



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Francisca Maria Pinto Rodrigues Teixeira da Silva

**Utilização de substratos orgânicos,  
nomeadamente resíduos agroindustriais,  
para cultivo de microalgas**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado integrado em Engenharia Biológica  
Ramo Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor António Augusto Martins de  
Oliveira Soares Vicente**  
e da  
**Doutora Joana Gabriela Laranjeira da Silva**

## DECLARAÇÃO

Nome: Francisca Maria Pinto Rodrigues Teixeira da Silva

Título da dissertação: Utilização de substratos orgânicos, nomeadamente resíduos agroindustriais, para cultivo de microalgas

Orientadores: Professor Doutor António Augusto Martins de Oliveira Soares Vicente

Doutora Joana Gabriela Laranjeira da Silva

Ano de conclusão: 2019

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura:

## AGRADECIMENTOS

Com o término da minha formação académica é importante agradecer às pessoas e instituições que me proporcionaram as melhores condições para atingir os objetivos por mim traçados e que me ajudaram a desenvolver não só enquanto profissional, mas também na vertente social. Todas as pessoas/instituições abaixo mencionadas foram muito importantes durante o meu trajeto académico e, por isso, os meus mais sinceros agradecimentos.

O primeiro agradecimento é dedicado à família, em especial aos meus pais e irmãos, que me orientaram durante toda a vida, preparando-me para as adversidades através da educação e aquisição de valores, os quais me permitiram concluir este objetivo.

Ao Luís pela paciência e companheirismo demonstrado durante todos estes anos, sendo uma peça importante na conclusão desta fase.

Aos meus orientadores de estágio, a Dr. Joana Laranjeira e Prof. Doutor António Vicente, pelo acompanhamento e disponibilidade durante este período. Foram uma ajuda muito importante na conclusão desta dissertação, ao transmitir os seus conhecimentos e ensinamentos.

À unidade de investigação e desenvolvimento (UID) e Algafarm, e as pessoas que compõem estas instituições, pelas experiências proporcionadas, oportunidade de aprendizagem e pela transmissão de conhecimentos. Em especial à Imma Gifuni, Joana Telles, Pedro Quelhas, Bernardo Carvalho, João Pereira, Joana Galante, Nádia Correia e ao Josué por toda a ajuda e partilha deste período de estágio que culmina com o término do meu percurso académico.

Ao grupo de investigação do Centro de Ciências do Mar (CCMAR) pela oportunidade, simpatia e amabilidade com que me receberam. Em especial ao Hugo Pereira, à Tamara Santos e Inês Maia, por toda a ajuda.

Aos meus companheiros do Mestrado Integrado em Engenharia Biológica pelos momentos vividos durante este longo percurso. Um sincero obrigada à Joana, à Tânia, à Cláudia, à Carla e ao Ricardo.

Não posso esquecer de mencionar a empresa Lacticínios Marinha pela amabilidade e disponibilidade em ceder o soro de queijo e a água de lavagem usados neste projeto.

A todos aqueles que não referi, mas que também foram importantes, um obrigada.



## RESUMO

Atualmente, problemas associados à crescente população mundial, poluição ambiental e procura de energias renováveis conduzem à exploração de fontes alternativas sustentáveis que possam satisfazer as exigentes necessidades do ser humano. Neste sentido, a produção de biomassa de microalgas tem vindo a demonstrar elevado potencial biotecnológico em função das inúmeras aplicações que apresenta. Estes microrganismos são capazes de produzir diversas moléculas de alto valor, fontes de energia como o biodiesel e, ainda, a fixação de gases com efeito de estufa. No entanto, os custos do seu cultivo devem ser reduzidos, de forma a tornar-se uma realidade perfeitamente alcançável. Deste modo, surge o presente estudo que tem como principal objetivo a produção de biomassa de microalgas a baixo custo através da formulação de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais. A formulação destes meios não só permite uma eficiente diminuição dos custos de produção, como também a reutilização de resíduos que, na sua maioria, não são encaminhados de forma adequada.

Numa primeira fase do presente projeto foi realizado um *screening* a diferentes meios alternativos, onde foram utilizados os resíduos: condensado de melação solúvel (CMS) líquido, condensado de melação solúvel (CMS) prills, Soro Queijo, água de lavagem da indústria de laticínios e açúcar da Tabaqueira. Já numa segunda fase precedeu-se à escolha de três principais resíduos, a partir dos quais foi realizado um estudo mais aprofundado quanto à sua utilização em meios de cultivo de microalgas.

Nesta segunda fase, onde se incluem os principais resultados do presente projeto, foi estudado o crescimento e perfil bioquímico das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oceanica*. Foram utilizados reatores de 2 L no laboratório, sob condições de cultivo controladas e pré-definidas, e no exterior em reatores de 50 L (reatores de painel plano (PP)), em condições dependentes do ambiente exterior. Foram formulados meios de cultivo com os resíduos: soro de queijo, açúcar da Tabaqueira e efluente salino proveniente da indústria de bacalhau.

No crescimento da microalga de água doce (*Chlorella vulgaris*), testado em meios com soro de queijo e açúcar da Tabaqueira, foram alcançados valores superiores de velocidade de crescimento sob condições controladas e em meios alternativos. O meio com soro de queijo foi aquele que maior taxa média de crescimento apresentou ( $0,52 \text{ d}^{-1}$ ). Pelo contrário, nos ensaios em reatores painel plano (PP) o meio controlo registou taxas médias de crescimento e produtividades mais elevadas. Também nestas condições, o regime semi-contínuo apresentou

melhores resultados, originando, por isso, concentrações em biomassa superiores quando comparado ao regime descontínuo. O meio com açúcar atingiu uma produtividade máxima de  $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , valor mais alto entre os meios alternativos sob condições externas. No que diz respeito à caracterização bioquímica, a percentagem de proteína máxima obtida foi de 17,82 %, em meio com soro de queijo. Este valor apresentou-se muito inferior comparativamente à percentagem obtida em meio controlo (36,12 %). Quanto à produção de clorofila (*a* e *b*), os resultados demonstraram concentrações mais reduzidas em biomassa cultivada em meios alternativos. Entre os meios testados, o cultivo com açúcar da Tabaqueira mostrou melhores resultados na produção desta microalga, no entanto a produção de compostos alvo não foi favorecida em qualquer um dos meios testados.

A microalga marinha (*Nannochloropsis oceanica*), testada em meios com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico e efluente salino mais soro de queijo, foi capaz de atingir uma taxa média de crescimento igual a  $0,21 \text{ d}^{-1}$  e uma produtividade de  $0,16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , obtidos em meio com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico. Os dois meios testados atingiram valores de velocidade de crescimento muito próximos do meio controlo e produtividade superiores. As taxas de crescimento obtidas foram superiores nos ensaios realizados sob condições controladas. Pelo contrário, as produtividades em biomassa em reatores painel plano (PP) foram mais altas. A produção de lípidos totais e o perfil em ácidos gordos apresentaram-se muito semelhante entre todos os meios. No entanto, é de ressaltar o facto de que a produção de PUFA (ácidos gordos polinsaturados) e EPA (ácido eicosapentaenóico) foi favorecida nos meios alternativos, comparativamente ao controlo. O meio com soro de queijo possibilitou uma percentagem de PUFA e de EPA de 50 % e 35 %, respetivamente. O meio alternativo formulado com efluente salino e meio Algafarm inorgânico foi o que mais favoreceu a produção da espécie, no entanto o meio com soro de queijo possibilitou percentagens mais elevadas dos principais ácidos gordos (PUFA e EPA).

Em suma, este trabalho apresenta alguns resultados quanto à integração de resíduos agroindustriais em meios de cultivo utilizados na produção de biomassa de microalgas.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Resíduos agroindustriais; Produção baixo custo; Crescimento; *Chlorella vulgaris*; *Nannochloropsis oceanica*;

## ABSTRACT

Nowadays, problems associated to growing world population, environmental pollution and search for renewable energy lead to exploration of sustainable alternative sources that can meet the existing human needs. In this sense, the production of microalgae biomass has been demonstrating a high biotechnological potential due to the numerous applications it presents. These microorganisms are capable of producing several high-value molecules, sources of energy such as biodiesel and greenhouse gas fixation. However, the costs of its cultivation must be reduced to become a perfectly achievable reality. Thus, appears the present study that has as main objective the production of low-cost microalgae biomass through the formulation of culture media from agroindustrial waste. The formulation of these means not only allows an efficient reduction of production costs, as well as the reuse of waste which, mostly, are not properly routed.

In a first phase of the present project a *screening* was done to different alternative means, where the residues were used: liquid soluble molasses condensate (CMS), CMS prills, cheese whey, dairy industry washing water and sugar from tobacco. In the second phase, three major residues were chosen, from which a more detailed study was carried out regarding their use in microalgae culture media.

In this second phase, which includes the main results of this project, the growth and biochemical profile of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oceanica* were studied. Experiments were conducted indoors in 2 L reactors, under controlled and pre-defined culture conditions, and outdoors in 50 L reactors (flat panel reactors), in conditions dependent on the external environment. Culture media were formulated with the residues: cheese whey, sugar from tobacco and saline effluent from the cod industry.

In the growth of the freshwater microalgae (*Chlorella vulgaris*), tested in media with cheese whey and sugar from tobacco, higher values of growth rate were obtained under controlled conditions and in alternative means. The medium with cheese whey was the one with the highest average growth rate ( $0.52 \text{ d}^{-1}$ ). On the contrary, the trials in flat panel the controlled media registered rates of growth and higher productivities. Also, under these conditions, the semi-continuous growth regime presented better results, originating, therefore, superior concentrations in biomass when compared to the discontinuous regime. The medium with sugar reached a maximum productivity of  $0.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , highest value among alternative means under external conditions. Concerning to the biochemical characterization, the percentage of

maximum protein obtained was 17.82 %, in media with cheese whey. This value was much lower compared to the percentage obtained in control media (36.12 %). As for chlorophyll production (*a* and *b*), the results showed lower concentrations in biomass grown in alternative media. Between the means tested, the cultivation with tobacco sugar showed better results in the production of this microalgae, however the production of compounds was not favored for any of the media tested.

The marine microalgae (*Nannochloropsis oceanica*), tested in media with saline effluent plus inorganic Algafarm and saline effluent plus cheese whey, was able to achieve a growth rate equal to 0.21 d<sup>-1</sup> and a productivity of 0.16 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, obtained in media with saline effluent plus inorganic Algafarm media. The two media tested reached growth rate values very close to the control medium and higher productivity. The growth rates obtained were higher in the tests carried out under controlled conditions. On the other hand, biomass productivities in flat panel were higher. The production of total lipids and the fatty acids profile are very similar among all means. However, it is important to note that the production of PUFA (polyunsaturated fatty acid) and EPA (eicosapentaenoic acid) was favored in alternative means, compared to control. The media with cheese whey allowed a percentage of PUFA and EPA of 50 % and 30 % respectively. The alternative media formulated with saline effluent and inorganic Algafarm media was the one that favored the production of the species, however the media with cheese serum allowed higher percentages of the main fatty acids (PUFA and EPA).

In short, this paper presents some results to the integration of agroindustrial waste in culture media used in the production of microalgae biomass.

## KEYWORDS

Agroindustrial waste; Low cost production; Growth; *Chlorella vulgaris*; *Nannochloropsis oceanica*

## ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract .....	vii
Índice de Figuras .....	xi
Índice de Tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos .....	xv
1. Contextualização.....	1
1.1 Enquadramento.....	1
1.2 Secil / Algafarm.....	2
1.3 Objetivos.....	4
1.4 Organização da dissertação .....	4
2. Fundamentação teórica .....	5
2.1 Microalgas .....	5
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i> .....	6
2.1.2 <i>Nannochloropsis oceanica</i> .....	7
2.2 Cultivo de microalgas.....	8
2.2.1 Condições de crescimento.....	8
2.2.2 Tecnologias de cultivo .....	12
2.3 Meios de cultivo – utilização de resíduos agroindustriais.....	15
2.4 Interesse biotecnológico .....	18
3. Materiais e métodos .....	21
3.1 Microalgas e inóculo .....	22
3.2 Reatores .....	23
3.3 Meios alternativos.....	23
3.4 Métodos analíticos.....	24
3.5 Avaliação do crescimento.....	25
3.6 Análise bioquímica .....	25
3.7 Análise estatística .....	27
4. Resultados e discussão.....	29
4.1 <i>Screening</i> resíduos agroindustriais .....	29

4.1.1	Caracterização elementar dos resíduos .....	29
4.1.2	Avaliação do crescimento à escala laboratorial .....	31
4.2	Principais resíduos .....	36
4.2.1	Avaliação do crescimento .....	36
4.2.2	Caracterização bioquímica .....	47
5.	Conclusões e recomendações.....	55
	Referências Bibliográficas .....	57
	Anexo I – Retas de calibração.....	A
	Anexo II – Gráficos auxiliares .....	D

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vista aérea da unidade de produção de microalgas, Algafarm.....	3
<b>Figura 2.</b> Imagens microscópicas de <i>C. vulgaris</i> (Fonte: Ponnuswamy, <i>et al.</i> , 2013).....	6
<b>Figura 3.</b> Imagens microscópicas de <i>N. oceanica</i> (Fonte: Zhang <i>et al.</i> , 2016).....	8
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática de um <i>raceway</i> (adaptado de Chisti, 2007). ....	13
<b>Figura 5.</b> Representações esquemáticas dos diferentes tipos de reatores em sistema fechado: (a) Reatores tubulares helicoidais; (b) reatores tubulares horizontais; (c) reatores tubulares verticais; (d) reatores de placa plana; (e) reatores tubulares em forma $\alpha$ (adaptado de Carvalho <i>et al.</i> , (2006)). ....	14
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do reator tipo fermentador (Carvalho <i>et al.</i> , (2006)). .	15
<b>Figura 7.</b> Culturas em reatores de 5 L. ....	22
<b>Figura 8.</b> Diferentes reatores de crescimento de culturas: (a) reatores de 2 L (balões de vidro); (b) reatores de 50 L (PP). ....	23
<b>Figura 9.</b> Alguns passos do método da determinação dos lípidos totais: (a) vasos com as amostras secas; (b) lípidos extraídos com separação de fases após centrifugação.....	26
<b>Figura 10.</b> Alguns passos do método da determinação de ácidos gordos: (a) vasos de reação com mistura aquecida em banho-maria; (b) amostras antes de serem tratadas com sulfato de sódio anidro; (c) placa automatizada do cromatógrafo. ....	27
<b>Figura 11.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>C. vulgaris</i> perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: CMS líquido e CMS prills, e meio controlo. ....	31
<b>Figura 12.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>N. oceanica</i> perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: CMS líquido e CMS prills, e meio controlo. ....	32
<b>Figura 13.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>C. vulgaris</i> perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: açúcar Tabaqueira, soro queijo e água de lavagem, a diferentes concentrações, e meio controlo. ....	33
<b>Figura 14.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>N. oceanica</i> perante a utilização dos meios alternativos com os resíduos: açúcar Tabaqueira, soro queijo e água de lavagem, a diferentes concentrações, e meio controlo. ....	34
<b>Figura 15.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>C. vulgaris</i> , em reatores de 2 L, perante a utilização de meios de cultivo com os resíduos: açúcar da Tabaqueira e soro de queijo, e meio controlo.....	37

<b>Figura 18.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>N. oceanica</i> , em reatores de 2 L, perante a utilização de meios de cultivo com efluente salino e soro de queijo. ....	42
<b>Figura 19.</b> Curvas de crescimento da microalga <i>N. oceanica</i> , em reatores de 50 L, perante a utilização de meios de cultivo com efluente salino e soro de queijo. ....	43
<b>Figura 20.</b> Valores de proteína, em biomassa de <i>C. vulgaris</i> , de acordo o meio utilizado e a fase de desenvolvimento. ....	48
<b>Figura 21.</b> Valores de concentração de clorofila a, em biomassa de <i>C. vulgaris</i> , de acordo com o meio de cultivo e a fase de desenvolvimento. ....	49
<b>Figura 22.</b> Valores de concentração de clorofila b, em biomassa de <i>C. vulgaris</i> , de acordo com o meio de cultivo e a fase de desenvolvimento. ....	50
<b>Figura 23.</b> Valores de lípidos totais, em biomassa de <i>N. oceanica</i> , de acordo com o meio utilizado e a fase de desenvolvimento. ....	51

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fatores que influenciam o crescimento de microalgas (adaptado de Larsdotter (2006)) .....	10
<b>Tabela 2.</b> Aplicações de microalgas (Adaptado de: Priyadarshani & Rath (2012)).....	19
<b>Tabela 3.</b> Caracterização elementar do meio Algafarm inorgânico (meio controle) .....	22
<b>Tabela 4.</b> Caracterização elementar dos diferentes resíduos utilizados na formulação dos meios .....	29
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros de avaliação de crescimento, da microalga <i>C. vulgaris</i> , para cada ensaio .....	40
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros de avaliação de crescimento, da microalga <i>N. oceanica</i> , para cada ensaio .....	45
<b>Tabela 7.</b> Perfil e percentagem de ácidos gordos em biomassa cultivada em meio alternativo com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico e meio controle .....	52
<b>Tabela 8.</b> Perfil e percentagem de ácidos gordos em biomassa cultivada em meio alternativo com efluente salino mais soro de queijo e meio controle .....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

AA	Ácido araquidónico
<i>Abs</i>	Absorvância
ANOVA	Análise de variância
<i>C</i>	Concentração
CMS	Condensado de melação solúvel
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ES + MAI	Efluente salino + Meio Algafarm Inorgânico
ES + SQ	Efluente salino + Soro Queijo
<i>f</i>	Instante final
FAME	Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FAO	Organização para Alimentação e Agricultura
<i>i</i>	Instante <i>i</i>
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PP	Reator de painel plano
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
$P_x$	Produtividade volumétrica de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )
SFA	Ácidos gordos saturados
<i>t</i>	Tempo (d)
<i>X</i>	Concentração em biomassa (g/L)
$\mu_{\text{média}}$	Taxa média de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ )



# 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

## 1.1 Enquadramento

Atualmente, estudos científicos sobre o cultivo de microalgas apresentam dois principais propósitos, um dos quais produzir produtos de alto valor acrescentado, sendo que a procura de alimentos saudáveis para humanos, assim como alimentos para animais, cosméticos e produtos farmacêuticos, levam a uma procura de fontes sustentáveis de tais produtos. Por outro lado, a despoluição ambiental, uma vez que o aumento da procura de energias renováveis e graves problemas de poluição necessitam de uma intervenção urgente (Ting, *et al.*, 2017). Assim, antecipando problemas como a escassez de fonte de proteína, devido ao aumento da população mundial com elevados padrões de vida, e a elevada poluição atmosférica, a crescente exploração de fontes alternativas sustentáveis e não convencionais deseja satisfazer as exigentes necessidades do ser humano.

O cultivo de microalgas em grande escala, de forma vantajosa e viável, demonstra elevado potencial devido às inúmeras e diversas aplicações que apresenta. A biomassa proveniente do cultivo de microalgas permite a produção de diversos compostos, como proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, minerais, lípidos, entre outros. Estes compostos possibilitam uma interação bastante próxima com a indústria alimentar para a criação de novos produtos alimentares com elevado valor nutricional, e a viabilização de um recurso como nova fonte de proteína. Outras aplicações passam pelo ramo químico, onde se salienta a produção de cosméticos, a agricultura e o potencial terapêutico, que foi demonstrado em todas as classes de microalgas, que possuem propriedades antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas (Richmond, 2004). A nível ambiental, as microalgas apresentam potencial na produção de energias renováveis, mas também na biorremediação de poluição, nomeadamente no tratamento de efluentes e mitigação de CO<sub>2</sub> (Richmond, 2004).

O cultivo de microalgas para a alimentação humana realiza-se há vários anos, onde povos nativos do Chade, África, e do lago Texcoco, no México, já se alimentavam através de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. (Barsanti & Gualtieri, 2006). Atualmente, em alguns países, várias espécies são cultivadas comercialmente, para utilizar a biomassa produzida como fonte de produtos para a indústria alimentar. Em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia, a utilização de microalgas em massas, pães, iogurtes e bebidas, apresenta um desenvolvimento acelerado (Barsanti & Gualtieri, 2006). As principais microalgas cultivadas

pertencem aos géneros *Chlorella*, *Arthrospira*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (Derner, *et al.*, 2006).

A produção industrial autotrófica de biomassa de microalgas tem sido amplamente desenvolvida nas últimas décadas, existindo dois principais tipos de sistemas: abertos e fechados. O cultivo em sistemas abertos (ex.: *raceways*, tanques e lagoas) de biomassa fotoautotrófica apresenta uma baixa eficiência fotossintética e elevada possibilidade de ocorrer contaminação, resultando, por isso, em baixos rendimentos. No entanto, os custos de capital e operacional destes sistemas são bastante mais reduzidos do que os verificados em sistemas fechados. A produção de microalgas em sistemas fechados (fotobiorreatores), proporciona diversas vantagens, nomeadamente em termos ambientais, como a redução local das emissões de carbono e azoto, mas também ao nível da produtividade de biomassa que é bastante superior nestes sistemas. Contudo, a principal desvantagem são os elevados custos associados a este tipo de sistemas (Larsdotter, 2006). De igual modo, o uso de sistemas de algas com o único propósito de produção de energia industrial apresenta-se como irrealista, uma vez que tecnologias como sistemas fotovoltaicos e eólicos encontram-se mais próximos da realidade económica atual (Richmond, 2004).

A utilização de resíduos agroindustriais no cultivo de microalgas é uma área emergente, com elevado potencial para a diminuição dos custos de produção de microalgas. Partindo do facto de que a geração de resíduos na indústria apresenta-se como um problema cada vez maior, onde muitos deles não são encaminhados de forma adequada, a sua reutilização possui enorme potencial noutros processos industriais. O cultivo de microalgas permite a utilização de resíduos industriais, uma vez que alguns desses resíduos são ricos em matéria orgânica e podem ser utilizados como fonte de nutrientes. A formulação de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais apresenta custos mínimos, onde a logística e o transporte desses resíduos apresentam o maior gasto. Alguns dos resíduos que podem ser utilizados são os efluentes provenientes de atividades industriais como processamento de carnes, resíduos da indústria de laticínios, da produção de cana de açúcar e de curtumes (Ortenzo, *et al.*, 2015).

## 1.2 Secil / Algafarm

Inaugurada em 1930, a Secil, grupo empresarial que produz e comercializa cimento, betão, argamassas, entre outros, opera atualmente em três fábricas em Portugal e no exterior, marcando presença em sete países e quatro continentes, o que permite uma capacidade anual de produção superior a 9 milhões de toneladas. Para além do seu foco principal, a produção e

comercialização de cimento, o desenvolvimento de soluções para a preservação do ambiente e a utilização de resíduos como fonte de energia, apresentam-se como áreas complementares com elevada importância para o grupo, integrando, por isso, empresas que operam nessas áreas (A Secil, 2016)

A 25 de outubro de 2016, o grupo Secil inaugurou uma unidade de produção de microalgas, de seu nome Algafarm, na qual é possível a redução de CO<sub>2</sub> proveniente da produção de cimento (objetivo primordial, de modo a cumprir as metas propostas pela comissão europeia para a redução das emissões de gases com efeito de estufa) e a comercialização de microalgas para fins industriais, cosmética, substituição de combustíveis fósseis e alimentação humana e animal (Secil, 2016; Silva, 2016; Silva, *et al.*, 2017). Esta unidade opera em sistemas de produção fechados, em regime autotrófico e heterotrófico, onde existe uma interação entre os vários sistemas de produção, com o fim de otimizar a produção a escalas cada vez maiores e o aumento da produtividade destes organismos (Ambiente Magazine, 2016).



**Figura 1.** Vista aérea da unidade de produção de microalgas, Algafarm.

Sendo um dos maiores projetos de biotecnologia em Portugal, existe a possibilidade de colaboração com universidades, o que torna viável o desenvolvimento de trabalhos académicos, através dos quais são gerados novos produtos com elevado valor de mercado, garantindo, assim, a competitividade do grupo Secil de uma forma sustentável (Secil, 2016).

O trabalho proposto para esta dissertação foi desenvolvido na unidade de produção de microalgas (Algafarm), localizada em Pataias, no concelho de Alcobaça (Figura 1).

### 1.3 Objetivos

O desenvolvimento da presente dissertação teve como principal objetivo o estudo de diferentes fontes de nutrientes, em concreto substratos orgânicos provenientes de resíduos agroindústrias, para a produção de biomassa de microalgas a baixo custo. Para isso, foram utilizados diferentes resíduos (CMS líquido, CMS prills, açúcar da Tabaqueira, soro de queijo, água de lavagem da indústria de laticínios e efluente salino da indústria do bacalhau) na formulação do meio de cultivo.

Os ensaios realizados tiveram como objetivo avaliar o crescimento, a produtividade volumétrica e os constituintes bioquímicos de interesse comercial (proteínas, pigmentos, lípidos totais e ácidos gordos) das microalgas *C. vulgaris* e *N. oceanica*. Todos estes parâmetros foram avaliados e comparados ao meio tradicionalmente utilizado.

### 1.4 Organização da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em cinco capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma contextualização, onde é exposto um enquadramento ao tema desenvolvido, uma visão sobre o grupo Secil/Algafarm, os principais objetivos do trabalho e a estrutura do presente documento.

O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica. As microalgas, características gerais e das espécies *C. vulgaris* e *N. oceanica*; o cultivo destes microrganismos, as condições de crescimento e as tecnologias de cultivo; os meios de cultivo utilizando resíduos agroindustriais e o interesse biotecnológico são temas abordados e revistos neste capítulo.

O Capítulo 3 descreve os materiais e metodologias utilizadas na avaliação do crescimento das microalgas. Descrevem-se os ensaios realizados, apresentando os parâmetros e meios de cultura, as espécies utilizadas e as condições aplicadas. São indicados os métodos analíticos e equações utilizados na avaliação do crescimento dos organismos. Apresenta-se a metodologia utilizada na caracterização bioquímica da biomassa e na avaliação estatística.

O Capítulo 4 expõe os resultados obtidos na avaliação do crescimento das espécies perante a utilização de meios alternativos. Os resultados dos diferentes ensaios são discutidos ao longo da apresentação dos mesmos.

Por último, o Capítulo 5 apresenta as principais conclusões obtidas durante a realização do presente estudo. Algumas recomendações são também apresentadas.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Microalgas

Qualquer organismo com clorofila *a* e talo não diferenciado em raízes, caule e folhas é considerado como sendo uma alga (Barsanti & Gualtieri, 2006). Existe uma forte semelhança morfológica entre algumas plantas e algas, no entanto as primeiras mostram um grau de diferenciação bastante alto, com raízes, folhas e rede vascular, enquanto as algas não apresentam essas características apesar de mostrarem especialização e diferenciação das suas células vegetativas (Richmond, 2004).

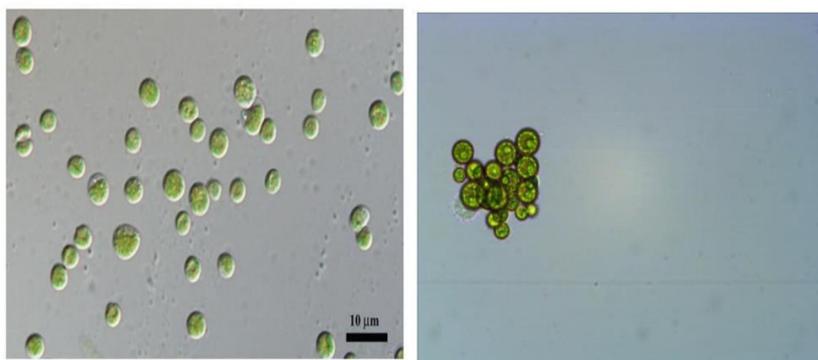
Assim, o termo microalga refere-se a algas microscópicas e bactérias fotossintéticas oxigenadas, as cianobactérias (Richmond, 2004). São microrganismos fotossintéticos eucariotas e procariotas (cianobactérias), capazes de produzir hidratos de carbono, proteínas e lípidos em resultado da fotossíntese que realizam. Devido à sua estrutura unicelular ou multicelular simples, conseguem crescer rapidamente, viver em condições rigorosas e, embora sejam de vida livre, um determinado número de microalgas vive em associação simbiótica com uma variedade de outros microrganismos. Encontram-se em todos os ecossistemas terrestres existentes, mais comumente na água, seja água doce ou marinha (Lee, 2008). Apresentam tolerância para uma ampla gama de pH, temperatura, turbidez e concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, representando, por isso, uma grande variedade de espécies que vivem numa ampla gama de condições ambientais (Barsanti & Gualtieri, 2006). Funcionam, na maioria dos habitats, como fonte básica de alimentos para a cadeia alimentar, produzindo material orgânico a partir da luz solar, CO<sub>2</sub> e água. São hábeis a fixar CO<sub>2</sub> utilizando energia solar, requerendo o mínimo de recursos para sobreviver e, para manter as suas estruturas, utilizam diferentes metabolismos energéticos, tais como a fotossíntese, respiração e fixação/assimilação de azoto, sendo, por isso, considerados organismos com elevado potencial biotecnológico (Ortenzo, *et al.*, 2015; Schmitz, *et al.*, 2012). Algumas espécies de microalgas apresentam a capacidade de utilizar diferentes vias metabólicas: foto-autotrofia, heterotrofia, foto-heterotrofia e mixotrofia (descritos na secção 2.2.1).

Estima-se a existência de mais de 100 000 espécies diferentes de microalgas, encontrando-se divididas em várias classes, as quais são distinguidas principalmente pela pigmentação, ciclo de vida e estrutura básica celular. As três classes mais importantes em

termos de abundância são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas verdes (*Chlorophyceae*) e as algas douradas (*Chrysophyceae*) (Dermibas & Dermibas, 2009; Schmitz, *et al.*, 2012).

### 2.1.1 *Chlorella vulgaris*

A microalga verde eucariótica unicelular da espécie *C. vulgaris* (Figura 2), foi descoberta pela primeira vez em 1890 por Martinus Willem Beijerinck. Presente na Terra desde o período pré-Cambriano, há 2,5 milhões de anos, foi no início dos anos 1900 que atraiu a atenção como fonte de alimento não convencional devido ao seu teor de proteína. Já em 1970 a substância  $\beta$ -1,3-glucano foi descoberta na célula de *C. vulgaris*, a qual é importante para a saúde humana, uma vez que é um imunostimulador ativo e apresenta como funções a eliminação de radicais livres e a redução de lípidos no sangue (Richmond, 2004; Safi, *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Imagens microscópicas de *C. vulgaris* (Fonte: Ponnuswamy, *et al.*, 2013).

*C. vulgaris*, microalga microscópica esférica com um diâmetro entre 2 e 10  $\mu\text{m}$ , apresenta vários elementos estruturais semelhantes às plantas. É uma célula reprodutiva não móvel que se reproduz rápida e assexuadamente, não produzindo zoósporos. As células apresentam uma parede celular fina e a acumulação de amido ocorre dentro do cloroplasto. São encontradas em todos os habitats de água, tendo sido isoladas quer de habitats de água doce quer de habitats marinhos. Em relação às condições de cultivo, *C. vulgaris* é capaz de crescer em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas, apresentando um pH e uma temperatura ótima entre 7 e 8 e entre 25 °C e os 27 °C, respetivamente, uma elevada taxa de crescimento e uma elevada quantidade de lípidos e polissacarídeos produzidos (Bodnar, *et al.*, 2016; Richmond, 2004; Safi, *et al.*, 2014).

Estas minúsculas algas solitárias e de propagação simples correspondem a um organismo modelo experimental perfeito. As culturas de *C. vulgaris* são fáceis de manusear e exibem performances previsíveis de crescimento. Devido à sua versatilidade nos sistemas de cultivo, esta espécie apresenta-se como importante para diversas aplicações biotecnológicas. Extratos

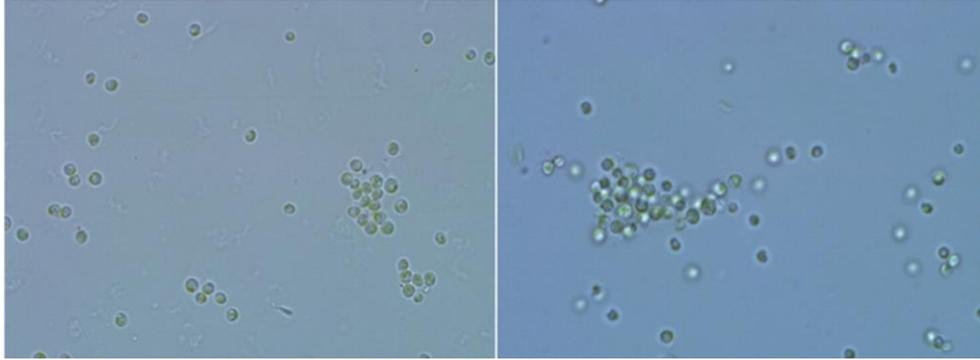
da mesma são utilizados para tratamentos médicos, devido às suas propriedades imunomoduladoras, anticancerígenas e de proteção contra doenças relacionadas com a idade, como doenças cardiovasculares e hipertensão (Krienitz, *et al.*, 2015; Safi, *et al.*, 2014). Apresenta como potenciais interesses a sua aplicação para biocombustíveis, nutrição humana, alimentação animal, tratamento de água poluída e aplicações agroquímicas. Existem inúmeras espécies pertencentes ao género *Chlorella*, no entanto apenas *C. vulgaris* é oficialmente reconhecida como segura para a nutrição humana na Europa. Assim, atualmente, esta estirpe é cultivada e comercializada para a indústria alimentar, em particular para uma alimentação saudável, sendo classificada como pertencente a um dos géneros mais importante (Richmond, 2004; Safi, *et al.*, 2014).

De acordo com a sua classificação científica, esta microalga pertence ao reino Plantae, ao filo Chlorophyta, à classe Trebouxiophyceae, à ordem Chlorellales, à família Chlorellaceae e ao género *Chlorella* (Safi, *et al.*, 2014).

#### 2.1.2 *Nannochloropsis oceanica*

Caraterizada por uma morfologia extremamente simples, a microalga *N. oceanica* (Figura 3) tem sido amplamente investigada e produzida devido à sua alta taxa de crescimento, alto teor lipídico e forte resistência à contaminação biótica (Suda, *et al.*, 2002; Zhang, *et al.*, 2016). Espécies pertencentes ao género *Nannochloropsis* são, também, capazes de produzir alto teor de ácido eicosapentaenóico (EPA), pelo que são bastante utilizadas na aquacultura e prometem ser uma fonte eficiente de EPA para a nutrição humana (Pal, *et al.*, 2013).

Sendo uma estirpe que habita, normalmente, águas costeiras e estuários, possui mecanismos de resposta rápida de forma a resistir às misturas de água doce e salgada. Esta necessidade de lidar com as flutuações de salinidade e as condições osmóticas permite uma plasticidade metabólica e uma rápida adaptação à osmolaridade variável, o que possibilita a produção de diferentes compostos osmorreguladores. Do ponto de vista biotecnológico, esta tolerância perante diferentes condições osmóticas apresenta-se como uma característica importante para o cultivo em reatores abertos (ex.: *raceways*) onde a precipitação ou a evaporação podem alterar as condições osmóticas do meio. Provas experimentais indicam que estas microalgas são capazes de lidar com variações severas das condições de crescimento, tal como a salinidade, a deficiência de nutrientes, a intensidade luminosa e o cultivo em diferentes tipos de instalações (Pal, *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Imagens microscópicas de *N. oceanica* (Fonte: Zhang *et al.*, 2016).

Espécies do género *Nannochloropsis* apresentam importantes aplicações biotecnológicas, como por exemplo, a produção de lípidos, o que permite que sejam uma fonte promissora destes compostos e elevam o seu potencial como matéria-prima industrial (Pal, *et al.*, 2013; Vieler, *et al.*, 2017).

A comunidade científica classifica esta microalga como pertencente ao reino Chromista, ao filo Ochrophyta, à classe Eustigmatophyceae, à ordem Eustigmatales, à família Monodopsidaceae e ao género *Nannochloropsis* (AlgaeBase, 2002).

## 2.2 Cultivo de microalgas

### 2.2.1 Condições de crescimento

As características de crescimento e composição das microalgas dependem, de forma significativa, das condições de cultivo, que condicionam a via metabólica utilizada. Dependendo da fonte de energia e de carbono, existem quatro principais tipos de metabolismo (Chen, *et al.*, 2011):

- Foto-autotrófico: as microalgas utilizam luz como fonte de energia e carbono inorgânico (ex.: CO<sub>2</sub>) como fonte de carbono para gerar energia química através da fotossíntese.
- Heterotrófico: algumas espécies de microalgas, para além de crescerem sob condições fototróficas, são capazes de utilizar carbono orgânico como fonte de energia e de carbono em condições de pouca luz, tal como as bactérias.
- Foto-heterotrófico: as microalgas requerem luz como fonte de energia quando utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono. Assim, o cultivo heterotrófico necessita de açúcar e luz ao mesmo tempo.

- **Mixotrófico:** as microalgas fazem fotossíntese e usam compostos orgânicos e carbono inorgânico como fonte de carbono, isto é, são capazes de viver sob condições autotróficas ou heterotróficas, ou ambas. Assim, as microalgas assimilam compostos orgânicos e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono, sendo que o CO<sub>2</sub> libertado via respiração será reutilizado sob cultivo foto-autotrófico.

Apesar da baixa produtividade em biomassa e crescimento lento das células, o cultivo foto-autotrófico é atualmente o mais utilizado na indústria, devido principalmente à facilidade de aumento de escala das culturas, os menores custos associados e a prometedora absorção de CO<sub>2</sub> atmosférico ou efluentes gasosos de indústrias altamente poluidoras localizadas nas proximidades. Por outro lado, o cultivo heterotrófico permite elevadas produtividades em biomassa quando comparado com outras condições. No entanto, este tipo de cultivo é facilmente contaminado, causando problemas na produção em grande escala e, além disso, o custo de uma fonte de carbono orgânico apresenta-se como uma desvantagem do ponto de vista comercial. Quanto ao metabolismo mixotrófico, os cultivos em sistemas abertos estão sujeitos a contaminações, mas possuem produtividades quer no período diurno (metabolismo foto-autotrófico) quer no período noturno (metabolismo heterotrófico). Adicionalmente, permitem evitar problemas associados à sombra devido a elevadas densidades celulares em fotobiorreatores (Chen, *et al.*, 2011).

Para além do referido, existem, ainda, variados fatores ou condições que influenciam o crescimento das microalgas. De acordo com Larsdotter (2006), fatores abióticos, físicos e químicos, bióticos e operacionais influenciam a taxa de crescimento das microalgas (Tabela1).

Segundo Barsanti e Gualtieri (2006), os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento de microalgas são a intensidade luminosa e fotoperíodo, temperatura, concentração de nutrientes, pH, salinidade e mistura. No entanto, é importante ressaltar o facto de os parâmetros ideais, assim como os intervalos tolerados, serem específicos da espécie e os fatores poderem ser interdependentes, isto é, um parâmetro ideal para um conjunto de condições não o ser necessariamente ideal para outro.

Sendo a luz a fonte de energia capaz de impulsionar as reações fotossintéticas das microalgas, a intensidade, a qualidade espectral e o fotoperíodo são aspetos fundamentais. A intensidade da luz desempenha um papel importante, no entanto varia muito com a profundidade e densidade da cultura. Microalgas nas partes mais profundas de um reator e culturas muito densas, limitam a quantidade de luz que estes microrganismos conseguem

absorver, uma vez que a água absorve a radiação fotossinteticamente ativa e a densidade de biomassa diminui a disponibilidade de luz devido ao sombreamento interno.

*Tabela 1. Fatores que influenciam o crescimento de microalgas (adaptado de Larsdotter (2006))*

<b>Fatores</b>	
Abióticos, físicos e químicos	Intensidade luminosa e fotoperíodo Temperatura Concentração de nutrientes, O <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> pH Salinidade Substâncias inibidoras
Bióticos	Patogénicos (bactérias, fungos, vírus) Predação pelo zooplâncton Competição entre espécies
Operacionais	Mistura Taxa de diluição Profundidade Adição de bicarbonato Frequência de colheita

Para evitar isso, é importante aumentar a intensidade da luz, para que seja possível a sua penetração através da cultura, e uma boa mistura para que todas as células sejam expostas à mesma. No entanto, a luz também pode causar uma redução da eficácia fotossintética, isto é, fotoinibição e, por isso, é importante que a intensidade da luz não seja muito alta e que seja assegurada uma boa mistura (Barsanti & Gualtieri, 2006; Larsdotter, 2006). Gonçalves *et al.* (2014) avaliaram o efeito da intensidade da luz e a razão da luz/escuridão no crescimento de microalgas, captação atmosférica de CO<sub>2</sub> e remoção de nutrientes (azoto e fósforo) em quatro diferentes espécies (*C. vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechocystis salina* e *Microcystis aeruginosa*), mostrando que valores mais altos de intensidade e períodos de luz resultaram em maiores taxas de crescimento e absorção de CO<sub>2</sub>. Em relação à remoção de nutrientes, as espécies apresentaram alta eficiência na remoção de azoto em culturas com maior suprimento de luz, enquanto que a remoção de fósforo aumentou com a intensidade da luz e a razão luz/escuridão.

Relativamente ao efeito da temperatura, o crescimento das microalgas é favorecido com o aumento deste parâmetro até que uma temperatura ótima seja alcançada. Na maioria das espécies a temperatura ronda os 15 e os 25 °C. O sobreaquecimento leva a um rápido declínio

na taxa de crescimento, no entanto a baixas temperaturas as microalgas são facilmente fotoinibidas por elevadas intensidades de luz (Larsdotter, 2006). Martinez *et al.* (2000) estudaram o efeito da temperatura na remoção de azoto e fósforo de efluentes urbanos no cultivo da microalga *Scenedesmus obliquus*. Esta apresentou maior taxa de crescimento a 30 °C, no entanto a produtividade em biomassa foi mais elevada a 25 °C.

O crescimento de microalgas também pode ser afetado pelo pH e, na maioria das espécies, o valor do mesmo situa-se entre 7 e 9. Geralmente, o valor deste parâmetro aumenta devido à assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub>. O valor de pH do meio afeta a disponibilidade de carbono inorgânico. A assimilação de iões nitrato tendem a elevar o pH, no entanto no caso de a fonte de azoto ser a amónia o pH pode diminuir. O pH elevado pode, também, induzir a floculação de algumas espécies, o que leva a uma redução de crescimento e da absorção de nutrientes. A mistura promove a troca gasosa entre a água e o ar, permitindo evitar valores extremos de pH e, assim, regular os valores do mesmo (Barsanti & Gualtieri, 2006; Larsdotter, 2006). Taraldsvik e Mykkestad (2010), estudaram o cultivo da diatomácea *Skeletonema costatum* em diferentes valores de pH. O estudo permitiu verificar que o crescimento da espécie manteve-se praticamente constante para valores de pH entre 6,5 e 8,5 e um declínio acentuado para valores superiores a 9. Este declínio pode ser causado pela diminuição de algumas reações bioquímicas importantes, bem como uma mudança nas propriedades da membrana celular.

Igualmente importante para o crescimento das microalgas é a mistura: esta permite evitar a sedimentação dos microrganismos, garantir que todas as células da população sejam igualmente expostas à luz e aos nutrientes, evitar a estratificação térmica e melhorar as trocas gasosas entre o meio de cultura e o ar, aspeto este de importância primordial uma vez que o ar contém a fonte de carbono para a fotossíntese. De ressaltar que nas células marinhas raramente existe turbulência e, por isso, a mistura deve ser suave (Barsanti & Gualtieri, 2006). O efeito da mistura foi, também, estudado por Martinez *et al.* (2000), sendo promovida de duas formas distintas: por injeção de ar (AR) e por injeção de ar em conjunto com agitação magnética (AR+AM). Do mesmo estudo concluiu-se que a mistura promovida pelo conjunto AR+AM foi mais favorável ao crescimento da microalga, aumentando a produtividade em biomassa.

Para um crescimento efetivo é necessário assegurar os nutrientes essenciais no meio de cultura, nutrientes esses que devem estar nas proporções de acordo com a fórmula estequiométrica para os elementos mais comuns numa célula de microalgas (C<sub>106</sub>H<sub>181</sub>O<sub>45</sub>N<sub>16</sub>P). Geralmente, os efluentes possuem altas concentrações de nutrientes quando comparadas com as condições naturais e, por isso, o crescimento é sobretudo limitado pelo carbono e pela luz.

O carbono, sendo o nutriente mais importante para as microalgas, é assimilado na forma inorgânica durante a fotossíntese. Normalmente, as microalgas utilizam, como carbono inorgânico, o  $\text{CO}_2$  e o  $\text{HCO}_3^-$ . No entanto, algumas espécies são capazes de utilizar fontes de carbono orgânicas (ácidos orgânicos, açúcares, acetato ou glicerol), optando pelo metabolismo heterotrófico. Adicionalmente, o azoto é o segundo nutriente mais importante para as microalgas, sendo o amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) os compostos azotados mais assimilados por estes microrganismos. Algumas microalgas conseguem absorver azoto além das necessidades metabólicas imediatas, sendo utilizado mais tarde no caso de falta deste nutriente. Este elemento influencia diretamente o fornecimento de aminoácidos, o que, por sua vez, limita a tradução do mRNA, reduzindo a taxa de síntese proteica. Outro macronutriente essencial é o fósforo, que é absorvido como ortofosfato inorgânico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Barsanti & Gualtieri, 2006). Tal como o azoto, também o fósforo pode ser assimilado em excesso, servindo como reserva suficiente para um crescimento prolongado na ausência de fosfato disponível. No caso do fósforo, ocorre uma limitação da síntese de ácidos nucleicos, o que implica uma limitação na replicação do genoma. Outros nutrientes são, também, importantes para o crescimento das microalgas. Tal como o azoto e o fósforo, que são macronutrientes, também o enxofre, o potássio, o cálcio e o magnésio devem fazer parte da composição do meio. Os micronutrientes, que são necessários em menores quantidades, são o manganês, o molibdênio, o cobre, o ferro, o zinco, o boro, o cloreto e o níquel. Estes últimos são, frequentemente, adicionados juntamente com um agente quelante (ex.: EDTA) de forma a evitar a limitação do crescimento por micronutrientes, uma vez que evita a sua precipitação, tornando-os disponíveis para absorção (Larsdotter, 2006).

De todos os fatores referidos, é importante ressaltar o facto de fatores como a intensidade da luz e a temperatura não serem fáceis de controlar em condições externas. Por isso, espécies robustas que sejam capazes de suportar uma ampla gama de temperatura e intensidade de luz são essenciais e relevantes em diversos estudos.

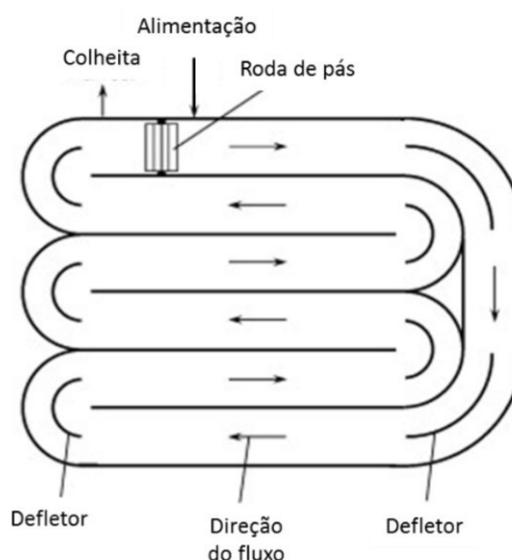
### 2.2.2 Tecnologias de cultivo

O cultivo das microalgas pode ser classificado quer pela via metabólica que permite o seu crescimento (descrita na secção 2.2.1) mas também pela tecnologia usada. Existem culturas suspensas e imobilizadas. No caso de culturas suspensas existem sistemas abertos, sistemas fechados e sistemas híbridos, sendo este último uma combinação dos anteriores. Nas culturas imobilizadas, as microalgas são fixadas em meio sólido, mas a troca de substratos e de produtos

é possível pelos poros do material, o qual pode ser sintético (ex.: poliuretano) ou natural (ex.: agar) (Cai, *et al.*, 2013; Larsdotter, 2006).

Os sistemas abertos dependem, em grande parte, de fatores externos, têm contacto com o ar livre e são mais simples de construir e operar, sendo preferidos por razões económicas. Um sistema aberto típico para o cultivo de microalgas é denominado de *raceway* (Figura 4). Estes sistemas apresentam, geralmente, entre 0,1 e 0,3 m de profundidade, permitindo o fornecimento de luz solar suficiente à realização da fotossíntese (Chisti, 2007; Larsdotter, 2006).

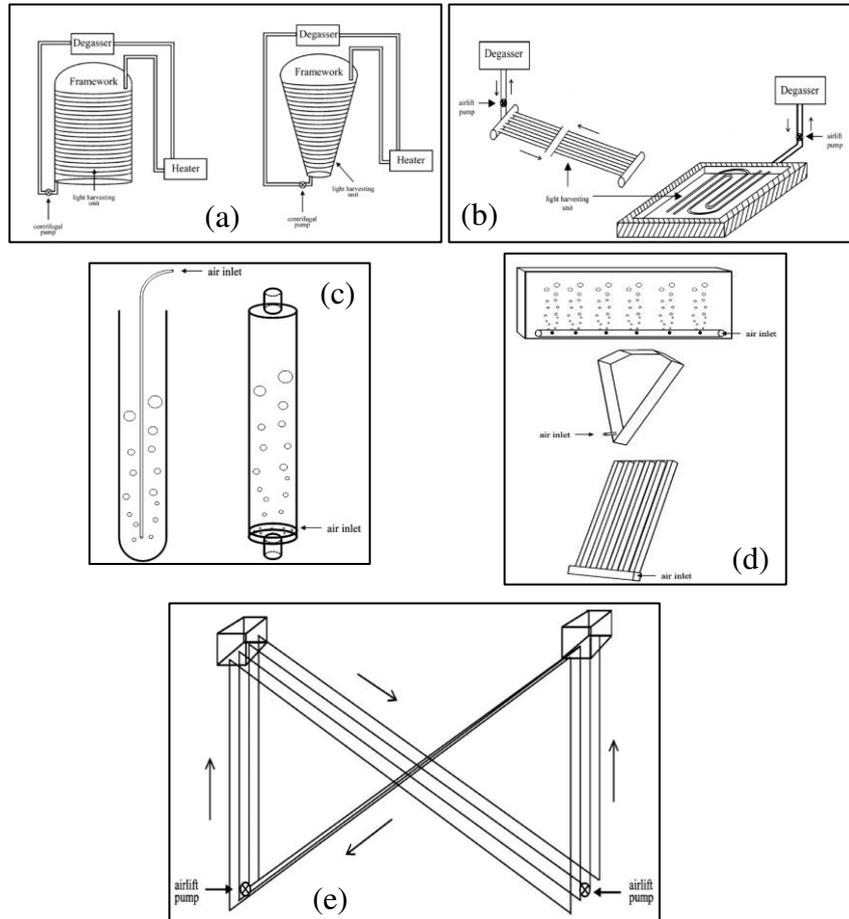
A cultura é mantida em recirculação num canal fechado e a mistura e circulação é assegurada por rodas de pás, as quais também permitem evitar a sedimentação.



*Figura 4. Representação esquemática de um raceway (adaptado de Chisti, 2007).*

Algumas das desvantagens deste tipo de sistemas de cultivo prendem-se com o facto da perda de água por evaporação e possíveis contaminações, provocando uma redução da produtividade e uma variabilidade na composição da biomassa obtida (Cai, *et al.*, 2013). No entanto, são sistemas com baixo custo capital e operacional que representam uma elevada vantagem tendo em conta a sua implementação a nível industrial.

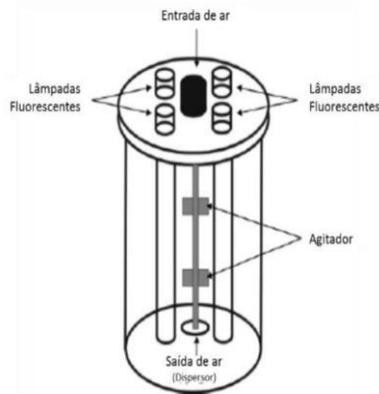
O crescimento em sistemas fechados (Figura 5) apresenta elevados custos de investimento e manutenção, no entanto apresentam diversas vantagens, uma vez que as condições de cultura e o crescimento podem ser controladas, a evaporação da água e as possíveis contaminações podem ser evitadas e podem ser atingidas concentrações elevadas de biomassa (Cai, *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Representações esquemáticas dos diferentes tipos de reatores em sistema fechado: (a) Reatores tubulares helicoidais; (b) reatores tubulares horizontais; (c) reatores tubulares verticais; (d) reatores de placa plana; (e) reatores tubulares em forma  $\alpha$  (adaptado de Carvalho *et al.*, (2006)).

Os reatores fechados são adequados para espécies de microalgas que são cultivadas para a produção de produtos de alto valor para as indústrias alimentares e farmacêuticas e, por isso, em meios livres de contaminantes. Este tipo de sistema pode ser agrupado em três tipos de reatores, os reatores tubulares, os reatores de placa plana e os reatores tipo fermentador. Os dois primeiros tipos de reatores são projetados para garantir disponibilidade de luz e troca de gás ideal. Exemplos de reatores tubulares são os reatores tubulares verticais, reatores tubulares horizontais, helicoidais e em forma  $\alpha$  (Cai, *et al.*, 2013; Carvalho, *et al.*, 2006).

Os reatores tipo fermentador (Figura 6) são mais apropriados para o metabolismo heterotrófico uma vez que possui uma enorme desvantagem: a razão área/volume é bastante reduzida e, por isso, a eficiência de captação da luz solar é fraca, não facilitando o cultivo autotrófico (Cai, *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Representação esquemática do reator tipo fermentador (Carvalho *et al.*, (2006)).

Este tipo de reator permite um alto controlo de todos os fatores que interferem diretamente no crescimento, sendo, por isso, capaz de atingir elevadas concentrações de biomassa em pouco tempo e a produção de produtos de alto valor.

Por fim, o modo de produção híbrido combina capacidades do sistema aberto e do sistema fechado num sistema de cultivo em dois estágios. O primeiro estágio caracteriza-se por um cultivo em fotobiorreatores fechados de forma a produzir o inóculo para o segundo estágio, no qual as microalgas são cultivadas em lagoas abertas. Assim, as culturas são expostas à mínima contaminação possível antes de serem alimentadas em lagoas de grande escala. Contudo, o custo do primeiro estágio limita a aplicação em grande escala deste sistema (Cai, *et al.*, 2013).

### 2.3 Meios de cultivo – utilização de resíduos agroindustriais

Os meios de cultivo devem proporcionar todos os elementos essenciais ao desenvolvimento da microalga, no entanto os meios formulados para a produção de microalgas tornam o processo economicamente pouco vantajoso devido aos elevados custos dos produtos químicos utilizados. Para além disso, alguns elementos necessários para certas espécies podem ser desnecessários para outras, não existindo, por isso, nenhum meio de cultivo viável para a produção de todas as espécies. O uso de meios alternativos para o cultivo, onde se estabelece um substrato eficiente e financeiramente menos dispendioso, apresenta-se como uma solução para os elevados custos associados a meios de cultivo sintéticos. Assim, os resíduos agroindustriais podem ser utilizados como base para a formulação de meios (Andrade & Filho, 2014).

As microalgas vivem essencialmente em meio líquido tornando, por isso, possível a utilização de resíduos da criação de animais e das atividades agroindustriais, os quais podem ser constituintes dos meios de cultivo. Esses resíduos apresentam-se como fonte de nutrientes para o meio, reduzindo o seu custo associado e, ainda, promovendo a reciclagem e a disposição adequada desses dejetos, diminuindo o seu impacto ambiental. No entanto, é necessário ter em conta os riscos que o uso de resíduos pressupõe, uma vez que a sua constituição pode apresentar metais pesados, compostos orgânicos persistentes, patogênicos, nitratos, entre outros. Assim, é importante minimizar ou eliminar o risco através de uma avaliação da viabilidade do resíduo a ser usado no cultivo de microalgas. A origem do resíduo deve ser conhecida, bem como a amostragem e a análise do resíduo devem ser criteriosas, onde, após a sua caracterização, uma avaliação sobre a necessidade de pré-tratamento deve ser efetuada (Andrade & Filho, 2014).

Segundo os mesmos autores, a utilização dos resíduos no cultivo de microalgas tem demonstrado algumas limitações, uma das quais a grande variabilidade dos teores de nutrientes e o desequilíbrio da composição dos resíduos em relação às necessidades de nutrientes das microalgas. Ao contrário dos meios sintéticos, os quais são formulados para cada situação específica, os resíduos apresentam vários nutrientes que se encontram em quantidades desproporcionais relativamente às exigências dos microrganismos.

Diversos estudos foram já desenvolvidos no sentido de determinar a eficiência da utilização de resíduos agroindustriais na produção de biomassa e produtos de alto valor.

Ding *et al.* (2015), estudaram a viabilidade do cultivo de *Chlorella* sp. em meios com resíduos da indústria de laticínios, a nível laboratorial, onde foi comparado o crescimento da microalga em meio sintético BG-11 e meio alternativo, variando a diluição do resíduo em 5, 10 e 20 %. O mesmo estudo obteve, para uma diluição de 5 %, 0,59 g/L de peso seco em 6 dias de cultivo e uma taxa de crescimento de 0,23 d<sup>-1</sup>. Para a diluição de 10 %, o peso seco foi de 0,74 g/L com uma taxa de crescimento de 0,26 d<sup>-1</sup>, enquanto que para a diluição de 20 % foi obtido 0,86 g/L com uma taxa de crescimento de 0,28 d<sup>-1</sup>. Relativamente à remoção de nutrientes, estes foram removidos efetivamente, onde a maior diluição apresentou taxas de remoção de 99,26 % para a amônia e de 89,92 % para o fósforo; na diluição de 10% a remoção de amônia foi de 93% e a de fósforo de 91 %; já para a menor diluição a remoção foi de 83% para a amônia e de 92 % para fósforo. Os autores concluíram que a microalga *Chlorella* sp. é capaz de crescer em meio com resíduos da indústria de laticínios, verificando-se maior produção de biomassa para uma diluição de 20% e que a taxa de remoção de nutrientes é elevada.

A biorremediação de um efluente da indústria de curtumes foi avaliada por Ajayan *et al.* (2015), através do cultivo a nível laboratorial de *Scenedesmus* sp., espécie de microalga isolada no local. De forma a avaliar o efeito do efluente de curtumes no crescimento da microalga, foram preparados meios de cultivo com diferentes concentrações do efluente. Para tal, prepararam meios com 10, 25, 50, 75 e 100 % do efluente e verificaram que o crescimento celular máximo ocorreu para a concentração de 50 %, no qual o número de células foi de  $1180 \times 10^4$ /mL, ao oitavo dia de crescimento. A concentração celular mais elevada foi atingida na seguinte ordem das concentrações,  $50\% > 25\% > 10\% > 75\% > 100\%$ . Verificou-se igualmente que a biomassa de microalgas durante o período de crescimento não só foi capaz de reduzir a carga poluente em metais (81-96 % de Cr; 73-98 % de Cu; 75-98 % de Pb e 65-98 % de Zn), como também nutrientes ( $\text{NO}_3^- > 44,3$  %;  $\text{PO}_4^{3-} > 95$  %), após 12 dias de cultivo. Os autores concluíram que meio alternativo a partir de efluentes da indústria de curtumes apresenta-se com elevado potencial para o cultivo de microalgas e para a biorremediação de substâncias tóxicas presentes nos efluentes originários da indústria de curtumes.

Lopes *et al.* (2015) publicaram um estudo com o objetivo de elevar ao máximo o potencial de desenvolvimento da microalga *Chlorella* sp. visando a produção de biocombustíveis em meios de cultura suplementados com efluentes industriais e efluentes de esgoto sanitário. Os autores estudaram a melhor concentração de vinhaça, a nível laboratorial, para a adaptação da *Chlorella* sp.. Para isso, foi adicionada vinhaça nas proporções de 5, 10 e 15 % aos meios de cultivo. Para concentrações superiores, o desenvolvimento da espécie foi inibido devido à alta toxicidade. O estudo permitiu observar o maior desenvolvimento de células no meio que continha 5 % de vinhaça, atingindo uma densidade celular de  $1,25 \times 10^8$  células/mL, num tempo de cultivo de 7 dias. Os melhores resultados, no presente estudo, foram obtidos para as menores concentrações de vinhaça, isto é, para meios com 5 e 10 %, os quais apresentaram semelhante produção de biomassa e excelente crescimento celular. Concluiu-se, portanto, que a utilização da concentração de 10% de vinhaça em meios de cultivo permitiria uma maior redução de custos, uma vez que continha maior quantidade de resíduo em comparação com o meio com 5% de vinhaça, sendo, por isso, menores quantidades de produtos químicos adicionados, e uma produção de biomassa de  $1,24 \times 10^8$  células/mL, bastante semelhante ao meio com menor percentagem de vinhaça.

Andrade e Filho (2014) estudaram o crescimento da microalga *C. vulgaris* em meio com resíduo suíno biodigerido (RSB), foi possível avaliar a possibilidade de o resíduo substituir o meio sintético BG-11. Antes da coleta, o dejetos passou por um processo de biodigestão e foi

comparado com o meio sintético no cultivo de *C. vulgaris*, durante 21 dias em condições de temperatura e luz controladas. Para realizar a comparação entre o RSB e o meio sintético, foram preparados 3 meios diferentes utilizando RSB, nos quais variou-se a concentração de azoto. Para tal, utilizou-se RSB com 25, 50 e 100 % de azoto, a qual correspondia à dose de azoto no meio BG-11. Da experiência resultou uma maior produção de biomassa para a microalga *C. vulgaris* em meio sintético BG-11 e no tratamento com 100 % de azoto, ou seja, os meios com a mesma quantidade de azoto. Nos meios com menor quantidade de azoto a produção de biomassa foi comprometida, indicando que a menor quantidade de azoto foi limitante ao crescimento da microalga. Por outro lado, a diferença de crescimento entre os meios de RSB e o meio sintético pode indicar deficiências de outros nutrientes, uma vez que o meio BG-11 recebeu todos os nutrientes adequados ao desenvolvimento de *C. vulgaris*.

## 2.4 Interesse biotecnológico

Devido à sua importância económica, nutricional e ecológica, as microalgas, atualmente, são alvo de inúmeras investigações biotecnológicas, as quais permitem encontrar diversas aplicações para o cultivo das mesmas.

As microalgas apresentam elevada importância para a exploração biotecnológica, especialmente em produtos, processos e serviços valiosos, com importante impacto nas indústrias alimentares e farmacêuticas, assim como na saúde pública. Uma diversificada gama de metabolitos com várias bioatividades é produzida pelas mesmas (Chu, 2012). Estas são capazes de produzir proteínas, lípidos, hidratos de carbono, carotenóides ou vitaminas. Atualmente, existem numerosas aplicações de microalgas, descritas, de forma sucinta, na Tabela 2 (Priyadarshani & Rath, 2012).

Estes microrganismos podem ser utilizados na alimentação humana, na cosmética, na produção de moléculas de alto valor, na produção de biocombustível, como biofertilizantes, na indústria farmacêutica e como alimento na aquacultura (Chu, 2012; Priyadarshani & Rath, 2012).

Segundo os mesmos autores, na alimentação humana, as microalgas são aproveitadas como fonte rica em hidratos de carbono, proteínas, enzimas, fibras e, além disso, vitaminas e minerais. Em países asiáticos como a China, o Japão e a Coreia, estes alimentos são uma fonte rica de nutrientes e um suplemento nutricional. A biomassa das microalgas é comercializada em comprimidos, cápsulas e líquidos, sendo adicionada a massas, salgadinhos ou bebidas como suplementos nutricionais ou corantes alimentares naturais.

*Tabela 2. Aplicações de microalgas (Adaptado de: Priyadarshani & Rath (2012))*

<b>Aplicações</b>	
Alimentação humana	Fonte rica em nutrientes
Cosmética	Agentes espessantes, ligantes de água e antioxidantes
Moléculas de alto valor	Compostos com atividade biológica
Produção de biocombustível	Alto teor de óleo e rápida produção de biomassa
Biofertilizantes	Aumento no rendimento da economia de azoto e das propriedades físico-químicas do solo
Indústria farmacêutica	Fonte rica de metabolitos primários e secundários biologicamente ativos
Alimento na aquacultura	Cultura de larvas e peixes, criação de zooplâncton para a alimentação de animais jovens

Diversos componentes das microalgas são, frequentemente, utilizados em cosméticos como agentes espessantes, agentes ligantes de água e antioxidantes. Podem encontrar-se extratos de microalgas em produtos de cuidados com a pele e rosto e de tratamento capilar. Adicionalmente, as microalgas também estão empregues em produtos de proteção solar, visto que certas espécies são capazes de produzir metabolitos orgânicos, como a esporopolidina, a cimiamina e aminoácidos do tipo micosporina, para se protegerem da radiação UV ao mesmo tempo que permitem a passagem de radiação visível envolvida na fotossíntese (Priyadarshani & Rath, 2012).

As microalgas são, também, cultivadas para a extração de componentes de alto valor, representando, por isso, um reservatório de novos compostos, muitos dos quais com atividade biológica, que podem ser usados como ingredientes funcionais. As microalgas marinhas representam uma fonte importante de lípidos bioativos com uma alta proporção de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), os quais se mostram eficazes na prevenção e tratamento de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, asma, artrite, distúrbios renais, entre outras (Chu, 2012).

Devido ao seu alto teor de óleo e à rápida produção de biomassa, estes microrganismos são reconhecidos como fontes potencialmente boas para a produção de biocombustível. O aumento de interesse nos últimos anos deve-se ao facto de estes microrganismos oferecerem muitas vantagens como: produzirem volumes muito mais altos em comparação com a soja e outras oleaginosas; o não competirem com a agricultura tradicional e poderem ser cultivados em grandes lagoas abetas ou em fotobiorreatores fechados localizados em terras não aráveis; poderem crescer numa ampla e variada gama de condições climáticas e, ainda, o facto de poderem ser processados num amplo espectro de produtos. Assim, as microalgas são capazes de

fornecer matéria-prima para combustíveis líquidos renováveis, como biodiesel e bioetanol (Schimtz, *et al.*, 2012).

Empregues na agricultura, as microalgas podem ser utilizadas como biofertilizantes e condicionadores de solo. As cianobactérias são capazes de fixar o azoto atmosférico e, por isso, eficientes no papel como biofertilizante. As algas verdes azuis, além de permitirem um aumento no rendimento e da economia de azoto do fertilizante, as propriedades físico-químicas do solo também melhoram (Mostafa, 2012).

O interesse na indústria farmacêutica provém, essencialmente, do facto de organismos como microalgas serem uma fonte rica de metabolitos primários e secundários novos biologicamente ativos, que são difíceis de produzir por síntese química. Quer os extratos celulares como os extratos do meio de crescimento de várias microalgas (*C. vulgaris*, *Chlamydomonas pyrenoidosa*), revelaram atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Também extratos de diatomáceas e dinoflagelados mostraram uma ampla gama de atividades antifúngicas *in vitro*. Algumas cianobactérias são capazes de produzir metabolitos intracelulares e extracelulares com diversas atividades biológicas, como atividade antialgal, antibacteriana, antifúngica e antiviral (Priyadarshani & Rath, 2012).

Por último, alimentos com microalgas são, atualmente, usados para a cultura de larvas e peixes juvenis, bem como para a criação de zooplâncton necessário para a alimentação de animais jovens. Na aquacultura, os géneros de microalgas mais utilizados são a *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* e *Thalassiosira*. Microalgas dos géneros *Spirulina* e *Chlorella* são usadas na alimentação de muitos animais, tais como: gatos, cães, peixes de aquário, pássaros, cavalos, aves domésticas, vacas e touros. Como fonte de pigmentos naturais para a cultura de camarões, peixes salmonídeos e peixes ornamentais são, geralmente, utilizadas microalgas como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e *Spirulina* sp. (Priyadarshani & Rath, 2012).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as experiências descritas no presente trabalho foram realizadas nas instalações da Algafarm (grupo Secil), entre os dias 14 de fevereiro e 3 de agosto do ano de 2018. O perfil bioquímico da biomassa foi realizado no grupo MarBiotech do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve, entre os dias 24 de setembro e 28 de setembro de 2018.

Numa parte inicial do estudo foram realizados ensaios de *screening* aos meios alternativos. Neste contexto, foram testados meios com diferentes resíduos (CMS líquido, CMS prills, soro de queijo, água de lavagem da indústria de laticínios e açúcar da Tabaqueira) em reatores de 1,5 L, a diferentes concentrações. Posteriormente foram escolhidos os meios alternativos com os resíduos: soro de queijo, açúcar da Tabaqueira e efluente salino da indústria do bacalhau para um estudo mais aprofundado. Este estudo prendeu-se na avaliação do crescimento e perfil bioquímico de *C. vulgaris* e *N. oceanica*. Em todos os ensaios realizados, foram efetuados triplicados em reatores de 2 L (condições controladas) e duplicados nos reatores de 50 L (condições externas).

O crescimento de *C. vulgaris* foi avaliado em soro de queijo e açúcar da tabaqueira, em reatores de 2 L (balões de vidro) e 50 L (PP). Nos reatores de maior volume foi testado o crescimento em descontínuo e semi-contínuo. Durante o semi-contínuo, a cultura foi alimentada com meio alternativo, a uma frequência entre 2 e 3 dias e com uma concentração igual à inicialmente utilizada (5 g/L), de forma a restaurar a concentração inicial de nutrientes assim que estes fossem consumidos pela biomassa. Tanto o meio alternativo formulado a partir de soro de queijo como a partir de açúcar da Tabaqueira, foram utilizados no sentido de fornecerem os nutrientes (micro e macro) necessários ao crescimento dos organismos. Na avaliação do crescimento de *N. oceanica* foi utilizado efluente salino mais soro de queijo e efluente salino mais meio Algafarm inorgânico. Neste caso, o efluente salino serviu para fornecer a concentração de sal requerida pela espécie, simulando, assim, a água do mar. O soro de queijo e o meio Algafarm inorgânico serviram como fonte de nutrientes para o crescimento da estirpe. Neste teste foram utilizados reatores de 2 L (balões de vidro) e reatores de 50 L (PP), apenas em regime descontínuo.

A par destes ensaios, as mesmas microalgas foram cultivadas em meio Algafarm inorgânico, também em reatores de 2 e 50 L, de forma a servir de controlo.

### 3.1 Microalgas e inóculo

As microalgas utilizadas no presente estudo, *C. vulgaris* e *N. oceanica*, foram obtidas a partir da coleção de culturas da Algafarm.

Inicialmente foram preparados diversos reatores de 5 L (Figura 7), das mesmas estirpes, de forma a preparar inóculo suficiente aos ensaios a realizar. Nesta preparação, o cultivo de *C. vulgaris* foi preparado com meio Algafarm inorgânico (caracterização elementar apresentada na Tabela 3), o qual apresenta meio nutritivo, micronutrientes, ferro e água de processo neutralizada. No cultivo de *N. oceanica*, ao meio citado anteriormente, foi adicionado salmoura e água de magnésio, visto ser uma espécie de água salgada. Estas culturas permaneceram durante 5 dias em crescimento com arejamento constante e suave (filtrada a 0,2  $\mu\text{m}$ ), uma temperatura ambiente de, aproximadamente, 24 °C, exposição constante à luz (24 horas e 100  $\mu\text{mol fotões m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e pH constante entre valores de 7 e 8 através da adição de pulsos de  $\text{CO}_2$ .

*Tabela 3. Caracterização elementar do meio Algafarm inorgânico (meio controlo)*

Meio Algafarm inorgânico		
Elementos	Quantidade	Unidades
- Azoto	10	Milimolar
- Fósforo	900	Micromolar
- Ferro	8,93	Milimolar
- Magnésio	10	Micromolar
- Zinco	5	Micromolar
- Estrôncio	0	Micromolar
- Cobre	0,5	Micromolar
- Manganês	5	Micromolar
- Molibdénio	5	Micromolar
- Cobalto	0,5	Micromolar



*Figura 7. Culturas em reatores de 5 L.*

### 3.2 Reatores

No estudo realizado foram utilizados diferentes reatores, que diferem quer no volume operacional quer nas condições de crescimento.

O estudo realizado em reatores de 2 L (Figura 8a) consistiu em manter as culturas em balões de vidro, mantidos numa sala com condições pré-definidas e essenciais ao crescimento das microalgas. Tal como o inóculo, estes balões permaneceram em crescimento sob condições controladas de temperatura, arejamento, intensidade da luz e pH (descrito na secção 3.1).

Quanto aos reatores de 50 L (Figura 8b), as culturas permaneceram em sacos de plástico no exterior e, por isso, sob diversas condições de crescimento não controláveis. Neste caso, as culturas de microalgas sofreram um aumento de escala a partir dos reatores de 5 L preparados anteriormente. Assim, dois reatores de 5 L foram utilizados como inóculo para o crescimento num reator de painel plano de 50 L (PP). Este reator foi arejado com ar filtrado (0,2  $\mu\text{m}$ ), o pH foi mantido entre 7 e 8 através da adição de pulsos de  $\text{CO}_2$  e a temperatura mantida, por meio de um sistema de aspersão de água, abaixo dos 28  $^\circ\text{C}$ .



**Figura 8.** Diferentes reatores de crescimento de culturas: (a) reatores de 2 L (balões de vidro); (b) reatores de 50 L (PP).

### 3.3 Meios alternativos

A fase inicial do estudo, correspondente a *screenings* aos diferentes resíduos, foi dividida em duas partes, de acordo com a estratégia adotada na formulação dos meios de cultivo. Na primeira parte foram estudados meios alternativos com CMS líquido e CMS prills, onde foi adotada a estratégia de igualar a concentração de azoto total consoante o meio Algafarm inorgânico (meio controlo). Assim, neste ensaio os meios foram formulados de forma a que a

concentração de azoto total final fosse igual à concentração de azoto do meio controlo. Para além disso, ao meio de cultivo foi adicionado ferro (Fe 2 %) de acordo com a concentração utilizada no meio tradicional. Já na segunda parte, a estratégia passou por estudar diferentes concentrações dos resíduos na formulação dos meios. Neste ensaio foram estudados os resíduos: açúcar da tabaqueira, soro de queijo e água de lavagem proveniente da indústria de laticínios. Os dois primeiros foram estudados em concentrações de 5, 10 e 20 g/L, enquanto que no último as concentrações foram de 50, 70 e 90 g/L. Também neste ensaio foi adicionado ferro de acordo com a concentração utilizada no meio standard.

Na segunda fase do estudo, onde foram avaliados três principais resíduos, os meios foram formulados conforme a segunda estratégia utilizada na fase de *screening*. Assim, o crescimento da microalga *C. vulgaris* foi avaliado a partir de meios alternativos com açúcar da tabaqueira e soro de queijo, a uma concentração de 5 g/L cada. Neste ensaio foi adicionado ferro (Fe 2 %) e uma fonte de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), também estes em concentrações de acordo com o meio tradicional. A microalga *N. oceanica* foi estudada em meios com efluente salino mais soro de queijo e efluente salino mais meio Algafarm inorgânico. Ambos os meios foram formulados de forma a que o efluente salino fornecesse a concentração de sal necessária à espécie e o soro de queijo (a 5 g/L) e meio Algafarm fossem a fonte de nutrientes necessária ao seu crescimento. Tal como no ensaio anterior, foram adicionados ferro (Fe 2 %) e uma fonte de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

### 3.4 Métodos analíticos

A recolha de amostras foi efetuada de dois em dois dias nos reatores de 2 L e diariamente nos reatores de 50 L. Nos reatores de menor volume a recolha foi realizada à chama e a amostra vertida para um copo de precipitação, enquanto que nos reatores de maior volume a amostra foi recolhida com recurso a uma seringa.

A temperatura, o pH e absorvância foram monitorizados sempre que foi recolhida uma amostra do reator. O pH e a temperatura foram medidos através da utilização de um medidor de pH e temperatura (Combo pH & EC, HANNA), já a absorvância a 600 nm foi medida através de um espectrofotómetro (Zuzi, model 4251/50). A concentração de biomassa (em peso seco) foi determinada indiretamente através de uma reta de calibração em ordem à  $Abs_{600}$  (Anexo I).

A análise de nitratos e fosfatos foi realizada de dois em dois dias. A análise da concentração de  $\text{NO}_3^-$  foi efetuada a partir de uma diluição à amostra recolhida (diluição 1:80 com 9,575 mL de água destilada, 300  $\mu\text{L}$  de HCL (1 M) e 125  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra

previamente centrifugada) e, posteriormente, a leitura da densidade ótica a 220 e 245 nm. A concentração dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$  foi avaliada com recurso a um teste colorimétrico (Phosphate-Test, Sera) e leitura da absorvância a 716 nm. Em ambos os testes foram, previamente, preparadas retas de calibração, as quais permitiram determinar a concentração dos iões a partir do valor de absorvância (Anexo I).

### 3.5 Avaliação do crescimento

A partir dos valores da concentração de biomassa ( $X$ ) ao longo do tempo, determinou-se a taxa média de crescimento ( $\mu_{\text{média}}$ , expressa em  $\text{d}^{-1}$ ) e a produtividade volumétrica em biomassa ( $P_x$ , expressa em  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). A taxa média de crescimento foi determinada a partir de uma cinética de 1ª ordem relativamente ao tempo (Equação 1). Através da representação gráfica de  $\ln(X)$  em função do tempo ( $t$  expresso em d), a taxa média de crescimento foi determinada a partir do conjunto de pontos relativos à fase de crescimento da microalga:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \leftrightarrow \mu_{\text{média}} (\text{d}^{-1}) = \frac{\ln(X_i/X_0)}{t_i - t_0} \quad (1)$$

onde  $X_i$  e  $X_0$  correspondem à concentração de biomassa (g/L) nos instantes  $t_i$  e  $t_0$ , o fim e o início da fase de crescimento, respetivamente.

A produtividade volumétrica em biomassa foi calculada a partir da Equação 2, onde  $X_t$  corresponde à concentração de biomassa (g/L) no final da fase de crescimento ( $t_x$ ) e  $X_0$  a concentração inicial de biomassa (g/L) em  $t_0$  (expresso em dias):

$$P_x (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{X_t - X_0}{t_x - t_0} \quad (2)$$

### 3.6 Análise bioquímica

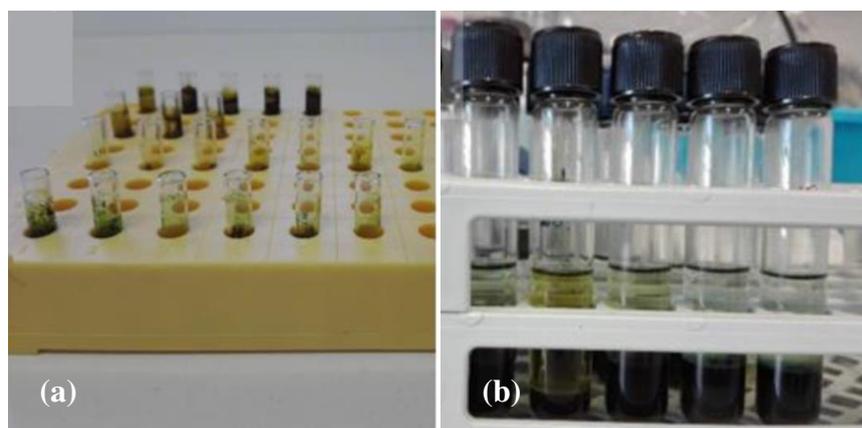
A biomassa de microalgas produzida foi caracterizada bioquimicamente. A espécie *C. vulgaris* foi analisada quanto ao teor em proteínas e pigmentos, enquanto na espécie *N. oceanica* analisou-se o teor em lípidos totais e ácidos gordos.

As proteínas totais foram calculadas, após a determinação elementar de CHN, pela multiplicação da percentagem de azoto por 6,25 (Marinho, et al., 2016). Na determinação de CHN foram, previamente, pesados, aproximadamente, 1 mg de biomassa em cápsulas de prata

e foi utilizado um Vario el III (Vario EL, Elementar Analyser system, GmbH, Hanau, Germany) (Nunnez & Quigg, 2015).

Na determinação do teor dos pigmentos foi utilizado um método de extração dos mesmos e análise no espectrofotómetro. Brevemente, pesaram-se 10 mg de biomassa em tubos de vidro e foram adicionados 3 mL de acetona (99,0 %) e 1,5 mL de esferas de zicórnia. Os tubos foram colocados no vórtex, à velocidade máxima durante 10 min e, de seguida, na centrifuga a 2500 g durante 10 min. Quando o *pellet* não apresentou cor branca, o processo foi repetido, renovando a acetona de extração. A acetona saturada foi recolhida para um novo tubo e novos 3 mL de acetona foram adicionados ao tubo de extração. No fim deste processo, toda a acetona utilizada foi reunida no mesmo tubo e analisada no espectrofotómetro. Todos os tubos utilizados foram protegidos da luz com papel de alumínio.

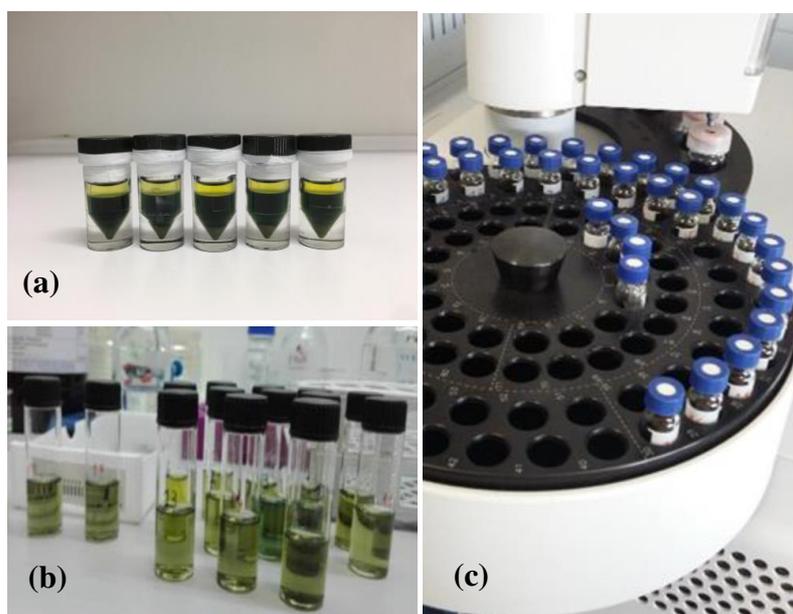
Os lípidos totais foram determinados pelo método anterior (Bligh & Dyer, 1959) modificado descrito em Pereira *et al.* (2012) (Figura 9). Utilizando uma mistura de clorofórmio, metanol e água (2:2:1), os lípidos foram extraídos da biomassa. Os extratos lipídicos, de seguida, foram homogeneizados com um Ultra Turrax, durante 2 min, e centrifugados durante 10 min a 2500 g. A fase de clorofórmio foi recuperada com recurso a uma pipeta de Pasteur. Desta fase foi pipetado um volume conhecido para os tubos pré-pesados e deixado a evaporar toda a noite. O peso do resíduo seco foi comparado com o peso dos tubos para obter a percentagem de lípidos totais.



**Figura 9.** Alguns passos do método da determinação dos lípidos totais: (a) vasos com as amostras secas; (b) lípidos extraídos com separação de fases após centrifugação.

Os ácidos gordos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos gordos correspondentes (FAME) de acordo com o protocolo de Lepage & Roy (1984) modificado por Pereira *et al.* (2012) (Figura 10). Em vasos de reação, foram pesados, aproximadamente, 10 mg

de microalga liofilizada. De seguida, foram adicionados 1,5 mL de uma solução de metanol e cloreto de acetilo (20:1, v/v) e a mistura homogeneizada em gelo com um Ultra Turrax, durante 90 s. Subsequentemente, adicionou-se 1 mL de hexano e a mistura foi aquecida num banho-maria durante 1 h a 70 °C. De seguida, 1 mL de água destilada foi adicionado à mistura e a fase orgânica foi removida para outro vaso. Esta fase foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada antes das análises. Os ácidos gordos foram analisados por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (Bruker SCION 456/GC, SCION TQ MS) equipado com uma coluna ZB-5MS.



**Figura 10.** Alguns passos do método da determinação de ácidos gordos: (a) vasos de reação com mistura aquecida em banho-maria; (b) amostras antes de serem tratadas com sulfato de sódio anidro; (c) placa automatizada do cromatógrafo.

### 3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com recurso à ferramenta Excel e os resultados experimentais são apresentados com um nível de confiança de 95 %. Para três ou mais condições foi realizado o teste ANOVA e, quando necessário, o Teste t para verificar a existência de diferenças significativas entre duas condições.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Screening* resíduos agroindustriais

Numa primeira fase do presente estudo foi realizado um *screening* aos diferentes meios alternativos a partir de uma avaliação ao crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *N. oceanica*. Nesta fase, resíduos como CMS líquido, CMS prills, soro de queijo, água de lavagem da indústria de laticínios e açúcar da tabaqueira foram utilizados na formulação dos meios de cultivo de ambas as estirpes. Assim, foi possível efetuar uma avaliação ao comportamento e crescimento destas microalgas perante a utilização de diferentes resíduos.

#### 4.1.1 Caracterização elementar dos resíduos

Os resíduos utilizados na formulação dos meios de cultivo foram avaliados quanto à sua caracterização, com o objetivo de perceber se a sua utilização permitiria o crescimento das diferentes microalgas. A Tabela 4 apresenta a caracterização elementar dos diferentes resíduos testados no presente estudo, mostrando a concentração de elementos importantes no crescimento destes organismos.

*Tabela 4. Caracterização elementar dos diferentes resíduos utilizados na formulação dos meios*

	<b>CMS líquido</b>	<b>CMS prills</b>	<b>Soro de Queijo</b>	<b>Água de lavagem</b>	<b>Açúcar Tabaqueira</b>	<b>Efluente Salino</b>
Fosfato (Milimolar)	<<	n. a.	1,43	0,78	0,57	n. a.
Amónio (Milimolar)	3,02	n. a.	0,48	0,64	0,19	n. a.
Nitrato (Milimolar)	0,31	n. a.	2,22	0,06	<<	n. a.
Azoto total (Milimolar)	<<	n. a.	10,51	5,55	153	n. a.
Fósforo (Milimolar)	17,2	64,1	9,58	0,36	<<	0,054
Magnésio (Milimolar)	6,20	62,3	0,18	0,33	<<	4,47
Zinco (Micromolar)	<<	329	2,43	0,58	<<	<<
Cobre (Micromolar)	<<	<<	1,56	<<	<<	<<
Manganês (Micromolar)	389	2370	<<	<<	<<	0,29
Potássio (Milimolar)	788	1270	8,01	0,53	<<	2,41
Cálcio (Milimolar)	9,19	94,0	2,23	0,21	0,030	1,33

**Nota:** '<<<' valor inferior ao limite detetável; 'n.a.' - não avaliado

A análise da Tabela 4 permite verificar que os diferentes resíduos utilizados no presente estudo apresentam muitas diferenças no que diz respeito à sua caracterização elementar. Este

aspecto deve-se, principalmente, à origem dos mesmos, a qual é bastante díspar entre alguns deles.

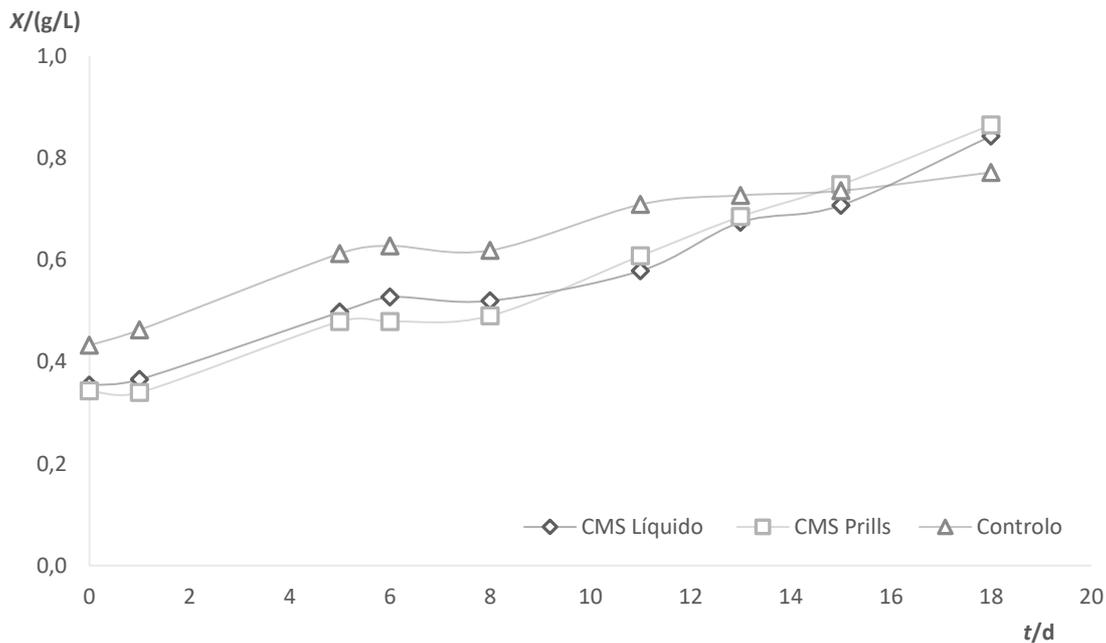
Os resíduos à base de CMS apresentam uma origem comum, no entanto a concentração da maioria dos elementos é bastante diferente entre os dois. Esta diferença na sua caracterização elementar pode resultar da utilização de processos diferentes na sua obtenção. Também os resíduos soro de queijo e água de lavagem possuem diferenças na concentração de alguns elementos, mas uma origem comum, visto que são provenientes da indústria de laticínios. No entanto, neste caso este aspeto pode ser explicado pelo facto de a água de lavagem resultar da limpeza dos equipamentos utilizados na indústria de laticínios, o que leva a que os mesmos elementos estejam presentes, mas em menores concentrações, visto que são diluídos em água. O efluente salino, proveniente da indústria de bacalhau, contém alguns elementos para além da salinidade que o define. Adicionalmente, o açúcar da indústria do tabaco é aquele que mais diferenças apresenta na sua caracterização. Este apresenta poucos elementos e uma elevada concentração em proteína, distinguindo-se, assim, dos demais resíduos.

Comparando a caracterização elementar do meio tradicionalmente usado (Tabela 3, secção 3.1) e os resíduos utilizados na formulação de meios alternativos (Tabela 4), é possível observar grandes diferenças na concentração de elementos importantes no crescimento de microalgas. Os resíduos CMS, na maioria dos elementos, apresentam concentrações muito superiores ao meio standard. Já a água de lavagem e o efluente salino contêm concentrações mais baixas e o açúcar da Tabaqueira não apresenta a maioria dos elementos e alta concentração de azoto. O soro de queijo é aquele que mais semelhanças exhibe ao meio controlo, mostrando concentrações muito próximas do meio tradicional.

A utilização destes resíduos na formulação de meios de cultivo de microalgas permite uma redução substancial no preço da sua produção, visto que, comparativamente aos meios sintéticos normalmente utilizados, apresentam custos muito inferiores. No entanto, a aplicação dos mesmos não é tão fácil quanto os meios tradicionalmente utilizados, uma vez que podem existir lacunas na sua composição, na relação entre azoto e fósforo e na disponibilidade dos mesmos. Estas deficiências podem resultar em concentrações, velocidades de crescimento, produtividades e características bioquímicas diferentes comparativamente ao meio sintético normalmente utilizado.

#### 4.1.2 Avaliação do crescimento à escala laboratorial

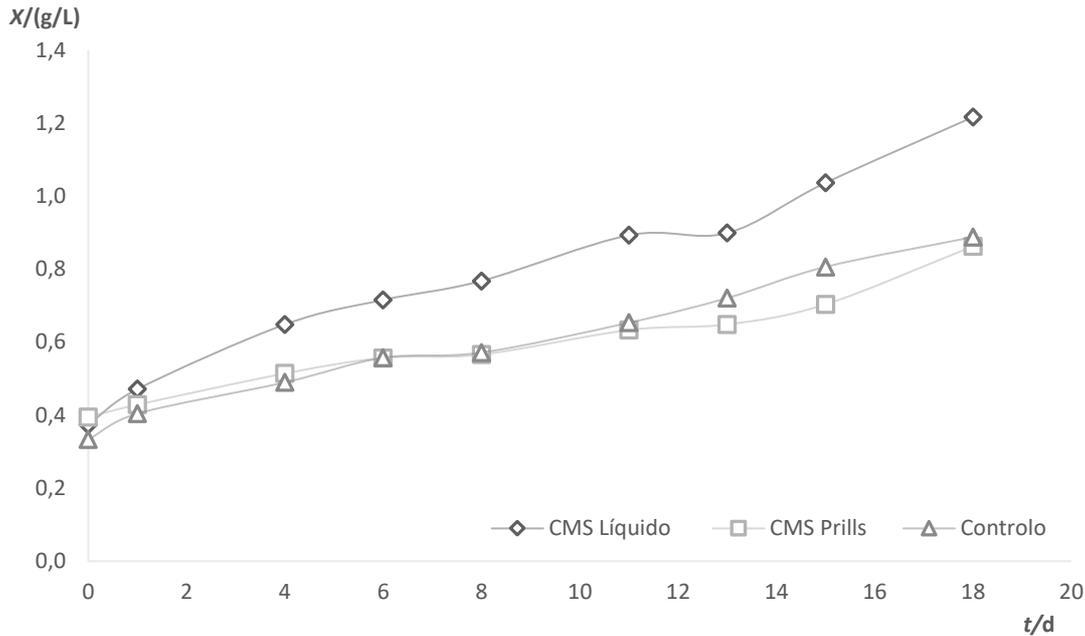
Numa primeira avaliação ao crescimento das microalgas perante uma formulação de meios a partir de resíduos agroindustriais, foi testado o cultivo com CMS líquido e CMS prills. A par deste cultivo alternativo foram preparadas culturas em meio controlo (meio Algafarm inorgânico), servindo de controlo. As Figuras 11 e 12 correspondem ao crescimento das estirpes *C. vulgaris* e *N. oceanica*, respetivamente, a partir de valores da concentração em biomassa ao longo do tempo.



**Figura 11.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris* perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: CMS líquido e CMS prills, e meio controlo.

O crescimento da microalga *C. vulgaris*, perante a utilização de resíduos na formulação dos meios de cultivo, apresentou-se de forma semelhante ao longo do tempo e sem grandes diferenças entre os distintos meios. A partir da Figura 11 é possível verificar que os meios com CMS líquido e CMS prills possibilitaram valores de concentração de biomassa muito próximos e superiores comparativamente ao meio controlo. Estes resultados indicam que o crescimento e desenvolvimento desta estirpe foi favorecido quando cultivada em meio alternativo. Estes permitiram, ao fim de 18 dias de cultivo, uma concentração de biomassa de 0,85 g/L enquanto o meio standard 0,77 g/L.

Os mesmos resíduos foram testados no crescimento da microalga marinha *N. oceanica* (Figura 12).



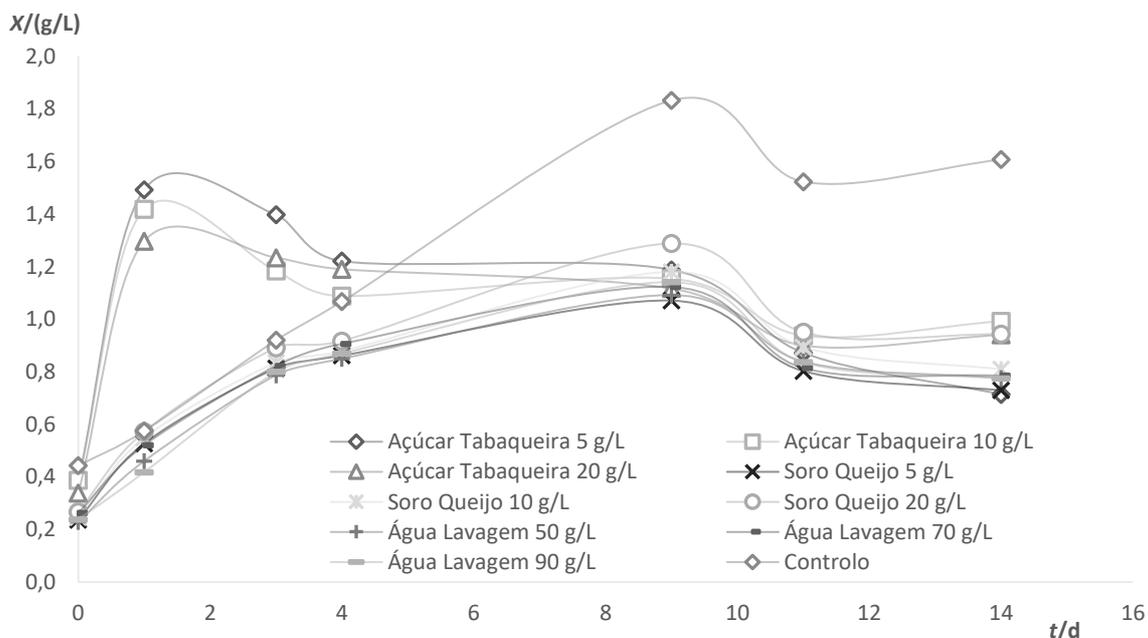
**Figura 12.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica* perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: CMS líquido e CMS prills, e meio controlo.

Contrariamente à estirpe de água doce, o crescimento de *N. oceanica*, ao longo do tempo de cultivo, exibiu diferenças entre os meios. A Figura 12 permite verificar que o meio com CMS líquido possibilitou um maior crescimento e, por isso, uma concentração em biomassa superior ao CMS prills, atingindo um valor de, aproximadamente, 1,2 g/L. O cultivo da mesma estirpe com o resíduo CMS prills apresentou um crescimento, de forma geral, mais próximo do meio controlo, mas, ainda assim, com valores de biomassa ligeiramente inferiores. O meio standard foi capaz de atingir uma concentração em biomassa, ao fim dos 18 dias de crescimento, de 0,88 g/L, enquanto o meio alternativo com CMS prills atingiu uma concentração de 0,86 g/L.

Ambas as microalgas foram capazes de crescer em meios alternativos com CMS líquido e prills, no entanto a estirpe *N. oceanica* apresentou concentrações em biomassa superiores comparativamente à *C. vulgaris*. Adicionalmente, verificou-se que a microalga de água doce apresentou um crescimento semelhante perante os dois diferentes meios enquanto a microalga marinha foi capaz de maior desenvolvimento perante o meio formulado a partir de CMS líquido. Através da observação das diferentes curvas de crescimento das duas estirpes, não é possível distinguir todas as fases de crescimento, no entanto nos primeiros dias é notável um período de adaptação ao meio, onde o crescimento é praticamente nulo, já que esta se caracteriza por elevada atividade metabólica e baixa divisão celular. Após esta primeira fase, o crescimento celular apresentou-se de forma mais acentuada, onde é visível um considerável aumento da

concentração em biomassa. Neste período de crescimento, os nutrientes estão em excesso e, por isso, os microrganismos são capazes de se dividir e crescer com uma taxa específica de crescimento máxima. Nos dois ensaios não é visível a fase estacionária, indicando a disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento durante os 18 dias de cultivo (Forget, *et al.*, 2010).

Numa segunda fase de *screening*, foi avaliada a formulação de meios de cultivo com açúcar da Tabaqueira, soro de queijo e água de lavagem proveniente da indústria de laticínios. Também neste ensaio foram preparadas culturas das mesmas estirpes com meio tradicionalmente utilizado, servindo de controlo. As Figuras 13 e 14 correspondem às curvas de crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *N. oceanica*, respetivamente, perante os meios alternativos com diferentes resíduos a diferentes concentrações, apresentando valores de concentração em biomassa ao longo do tempo de cultivo.

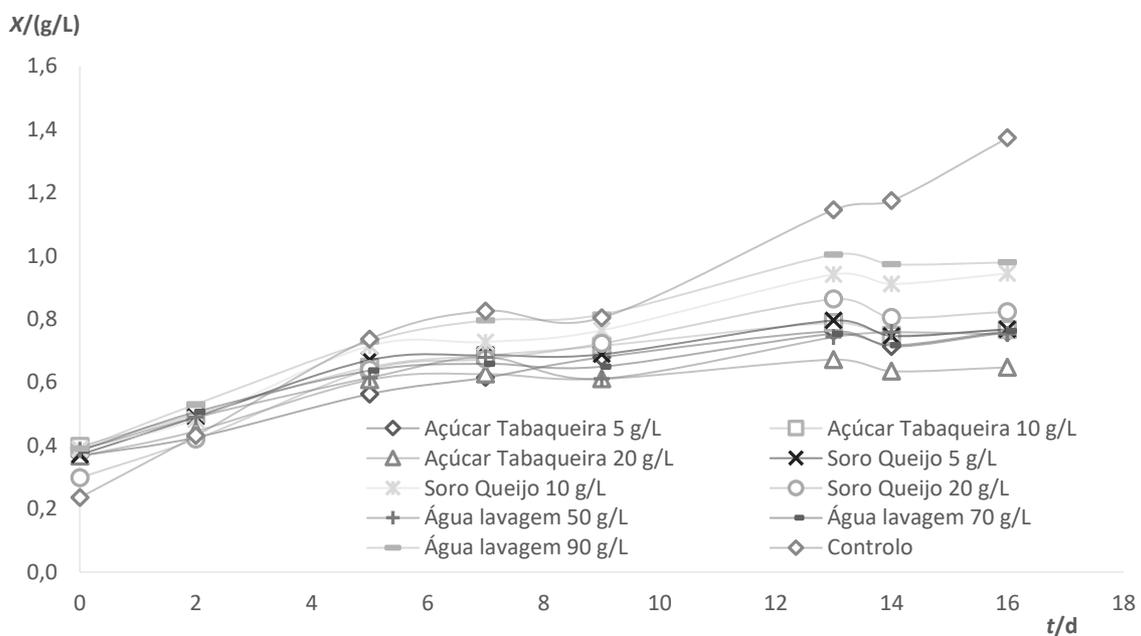


**Figura 13.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris* perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: açúcar Tabaqueira, soro queijo e água de lavagem, a diferentes concentrações, e meio controlo.

A observação e análise da Figura 13 permite avaliar o crescimento da microalga *C. vulgaris* perante os diferentes resíduos testados nesta fase do estudo. Os meios formulados com açúcar da Tabaqueira foram os que mais diferenças evidenciaram no crescimento da estirpe. Com este resíduo no meio, observa-se um crescimento bastante acentuado nos primeiros dias de cultivo, seguido por uma queda e estabilização ao longo de todo o resto tempo de cultura. Este comportamento não condiz com a habitual curva de crescimento destes microrganismos, no entanto pode ser explicado pela presença e rápida absorção de açúcar. Todos os outros meios

alternativos testados permitiram um crescimento da estirpe, ao longo do tempo, muito semelhante. Meios com soro de queijo e água de lavagem, nas diferentes concentrações, não evidenciaram diferenças consideráveis, permitindo uma concentração em biomassa final muito próxima entre todos. É importante analisar o comportamento diferente da microalga perante os meios alternativos e o meio controlo. Os meios alternativos não permitiram um crescimento como o meio tradicionalmente utilizado, obtendo concentrações em biomassa inferiores. Com efeito, enquanto que no meio standard a microalga alcançou uma concentração em biomassa de 1,6 g/L, em meios alternativos foi alcançado, no máximo, uma concentração de 1 g/L (no caso do açúcar da Tabaqueira a 10 g/L).

Os mesmos resíduos, nas mesmas concentrações, foram igualmente estudados no cultivo da microalga *N. oceanica* (Figura 14).



**Figura 14.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica* perante a utilização dos meios alternativos com os resíduos: açúcar Tabaqueira, soro queijo e água de lavagem, a diferentes concentrações, e meio controlo.

Avaliando o crescimento desta microalga nos diferentes meios (Figura 14), é visível um maior desenvolvimento da mesma perante o meio tradicionalmente utilizado e, por isso, uma maior concentração em biomassa no final do tempo de cultivo (1,4 g/L ao décimo sexto dia). No que diz respeito aos meios de cultivo alternativos, o comportamento deste microrganismo foi semelhante, no entanto o meio com água de lavagem a 90 g/L foi aquele que melhor crescimento proporcionou. O meio com açúcar da Tabaqueira a 20 g/L apresentou-se como o pior em termos de crescimento celular. Os meios formulados com soro de queijo a 5 g/L, água de lavagem a 50 e 70 g/L e, ainda, açúcar Tabaqueira a 5 e 10 g/L, permitiram uma igual

concentração final em biomassa, sendo esta de 0,76 g/L. Neste teste é de referir o facto de as culturas, em meios alternativos, terem apresentado uma cor alaranjada e não a cor verde esperada. Este aspeto pode ser indicativo de a estirpe encontrar-se sob stress devido à falta ou disponibilidade de um nutriente importante no seu desenvolvimento.

Neste ensaio, embora se tenha observado que os meios alternativos testados permitem o crescimento das duas estirpes, o meio controlo apresentou-se, em ambos os casos, mais vantajoso a nível de crescimento celular, tendo-se obtido uma maior concentração de biomassa. Enquanto que a microalga *C. vulgaris* evidenciou uma concentração final em biomassa muito semelhante perante qualquer um dos meios, a microalga *N. oceanica*, apresentou maior concentração no meio formulado com água de lavagem a 90 g/L. São notórias diferenças significativas no comportamento e crescimento de ambas as estirpes perante os mesmos meios alternativos. Estas diferenças evidenciam a diferente disponibilidade de nutrientes requerida pelas diferentes estirpes. Os resultados deste ensaio demonstraram que diferentes microalgas apresentam comportamentos diferentes perante meios alternativos iguais. Assim, o sucesso da utilização de resíduos no cultivo de microalgas pode depender da estirpe que se pretende produzir. Meios formulados a partir de determinados resíduos podem permitir o crescimento e produção de determinada microalga em detrimento de outra.

No crescimento de qualquer microalga é importante ter em conta todos fatores que possam influenciar diretamente o seu desenvolvimento. Nos dois ensaios anteriormente discutidos, fatores como temperatura, pH, concentração de  $O_2$  e  $CO_2$ , mistura, intensidade da luz e fotoperíodo foram controlados e, por isso, pré-definidos de forma igual para qualquer reator em cultivo. Por outro lado, a concentração de nutrientes variou de acordo com o meio alternativo utilizado, sendo, por isso, o fator que pode explicar as diferenças obtidas no crescimento das espécies perante os meios testados. De uma forma geral, o azoto e o fósforo são os principais elementos que limitam o crescimento destes organismos. Esta limitação é determinada não só pela sua disponibilidade, mas também por uma proporção adequada entre os dois. No caso do fósforo, ocorre uma limitação da síntese de ácidos nucleicos, o que implica uma limitação na replicação do genoma. O azoto influencia diretamente o fornecimento de aminoácidos, o que, por sua vez, limita a tradução do mRNA, reduzindo a taxa de síntese proteica (Barsanti & Gualtieri, 2006; Maqsood, 1974). Para um crescimento ideal, os nutrientes devem estar nas proporções de acordo com a fórmula estequiométrica -  $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$  (Larsdotter, 2006). Quando avaliada a caracterização dos diferentes resíduos (Tabela 3), os elementos mais comuns numa célula de microalgas não estão de acordo com as proporções

necessárias ao crescimento destes microrganismos e, por isso, são observadas diferenças no desenvolvimento das mesmas. No entanto, microalgas diferentes apresentam necessidades nutricionais diferentes e, por isso, desenvolvimentos diferentes perante meios alternativos iguais.

No primeiro ensaio, os meios continham a mesma concentração de azoto comparativamente ao meio standard, indicando, por isso, que no caso da microalga *C. vulgaris* quer a proporção entre azoto e fósforo quer a disponibilidade dos mesmos, foi adequado ao seu crescimento. Quanto ao caso da microalga *N. oceanica*, o meio CMS prills correspondeu ao pior meio em termos de crescimento celular, o que pode ter resultado de uma má proporção entre os dois elementos ou mesmo a falta de disponibilidade do fósforo. Quanto ao segundo ensaio, a concentração de azoto não foi controlada e por isso, as proporções desadequadas entre os dois principais elementos resultaram em piores desenvolvimentos nas duas espécies, comparativamente ao meio controlo.

## 4.2 Principais resíduos

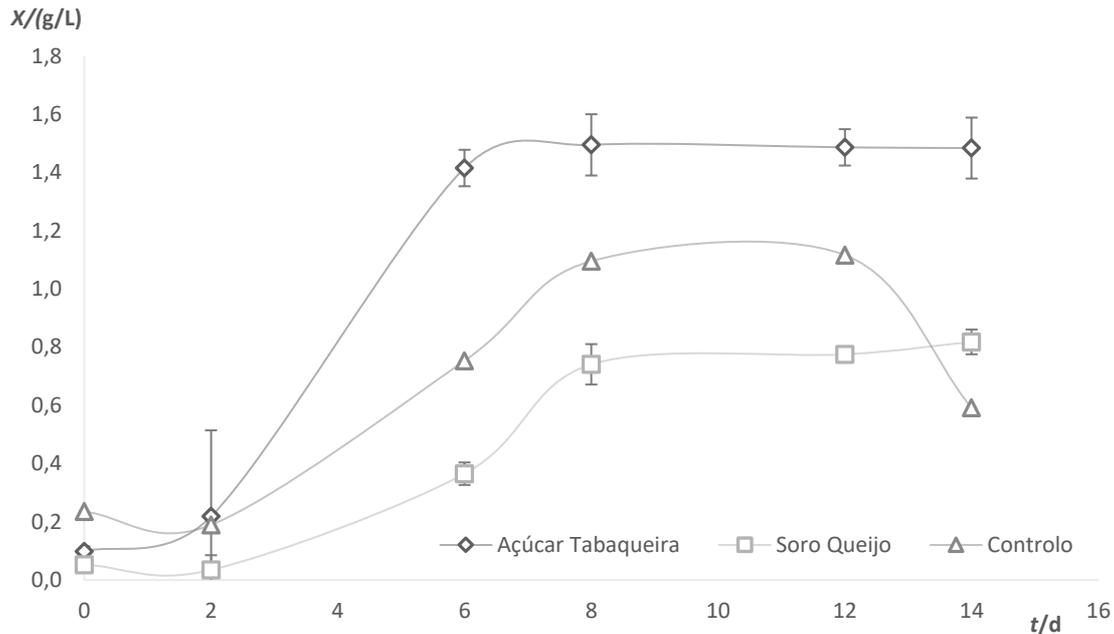
Na segunda fase do presente estudo foram escolhidos três resíduos, a partir dos quais foi feita uma análise mais aprofundada em relação à sua aplicação em meios de cultivo para a produção de microalgas. A escolha destes resíduos recaiu quer nos resultados obtidos na fase anterior quer na caracterização elementar de cada um, mas sobretudo na disponibilidade destes para que fosse possível esta investigação.

Este ensaio permitiu a comparação do crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *N. oceanica* em meios de cultivo alternativos e o meio tradicionalmente utilizado, sob condições controladas e pré-definidas e condições externas.

### 4.2.1 Avaliação do crescimento

A análise do crescimento de ambas as estirpes, perante os meios de cultivo alternativos, resumiu-se numa avaliação às curvas de crescimento e, por isso, à concentração em biomassa ao longo do tempo de cultivo e, ainda, à taxa média de crescimento e produtividade volumétrica em biomassa.

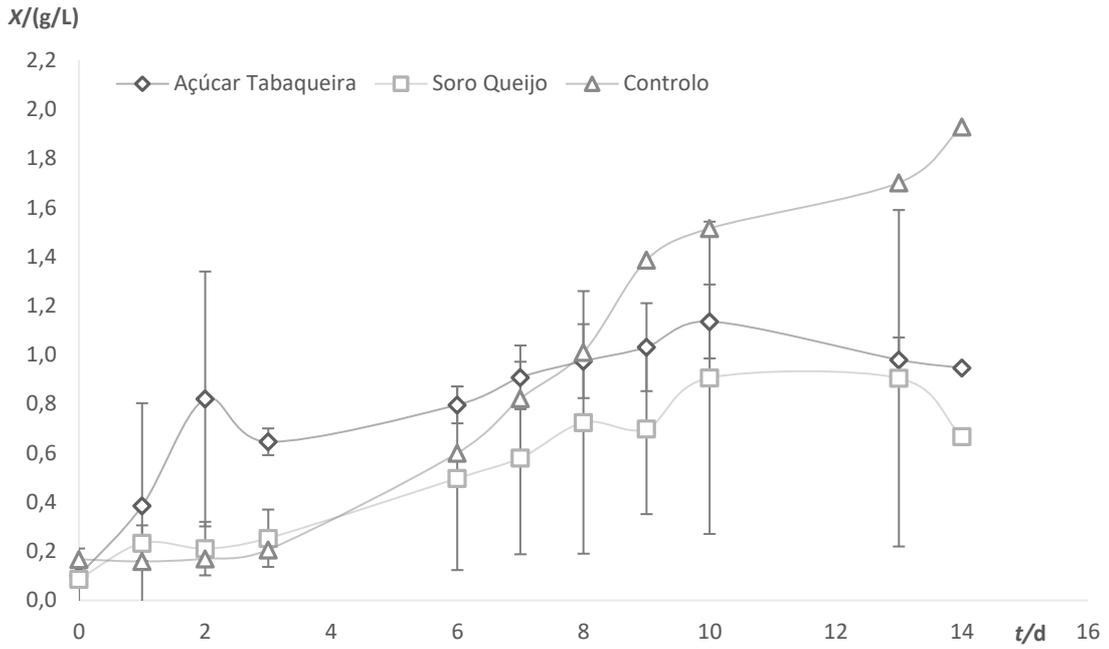
Na Figura 15 encontra-se o crescimento da microalga *C. vulgaris* em meios alternativos com açúcar da Tabaqueira e soro de queijo sob condições pré-definidas e controladas. Nesta figura é possível observar a concentração em biomassa ao longo do tempo de cultivo.



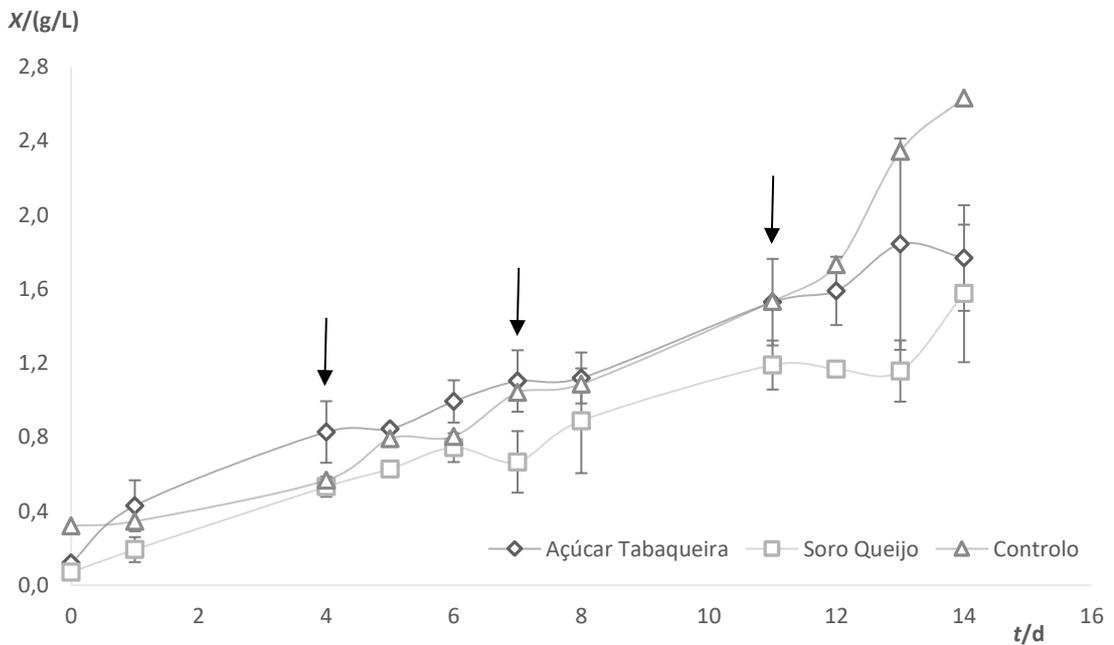
**Figura 15.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 2 L, perante a utilização de meios de cultivo com os resíduos: açúcar da Tabaqueira e soro de queijo, e meio controlo.

Analisando a Figura 15 verifica-se que o crescimento da estirpe foi favorecido perante o meio alternativo formulado com açúcar da Tabaqueira. Neste caso, a concentração em biomassa, no final dos 14 dias de cultivo, foi de 1,5 g/L, sendo bastante superior ao meio com soro de queijo e ao meio controlo. Quanto ao meio formulado com soro de queijo, o crescimento celular foi inferior ao controlo durante o tempo de cultivo, com exceção no último dia, em que no meio controlo ocorreu uma queda em biomassa resultante da fase de morte. Em todos os meios utilizados é possível observar nos 2 primeiros dias de cultivo, uma fase de adaptação, onde o crescimento celular praticamente não existe. A partir deste dia, é notável a fase de crescimento. No meio com açúcar esta prolonga-se até ao sexto dia de cultivo, enquanto que no meio com soro de queijo e meio controlo, a fase decorreu até ao oitavo dia. Este aspeto é indicativo de que os nutrientes disponíveis ao organismo esgotaram mais rapidamente em meio com açúcar comparativamente aos restantes meios. Nestes meios, os nutrientes permaneceram disponíveis durante mais tempo, no entanto a concentração em biomassa foi inferior.

O crescimento da mesma espécie, perante os mesmo meios, foi, também, avaliado em reatores de 50 L e, por isso, sob condições externas. Nestes reatores foram testados os regime descontínuo e semi-contínuo, representados, respetivamente, nas Figuras 16 e 17, através da concentração em biomassa ao longo do tempo de cultivo.



**Figura 16.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 50 L e regime descontínuo, perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: açúcar da tabaqueira e soro de queijo, e meio controlo.



**Figura 17.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 50 L e regime semi-contínuo, perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: açúcar da tabaqueira e soro de queijo, e meio controlo.

Uma análise às Figuras 16 e 17 permite observar um comportamento bastante díspar perante um regime descontínuo e um regime semi-contínuo. Sob condições externas e um regime descontínuo o crescimento da microalga foi bastante inferior em meios alternativos comparativamente ao meio controlo. Na fase inicial, a concentração em biomassa ainda se apresentou superior em ambos os meios alternativos, no entanto, a partir do sexto dia de cultivo verificou-se um crescimento pouco acentuado, culminando num decréscimo em biomassa após o décimo dia. Ainda assim, o comportamento deste organismo em meios alternativos foi melhor perante o meio com açúcar, no qual o crescimento terminou com uma concentração em biomassa de, aproximadamente, 0,95 g/L. Já o meio com soro de queijo alcançou uma concentração de 0,7 g/L, no último dia de cultivo. No meio controlo é notória a fase de latência durante os 3 primeiros dias e, de seguida, a fase de crescimento. Neste meio foi possível uma concentração em biomassa de 1,9 g/L, a qual foi bastante superior relativamente aos restantes.

Pelo contrário, no regime semi-contínuo o comportamento e crescimento da microalga foi semelhante entre todos os meios de cultivo. Neste ensaio, ao quarto, ao sétimo e ao décimo primeiro dia (dias assinalados na figura com uma seta) os reatores com meios alternativos foram alimentados com meio nutritivo, isto é, açúcar da Tabaqueira e soro de queijo, respetivamente. Assim, a partir da Figura 17 é possível observar que nos dias seguintes à adição de meio ocorreu uma fase de latência, onde há uma estagnação no crescimento celular, seguida de uma fase com crescimento acentuado. Estas adições de meio permitiram o crescimento deste microrganismo de forma equiparada ao meio controlo, no entanto alguns dias após a última adição o crescimento cessou, atingindo a concentração em biomassa máxima. Já o meio controlo permitiu a continuação do crescimento e, ao fim de 14 dias de cultivo, ainda não foi atingida a fase estacionária. A concentração final em biomassa dos meios alternativos é muito próxima, sendo de 1,6 g/L para o meio com soro de queijo e de 1,8 g/L para o meio com açúcar. O meio tradicionalmente utilizado permitiu uma concentração de 2,6 g/L.

Uma avaliação aos três ensaios realizados à microalga *C. vulgaris*, permite verificar que a mesma é capaz de crescer em meio com açúcar da Tabaqueira e soro de queijo quer em condições controladas quer em condições externas. Em qualquer um dos três, o crescimento deste microrganismo foi mais favorecido em meio com açúcar culminando, por isso, numa concentração em biomassa superior. No entanto, é importante ressaltar o facto de que em condições controladas o melhor meio alternativo (meio com açúcar) foi capaz de permitir maior crescimento celular comparativamente ao meio controlo e, em condições externas, o mesmo não foi verificado, já que o meio tradicionalmente utilizado apresentou maior concentração em

biomassa. Sob condições externas, o regime semi-contínuo apresentou melhores resultados, uma vez que as adições de meio permitiram um crescimento equiparado ao meio tradicional e concentrações mais elevadas. O mesmo não aconteceu em regime descontínuo, no qual o crescimento foi bastante inferior comparativamente. Daqui entende-se que não só as condições externas influenciaram de forma mais negativa o crescimento da estirpe em meios alternativos, como também reatores de maior volume requerem maiores quantidades de nutrientes disponíveis ao desenvolvimento, o que não acontece nos meios testados.

Também a taxa média de crescimento e a produtividade volumétrica foram calculadas de forma a avaliar o crescimento da microalga perante os diferentes meios e condições utilizadas. A Tabela 5 apresenta os valores da taxa média de crescimento e a produtividade volumétrica da estirpe *C. vulgaris*, de acordo com o meio alternativo, os reatores e o regime utilizado.

*Tabela 5. Parâmetros de avaliação de crescimento, da microalga C. vulgaris, para cada ensaio*

Meio	Reator	$\mu_{média}$ (d <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )
Açúcar Tabaqueira	Balão 2 L	0,45 ± 0,22	0,24 ± 0,62
	PP 50 L (descontínuo)	0,16 ± 0,12	0,092 ± 0,021
	PP 50 L (semi-contínuo)	0,16 ± 0,12	0,12 ± 0,016
Soro Queijo	Balão 2 L	0,52 ± 0,74	0,090 ± 0,084
	PP 50 L (descontínuo)	0,12 ± 0,012	0,069 ± 0,010
	PP 50 L (semi-contínuo)	0,18 ± 0,076	0,087 ± 0,014
Controlo	Balão 2 L	0,30 ± 0,49	0,12 ± 0,10
	PP 50 L (descontínuo)	0,29 ± 0,038	0,14 ± 0,037

A determinação da taxa média de crescimento ( $\mu_{média}$  em d<sup>-1</sup>) possibilita identificar quais as condições que permitiram à cultura uma velocidade de crescimento superior, enquanto a produtividade em biomassa ( $P_x$  em g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) permite avaliar a eficiência do crescimento. De uma forma geral, os resultados apresentados na Tabela 5 permitem verificar a superioridade destes parâmetros em reatores de menor volume e, por isso, condições controladas. Dentro dos reatores PP, o regime semi-contínuo apresenta valores mais elevados quando comparados com o regime descontínuo. Os ensaios desta espécie em reatores de 2 L, apresentam uma velocidade de crescimento superior quando cultivada em meios alternativos. No que diz respeito aos valores de produtividade, os mesmos mostram uma maior eficiência de crescimento em meio com açúcar (0,24 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), o qual superou o meio controlo contrariamente ao meio com soro

de queijo que atingiu um valor  $0,090 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  e ficou abaixo dos  $0,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  obtido em meio standard. Estes valores vão de encontro ao crescimento apresentado na Figura 15, onde o meio com açúcar apresenta maior concentração em biomassa ao longo do tempo de cultivo. Quanto aos reatores de 50 L, são notórios valores, quer de velocidade quer de eficiência, superiores em meio controlo. Tal como era esperado e indo de encontro às Figuras 16 e 17, o regime semi-contínuo apresentou-se mais vantajoso e, por isso, produtividades mais altas, no entanto não superiores ao meio controlo que foi capaz de atingir concentrações em biomassa mais elevadas. Para qualquer um dos regimes estudados, o meio alternativo com açúcar mostrou-se mais favorável ao crescimento desta microalga comparativamente ao meio com soro de queijo. Os valores referentes à taxa média de crescimento variam entre  $0,12 \text{ d}^{-1}$  e  $0,52 \text{ d}^{-1}$  e encontram-se abaixo do intervalo reportado pela literatura,  $0,55 \text{ d}^{-1}$  a  $1,87 \text{ d}^{-1}$ , demonstrando que as condições de cultivo do presente trabalho foram, de alguma forma, inibitórias para o crescimento da estirpe (Chang, *et al.*, 2016; Silva, *et al.*, 2015). Já os valores de produtividade variam entre  $0,069 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  e  $0,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ , encontrando-se alguns valores fora do intervalo da literatura ( $0,077 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  a  $0,106 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) (Silva, *et al.*, 2015). O valor mínimo obtido está abaixo do intervalo referido, indicando que o ensaio com soro de queijo sob condições externas e regime descontínuo teve um efeito negativo mais pronunciado no crescimento e, conseqüentemente, na produtividade em biomassa. Já o valor máximo obtido apresenta-se acima do intervalo e, por isso, o ensaio com açúcar em condições controladas produziu um efeito bastante positivo no crescimento destes microrganismos.

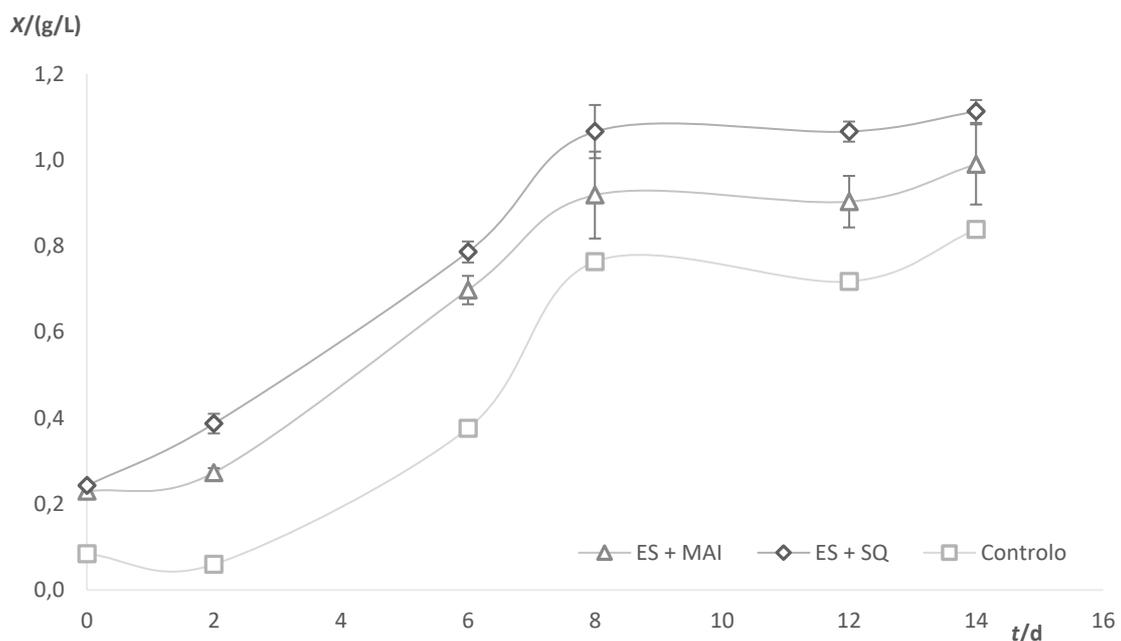
A análise estatística não apresentou diferenças significativas entre os meios alternativos testados, quer nas taxas médias de crescimento quer nas produtividades ( $p \geq 0,05$ ). Pelo contrário, foram verificadas diferenças significativas nos valores da velocidade de crescimento entre os reatores de 2 L e de 50 L em regime descontínuo ( $p < 0,05$ ).

De uma forma geral, é possível concluir que quer a velocidade quer a eficiência de crescimento foram superiores em reatores de 2 L constatando-se, por isso, o facto de que condições externas pressupõem fatores de crescimento não controláveis e não tão adequados ao crescimento destes microrganismos, resultando em taxas médias de crescimento e produtividades volumétricas inferiores. Os valores obtidos inferiores ao meio controlo, são comparáveis com o mesmo e, por isso, indicativos de que a sua utilização na produção desta microalga não se encontra totalmente desajustada. Por outro lado, a produção em reatores de maior volume foi favorecida em regime semi-contínuo o que pode ser revelador da falta de disponibilidade de nutrientes essenciais ao crescimento. Os valores de produtividade obtidos

são indicativos de que meios formulados com soro de queijo apresentam um efeito negativo mais acentuado no crescimento de *C. vulgaris*. Pelo contrário, a eficiência do crescimento em meio com açúcar apresenta valores de produtividade mais próximos do meio controlo, o que mostra um maior potencial para a produção de biomassa. Conclui-se, por isso, que a produção desta estirpe é mais vantajosa quando utilizado o meio alternativo formulado com açúcar da Tabaqueira, uma vez que destes ensaios resultaram concentrações e produtividades mais elevadas.

A mesma avaliação aos parâmetros de crescimento foi efetuada à microalga *N. oceanica*.

A Figura 18 apresenta as curvas de crescimento desta estirpe perante meios alternativos com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico (ES + MAI) e efluente salino mais soro de queijo (ES + SQ), sob condições controladas e, por isso, em reatores de 2 L. Estes meios foram comparados ao meio tradicionalmente utilizado, descrito na imagem como controlo. Na mesma figura estão representadas as concentrações em biomassa ao longo do tempo de cultivo de acordo com o meio utilizado.

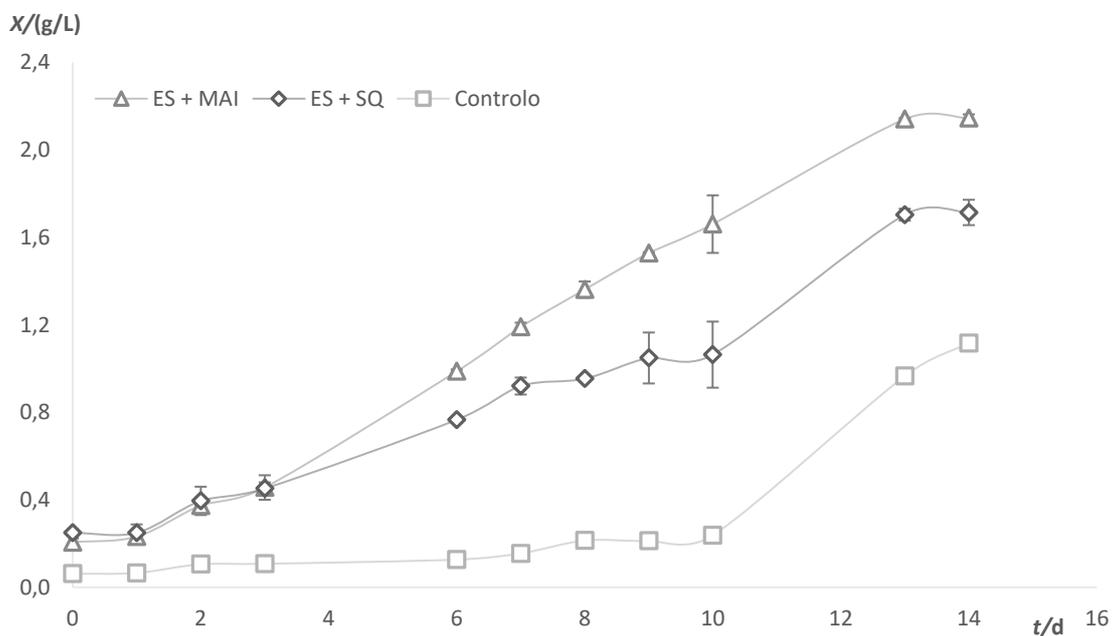


**Figura 16.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica*, em reatores de 2 L, perante a utilização de meios de cultivo com efluente salino e soro de queijo.

O crescimento da microalga *N. oceanica*, evidenciado na Figura 18, apresentou-se, de uma forma geral, semelhante entre todos os meios. Ainda assim, o meio de cultivo formulado a partir de efluente salino e soro de queijo proporcionou concentrações em biomassa superiores relativamente aos demais. Neste meio alternativo a espécie atingiu uma concentração de 1,1 g/L, enquanto que o meio com efluente salino e meio Algafarm inorgânico apresentou uma

concentração de 0,99 g/L e o meio controlo 0,84 g/L. Assim, neste ensaio qualquer um dos meios alternativos proporcionou um crescimento em biomassa superior ao meio controlo, tal como está demonstrado nas concentrações finas de biomassa. Nos dois primeiros dias de crescimento, no meio alternativo com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico e meio controlo, é notória uma fase de adaptação ao meio. Nos dias seguintes está evidenciada a fase de crescimento e, para os três meios utilizados, durou até ao oitavo dia de cultivo. A partir daí, foi alcançada a fase estacionária onde não foi observado crescimento, uma vez que existe um equilíbrio entre a divisão celular e a morte, a qual é induzida pela falta de nutrientes e a acumulação de resíduos (Forget, *et al.*, 2010). Através deste ensaio é possível constatar que, para qualquer um dos meios, os nutrientes essenciais ao crescimento da microalga estiveram disponíveis durante oito dias de crescimento e que, por isso, esgotaram na mesma altura, altura essa em que o crescimento da espécie estagnou e entrou na fase estacionária.

A mesma microalga foi, também, cultivada em reatores de 50 L (PP) e condições externas. A Figura 19 apresenta as curvas de crescimento, mostrando as concentrações em biomassa ao longo do tempo de cultivo de acordo com os meios utilizados.



**Figura 17.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica*, em reatores de 50 L, perante a utilização de meios de cultivo com efluente salino e soro de queijo.

Analisando o crescimento da microalga demonstrado na Figura 19, verifica-se que os meios alternativos utilizados no cultivo da mesma foram capazes de proporcionar concentrações em biomassa superiores ao meio tradicionalmente utilizado. O meio alternativo

formulado com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico (ES + MAI) foi aquele que maior concentração em biomassa alcançou, permitindo um valor final igual a 2,1 g/L. Já o meio com efluente salino mais soro de queijo (ES + SQ) atingiu uma concentração em biomassa igual a 1,7 g/L e o meio controlo uma concentração de 1,1 g/L. Estes resultados evidenciam uma clara superioridade dos meios alternativos em relação ao meio standard, no crescimento deste microrganismo. Entre os meios alternativos, nos três primeiros dias de cultivo, o comportamento e crescimento da estirpe foram muito semelhantes, onde as concentrações foram iguais e o crescimento manteve-se dentro da fase de adaptação ao meio. A partir deste terceiro dia até ao décimo terceiro está evidenciada a fase de crescimento, no entanto o meio com efluente salino e meio Algafarm inorgânico proporcionou um crescimento superior. O meio controlo, durante todo o tempo de cultivo, apresentou crescimento inferior, mas também é notória a fase *lag* nos três primeiros dias de cultivo e a fase de crescimento até ao décimo terceiro dia.

Os dois ensaios anteriormente discutidos, permitem concluir que a utilização dos resíduos agroindustriais usados na formulação do meio de cultivo favorece o crescimento desta estirpe marinha. Em ambos os casos verificou-se que o crescimento da mesma foi superior quando utilizado um meio alternativo relativamente ao meio tradicionalmente utilizado, o que permite uma concentração em biomassa, ao fim de 14 dias de cultivo, superior. No entanto, é importante ressaltar o facto de que em reatores de menor volume, isto é, cultivo em condições controladas, o crescimento deste microrganismo foi favorecido em meio formulado com efluente salino e soro de queijo. Já o mesmo não aconteceu em reatores de maior volume e condições externas, onde o crescimento foi superior em meio com efluente salino e meio Algafarm inorgânico. Estes resultados indicam que não só a concentração e disponibilidade de nutrientes são determinantes no comportamento e crescimento desta estirpe, mas também as condições em que o cultivo é efetuado. Ainda assim, sob as mesmas condições os meios alternativos apresentaram melhores resultados relativamente ao controlo, indicando que a concentração e disponibilidade de nutrientes presente nestes meios favorece o crescimento da microalga.

Relativamente a estes ensaios, também a taxa média de crescimento e a produtividade volumétrica foram calculadas e analisadas. A Tabela 6 apresenta os valores obtidos nestes parâmetros de crescimento no cultivo da microalga *N. oceanica*.

**Tabela 6.** Parâmetros de avaliação de crescimento, da microalga *N. oceanica*, para cada ensaio

Meio	Reator	$\mu_{média}$ (d <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g·L <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )
ES + MAI	Balão 2 L	0,21 ± 0,30	0,091 ± 0,014
	PP 50 L	0,19 ± 0,045	0,16 ± 0,011
ES + SQ	Balão 2 L	0,18 ± 0,040	0,10 ± 0,033
	PP 50 L	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,016
Controlo	Balão 2 L	0,35 ± 0,33	0,082 ± 0,16
	PP 50 L	0,18 ± 0,065	0,047 ± 0,034

Os resultados apresentados na Tabela 6 indicam, tal como nos ensaios com a estirpe de água doce, valores de velocidade de crescimento superiores em reatores de menor volume e, por isso, condições controladas. O mesmo não se verifica relativamente às produtividades em biomassa, onde, em meios alternativos, a eficiência de crescimento desta microalga foi superior quando cultivada em reatores PP. Os valores relativos à taxa média de crescimento mostram uma maior velocidade de crescimento em meio controlo quando comparado com as culturas em meios alternativos, indiciando melhores condições para uma maior divisão celular na fase de crescimento. Estes valores variam entre 0,15 d<sup>-1</sup> e 0,35 d<sup>-1</sup> e alguns valores encontram-se abaixo do intervalo referenciado pela literatura (0,196 d<sup>-1</sup> a 0,663 d<sup>-1</sup>) (M. & K., 2017). Por isso, esses ensaios apresentaram condições mais inibitórias ao crescimento desta microalga. Por outro lado, as produtividades em biomassa obtidas em meios alternativos foram superiores ao meio controlo para qualquer um dos ensaios. Em reatores de menor volume, o meio com efluente salino e soro de queijo (ES + SQ) superou o outro meio testado, no entanto em reatores PP verificou-se exatamente o contrário. Estes resultados vão de encontro às curvas de crescimento (Figuras 18 e 19), onde a concentração em biomassa das culturas em meios alternativos foi superior quer em condições controladas quer em condições externas e o meio com soro de queijo foi superior em reatores de 2 L. Os valores deste parâmetro variam entre 0,047 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> e 0,16 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> e encontram-se abaixo do intervalo reportado pela literatura, 0,244 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> a 0,783 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (Sandnes, *et al.*, 2005).

Entre os meios alternativos testados e os reatores utilizados não foram verificadas diferenças significativas quer para os valores de taxa média de crescimento quer para os valores de produtividade volumétrica em biomassa ( $p \geq 0,05$ ).

Os resultados dos ensaios com a microalga *N. oceanica* são indicativos de que o crescimento desta estirpe perante os meios alternativos estudados é possível e permite superar em produtividade o meio tradicionalmente utilizado. Sendo a produção de biomassa de

microalgas a baixo custo o principal objetivo deste estudo, os resultados obtidos admitem concluir que a mesma é mais vantajosa com a utilização do meio formulado a partir de efluente salino e meio Algafarm inorgânico, uma vez que os ensaios em maior escala permitiram uma concentração e produtividade em biomassa superiores ao meio controlo. Os dois meios alternativos estudados apresentam uma concentração e disponibilidade de nutrientes ajustadas ao crescimento da microalga. Ainda assim, esta produção é dependente de diversos fatores e, por isso, as condições externas podem influenciar de forma positiva ou negativa a sua concretização. As condições externas pressupõem o não controlo de diversos fatores importantes ao crescimento destes microrganismos, implicando diretamente na produtividade em biomassa.

Uma análise geral a todos os resultados obtidos, quer nos ensaios com a estirpe *C. vulgaris* quer nos ensaios com a estirpe *N. oceanica*, indicam que a produção de microalgas a baixo custo através da utilização de meios alternativos formulados com resíduos orgânicos é praticável, no entanto condições como a temperatura, profundidade, intensidade da luz e fotoperíodo são determinantes no crescimento de qualquer uma das espécies.

Tal como foi possível verificar nos resultados obtidos nos ensaios com a microalga de água doce, as condições externas proporcionaram piores resultados em produtividade e velocidade de crescimento. Também foi possível apurar o facto de que numa escala superior e que, por isso, muito mais próxima de uma produção em grande escala, foi necessário um regime semi-contínuo para ser possível atingir concentrações mais próximas do meio standard, indicando a falta de disponibilidade de nutrientes essenciais. Assim, não só é importante uma reformulação ao meio de forma a reajustar todos os nutrientes importantes ao crescimento deste microrganismo, como é preciso ter em conta todos os fatores que influenciam diretamente o seu desenvolvimento.

Em contrapartida os resultados dos ensaios com a microalga marinha indicam que os meios testados apresentam uma disponibilidade e concentração de nutrientes mais adequados ao seu desenvolvimento, permitindo concentrações e produtividades em biomassa superiores ao meio controlo. Ainda assim, os valores de parâmetros de avaliação de crescimento não se encontram dentro do intervalo reportado pela literatura o que pode indiciar condições de cultivo menos favoráveis e mais inibitórias ao seu desenvolvimento.

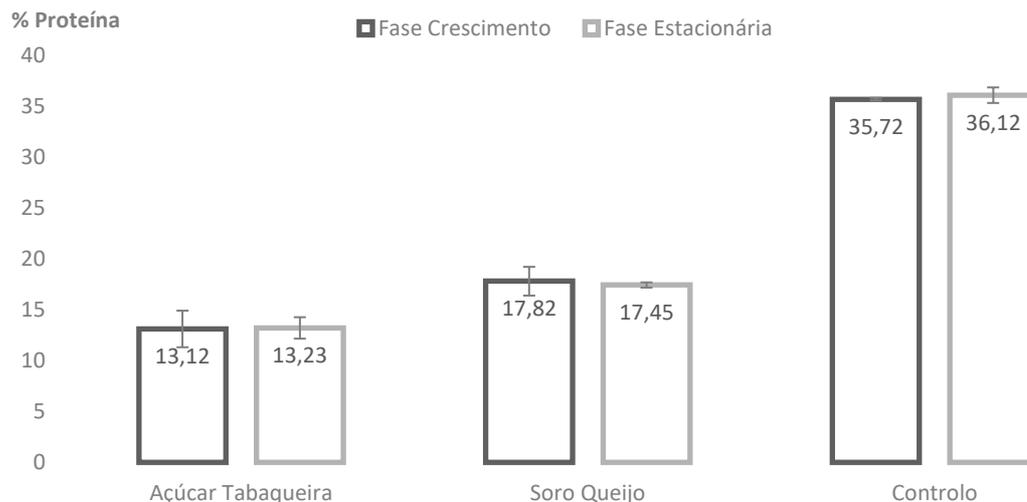
#### 4.2.2 Caracterização bioquímica

A extração de moléculas de alto valor surge como uma aplicação da biomassa de microalgas de elevado interesse biotecnológico. Atualmente, diferentes moléculas extraídas dessa biomassa são empregues em distintas áreas, tais como a medicina, cosmética e indústria alimentar e farmacêutica. Assim, a produção destes microrganismos a baixos custos é determinante para que a sua utilização seja exequível.

Neste estudo, onde se investigou a possibilidade de utilização de meios alternativos formulados a partir de resíduos agroindustriais de forma a produzir biomassa de microalgas a baixo preço, foram estudadas duas microalgas, uma de água doce e outra marinha, as quais apresentam diferentes interesses ao nível de extração de compostos. Por isso, a caracterização bioquímica da estirpe *C. vulgaris* centrou-se numa análise ao teor em proteínas e pigmentos (clorofila *a* e *b*), já a estirpe *N. oceanica* em lípidos totais e ácidos gordos. A produção destes compostos só faz sentido em grandes escalas, onde o reaproveitamento é muito maior e a produção é de elevadas concentrações. Assim, neste estudo a caracterização bioquímica foi analisada aos reatores de maior volume, de forma a possibilitar resultados mais próximos da realidade produtiva. No caso da microalga *C. vulgaris* o teor em proteínas foi analisado no regime semi-contínuo, uma vez que apresentou melhores resultados no crescimento e desenvolvimento deste microrganismo.

As proteínas possuem um papel de elevada importância na química e composição de microalgas, já que estão envolvidas no crescimento, reparo e manutenção das células. A qualidade nutricional da proteína é determinada pelo seu perfil de aminoácidos e, no caso da microalga *C. vulgaris*, esse perfil comparado com o padrão para a nutrição humana proposto pela OMS e FAO, apresenta-se como ainda melhor. Além disso, mostram-se com excelente capacidade de emulsão, sendo comparável e por vezes melhor que alguns ingredientes comerciais. Assim, proteínas desta espécie permitem opções adicionais de valorização desta microalga no mercado, especialmente no setor alimentar (Safi, *et al.*, 2014).

A Figura 20 apresenta as percentagens de proteína, em células de *C. vulgaris*, de acordo com a fase de desenvolvimento e o meio de cultivo utilizado.



**Figura 18.** Valores de proteína, em biomassa de *C. vulgaris*, de acordo o meio utilizado e a fase de desenvolvimento.

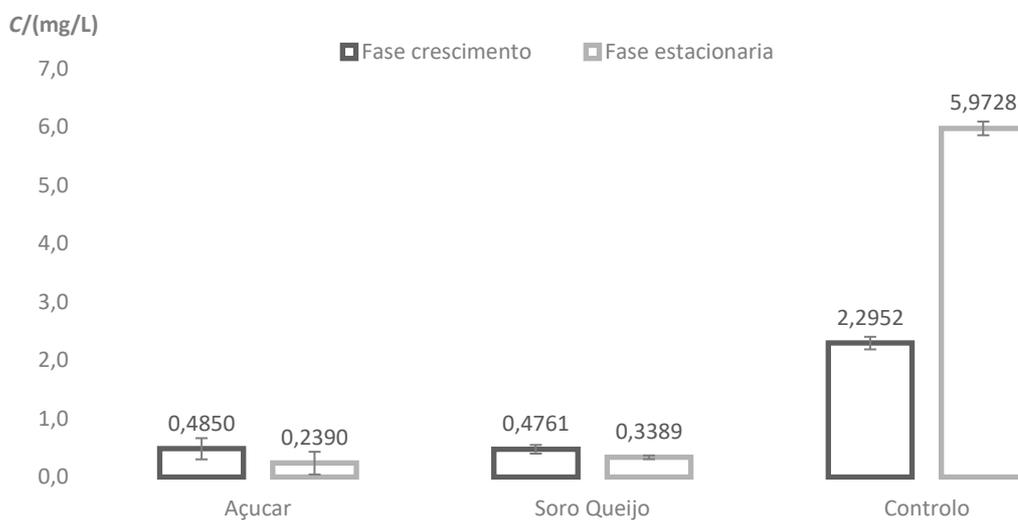
Analisando a percentagem de proteína em células de *C. vulgaris* em função do meio (Figura 20), é visível que o cultivo desta estirpe em meio formulado a partir de resíduos agroindustriais não permitiu a produção de proteína como o meio tradicionalmente utilizado. É observável uma grande diferença na percentagem de proteína entre os meios de cultivo, no entanto o mesmo não acontece entre as fases de desenvolvimento, já que o teor em proteínas é muito próximo. O cultivo desta espécie em meio controlo possibilitou uma produção de proteína de, aproximadamente, 36 %, valor esse que se encontra dentro do intervalo reportado pela literatura (33 a 58 %) (Safi, *et al.*, 2014; Seyfabadi, *et al.*, 2011). Pelo contrário, os meios alternativos com açúcar da tabaqueira e soro de queijo atingiram uma percentagem de 13 % e 18 %, respetivamente, encontrando-se abaixo do intervalo referenciado. A análise estatística evidenciou diferenças significativas para a percentagem de proteína entre todos os meios de cultivo utilizados ( $p < 0,05$ ). Já entre as fases de desenvolvimento o mesmo não se verificou ( $p \geq 0,05$ ).

Outros estudos com a mesma espécie relatam grandes diferenças no conteúdo de proteína em consequência das concentrações de azoto no meio de cultivo e, ainda, das condições de luz. Foi verificado que elevadas concentrações de azoto, alta intensidade de luz e longo fotoperíodo possibilitaram um aumento na produção de proteína (Piorreck, *et al.*, 1984; Seyfabadi, *et al.*, 2011). Estes factos podem explicar os diferentes resultados obtidos neste estudo. As distintas concentrações de azoto entre os meios originaram diferentes percentagens de proteína, evidenciando que o meio controlo possui uma concentração mais adequada à sua produção. Por

outro lado, as disposições dos reatores PP podem ter contribuído para diferentes intensidades de luz entre as culturas.

Os pigmentos apresentam múltiplas propriedades terapêuticas, tais como atividades antioxidantes, efeito protetor contra a degeneração da retina, regulação do colesterol, prevenção de doenças crónicas e fortalecimento do sistema imunológico. A clorofila surge como o pigmento mais abundante em biomassa de *C. vulgaris*, servindo não só como recetor de energia de luz como também reparador do aparelho fotossintético (Arun, *et al.*, 2017; Safi, *et al.*, 2014).

No presente estudo foram quantificadas as concentrações de clorofila *a* e *b*, evidenciadas nas Figuras 21 e 22 respetivamente, em biomassa de *C. vulgaris*, em função do meio de cultivo utilizado e a fase de desenvolvimento do microrganismo.

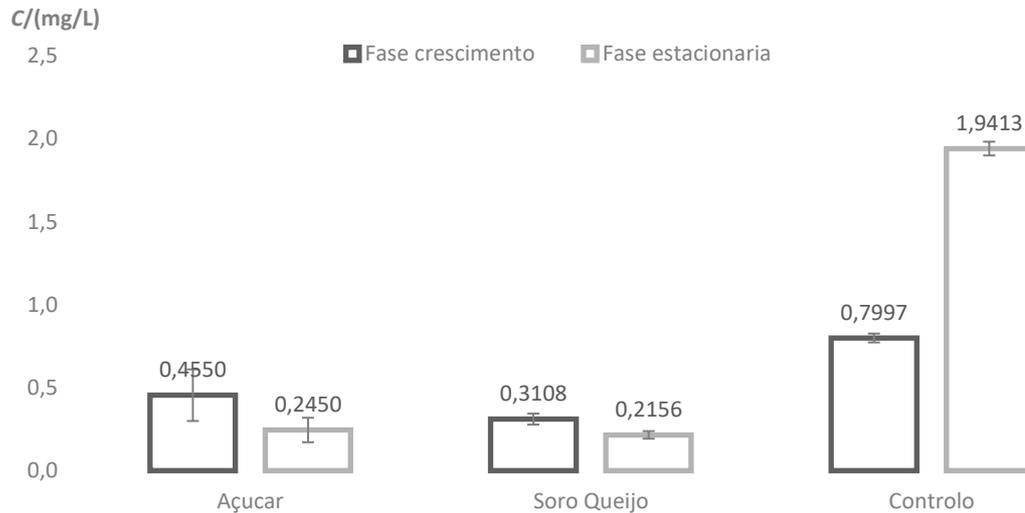


**Figura 19.** Valores de concentração de clorofila *a*, em biomassa de *C. vulgaris*, de acordo com o meio de cultivo e a fase de desenvolvimento.

As concentrações de clorofila *a* evidenciadas na Figura 21, demonstram a falta de capacidade de produção deste pigmento quando utilizados os meios alternativos estudados, comparativamente ao meio controlo. O cultivo desta microalga em meios com açúcar e soro de queijo permitiram uma concentração máxima de, aproximadamente, 0,49 mg/L, já o meio tradicionalmente utilizado alcançou uma concentração igual a 5,9 mg/L. Contrariamente ao meio controlo, em que a concentração máxima foi atingida na fase estacionária, os meios alternativos proporcionaram concentrações muito próximas entre as fases, mas, ainda assim, superiores na fase de crescimento. Contudo, entre os meios de cultivo e as fases de desenvolvimento não foram verificadas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ). As concentrações obtidas encontram-se dentro do intervalo reportado pela literatura (0,116 mg/L – 13,25 mg/L),

onde foram estudadas diferentes condições de cultivo desta espécie (Bodnar, *et al.*, 2016; Seyfabadi, *et al.*, 2011).

Quanto à clorofila *b*, as concentrações obtidas em função do meio de cultivo e da fase de desenvolvimento estão apresentadas na Figura 22.



**Figura 20.** Valores de concentração de clorofila *b*, em biomassa de *C. vulgaris*, de acordo com o meio de cultivo e a fase de desenvolvimento.

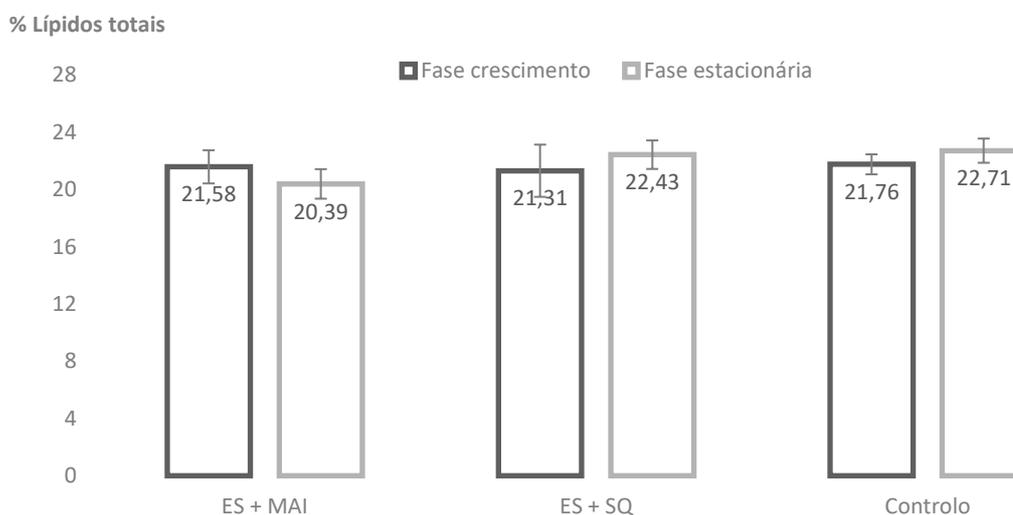
De forma semelhante às concentrações de clorofila *a*, também as concentrações deste pigmento, evidenciadas na Figura 22, são bastante inferiores quando utilizados os meios alternativos. O cultivo desta estirpe em meios com açúcar e soro de queijo permitiram concentrações máximas de 0,46 mg/L e 0,31 mg/L, respetivamente, enquanto o meio controlo possibilitou uma concentração de 1,9 mg/L. Ainda assim, a análise estatística não evidenciou diferenças significativas quer entre os meios de cultivo quer entre as fases de desenvolvimento ( $p \geq 0,05$ ). Estudos do cultivo da mesma espécie sob diferentes condições indicam um intervalo de concentrações para este pigmento, 0,0817 mg/L – 5,9 mg/L, demonstrando que os valores obtidos encontram-se dentro do mesmo (Abou-El-Souod, *et al.*, 2016; Bodnar, *et al.*, 2016).

Ensaio com a mesma microalga sob diferentes condições de cultivo relatam a importância de fatores como a intensidade da luz e o fotoperíodo, a concentração de azoto no meio, a aeração e o pH na produção de clorofila. Alta intensidade de luz, não aeração ou alto pH prejudicam a produção deste pigmento. Já a concentração de azoto parece ter uma correlação positiva com a biossíntese do mesmo (Abou-El-Souod, *et al.*, 2016; Safafar, *et al.*, 2016; Seyfabadi, *et al.*, 2011). Estas evidências permitem concluir que as diferentes

concentrações de azoto nos meios de cultivo utilizados resultaram nas concentrações de clorofila *a* e *b* discutidas anteriormente. Assim, o meio controlo possui uma concentração deste elemento que beneficia a produção de clorofila, contrariamente ao meios alternativos estudados. Os outros fatores relatados nos estudos não se fizeram variar para qualquer ensaio, pelo que não pode explicar as diferenças entre os meios.

A microalga *N. oceanica* apresenta um elevado potencial biotecnológico, com especial ênfase na produção de lípidos. Estes microrganismos não só possuem capacidade de sintetizar lípidos neutros, utilizados na produção de biodiesel, mas também ácidos gordos, importantes substâncias bioativas capazes de beneficiar a saúde humana (Ma, *et al.*, 2016).

Na Figura 23 estão apresentadas as percentagens de lípidos totais em células de *N. oceanica* de acordo com a fase de desenvolvimento e o meio de cultivo.



**Figura 21.** Valores de lípidos totais, em biomassa de *N. oceanica*, de acordo com o meio utilizado e a fase de desenvolvimento.

Uma observação e análise à Figura 21, permite verificar que, para qualquer um dos meios de cultivo utilizados no presente estudo, a percentagem em lípidos totais foi muito próxima. Assim, os meios alternativos estudados foram capazes de possibilitar uma produção de lípidos semelhante ao meio tradicionalmente utilizado. Todos eles apresentam uma percentagem de lípidos totais entre os 21 % e os 22 %. Estes valores encontram-se dentro do intervalo reportado pela literatura (18 % a 58 %), onde a mesma espécie foi estudada sob diferentes meios e condições de cultivo (M. & K., 2017; Ma, *et al.*, 2016). Os valores de lípidos totais também não variaram entre as fases de desenvolvimento do microrganismo. Não foram verificadas

diferenças significativas entres os meios de cultivo e as fases de desenvolvimento para o intervalo de confiança utilizado ( $p \geq 0,05$ ).

M. & K. (2017) testaram culturas, da mesma espécie, sob limitação de nutrientes e os resultados mostraram que a relação, as concentrações e as fontes de azoto e fósforo interferem no conteúdo lipídico. Correlacionando tais factos com os resultados obtidos, é possível aferir que todos os fatores relatados interferiram de forma positiva na produção de lípidos e, por isso, os meios alternativos foram capazes de fornecer à espécie o necessário para a produção deste composto.

Os ácidos gordos apresentam-se como importantes substâncias bioativas e essenciais aos seres humanos. Estas moléculas são classificadas em ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Estes últimos são reconhecidos como os ácidos gordos essenciais, uma vez que são importantes para a integridade dos tecidos e beneficiam a saúde humana (Ma, *et al.*, 2016).

As Tabelas 7 e 8 apresentam o perfil e percentagem de ácidos gordos em meios alternativos, comparativamente ao meio controlo.

*Tabela 7. Perfil e percentagem de ácidos gordos em biomassa cultivada em meio alternativo com efluente salino mais meio Algafarm inorgânico e meio controlo*

% Ácidos Gordos				
Ácidos Gordos	ES + MAI		Controlo	
	Fase crescimento	Fase estacionária	Fase crescimento	Fase estacionária
C14:0	2,3 ± 0,15	2,4 ± 0,19	3,2 ± 0,15	3,19 ± 0,086
C16:1	28 ± 2,4	26 ± 1,1	32 ± 3,4	34 ± 1,2
C16:0	18 ± 1,2	18 ± 0,46	24 ± 1,5	24 ± 0,49
C18:2 (ω-6)	6,3 ± 0,19	6,0 ± 0,34	2,5 ± 0,55	2,3 ± 0,42
C18:1	3,3 ± 0,19	3,6 ± 0,18	2,2 ± 1,2	1,3 ± 0,43
C20:4 (ω-6) (AA)	8,2 ± 0,82	8,5 ± 0,68	7,3 ± 0,54	7,3 ± 0,32
C20:5 (ω-3) (EPA)	30 ± 3,6	30 ± 1,7	26 ± 1,1	26 ± 1,4
SFA	20 ± 1,2	20 ± 0,50	27 ± 1,5	27 ± 0,50
MUFA	31 ± 2,4	30 ± 1,1	34 ± 3,6	35 ± 1,3
PUFA	44 ± 3,7	45 ± 1,8	36 ± 1,3	36 ± 1,5

Quando analisado o perfil de ácidos gordos do meio alternativo com efluente salino e meio Algafarm inorgânico comparativamente ao meio controlo (Tabela 7), é visível um perfil de ácidos gordos igual. O mesmo não acontece com todas as percentagens de ácidos gordos obtidas, demonstrando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Para os ácidos tetradecanóico (C14:0), hexadecenóico (C16:1) e octadecadienóico (C18:2  $\omega$ -6) verificaram-se diferenças significativas entre o meio alternativo e o meio tradicionalmente utilizado ( $p < 0,05$ ). Os dois primeiros apresentaram uma percentagem superior no meio controlo, já o último a percentagem foi maior no meio alternativo. Nos ácidos gordos saturados (SFA) e polinsaturados (PUFA), não se verificaram diferenças consideráveis. No entanto, é de referir que a percentagem dos PUFA foi superior em meio alternativo, atingindo uma percentagem de 45 %. Na percentagem dos MUFA, a diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que a maior percentagem destes ácidos corresponde ao meio controlo. Entre as fases de desenvolvimento não foram obtidas diferenças significativas para qualquer um dos ácidos ( $p \geq 0,05$ ).

O perfil e percentagem de ácidos gordos do meio alternativo com efluente salino e soro de queijo e do meio controlo estão representados na Tabela 8.

*Tabela 8. Perfil e percentagem de ácidos gordos em biomassa cultivada em meio alternativo com efluente salino mais soro de queijo e meio controlo*

% Ácidos Gordos				
Ácidos Gordos	ES + SQ		Controlo	
	Fase crescimento	Fase estacionária	Fase crescimento	Fase estacionária
C14:0	2,3 ± 0,17	2,6 ± 0,079	3,2 ± 0,15	3,19 ± 0,086
C16:1	25 ± 2,5	26 ± 2,7	32 ± 3,4	34 ± 1,2
C16:0	16 ± 0,37	19 ± 1,2	24 ± 1,5	24 ± 0,49
C18:2 ( $\omega$ -6)	5,8 ± 0,46	6,0 ± 0,39	2,5 ± 0,55	2,3 ± 0,42
C18:1	2,1 ± 0,35	3,4 ± 0,53	2,2 ± 1,2	1,3 ± 0,43
C20:4 ( $\omega$ -6) (AA)	9,1 ± 0,28	8,9 ± 0,22	7,3 ± 0,54	7,3 ± 0,32
C20:5 ( $\omega$ -3) (EPA)	35 ± 1,9	29 ± 3,5	26 ± 1,1	26 ± 1,4
SFA	18 ± 0,41	22 ± 1,2	27 ± 1,5	27 ± 0,50
MUFA	28 ± 2,5	29 ± 2,7	34 ± 3,6	35 ± 1,3
PUFA	50 ± 1,9	44 ± 3,5	36 ± 1,3	36 ± 1,5

Também neste ensaio o perfil foi igual, tendo-se obtido os mesmos ácidos gordos para qualquer um dos meios. No que diz respeito às percentagens, foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos ácidos octadecadienóico (C18:2  $\omega$ -6) e ecosatetraenóico (C20:4  $\omega$ -6). Nestes ácidos a percentagem obtida foi sempre superior no meio alternativo. Os MUFA também revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os meios, mas a sua percentagem foi superior no meio controlo. Pelo contrário, nos SFA e nos PUFA não se obtiveram diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ). Tal como no ensaio anterior, o meio alternativo foi capaz de possibilitar uma maior produção de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), atingindo uma percentagem igual a 50 % na fase exponencial contra os 36 % da mesma fase no meio standard. Entre as fases de desenvolvimento não foram obtidas diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ).

Uma análise conjunta aos resultados obtidos na caracterização bioquímica em ácidos gordos nos meios alternativos e meio controlo, é possível concluir que os meios testados permitem um perfil igual entre todos. Embora concentrações de alguns ácidos apresentem diferenças significativas, de uma forma geral a semelhança entre todos os meios é bastante considerável. Um facto importante e revelador dos meios alternativos estudados recai sobre a percentagem obtida dos PUFA. Qualquer um desses meios permitiu uma concentração superior ao meio controlo, destacando-se o meio com efluente salino e soro de queijo que atingiu uma percentagem igual a 50 %. Quanto ao valor de EPA, um dos PUFAs mais importantes, também em meio alternativo a sua produção foi superior quando comparado com o meio tradicionalmente utilizado.

Estudos indicam que o perfil de ácidos gordos da microalga *N. oceanica* pode ser influenciado por diferentes fatores, em especial a intensidade e regime da luz, temperatura, pH e outras condições ambientais. Em resultado desses ensaios, verificou-se que o aumento da intensidade luminosa proporcionou uma diminuição dos ácidos gordos polinsaturados e, pelo contrário, a baixa temperatura o aumento dos mesmos (Ma, *et al.*, 2016; Sirisuk, *et al.*, 2018). Estes factos podem explicar os resultados obtidos, uma vez que os principais fatores capazes de interferir no perfil de ácidos gordos desta estirpe não dizem respeito às concentrações de nutrientes presentes no meio, mas sim às condições de cultivo, que, nestes ensaios, foram semelhantes entre todos e não se fizeram variar.

## 5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O objetivo principal do presente estudo assentava na avaliação do crescimento de microalgas em meios alternativos formulados com resíduos agroindustriais. Essa avaliação foi efetuada com base nas curvas de crescimento, isto é, a concentração de biomassa ao longo do tempo de cultivo, a taxa média de crescimento e a produtividade em biomassa e teve como objetivo verificar em que medida os meios de cultivo testados permitiriam o desenvolvimento destes microrganismos. Os resultados demonstram a viabilidade de cultivar as microalgas *C. vulgaris* e *N. oceanica* em meios alternativos. Todos os meios testados permitiram o crescimento das espécies, no entanto é importante ter em conta todos os fatores que influenciam diretamente o desenvolvimento destes microrganismos.

O cultivo da microalga de água doce demonstrou diferenças significativas no seu crescimento quando cultivada em condições distintas. O desenvolvimento deste microrganismo sob condições controladas possibilitou uma produtividade máxima em meio alternativo com açúcar da Tabaqueira, tendo, assim, superado o meio tradicionalmente utilizado. Pelo contrário, o cultivo sob condições externas apresentou-se mais vantajoso em meio standard, o qual possibilitou uma produtividade superior aos meios alternativos. Estes meios, tanto em regime descontínuo como em regime semi-contínuo, apresentaram menor eficiência no crescimento deste microrganismo. Estes resultados não só demonstram a forte influência da variabilidade das condições externas no crescimento da microalga, como também a pior disponibilidade e proporção de nutrientes essenciais presentes nos meios alternativos. Os ensaios realizados permitem concluir que a variabilidade diária de diversas condições provoca um efeito negativo mais acentuado no crescimento da microalga cultivado em meios alternativos. O crescimento em regime semi-contínuo demonstrou a pior disponibilidade e proporção de nutrientes existente nos meios alternativos, uma vez que possibilitou um crescimento superior ao regime descontínuo e mais próximo ao meio standard. A caracterização bioquímica apresentou resultados não satisfatórios quanto à produção de proteínas e clorofila. A biomassa de *C. vulgaris* cultivada em meios alternativos exibiu percentagem de proteína e concentração de clorofila (*a* e *b*) inferiores ao atingido em meio tradicional. Destes factos conclui-se que as distintas caracterizações elementares entre os meios utilizados influenciaram os diferentes resultados obtidos na concentração quer de proteína quer de clorofila (*a* e *b*). Os meios alternativos não proporcionam as condições necessárias para a produção destes compostos e, por isso, demonstram a fraca disponibilidade de nutrientes essenciais.

A microalga marinha apresentou resultados bastante satisfatórios quando cultivada em meios alternativos. O crescimento desta estirpe sob condições controladas foi sempre superior quando utilizados os meios em estudo, tendo alcançado uma produtividade máxima em meio com efluente salino e soro de queijo. Em condições externas, também os meios alternativos mostraram melhor eficiência no crescimento deste microrganismo, alcançando, por isso, produtividades em biomassa superiores ao meio controlo. No entanto, nestes ensaios o meio com efluente salino e meio Algafarm inorgânico superou o meio com soro de queijo. Estes resultados indicam o potencial da produção desta microalga em meios com resíduos agroindustriais e demonstram uma ajustada concentração e disponibilidade de nutrientes existentes nos meios testados. Ainda assim, o meio com soro de queijo evidenciou a influência da variabilidade das condições externas no desenvolvimento da estirpe, os quais produziram um efeito negativo mais acentuado no crescimento em culturas com o meio alternativo com soro de queijo. Quanto à caracterização bioquímica, o perfil e percentagem de ácidos gordos e lípidos totais demonstrou o elevado potencial destes meios para a produção destes compostos em biomassa de *N. oceanica*. A produção de lípidos totais foi semelhante entre todos os meios testados e a produção de EPA e PUFA foi favorecida em meios alternativos. Assim, os meios testados possibilitam a produção destes compostos, o que demonstra a capacidade dos mesmos em fornecer o necessário às células desta estirpe.

As microalgas testadas no presente estudo foram capazes de crescer em meios alternativos com resíduos, no entanto o cultivo de *N. oceanica* apresentou melhores resultados, indicando a presença de meios mais ajustados ao seu desenvolvimento e uma maior capacidade e resistência a ambientes mais adversos. Por outro lado, foi notória a influência das condições externas no cultivo destes microrganismos, demonstrando a importância dos mesmos numa produção em grande escala. Não só é essencial reajustar os meios, de forma a oferecer todos os nutrientes essenciais e possibilitar o máximo desenvolvimento, como também ter em conta todos os fatores que possam interferir numa produção vantajosa.

Apesar dos bons resultados obtidos, deve efetuar-se a avaliação das mesmas estirpes em reatores de maiores dimensões. É importante perceber se o desenvolvimento das mesmas é possível em reatores utilizados em produções em grande escala. Também outros resíduos e microalgas devem ser testados. Resíduos de distintas origens e com uma caracterização elementar diferente podem proporcionar boas condições ao desenvolvimento destes microrganismos, assim como estirpes isoladas de ambientes mais adversos demonstrem maior capacidade, resistência e tolerância, proporcionando melhores resultados em crescimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A *Secil* (2016). Obtido em 24 de maio de 2018, de Secil-group: <http://www.secil-group.com/missao-visao-valores/>
- Abou-El-Souod, G. W., Hassan, L. H., & Morsy, E. M. (2016). Comparison of Different Media Formulations and the Optimal Growing Conditions on Growth, Morphology and Chlorophyll Content of Green Alga, *Chlorella vulgaris*. *Journal of American Science*.
- Ajayan, K. V., Selvaraju, M., Unnikannan, P., & Sruthi, P. (2015). Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species. *International Journal of Phytoremediation*.
- AlgaeBase* (2002). Obtido em 27 de junho de 2018, de AlgaeBase: [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=P910568ab64370075](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=P910568ab64370075)
- Ambiente Magazine* (26 de outubro de 2016). Obtido em 24 de maio de 2018, de ambiente magazine: <https://www.ambientemagazine.com/secil-inaugura-unidade-de-producao-de-microalgas-em-alcobaca/>
- Andrade, D. S., & Filho, A. C. (2014). *Produção de biomassa e coprodutos*. COPEI Geração e Transmissão.
- Arun, V., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2017). Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofpr*.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. CRC Press.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*.
- Bodnar, O. I., Burega, N. V., Palchyk, A. O., Viniarska, H. B., & Grubinko, V. V. (2016). Optimization of *Chlorella vulgaris* Beij. cultivation in a bioreactor of continuous action.
- Bodnar, O., Viniarska, H., Vasilenko, O., & Grubinko, V. (2016). PIGMENT CONTENT OF *Chlorella vulgaris* Beij. Under influence of sodium selenite and metals ions. *Biotechnologia acta*.
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.

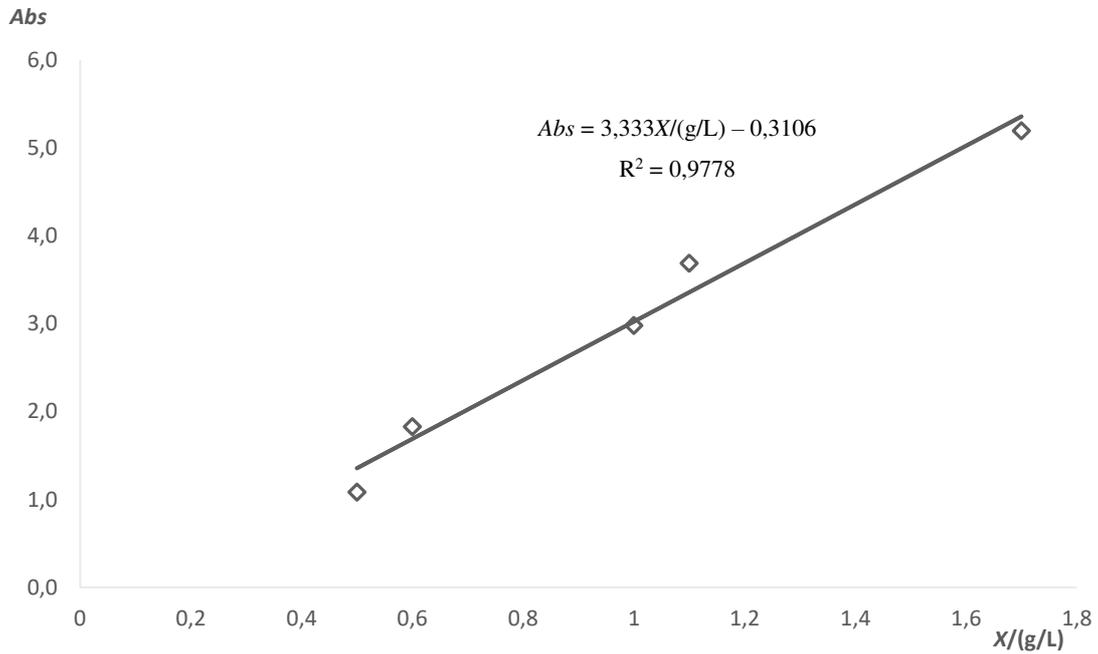
- Chang, H.-X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., & Zhu, X. (2016). Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO<sub>2</sub> biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresource Technology*.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Elsevier*.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*.
- Chu, W.-L. (2012). Biotechnological applications of microalgae.
- Dermibas, A., & Dermibas, M. F. (2009). *Algae Energy: Algae as a new source of biodiesel*. Springer.
- Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Carvalho, S. M., & Fett, R. (nov-dez de 2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*.
- Ding, J., Zhao, F., Cao, Y., Xing, L., Liu, W., Mei, S., & Li, S. (2015). Cultivation of Microalgae in Dairy Farm Wastewater Without Sterilization. *International Journal of Phytoremediation*.
- Forget, N., Belzile, C., Rioux, P., & Nozais, C. (2010). Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry. *Journal of biological education*.
- Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. (2014). The effect light supply on microalgal growth, CO<sub>2</sub> uptake and nutrient removal from wastewater. *Energy Conversion and Management*.
- Krienitz, L., Huss, V. A., & Bock, C. (2015). Chlorella: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science*.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae - a literature review.
- Lee, R. E. (2008). *Phycology*. United States of America: Cambridge University Press.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1984). Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*.
- Lopes, T. S., Silva, A. L., Silva, A. F., Dantas, G. D., & Ferreira, W. B. (2015). Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella* sp. *Revista Ciência e Tecnologia*.

- M., A., & K., A. E.-W. (2017). Enhance Growth and Biochemical Composition of *Nannochloropsis oceanica*, Cultured under Nutrient Limitation, Using Commercial Agricultural Fertilizers. *Journal of Marine Science: Research & Development*.
- Ma, X.-N., Chen, T.-P., Yang, B., Liu, J., & Chen, F. (2016). Lipid Production from *Nannochloropsis*. *marine drugs*.
- Maqsood, S. A. (1974). *Determination of algae growth potencial in natural environment*. Master's thesis, Texas Tech University, Civil Engineering, Texas.
- Marinho, Y. F., Brito, L. O., Campos, C. V., Severi, W., Andrade, H. A., & Galvez, A. O. (2016). Effect of the addition of *Chaetoceros calcitrans*, *Navicula* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (diatoms) on Phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) postlarvae reared in a biofloc system. *Aquaculture Research*.
- Martínez, M. E., Sánchez, S., Jiménez, J. M., Yousfi, F. E., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Elsevier*.
- Nunnez, M., & Quigg, A. (2015). Changes in growth and composition of the marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Nannochloropsis salina* in response to changing sodium bicarbonate concentrations. *Journal of Applied Phycology*, 4.
- Ortenzo, Y. T., Amaral, G. G., Almeida, S. d., & Oliveira, E. C. (2015). Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. *bioenergia em revista: diálogos*.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Solovchenko, A., Batushansky, A., Kaye, Y., . . . Boussiba, S. (2013). Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophy *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Applied microbial and cell physiology*.
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custódio, L., Catarina Vizetto-Duarte, C. P., Resek, E., . . . Varela, J. (2012). Polyunsaturated Fatty Acids of Marine Macroalgae: Potential for Nutritional and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*.
- Piorreck, M., Baasch, K.-H., & Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acid of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*.
- Ponnuswamy, I., Madhavan, S., & Shabudeen, S. (2013). Isolation characterization of green microalgae for carbon sequestration, waste water treatment and bio-fuel production. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*.

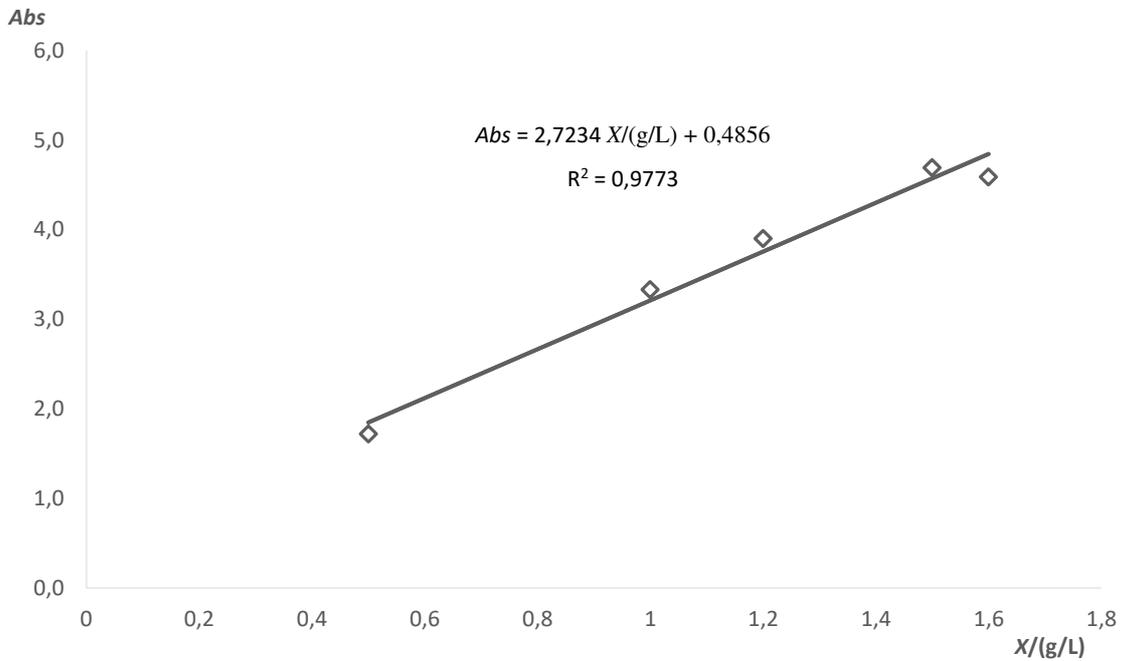
- Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of microalgae - A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*.
- Raposo, M. F., Morais, R. M., & Morais, A. M. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*.
- Richmond, A. (2004). *Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science.
- Safafar, H., Norregaard, P., Ljubic, A., Moller, P., Holdt, S., & Jacobsen, C. (2016). Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering*.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.
- Sandnes, J. M., Kallqvist, T., Wenner, D., & Gislerod, H. R. (2005). Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. *Journal of Applied Phycology*.
- Schmitz, R., Magro, C. D., & Colla, L. M. (2012). Aplicações ambientais de microalgas. *CIATEC - UPF*, 48-60.
- Secil (28 de outubro de 2016). Obtido em 24 de maio de 2018, de Secil-group: <http://www.secil-group.com/2016/10/28/inauguracao-da-unidade-de-producao-de-microalgas/>
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Khoeyi, Z. A. (2011). Protein, fatty acid, and pigments content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *Journal of Applied Phycology*.
- Silva, J. L., Marques, A., Barros, A., Campos, J., Mendonça, S. H., & Gomes, R. (2017). Algafarm: cultivo de microalgas à escala industrial. *Tecnoalimentar*.
- Silva (24 de outubro de 2016). *Secil inaugura unidade de produção de microalgas*. Obtido em 24 de maio de 2018, de Jornal Económico: <http://www.jornaleconomico.sapo.pt/noticias/secil-inaugura-unidade-producao-microalgas-82605>
- Silva, N., Gonçalves, A., Moreira, F., Silva, T., Martins, F., Alvim-Ferraz, M., . . . Pires, J. (2015). Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: a kinetic study. *Algal Research*.
- Sirisuk, P., Sunwoo, I., Kim, S. H., Awah, C. C., Ra, C. H., Kim, J.-M., . . . Kim, S.-K. (2018). Enhancement of biomass, lipids, and polyunsaturated fatty acid (PUFA) production in

- Nannochloropsis oceanica with a combination of single wavelength light emitting diodes (LEDs) and low temperature in a three-phase culture system. *Bioresource Technology*.
- Suda, S., Atsumi, M., & Miyashita, H. (2002). Taxonomic Characterization of marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia*.
- Taraldsvik, M., & Mykkestad, S. (2010). The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *European Journal of Phycology*.
- Ting, H., Haifeng, L., Shanshan, M., Zhang, Y., Zhidan, L., & Na, D. (January de 2017). Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review.
- Vieler, A., Wu, G., Tsai, C.-H., Bullard, B., Cornish, A. J., Harvey, C., . . . Clark, T. J. (2017). Genome, functional gene annotation, and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genetics*.
- Zhang, X., Lu, Z., Wang, Y., Wensel, P., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2016). Recycling *Nannochloropsis oceanica* culture media and growth inhibitors characterization. *Elsevier*.

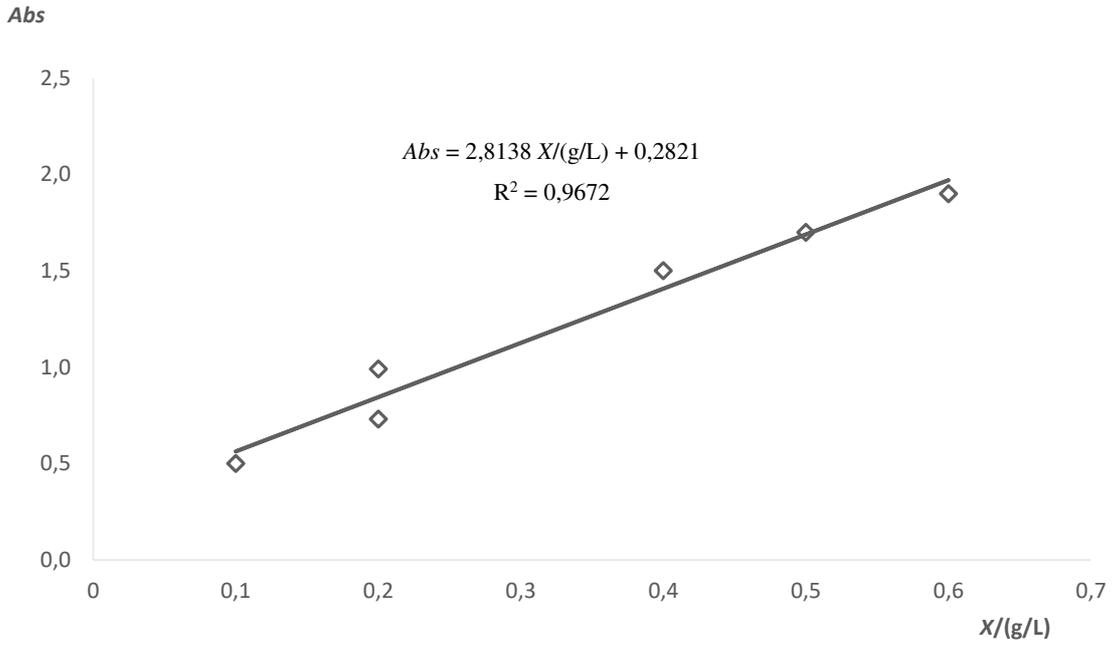
## ANEXO I – RETAS DE CALIBRAÇÃO



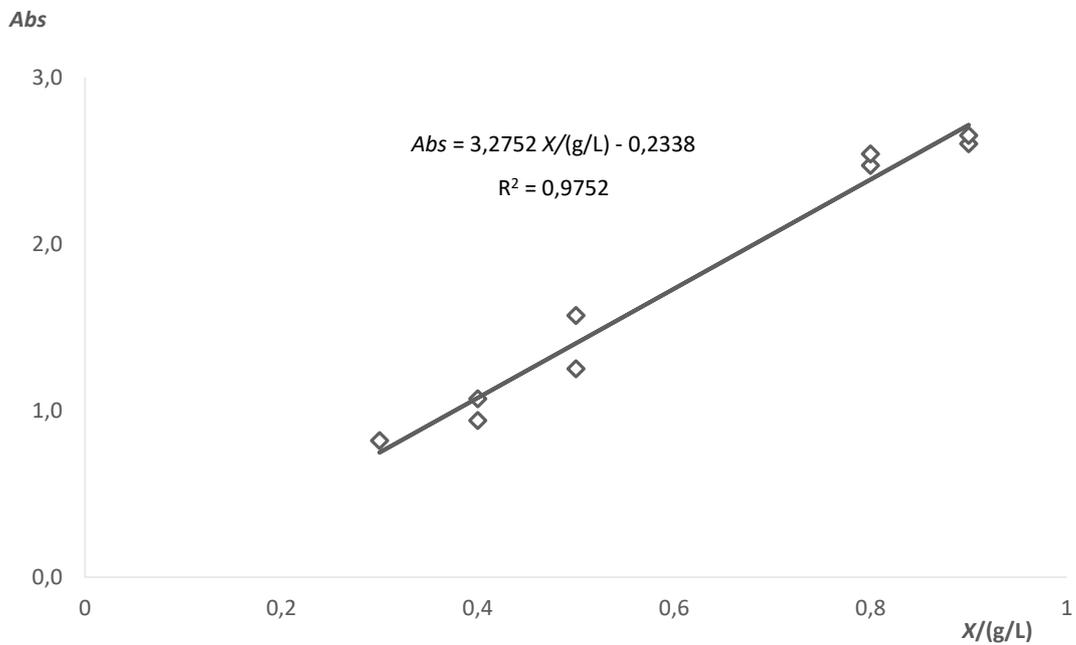
**Figura I-1.** Valores de absorvância, medida a 600 nm, em função da concentração em biomassa (g/L), em meio inorgânico, da espécie *Chlorella vulgaris*.



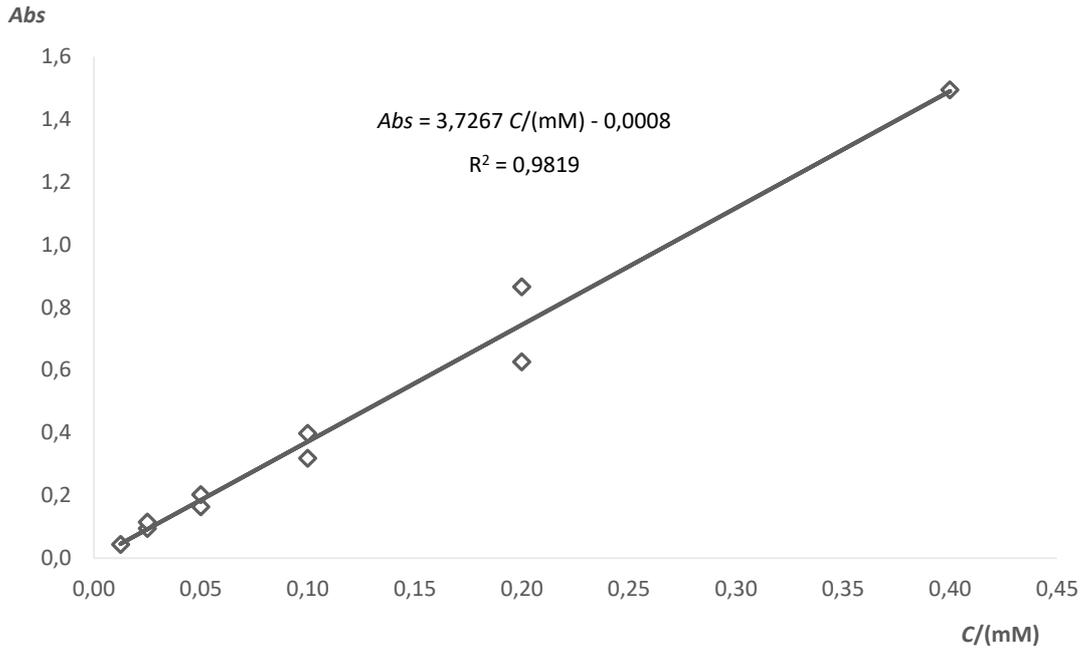
**Figura I-2.** Valores de absorvância, medida a 600 nm, em função da concentração em biomassa (g/L), em meio orgânico, da espécie *Chlorella vulgaris*.



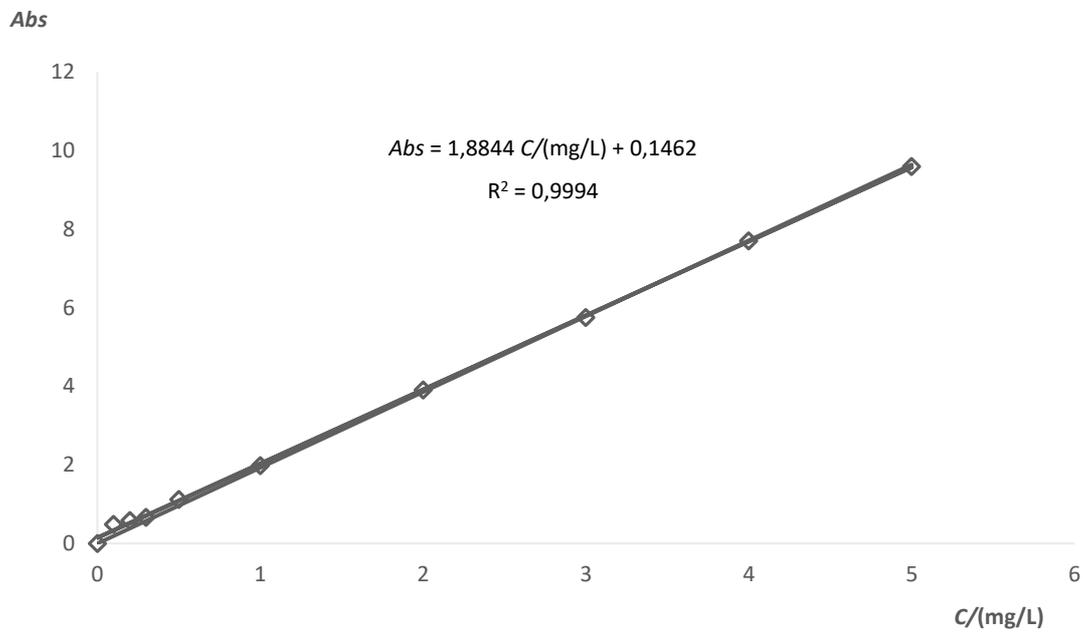
**Figura I-3.** Valores de absorvância, medida a 600 nm, em função da concentração em biomassa (g/L), em meio inorgânico, da espécie *Nannochloropsis oceânica*.



**Figura I-4.** Valores de absorvância, medida a 600 nm, em função da concentração em biomassa (g/L), em meio orgânico, da espécie *Nannochloropsis oceânica*.

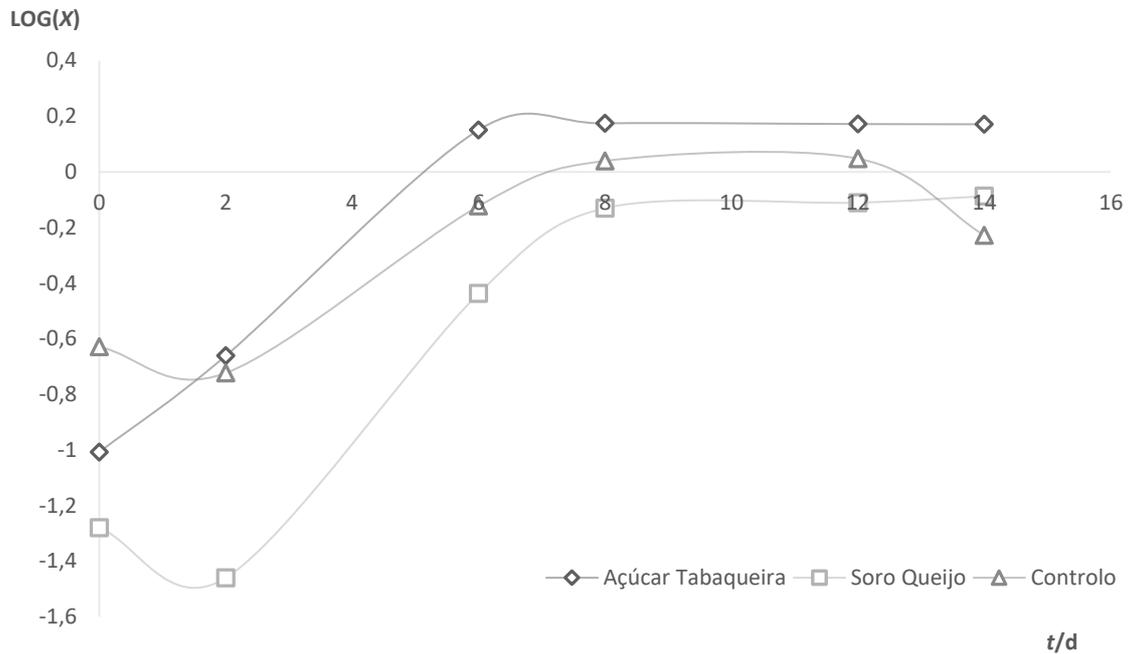


**Figura I-5.** Valores de absorvância, medida pelo cálculo:  $Abs_{220} - 2 \times Abs_{275}$ , em função da concentração de nitratos (mM).

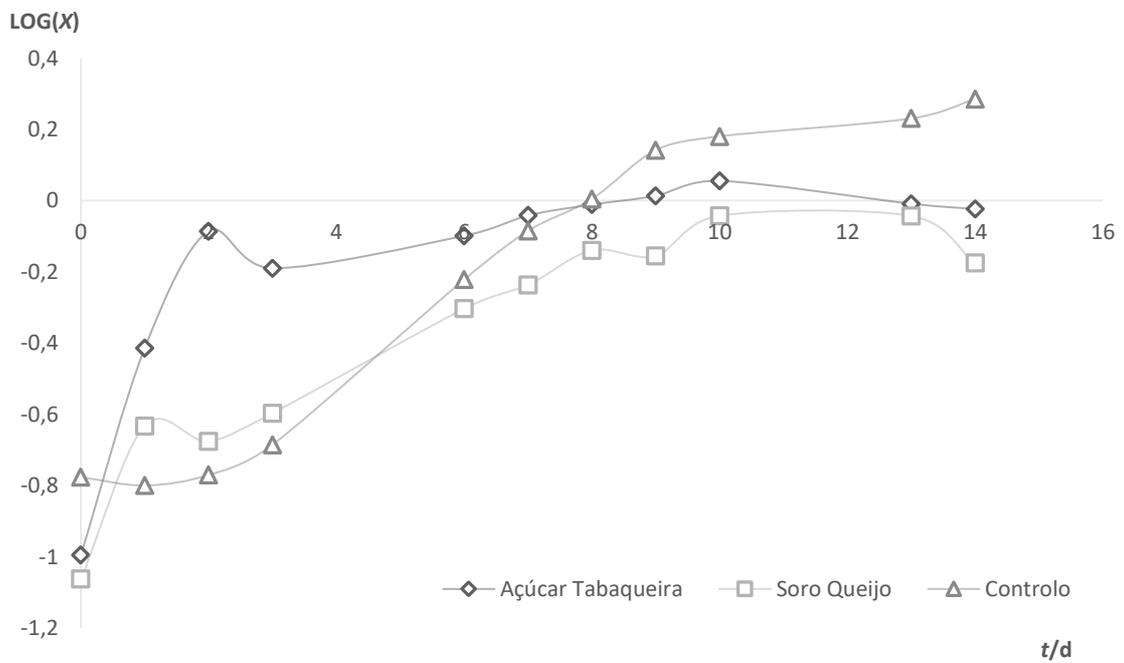


**Figura I-6.** Valores de absorvância, medida a 716 nm, em função da concentração de fosfato (mg/L).

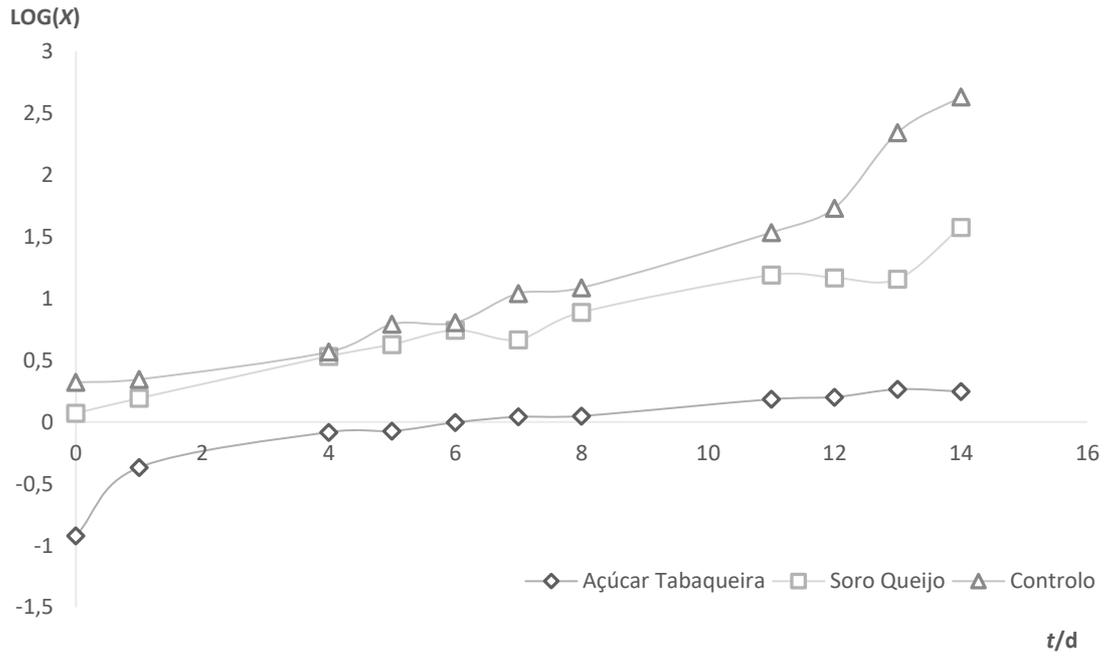
## ANEXO II – GRÁFICOS AUXILIARES



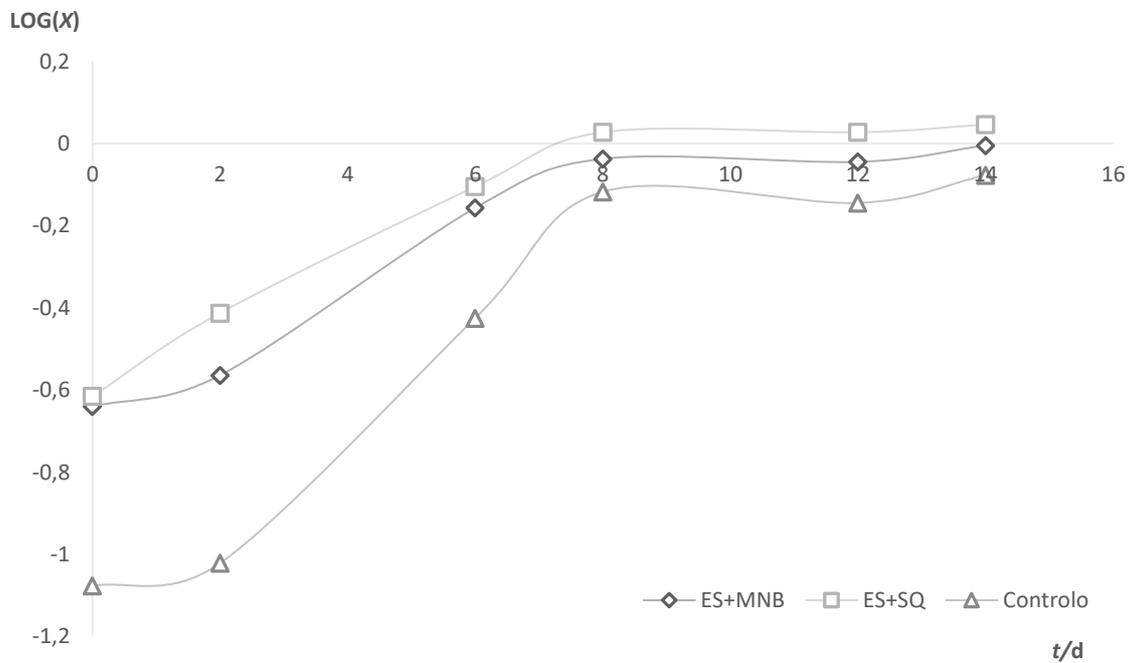
**Figura II-1.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 2 L, perante a utilização de meios alternativos com açúcar da Tabaqueira e Soro Queijo.



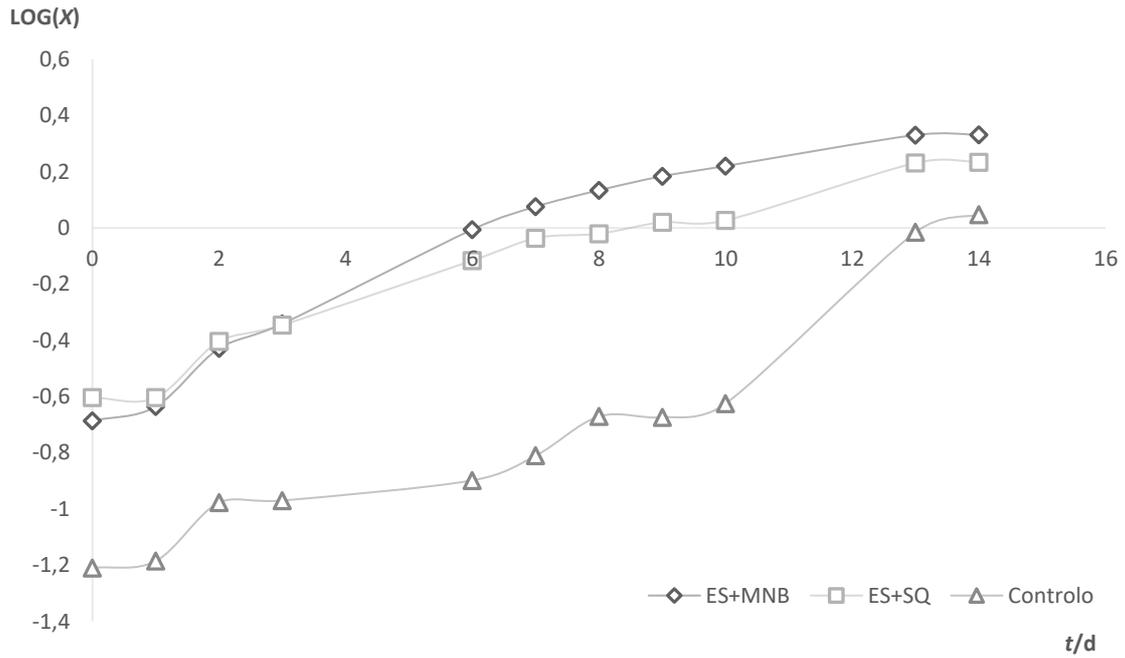
**Figura II-2.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 50 L e regime descontínuo, perante a utilização de meios alternativos com açúcar da Tabaqueira e Soro Queijo.



**Figura II-3.** Curvas de crescimento da microalga *C. vulgaris*, em reatores de 50 L e regime semi-contínuo, perante a utilização de meios alternativos com açúcar da Tabaqueira e Soro Queijo.



**Figura II-4.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica*, em reatores de 2 L, perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: Efluente Salino e Soro Queijo.



**Figura II-5.** Curvas de crescimento da microalga *N. oceanica*, em reatores de 50 L, perante a utilização de meios alternativos com os resíduos: Efluente Salino e Soro Queijo.