 3.4 que, todas as espécies apresentadas quando sujeitas a uma limitação de azoto, sofrem um aumento de quase dez vezes mais de acumulação de amido nas células. É de referir, que não podemos afirmar o mesmo para a *Chlorella sorokiniana* axénica, uma vez que, em condições não limitadas, não foi possível obter uma quantidade percentual de amido. Quando comparamos a acumulação de amido no meio com e sem azoto, observa-se que tanto na *Chlorella sorokiniana* não axénica, como na *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 ocorreu um aumento na quantidade de amido acumulado de 88.93 e 82.54 %, respetivamente (Figura 3.4).

Estudos realizados por *Dragone, et al., (2011)* comprovam que o aumento do conteúdo de amido nas microalgas, deve-se às diferentes concentrações de azoto no meio de crescimento. Também *Behrens et al., (1989)* mostrou que, o conteúdo de amido da *Chlorella vulgaris* aumenta quando há limitação de azoto no meio de crescimento, confirmando o mesmo em estudos realizados com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2,. Estes dados encontram-se de acordo com os dados apresentados neste estudo, no entanto as percentagens de amido obtidas pelos autores foram bastante superiores. O valor mais alto obtido nos ensaios deste plano de trabalhos, foi 2.84 %, para *Chlorella sorokiniana* não axénica em condições de ausência de azoto.

3.2.2.2 Análise do amido pelo método do ácido perclórico

As mesmas amostras que foram usadas na análise de amido pelo *kit* da *Megazyme*, foram também analisadas pelo método de ácido perclórico. Este segundo método foi realizado para que os resultados, obtidos pelos dois métodos pudessem ser aferidos. Antes de se realizar as análises nas amostras, determinou-se a curva padrão para a quantificação do amido, que se encontra no Anexo III. Esta curva foi realizada com diferentes concentrações de glucose conhecidas, às quais se adicionou solução de antrona a 72% (Anexo II), para que as densidades óticas das amostras pudessem ser lidas por espectrometria (Figura 3.5). Quando os hidratos de carbono são aquecidos com uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) de antrona a 72%, é produzida uma cor esverdeada (Figura 3.5). A antrona é usada, como um reagente específico, para a estimativa por colorimetria de hidratos de carbono presentes nas microalgas (Yemm & Willis, 1954). Neste caso foi utilizada para a determinação de amido nas células.

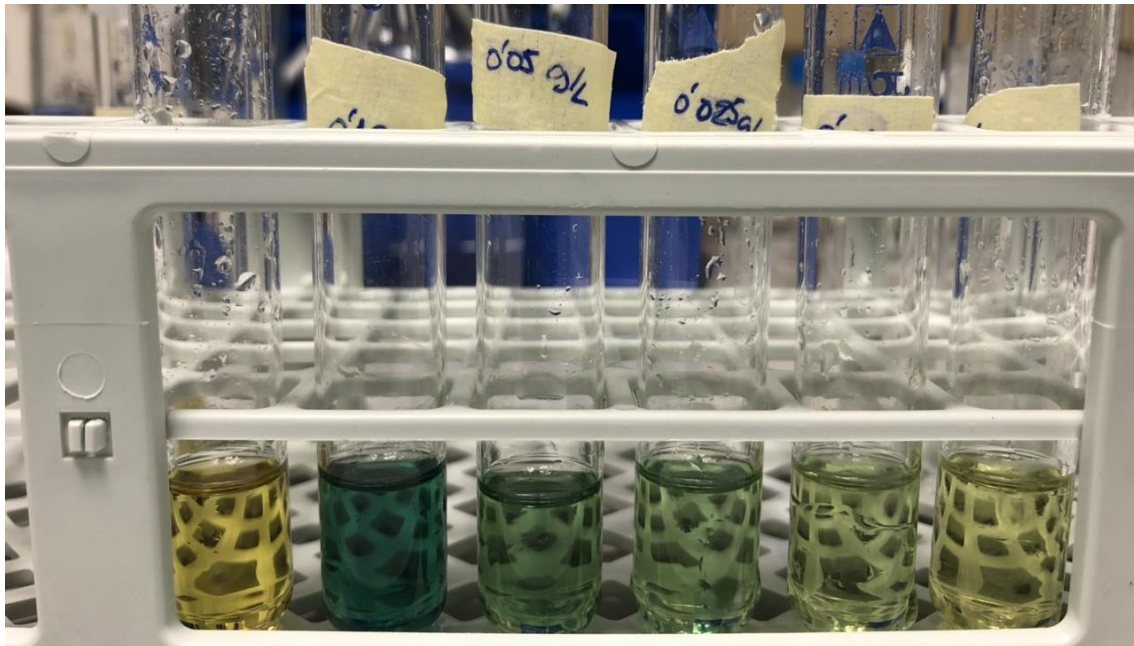


Figura 3.5 – Amostras de glucose com diferentes concentrações, usadas para determinar a curva padrão para a quantificação de amido pelo método espectrofotométrico pela quantificação com a antrona em ácido sulfúrico a 72%

Após determinada a curva padrão procedeu-se à determinação do amido de todas espécies em estudo, em condições de presença e ausência de azoto. Submeteu-se as amostras à solução de antrona, para que estas pudessem ser lidas por espectrofotometria, e com o auxílio da curva padrão de glucose (Anexo III), convertemos os resultados em concentração de amido. A percentagem de amido obtida após a conversão, de cada uma das espécies em condições de presença e ausência de azoto, encontra-se apresentada na Figura 3.5.

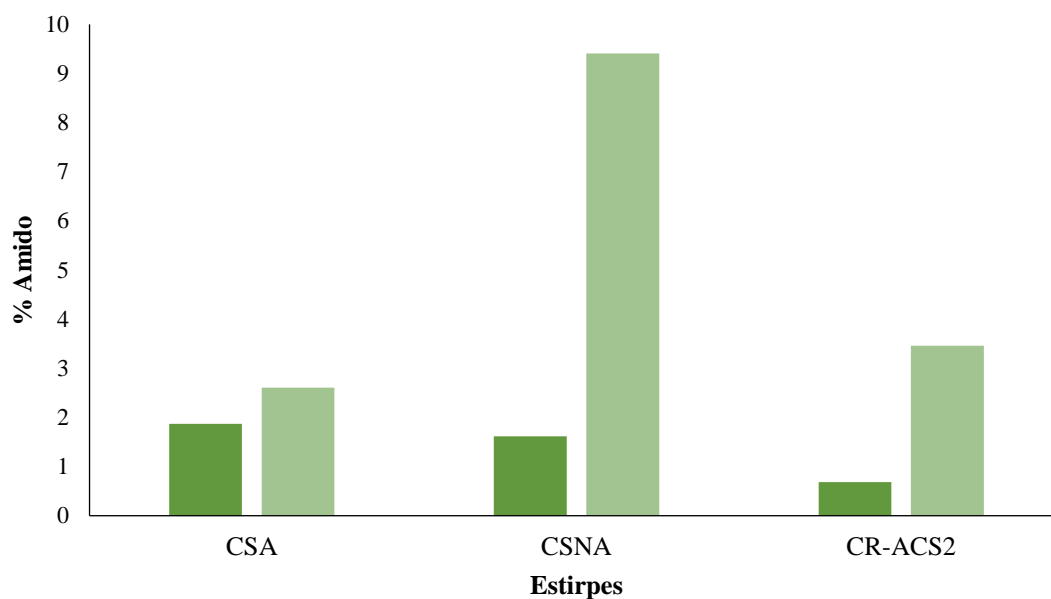


Figura 3.6 – Percentagem mássica de amido, determinada pelo método de ácido perclórico, para as diferentes microalgas em meio não limitado e após 4 dias de exposição em meio sem azoto. (CSNA) *Chlorella sorokiniana* não axénica; (CSA) *Chlorella sorokiniana* axénica; (CR-ACS2) *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2. (●) Com azoto; (●) Sem azoto.

Verifica-se que houve aumento na quantidade de amido acumulado nas células de 28,08, 82,89, e 80,35 %, na *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica, e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, respetivamente, quando comparando o meio com azoto com o meio sem azoto (Figura 3.6). Mais uma vez se verifica, tal como no método anterior, que após a limitação de azoto a acumulação de amido nas células aumenta em todas as espécies. Sendo o valor mais alto obtido, de cerca de 9,41 %, e mais uma vez, este valor refere-se à *Chlorella sorokiniana* não axénica, em condições de ausência de azoto. No entanto, quando comparamos os valores de percentagem obtidos pelos dois métodos, verificamos, que o método ácido obtém valores mais elevados, em relação às mesmas amostras.

Fernandes et al., (2012) realizou estudos para determinação de amido na *Chlorella vulgaris*, onde comparou os resultados entre métodos ácidos e métodos enzimáticos, e concluiu que apesar dos resultados obtidos, pelos dois métodos serem semelhantes, o método enzimático que usa enzimas para hidrolisar o amido da

microalga, como é caso do *kit* da *Megazyme* é muito mais preciso e rápido todavia, apesar disso obtivemos resultados de amido superiores, pelo método ácido. No caso deste estudo, uma forma de verificar se o kit apresenta resultados reprodutíveis era validar com um padrão de amido, numa concentração conhecida. Através deste controlo, teriam sido confirmados os resultados obtidos neste estudo. Se houve falha na aplicação do método ou se são mesmo as microalgas que apresentam um baixo teor em amido.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo, as microalgas, *Chlorella sorokiniana* axénica, *Chlorella sorokiniana* não axénica, e *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, cresceram em condições de mixotrofia, em meio TAP, sob iluminação contínua fluorescente de 18 W a $100 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, com arejamento e sem agitação. Quando comparamos as três estirpes, observa-se que ambas estirpes de *Chlorella sorokiniana*, apresentam tanto um crescimento celular como uma produção de biomassa, mais elevados que a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, atingindo valores de produção de biomassa de 4,07 e 4,47 g/L, enquanto a última, produz apenas cerca de metade, 2,42 g/L. As produtividades máximas das estirpes de *Chlorella* atingiram valores da ordem das 0,300 g/L.d enquanto para a *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2 foi de 0,16 g/L.d, praticamente metade. Verificou-se que ao fim de 192 horas de cultura, houve esgotamento da fonte de carbono presente no meio, ácido acético, no caso das diferentes microalgas testadas.

Em todas as espécies de microalgas, a clorofila a, apresenta concentrações mais elevadas, quando comparada com a clorofila b, no final do ensaio de crescimento. A *Chlorella sorokiniana* não axénica, apresenta uma produtividade de C_T máxima de 1,282 g/L.d, e 0,269 g/L.d de produtividade máxima de carotenoides, valores superiores às restantes microalgas.

O stress provocado à cultura das três microalgas, através da utilização de um meio limitado em fonte de azoto, apenas se traduziu num aumento do conteúdo lipídico na *Chlorella sorokiniana* não axénica, onde ocorreu um aumento de cerca de 60.66 %.

Por outro lado, o conteúdo em amido aumentou nas três estirpes das microalgas, quando em condições de limitação nutricional pelo azoto. Testaram-se dois métodos, um enzimático, e outro ácido, com resultados semelhantes, embora no método ácido, os valores sejam ligeiramente superiores. Mais uma vez, os valores mais elevados, foram obtidos com a *Chlorella sorokiniana* não axénica, quando comparando as três estirpes. No entanto, quando comparamos a acumulação de amido nas células de cada espécie, no meio sem azoto, as percentagens da *Chlorella sorokiniana* não axénica, e da *Chlamydomonas reinhardtii* CR-ACS2, são observados valores bastante semelhantes, com cerca de 88.93 e 82.54 % pelo método enzimático, e 82.89, e 80.35 % pelo método ácido, respetivamente.

Pode-se assim, concluir que das três estirpes de microalgas, estudadas no presente trabalho, a *Chlorella sorokiniana* não axénica, é a microalga mais promissora, uma vez que apresenta bons crescimentos, podendo em condições otimizadas, produzir elevada quantidade de biomassa. Esta estirpe acumula lípidos e amido sendo potenciada a acumulação em condições de limitação de azoto. Assim, sendo esta microalga apresenta elevadas potencialidades para a produção de biocombustível, uma vez que produz metabolitos de interesse para a produção de biodiesel e bioetanol.

Atualmente, estão em curso no Laboratório de Engenharia e Biotecnologia Ambiental, estudos de otimização do meio nutricional para aumento da biomassa produzida e aumento de metabolitos de interesse.

5. BIBLIOGRAFIA

- Amin, S. (2009). Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 50(7), 1834–1840. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2009.03.001>
- An, H., Wilhelm, W. E., & Searcy, S. W. (2011). Biofuel and petroleum-based fuel supply chain research: A literature review. *Biomass and Bioenergy*, 35(9), 3763–3774. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.021>
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology*, 24(1), 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Asada, C., Doi, K., Sasaki, C., & Nakamura, Y. (2012). Efficient Extraction of Starch from Microalgae Using Ultrasonic Homogenizer and Its Conversion into Ethanol by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Natural Resources*, 03(04), 175–179. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.34023>
- Baicha, Z., Salar-García, M. J., Ortiz-Martínez, V. M., Hernández-Fernández, F. J., de los Ríos, A. P., Labjar, N., ... Elmahi, M. (2016). A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. *Fuel Processing Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.08.017>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., Pires, J. C. M. J. C. M., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Behrens, P. W., Bingham, S. E., Hoeksema, S. D., Cohoon, D. L., & Cox, J. C. (1989). Studies on the incorporation of CO₂ into starch by *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*, 1(2), 123–130. <https://doi.org/10.1007/BF00003874>
- Blue Biotechnology, E. C. (2014). Blue growth study - marine biotechnology, 1–2.
- Bohutskyi, P., Kula, T., Kessler, B. A., Hong, Y., Bouwer, E. J., Betenbaugh, M. J., & Allnut, F. C. T. (2014). Mixed Trophic State Production Process for Microalgal

- Biomass with High Lipid Content for Generating Biodiesel and Biogas. *Bioenergy Research*, 7(4), 1174–1185. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9453-5>
- Bohutskyi, P., Liu, K., Kessler, B. A., Kula, T., Hong, Y., Bouwer, E. J., ... Allnut, F. C. T. (2014). Mineral and non-carbon nutrient utilization and recovery during sequential phototrophic-heterotrophic growth of lipid-rich algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 5261–5273. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5655-1>
- Brányiková, I., Maršáľková, B., Doucha, J., Brányik, T., Bišová, K., Zachleder, V., & Vítová, M. (2011). Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(4), 766–776. <https://doi.org/10.1002/bit.23016>
- Brown, M. R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145(1), 79–99. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(91\)90007-J](https://doi.org/10.1016/0022-0981(91)90007-J)
- Burkart, M. D., & Mayfield, S. P. (2013). Biofuels for the 21st century. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3), 436–438. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.003>
- Catarina, A., & Nunes, F. (2014). UNIVERSIDADE DO ALGARVE Faculdade de Ciências e Tecnologia Produção de biodiesel a partir da cultura de UNIVERSIDADE DO ALGARVE Faculdade de Ciências e Tecnologia Produção de biodiesel a partir da cultura de microalga *Chlorella* sp .
- Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., ... Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>
- Chng, L. M., Lee, K. T., & Chan, D. C. J. (2017). Evaluation on Microalgae Biomass for Bioethanol Production. *IOP Conference Series: Materials Science and*

Engineering, 206(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012018>

- Cho, H. S., Oh, Y. K., Park, S. C., Lee, J. W., & Park, J. Y. (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, 54, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.08.031>
- Choi, S. P., Nguyen, M. T., & Sim, S. J. (2010). Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(14), 5330–5336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.026>
- Colling Klein, B., Bonomi, A., & Maciel Filho, R. (2017). Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.063>
- Cordero, B. F., Obratsova, I., Couso, I., Leon, R., Vargas, M. A., & Rodriguez, H. (2011). Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine Drugs*, 9(9), 1607–1624. <https://doi.org/10.3390/md9091607>
- de-Bashan, L. E., Trejo, A., Huss, V. A. R., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*, 99(11), 4980–4989. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.065>
- de Farias Silva, C. E., & Bertucco, A. (2016). Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry*, 51(11), 1833–1842. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.016>
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Bioresource Technology Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499–4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
- Demirbas, A. (2017). Production economics of high-quality microalgae. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning and Policy*. <https://doi.org/10.1080/15567249.2015.1057655>
- Deng, X., Fei, X., & Li, Y. (2011). The effects of nutritional restriction on neutral lipid

- accumulation in *Chlamydomonas* and *Chlorella*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(3), 260–270. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.557>
- Diário da República n.º 145/2017, S. I. de 2017-07-28. (2017). Decreto-Lei n.º 91/2017. *Economia, Decreto-Le(91/2017)*, 4290–4307.
- Dickinson, S., Mientus, M., Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Ozturk, S., Shaikh, F., ... El-Halwagi, M. M. (2017). A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technologies and Environmental Policy*. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1309-6>
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011a). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88(10), 3331–3335. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>
- Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011b). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88(10), 3331–3335. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A., & Teixeira, J. (2010). Third generation biofuels from microalgae. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>
- Fariied, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>
- Fernandes, B., Dragone, G., Abreu, A. P., Geada, P., Teixeira, J., & Vicente, A. (2012). Starch determination in *Chlorella vulgaris*-a comparison between acid and enzymatic methods. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1203–1208. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9761-5>
- Fields, F. J., Ostrand, J. T., & Mayfield, S. P. (2018). Fed-batch mixotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for high-density cultures. *Algal Research*, 33(May),

- 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.006>
- Freitas, A. C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T. A. P., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2012). Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology Advances*, *30*(6), 1506–1515. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.006>
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *54*(6), 1665–1669. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.6.1665>
- Gressel, J. (2008). Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, *174*(3), 246–263. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.009>
- Harun, R., & Danquah, M. K. (2011). Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, *168*(3), 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2015). Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, *262*, 939–945. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.10.049>
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, *135*, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>
- Hutner, S. H., Provasoli, L., Schnatz, A., & Haskins, C. P. (1950). Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms Author (s): S . H . Hutner , L . Provasoli , Albert Schatz and C . P . Haskins Reviewed work (s): Published by : American Philosophical Society Stable URL : <http://>. *Proceedings of the American Philosophical Society*, *94*(2), 152–170.
- Ishika, T., Moheimani, N. R., & Bahri, P. A. (2017). Sustainable saline microalgae co-cultivation for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.110>

- Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., & Elibol, M. (2012). Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, *61*, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.12.001>
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *65*, 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, *102*(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>
- Kendall, A., & Yuan, J. (2013). Comparing life cycle assessments of different biofuel options. *Current Opinion in Chemical Biology*, *17*(3), 439–443. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.020>
- Kermanshahi-pour, A., Sommer, T. J., Anastas, P. T., & Zimmerman, J. B. (2014). Enzymatic and acid hydrolysis of *Tetraselmis suecica* for polysaccharide characterization. *Bioresource Technology*, *173*, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.048>
- Kim, K. H., Choi, I. S., Kim, H. M., Wi, S. G., & Bae, H. J. (2014). Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, *153*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.059>
- Kim, S., Park, J. eun, Cho, Y. B., & Hwang, S. J. (2013). Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, *144*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>
- Lee, O. K., Kim, A. L., Seong, D. H., Lee, C. G., Jung, Y. T., Lee, J. W., & Lee, E. Y. (2013). Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource*

- Technology*, 132, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.007>
- Lee, R. A., & Lavoie, J.-M. (2013). From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*, 3(2), 6–11. <https://doi.org/10.2527/af.2013-0010>
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.04.010>
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 629–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, J., Yuan, C., Hu, G., & Li, F. (2012). Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp . 11-1 Under Nitrogen Limitation, 2127–2137. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9639-2>
- Mahdy, A., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2016). Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production: Influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency. *Bioresource Technology*, 199, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.080>
- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2016). Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(5), 1299–1305. <https://doi.org/10.1002/jctb.4722>
- Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 96(3), 631–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>

Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions.

Biotechnology Advances, 31(8), 1532–1542.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>

Mondal, M., Goswami, S., Ghosh, A., Oinam, G., Tiwari, O. N., Das, P., ... Halder, G. N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *3 Biotech*. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4>

Mulders, K. J. M., Lamers, P. P., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities.

Journal of Phycology, 50(2), 229–242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>

Nagarajan, D., Lee, D. J., Kondo, A., & Chang, J. S. (2017). Recent insights into biohydrogen production by microalgae – From biophotolysis to dark fermentation.

Bioresource Technology. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.104>

Naik, S. N., Goud, V. V., Rout, P. K., & Dalai, A. K. (2010). Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>

Odjadjare, E. C., Mutanda, T., & Olaniran, A. O. (2017). Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*,

37(1), 37–52. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1108956>

Parsaeimehr, A., Sun, Z., Dou, X., & Chen, Y. F. (2015). Simultaneous improvement in production of microalgal biodiesel and high-value alpha-linolenic acid by a single regulator acetylcholine. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1186/s13068-015-0196-0>

Procedure, A., & Method, A. M. (2011). Total Starch (Amyloglucosidase / α -Amylase Method), 11.

Qin, S., Müller, W. E. G., & Cooper, E. L. (2011). *Marine biotechnology. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* (Vol. 2011).

<https://doi.org/10.1155/2011/639140>

- Randhawa, K. S., Relph, L. E., Armstrong, M. C., & Rahman, P. K. S. M. (2017). Biofuel production: tapping into microalgae despite challenges. *Biofuels*, 8(2), 261–271. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1224290>
- Razzak, S. A., Ali, S. A. M., Hossain, M. M., & DeLasa, H. (2017). Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76, 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>
- Rengel, R., Smith, R. T., Haslam, R. P., Sayanova, O., Vila, M., & León, R. (2018). Overexpression of acetyl-CoA synthetase (ACS) enhances the biosynthesis of neutral lipids and starch in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Research*, 31(February), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.009>
- Ribeiro, P. F. F. de A. e C. (2012). Processo de Liofilização de Produtos Alimentares Perecíveis, 117.
- Rodrigues, M. A., & Bon, E. P. da S. (2011). Evaluation of *Chlorella* (Chlorophyta) as Source of Fermentable Sugars via Cell Wall Enzymatic Hydrolysis. *Enzyme Research*, 2011, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/405603>
- Shekharam, K. M., Venkataraman, L. V., & Salimath, P. V. (1987). Carbohydrate composition and characterization of two unusual sugars from the blue green alga *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, 26(8), 2267–2269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84698-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84698-1)
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S., & Zamani, M. (2017). Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*, 200, 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.03.090>
- Show, P. L., Tang, M. S. Y., Nagarajan, D., Ling, T. C., Ooi, C. W., & Chang, J. S. (2017). A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010215>
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570–1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>

- Singh, A., Nigam, P. S., & Murphy, J. D. (2011). Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology*, *102*(1), 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.032>
- Sivakumar, G., Vail, D. R., Xu, J., Burner, D. M., Lay, J. O., Ge, X., & Weathers, P. J. (2010). Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. *Engineering in Life Sciences*, *10*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900061>
- Su, Y. Y., Song, K., Zhang, P., Su, Y. Y., Cheng, J., & Chen, X. (2017). Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.078>
- Templeton, D. W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D., & Laurens, L. M. L. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, *1270*, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.034>
- Thakur, N. L., & Thakur, A. N. (2006). Marine biotechnology: An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, *5*(3), 263–268.
- Tulashie, S. K., & Salifu, S. (2017). Potential production of biodiesel from green microalgae. *Biofuels*, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1348188>
- Verma, N. M., Mehrotra, S., Shukla, A., & Mishra, B. N. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories : A comprehensive discussion. *Journal of Biotechnology*, *9*(10), 1402–1411. <https://doi.org/10.5897/AJBx09.071>
- Vítová, M., Bišová, K., Umysová, D., Hlavová, M., Kawano, S., Zachleder, V., & Čížková, M. (2011). *Chlamydomonas reinhardtii*: Duration of its cell cycle and phases at growth rates affected by light intensity. *Planta*, *233*(1), 75–86. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1282-y>
- Wang, Y., Chiu, S. Y., Ho, S. H., Liu, Z., Hasunuma, T., Chang, T. T., ... Kondo, A. (2016). Improving carbohydrate production of *Chlorella sorokiniana* NIES-2168 through semi-continuous process coupled with mixotrophic cultivation. *Biotechnology Journal*, *11*(8), 1072–1081. <https://doi.org/10.1002/biot.201500270>
- Widjaja, A., Chien, C. C., & Ju, Y. H. (2009). Study of increasing lipid production from

fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.07.007>

Yang, L., Chen, J., Qin, S., Zeng, M., Jiang, Y., Hu, L., ... Wang, J. (2018). Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1041-z>

Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508–514. <https://doi.org/10.1042/bj0570508>

Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.12.021>

Zhu, L. (2014). The combined production of ethanol and biogas from microalgal residuals to sustain microalgal biodiesel: A theoretical evaluation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(1), 7–15. <https://doi.org/10.1002/bbb.1442>

6. ANEXOS

I. Complemento ao Meio de Cultura TAP

1. Preparação da solução Tris 1M

Tampão Tris a 1M (pH 9.0): Para um 1L de água destilada, adicionar 121.14 g de Tris em 800 mL de água destilada. Ajustar o pH para 9.0, com Ácido Clorídrico (HCl) concentrado. Perfazer, com água destilada, até ao volume de 1 L. Por fim, levar a autoclavar, deixar arrefecer à temperatura ambiente, e está pronto para ser utilizado.

2. Preparação da solução *Hunter Trace* (adaptado (Hutner, Provasoli, Schnatz, & Haskins, 1950))

É necessário preparar as seguintes soluções, para a obtenção de 1 litro de solução *Hunter Trace*

- Solução 1: Dissolver 10 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em 250 mL de água destilada.
- Solução 2: Dissolver em 550 mL de água destilada, por ordem e a uma temperatura de 100 °C, os seguintes compostos:
 - 2.28 g de H_3BO_3
 - 4.40 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 1.02 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
 - 1.00 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$
 - 0.32 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
 - 0.32 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
 - 0.22 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

Ambas as soluções 1 e 2 devem ser misturadas, obtendo-se uma nova cor verde-azulada, e ferver até aos 100 °C. Após tudo ter sido dissolvido, deixar arrefecer até aos 80-90 °C, e nesse momento ajustar o pH para 6.8 com uma solução de KOH a 20 %

(p/v), mantendo sempre a temperatura acima dos 70 °C. Perfazer com água destilada até obter 1 L de volume total e guardar no escuro durante 48 h, esta deverá apresentar uma coloração rosa e deverá estar pronta a ser utilizada. Por fim, a solução deverá ser armazenada a 4 °C.

II. Preparação da mistura concentrada de Antrona e H₂SO₄

Para se obter 1 L de H₂SO₄ a 72 %, este teve de ser diluído a partir de uma solução H₂SO₄ a 96 %. Para isso, usou-se 750 mL de H₂SO₄ a 96 %, e fez-se até ao volume de 1 L com água destilada, para se obter a concentração de 72 %. A adição da água, ao ácido, foi realizada de pouca em pouca quantidade, em gelo, e dentro de uma câmara, devido à reação térmica que ocorre entre os dois.

De seguida, a solução de H₂SO₄ a 72 %, foi adicionada às 2g de antrona, para que esta fosse dissolvida, mais uma vez, em poucas quantidades, em gelo, e dentro de uma câmara. Por fim, a solução é colocada num sonicador, para que ocorra a dissolução total, e após arrefecer, à temperatura ambiente, está pronta a ser utilizada.

III. Determinação da curva padrão, para a quantificação de amido

Para calcular a concentração de glucose presente em cada amostra foi necessário obter uma curva padrão, usando concentrações conhecidas de glucose (0.005 – 0.1 g/L). As amostras foram efetuadas em triplicado, e a concentração obtida foi multiplicada por 0.9, para a obtenção de uma curva de calibração para determinação da concentração de amido. A figura seguinte representa a curva padrão obtida:

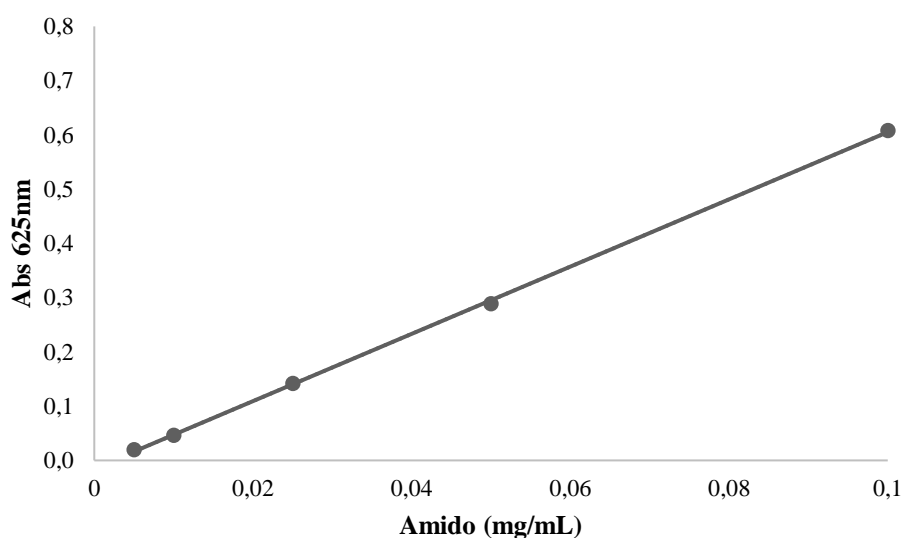


Figura 0.1 – Curva padrão para quantificação de amido. Absorvância a 625 nm para diferentes concentrações. Reta de regressão linear obtida: $Y = 6.1991 x + 0.0147$, $R^2 = 0,9997$.

IV. Determinação da reta de calibração, para a determinação do consumo de acetatos

Para determinar o consumo de acetatos, em cada amostra foi necessário obter uma reta de calibração, usando concentrações conhecidas de acetato (0.4 – 1.2 g/L). As amostras foram efetuadas em triplicado, foram colocadas a correr no HPLC, e a concentração obtida, foi usada para a construção de uma reta de calibração para determinação da concentração de acetatos consumidos. A figura seguinte representa a reta padrão obtida:

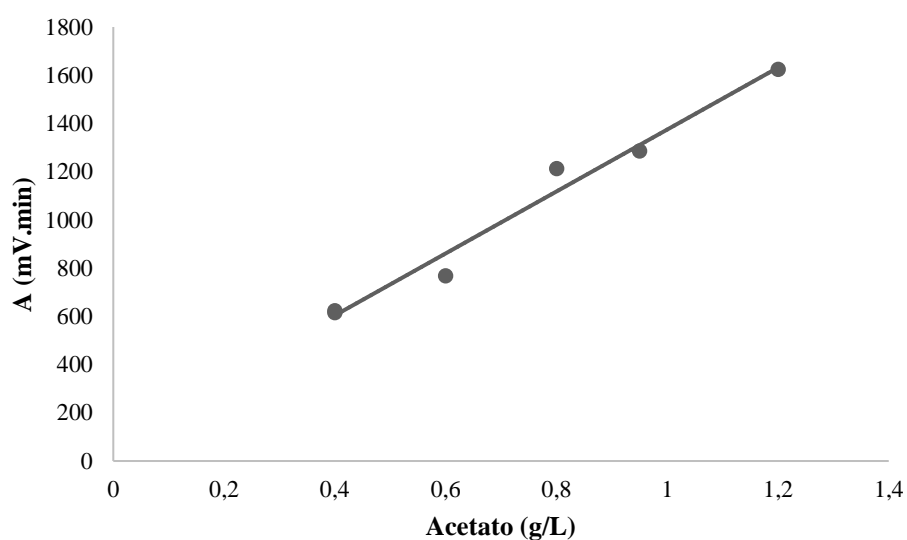


Figura 0.2 – Reta de calibração para a determinação do consumo de acetatos. Reta de regressão linear obtida: $Y = 1284.4x + 9013.3$