

RESUMO

Este trabalho, desenvolvido no contexto de estágio curricular nos laboratórios de Engenharia Química e Ambiente do Instituto Politécnico de Tomar, teve como principal objectivo estudar a potencialidade de produzir biomassa algal, de forma integrada no processo de tratamento de águas residuais através de zonas húmidas construídas. Neste âmbito, desenvolveram-se actividades predominantemente de foro experimental segundo três vertentes: a implementação ou validação de técnicas analíticas, tais como a determinação da concentração de nutrientes na fase aquosa, o teor de biomassa em termos secos e o teor de açúcares totais e redutores; o estudo da potencialidade de utilização de lixiviados, ricos em nutrientes, obtidos de argilas expandidas usadas como enchimento de zonas húmidas construídas, como meio de crescimento de micro e de macroalgas; a avaliação e tentativa de optimização do crescimento das microalgas e das macroalgas.

Escolheu-se a macroalga *Cladophora aegagropila* atendendo a estar referenciada pela sua capacidade de clarificação das águas. Estudou-se o crescimento da macroalga em substratos tradicionais, e na argila expandida sem qualquer tratamento, verificando-se uma aparente boa adequação das algas a este diferente substrato. Não existindo dados na literatura sobre o teor de açúcares ou amidos nesta alga, determinou-se por análise que o teor em açúcares totais é de 38,8%, dos quais 22,4% são açúcares redutores.

Foram também estudadas duas microalgas, *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.* Avaliou-se a cinética de crescimento em diferentes meios de crescimento, determinando-se a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação. A concentração máxima obtida foi de 0,21 g/L para a *Anabaena sp.*, sendo de salientar que o meio líquido obtido por lixiviação da argila expandida comprovou ser apropriado para o crescimento das microalgas, apesar de conduzir a taxas específicas de crescimento inferiores. A utilização dos lixiviados pode representar uma redução de custos na produção de algas, e uma forma de regenerar os materiais de enchimento usados nas zonas húmidas construídas.

Palavras-chave: Algas, *Cladophora aegagropila*, *Spirogyra* sp., *Anabaena* sp., açúcares, nutrientes.

ABSTRACT

This work, developed in the context of curricular internship in the Chemical Engineering and Environment laboratories of the Polytechnic Institute of Tomar, had as main objective to study the capability of producing algal biomass integrated with the process of wastewater treatment through constructed wetlands. In this context, experimental activities have been developed in three main areas: the implementation and validation of analytical techniques, such as determining the nutrient concentration in the aqueous phase, the content of biomass in dry terms and total and reducing sugars; study of the potential use of leachates, rich in nutrients, obtained from expanded clays used as fillers in constructed wetlands, as growth medium for micro- and macro-algae; evaluation and attempt to optimize the growth of micro- and macro-algae.

The macroalgae *Cladophora aegagropila* was chosen to assess its composition in starch since its capacity for removing organic matter and compounds of phosphorus and nitrogen, water clarification and odors is already widely known. The growth experiments in expanded clay show a favorable adaptation of the macroalgae to that media. On analysis it was found that their content of total sugar is 38,8% of which 22,4% are reducing sugars.

For the microalgae *Anabaena sp.* and *Spirogyra sp.* the growth kinetics has been studied for different growth media by determining the specific growth rate and doubling time. The maximum concentration obtained was 0,21 g/L for the *Anabaena sp.* being observed that the medium obtained from expanded clay, although leading to lower growth rates, proved to be appropriate with the added value of regenerating these constructed wetlands filling materials. The use of leachates may represent a reduction in algae production costs and a way of regenerating filling materials used in constructed wetlands.

Keywords: Algae, *Cladophora aegagropila*, *Spirogyra sp.*, *Anabaena sp.*, sugars, nutrients.

Índice

Resumo	I
Abstract	III
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas	XI
1. Introdução	1
1.1 Bioetanol como Biocombustível	2
1.2 Colheita e processamento da biomassa algal	10
1.3 Tipos de algas	12
1.4 Reprodução, metabolismo, regime e sistema de cultivo	24
1.5 Influência dos factores ambientais	30
1.6 Objectivos do estágio e estrutura da tese	39
2. Materiais e Métodos	41
2.1 Materiais	41
2.1.1 Algas	41
2.1.2 Meios de crescimento das algas	42
2.1.2.1 Meios de crescimento da macroalga	42
2.1.2.2 Meios de crescimento da microalga	46
2.2 Métodos experimentais	49
2.2.1 Crescimento da macroalga	49
2.2.2 Crescimento das microalgas	50
2.2.2.1 Preparação do material utilizado no cultivo	51
2.2.2.2 Manutenção do banco de células	52
2.2.3 Metodologias Analíticas para as Macroalgas	52
2.2.3.1 Determinação do Peso Seco	52
2.2.3.2 Hidrólise Ácida Quantitativa	52
2.2.3.3 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais	53
2.2.3.4 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores	54
2.2.3.5 Determinação do Teor em Fósforo Total	54
2.2.3.6 Determinação do Teor em Azoto Total	55
2.2.3.7 Determinação da Concentração de Fosfatos	56
2.2.3.8 Determinação da Concentração de Nitratos	56
2.2.4 Metodologias Analíticas para as Microalgas	57
2.2.4.1 Determinação da Biomassa Seca	57

2.2.4.2	Elaboração de curvas de crescimento	58
3.	Resultados e discussão	59
3.1	Rectas de calibração dos vários métodos	59
3.1.1	Açúcares Totais e Redutores	59
3.1.2	Teor em Fósforo Total, Azoto Total, Fosfatos e Nitratos	60
3.2	Estudos efectuados com a macroalga <i>Cladophora aegagropila</i>	62
3.2.1	Ensaio de crescimento	62
3.2.2	Estimativa do consumo de nutrientes pela macroalga	65
3.3	Estudos efectuados com as microalgas <i>Spirogyra sp.</i> e <i>Anabaena sp.</i>	70
3.3.1	Caracterização das microalgas	70
3.3.2	Rectas de calibração para acompanhar o crescimento pelo método espectrofotométrico	72
3.3.3	Estudos de crescimento	73
4.	Conclusões	81
	Bibliografia	83
	ANEXO I – REAGENTES QUÍMICOS	89

Índice de figuras

	Pág
Capítulo 1 – Introdução	
Figura 1.1 Processo conceptual para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal.	1
Figura 1.2 Fig. 1.2 - Consumo de biocombustíveis, em ktep (kilo-toneladas equivalentes de petróleo), no sector dos transportes na União Europeia em 2010.	3
Figura 1.3 Consumo de gasóleo e de gasolina em Portugal entre 1995 e 2010 em Gigajoule.	4
Figura 1.4 Projecção para 2020 da contribuição de bioetanol e biodiesel no sector dos transportes na UE27.	5
Figura 1.5 Representação de um processo de produção de Etanol.	7
Figura 1.6 Vias metabólicas em microalgas verdes relacionadas com a produção de biocombustíveis.	8
Figura 1.7 Produção de Bioetanol ou de Biodiesel a partir de Algas.	9
Figura 1.8 Origem dos plastos.	13
Figura 1.9 Amiloplastosou grãos de amido.	13
Figura 1.10 Algumas espécies de Cianobactérias.	14
Figura 1.11 Organização celular das algas azuis ou cianobactérias.	15
Figura 1.12 Exemplo de cianobactériasheterocísticas.	16
Figura 1.13 Fornecimento de azoto, pelos heterocistos, sob a forma de glutamina às células vegetativas vizinhas, enquanto estas fornecem glúcidos.	16
Figura 1.14 Reprodução sexuada na <i>Spirogyrasp</i> .	18
Figura 1.15 Representação esquemática de algumas clorófitas.	19
Figura 1.16 <i>Sargassum</i> , exemplo de algas pardas.	21
Figura 1.17 Representação esquemática do aspecto geral do talo de algumas rodófitas.	22
Figura 1.18 Produção de macroalgas.	25
Figura 1.19 Exemplos de sistemas de cultivo de microalgas.	26
Figura 1.20 Ciclo de crescimento em sistema fechado.	28
Figura 1.21 Curva de crescimento diáuxico.	30
Figura 1.22 Fotossíntese e respiração celular.	31
Figura 1.23 Comprimentos de onda do espectro da luz visível mais eficazes na realização da fotossíntese.	32
Figura 1.24 Ciclo do Fósforo.	37
Figura 1.25 Ciclo do nitrogénio.	38

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Figura 2.1	Macroalga <i>Cladophora aegagropila</i> – “MossBall”.	41
Figura 2.2	Pré-inóculo das microalgas.	42
Figura 2.3	Aquário com macroalgas instalado no laboratório.	43
Figura 2.4	(a) Instalação piloto de uma zona húmida existente no departamento de Engenharia Química, desde 2005, no Instituto Politécnico de Tomar em que o enchimento dos tanques é a argila expandida; (b) Análise microscópica da argila expandida; (c) Superfície da argila expandida com bactérias produzindo uma área de biofilme.	44
Figura 2.5	Utilização da argila expandida e sua regeneração.	45
Figura 2.6	Configuração do fotobioreator.	50
Figura 2.7	Diferentes espectros fotossintéticos que as lâmpadas fluorescentes GLO T8 Linear Fluorescent Bulbs reproduzem.	51
Figura 2.8	Preparação da macroalga para a hidrólise ácida quantitativa.	53
Figura 2.9	Filtração a vácuo.	58

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Figura 3.1	Recta de calibração para avaliar o teor em açúcares totais, em termos de glucose, com o reagente FS.	59
Figura 3.2	Recta de calibração para avaliar o teor em açúcares redutores, em termos de glucose, com o reagente DNS.	59
Figura 3.3	Recta de calibração para avaliar o teor em fósforo total.	60
Figura 3.4	Recta de calibração para avaliar o teor em azoto total.	61
Figura 3.5	Recta de calibração para avaliar o teor em fosfatos.	61
Figura 3.6	Recta de calibração para avaliar o teor em nitratos.	61
Figura 3.7	.Ensaio de reprodução das macroalgas.	64
Figura 3.8	Variação do valor do pH em função do tempo.	65
Figura 3.9	Distribuição mássica do fósforo entre as fases líquida e sólida após 14 dias de contacto.	67
Figura 3.10	Distribuição mássica do fósforo entre as fases líquida e sólida após mais 15 dias (em que se retirou todo o líquido mas manteve-se a mesma argila).	68
Figura 3.11	Quantidade de azoto na fase líquida após 14 dias de contacto.	69
Figura 3.12	Quantidade de azoto na fase líquida após mais 15 dias (em que se retirou todo o líquido mas manteve-se a mesma argila).	69
Figura 3.13	Observação ao microscópio, numa ampliação x400, das espécies: (a) <i>Anabaena</i>	70

sp; (b) *Spirogyra sp*.

Figura 3.14	Observação ao microscópio, numa ampliação 400x, da espécie <i>Anabaena sp.</i> .	71
Figura 3.15	Observação ao microscópio, numa ampliação 400x, da espécie <i>Spirogyra sp.</i> .	72
Figura 3.16	Recta de calibração para a <i>Anabaenasp.</i> .	73
Figura 3.17	Recta de calibração para a <i>Siprogyra sp.</i> .	73
Figura 3.18	Crescimento da <i>Anabaenasp.</i> em diferentes meios de cultura.	75
Figura 3.19	Evolução do pH nos diferentes meios de cultura da <i>Anabaenasp.</i> .	77
Figura 3.20	Crescimento da <i>Spirogyrasp.</i> em diferentes meios de cultura.	78
Figura 3.21	Evolução do pH nos diferentes meios de cultura da <i>Spirogyrasp.</i> .	79

Índice de tabelas

Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1.1	Percentagem de biocombustíveis face ao total de gasolina e gasóleo utilizados para efeito de transportes em Portugal.	2
Tabela 1.2	Propriedades da gasolina e do etanol.	5
Tabela 1.3	Componentes presentes na mistura de combustível, em mg/L.	6
Tabela 1.4	Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas.	7
Tabela 1.5	Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas.	9
Tabela 1.6	Resumo das principais características dos métodos de recolha da biomassa microalgal.	11
Tabela 1.7	Categorias nutricionais de organismos.	27
Tabela 1.8	Os elementos essenciais à nutrição vegetal, as suas funções e identificação de sintomas de deficiência.	33

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Tabela 2.1	Teores dos elementos nutritivos da Nitrofoska Azul Especial 12-12-17s (+2).	46
Tabela 2.2	Composição do meio líquido L-M7.	47
Tabela 2.3	Composição da solução dos micronutrientes.	48

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3.1	Parâmetros das rectas de calibração para os diferentes métodos de determinação dos açúcares.	60
Tabela 3.2	Parâmetros das rectas de calibração para os diferentes métodos de determinação dos nutrientes.	62
Tabela 3.3	Variação do peso das macroalgas no meio A.	63
Tabela 3.4	Determinação em mg/L dos teores libertados, em equilíbrio, no meio A.	64
Tabela 3.5	Parâmetros das rectas de calibração para as microalgas <i>Anabaena sp.</i> e <i>Siprogyra sp.</i> .	73

Tabela 3.6	Determinação em mg/L dos teores libertados, em equilíbrio, no meio A.	74
Tabela 3.7	Taxa específica de crescimento da <i>Anabaena sp.</i>	76
Tabela 3.8	Taxa específica de crescimento da <i>Spirogyra sp.</i>	78

1.Introdução

O recurso a algas para satisfazer as necessidades da sociedade já é antigo e razoavelmente estudado e explorado. Certo tipo de algas podem ser utilizadas como fertilizantes ou para tratamento de solos, são utilizadas na indústria alimentar ou na indústria farmacêutica e naturalmente promovem a mitigação de CO₂. Acompanhando o desenvolvimento, a aplicação de algas também evolui e têm utilização no tratamento de efluentes, são fonte de matéria-prima sustentável com potencial para fins energéticos dependendo do seu tipo e quantidade o que influencia a escolha do processo de conversão (térmica, química e/ou biológica).

Algumas das vantagens que as algas apresentam em relação a outro tipo de matérias-primas utilizadas para a produção de biocombustíveis são por exemplo apresentarem uma produção não sazonal,manuseamento fácil por serem cultivadas em meio líquido e possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para crescimento de culturas alimentares. São versáteis em relação à utilização de água, podendo crescer em água doce e salgada, mas também em efluentes e águas residuais o que permite reduzir custos no fornecimento de nutrientes e/ou despoluir cursos de água

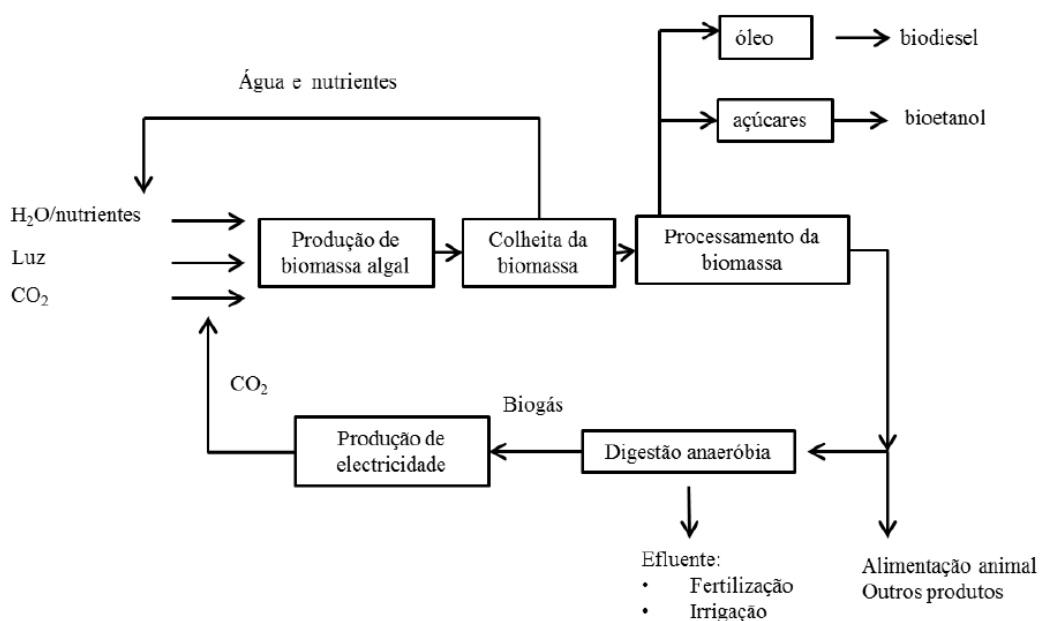


Figura 1.1 - Processo conceitual para a produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal [1].

1.1 Bioetanol como Biocombustível

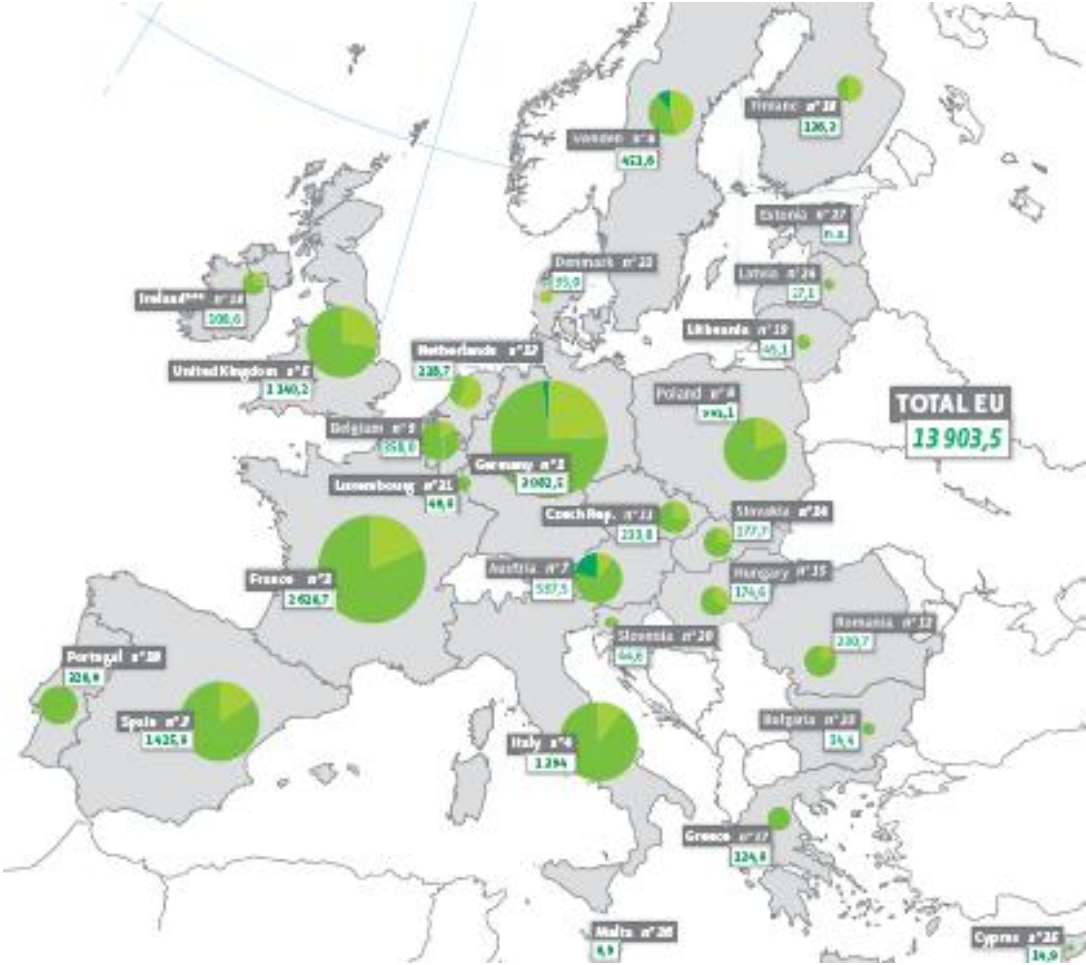
A estratégia 20 – 20 – 20, fixa como metas, a serem alcançados em 2020, a substituição de 20% dos combustíveis convencionais por combustíveis alternativos no sector dos transportes, 20% redução mínima das emissões de gases com efeito de estufa (comparação com os níveis de 1990) e 20% de aumento da eficiência energética. Este objectivo está descrito no livro verde da Comissão das Comunidades Europeias de 29 de Novembro de 2000, intitulado "Para uma estratégia europeia de segurança do abastecimento energético".

A Comissão aborda as principais questões associadas ao crescimento contínuo da dependência energética europeia. As necessidades energéticas da União Europeia (UE) são cobertas em 50% com produtos importados e, se nada se fizer até 2020 ou 2030, este número aumentará para 70%. Tal dependência externa implica riscos económicos, sociais, ecológicos e físicos para a UE [2].

Com base no Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de Março de 2006 que transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva nº 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes, as percentagens de consumo de biocombustíveis em Portugal estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1.1 – Percentagem de biocombustíveis face ao total de gasolina e gasóleo utilizados para efeito de transportes em Portugal [3].

2005	2006	2007	2008	2009	2010
0,00%	2,75%	3,50%	4,25%	5,00%	5,75%



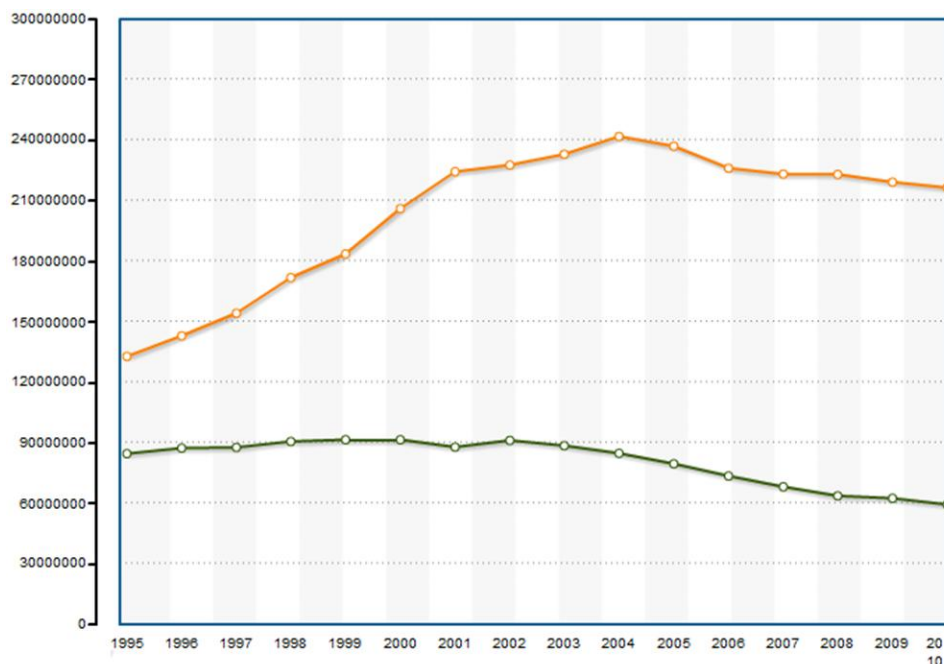


Figura 1.3 - Consumo de gasóleo e de gasolina em Portugal entre 1995 e 2010 em Gigajoule, (Gasóleo (, Gasolina ()) [5].

O mercado português e à semelhança do Europeu é caracterizado por um elevado número de veículos a gasóleo (29% do consumo é em gasolina e 62% de gasóleo), ficando assim limitado o uso de bioetanol e havendo apenas procura de biodiesel [6].

Apesar de não se investir em etanol, o mercado de combustíveis é um mercado atractivo:

- ✓ Representa 39% do consumo de energia;
- ✓ No segmento de transportes, a UE depende actualmente 98% do petróleo;
- ✓ Estima-se que a procura de combustíveis cresça cerca de 2% / ano durante as próximas décadas (estimativa conservadora que não incorpora ainda o alargamento da UE);
- ✓ As emissões de CO₂ derivadas dos transportes aumentam diariamente, pelo que o esforço para que se utilizem biocombustíveis, mais “limpos” que o petróleo, são uma constante em todos os governos da EU [7].

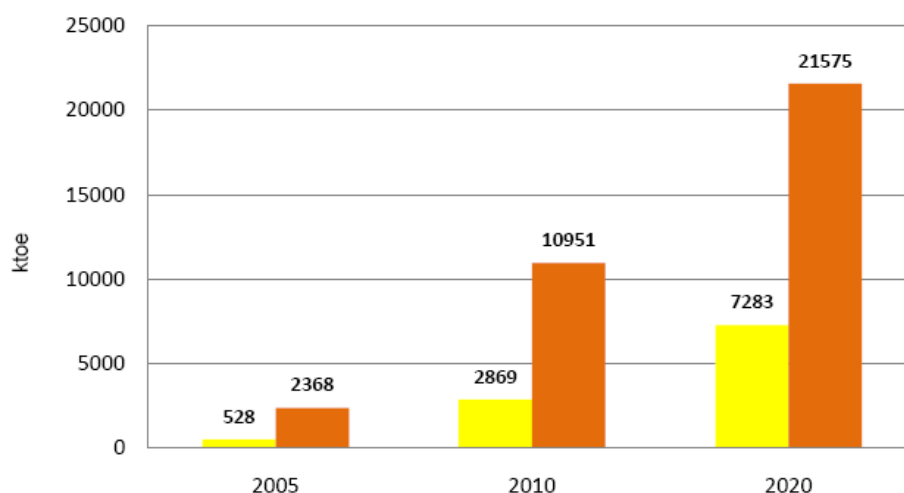


Figura 1.4 – Projecção para 2020 da contribuição de bioetanol e biodiesel no sector dos transportes na UE27, (Bioetanol (■), Biodiesel (■))[8].

O bioetanol tem como vantagens poder ser produzido a partir de diferentes culturas o que o torna disponível e sustentável, é uma fonte renovável logo não contribui para o aumento de emissões de CO₂, diminui a dependência energética e como tem um índice de octanas superior à gasolina aumenta a eficiência.

Tabela 1.2 - Propriedades da gasolina e do etanol [9].

Parâmetro	Unidade	Gasolina	Etanol
Poder calorífico	kJ/kg	43500	28225
	kJ/litro	32180	22350
Densidade	Kg/litro	0,72 – 0,78	0,792
Índice de octano RON (Research Octane Number)	-----	90 - 100	102 - 130
Índice de octano MON (Motor Octane Number)	-----	80 - 92	89 - 96
Calor latente de vaporização	kJ/kg	330 - 400	842 - 930
Relação ar/combustível	-----	14,5	9,0
Pressão de vapor	kPa	40 - 65	15 - 17
Temperatura de ignição	°C	220	420
Solubilidade em água	% volume	~0	100

No entanto a utilização de etanol ainda apresenta problemas como por exemplo na necessidade de conversão de alguns veículos, armazenamento e transporte pois o etanol é muito solúvel em água e no caso de existir humidade o combustível pode-se degradar. Na tabela 1.3 estão descritas as características dos componentes presentes nas misturas E5 e E85 no Brasil, na ASTM (American Society for Testing and Materials) e na Europa.

Tabela 1.3 - Componentes presentes na mistura de combustível, em mg/L [10].

Características	E5			E85		
	5L /100L			85L / 100L		
	Brasil	ASTM	Europa	Brasil	ASTM	Europa
% Etanol	5	5	5	85	85	85
Teor em água (Método de Karl- Fisher (KF))	250	500	120	4250	8500	2040
Acidez total	1,5	2,8	2,8	26	48	48
Cobre	0,003	0,004	0,004	0,05	0,07	0,07
Cloreto	-----	1,6	1,0	-----	27,2	17,0
Gomas lavadas	-----	2,5	-----	-----	42,5	-----
Metanol	-----	250	395	-----	4250	6715
C3-C5	-----	-----	790	-----	-----	13430
Enxofre	-----	1,2	0,4	-----	20,2	6,7
Sulfato	-----	0,2	-----	-----	2,7	-----
Fósforo	-----	-----	0,03	-----	-----	0,43
Mat. Não-volátil	-----	-----	5,0	-----	-----	85
Total (mg)	252	758	1314	4276	12890	22342

O Bioetanol, etanol produzido a partir de biomassa e/ou da fracção biodegradável de resíduos, para utilização como biocombustível, para que seja economicamente viável é necessário considerar-se o seu volume e custo de produção e o seu rendimento industrial. As suas matérias-primas podem ser classificadas em matérias açucaradas, em matérias amiláceas e em matérias celulósicas. No Brasil produz-se etanol a partir da cana-de-açúcar, nos Estados Unidos usa-se o milho, em África usa-se o sorgo sacarino e a União Europeia a beterraba (Alemanha) e o trigo [11].

A produção de Etanol envolve processos de hidrólise (acordo com o tipo de matéria-prima como se pode ver na Figura 1.5), fermentação dos açúcares e destilação. Existem variantes

que podem incluir sistemas de fermentação e sacarificação simultâneas (SSF) ou em separado.

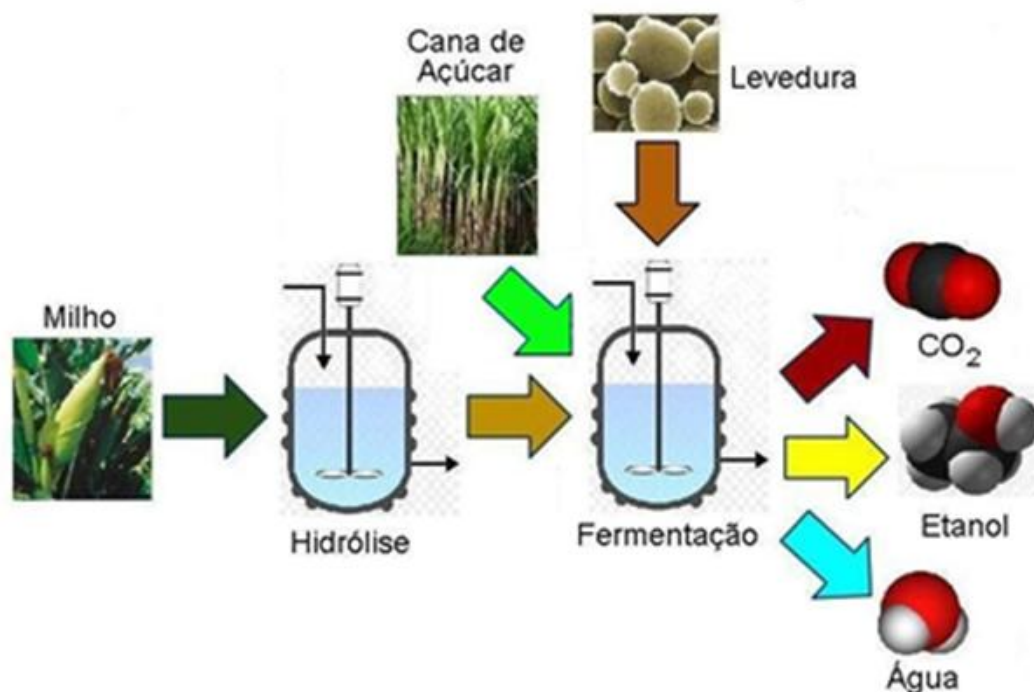


Figura 1.5 - Representação de um processo de produção de Etanol. [12]

As algas são uma fonte promissora de biocombustível, existindo um esforço relevante de investigação neste campo, em particular na produção a partir de microalgas [1]. As algas tanto podem representar uma fonte de lípidos como de hidratos de carbono. Os lípidos, óleo das algas podem ser convertidos em biodiesel e os hidratos de carbono podem ser convertidos em etanol. É possível produzir bioetanol a partir de algas através da conversão do amido (o componente de armazenamento) e celulose (o componente da parede celular).

Tabela 1.4 - Produtividade em etanol de diferentes matérias-primas [1].

Matéria-prima	Produtividade em etanol (L.ha ⁻¹)
Trigo	2 590
Mandioca	3 310
Sorgo sacarino	3 050 – 4 070
Milho	3 460 – 4 020
Beterraba sacarina	5 010 – 6 680
Cana-de-açúcar	6 190 – 7 500
Microalgas	46 760 – 140 290

Produzir etanol a partir de algas é fácil, o verdadeiro problema é que existem muitos produtos mais valiosos para produzir a partir delas, como ágar e outros produtos valiosos em comparação como álcool que é um produto de baixo preço.

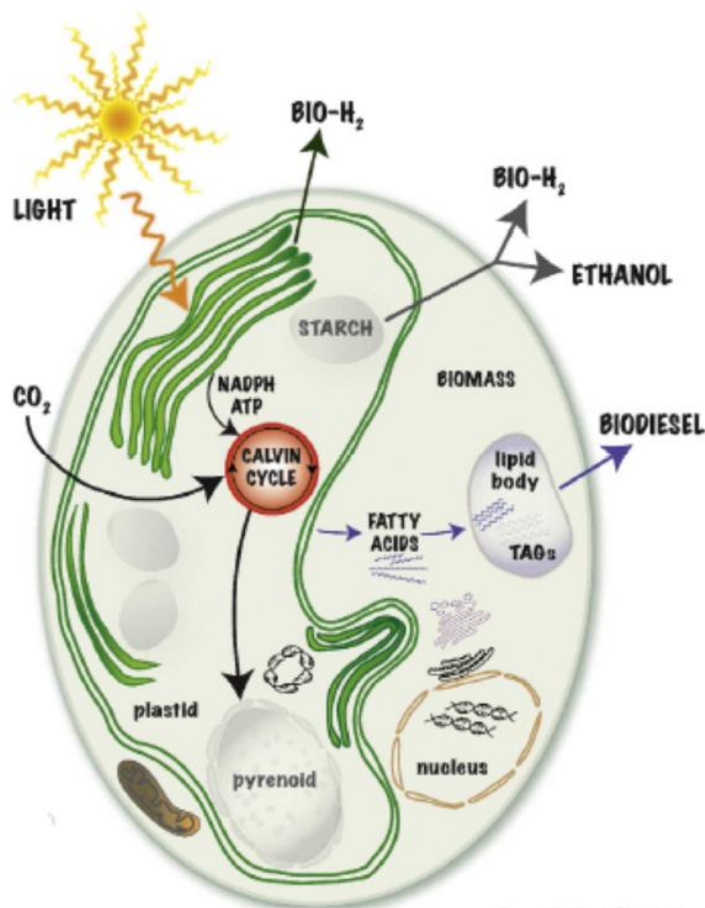


Figura 1.6 – Vias metabólicas em microalgas verdes relacionadas com a produção de biocombustíveis [13].

O processo de produção de etanol a partir de algas envolve: as fases de acumulação de amido através do crescimento e formação de filamentos, ou de colônias, num ambiente de aquicultura; a colheita e secagem da biomassa algal, ruptura das paredes celulares e extração de açúcares que pode ser obtida por tratamentos físicos (sonicação, abrasão por esferas de vidro, homogeneização e temperatura) ou por associação de tratamentos químicos e físicos (ataque ácido e alcalino sob pressão e temperatura); sacarificação do amido, fermentação e finalmente separação do etanol resultante.

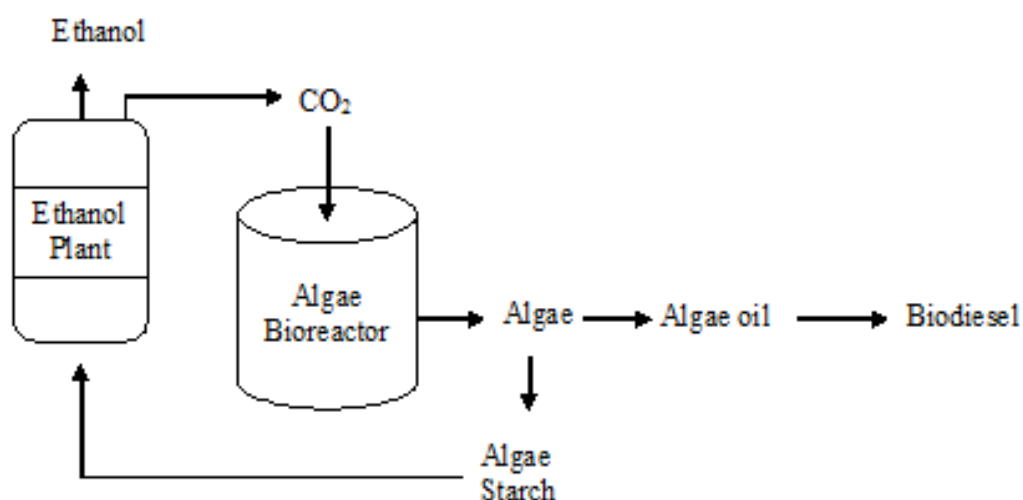


Figura 1.7 - Produção de Bioetanol ou de Biodiesel a partir de Algas [14].

A capacidade de algumas espécies acumularem elevados teores de açúcares, torna este tipo de biomassa muito apelativo para servir como matéria-prima para a produção de bioetanol. Esta área de investigação em microalgas ainda é embrionária, no entanto já se identificaram algumas espécies com teores elevados de açúcares (Tabela 1.5). É ainda necessário proceder à selecção de novas espécies capazes de acumular naturalmente teores elevados de açúcares, identificar processos de indução de açúcares e determinar os melhores métodos para sacarificar a biomassa.

Tabela 1.5 - Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas [1].

Espécie	Açúcares (% m.m-1)
<i>Anabaenacylindrica</i>	25 – 30
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	12 – 17
<i>Dunaliella salina</i>	32
<i>Porphyridium cruentum</i>	40 – 57
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10 – 17
<i>Spirulina máxima</i>	13 – 16
<i>Synechococcus</i> sp.	15
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	26
<i>Spirogyra</i> sp.	33 – 64

1.2 Colheita e processamento da biomassa algal

A colheita da biomassa algal consiste em separar as algas do seu meio de cultura, cujo método depende principalmente do tipo de algas. Para que a colheita seja energeticamente eficiente e pouco dispendiosa é importante seleccionar linhagens de fácil colheita. Os processos de recolha mais comuns são sedimentação gravítica, a centrifugação, a floculação, a filtração e a flotação.

O método de colheita das macroalgas depende do local onde estas cresceram, que pode ser em substratos sólidos ou flutuação livre em água. No primeiro caso é necessário cortar as algas o que eleva ligeiramente o consumo de energia. Nas macroalgas flutuantes a colheita pode ser feita simplesmente por aumentar o líquido instalado no tanque o que induz uma grande poupança de energia principalmente em relação às microalgas que ainda necessitam de ser filtradas.

Antigamente a colheita das macroalgas era uma a uma, em redes, o que era um trabalho lento. Hoje em dia existem cortadores rotativos, idênticos a cortadores comuns de relva, que podem ter uma bomba de vácuo incorporada. As colheitas são feitas em zonas escolhidas de modo a fazer como que zonas diferentes de colheita permitindo ter sempre macroalgas em diferentes fases de crescimento. No final de cada período de colheita as redes são cuidadosamente limpas com água doce, secas e armazenadas para a próxima estação. As macroalgas são transportadas para terra a secas ao sol.

A colheita de microalgas refere-se à concentração da suspensão diluída da biomassa algal até se obter uma pasta espessa. A colheita é dificultada devida às reduzidas dimensões da biomassa e pode ser feito num único passo ou em dois passos em separado de colheita e desidratação. A escolha para efectuar este processo depende da estirpe, do tamanho, e de propriedades de tensão das algas. As técnicas de colheita incluem filtração, centrifugação, floculação e sedimentação. A sedimentação, ou gravitação, consiste na concentração da biomassa pelo simples assentamento das células. Este processo é lento e o produto final contém um elevado teor de água. Estes processos são auxiliados por floculação celular, que pode ser feita por adição de floclantes químicos ou por autofloculação da cultura. A interrupção do fornecimento de dióxido de carbono pode causar a autofloculação. A floculação faz com que as células se agrupem em aglomerados de maiores dimensões

facilitando a sua colheita [14]. Este processo consiste na agregação de células das microalgas quer por neutralização ou inversão das cargas eléctricas das paredes celulares (coagulação), quer pela formação de ligações entre as microalgas. Entre os compostos químicos capazes de induzir a coagulação de microrganismos encontram-se o cálcio (na forma de carbonato, óxido ou hidróxido), o sulfato de alumínio, o cloreto de ferro (III) e o sulfato de ferro (III). Os flocculantes orgânicos usados incluem os polieletrólitos catiónicos e/ou aniónicos e polímeros como os derivados de amido, alginato, quitosano, entre outros [1].

Tabela 1.6 – Resumo das principais características dos métodos de recolha da biomassa microalgal [13].

Método	Características Relevantes	Vantagens	Desvantagens
Filtração	Pode funcionar sob pressão ou vácuo.	Factor de concentração elevado	• Limitado a microalgas coloniais ou filamentosas. • Possível colmatção. • Processo moroso.
Centrifugação	A recuperação depende das características de sedimentação das células, do tempo de permanência na centrífuga, da temperatura e da profundidade de decantação.	• Para a maioria das microalgas é eficaz. • A biomassa fica bastante concentrada.	Processo moroso e não é energeticamente eficiente, o que se reflecte no aumento dos custos.
Floculação	A adição de agentes químicos induz a agregação das células das microalgas por neutralização, inversão das cargas eléctricas das paredes celulares ou por formação de ligações entre as microalgas.	A floculação proporciona o aumento do tamanho das partículas, o que torna a sedimentação mais rápida.	• O processo pode ser moroso e carece de muito espaço. • A utilização de flocculantes pode tornar o processo dispendioso à escala industrial. • Possível alteração do produto final.

(Continuação da tabela 1.6)

Sedimentação	A concentração da biomassa ocorre pelo simples assentamento das células	• Processo simples e de custos reduzidos. • Ausência de agentes químicos.	Processo lento e produto final com elevado teor de água. Em ambientes de temperatura elevada a biomassa pode ficar deteriorada.
---------------------	---	--	---

1.3 Tipos de algas

O termo alga, usado a partir de 1753 e introduzido por Lineu é aplicado a uma grande variedade de organismos e o seu estudo é designado de Ficologia. A organização celular de todas as algas é eucariótica, com exceção das cianofíceas. Algas unicelulares móveis possuem um ou mais flagelos. Apresentam cloroplastos, que variam em forma e pigmentação nas diversas divisões. O núcleo muitas vezes pode estar mascarado pelos plastos [15]. Estes podem ser separados em duas categorias. Numa categoria temos os cromoplastos (do grego *chromos*, cor), que apresentam pigmentos no seu interior. O cromoplasto mais frequente nas plantas é o cloroplasto, cujo principal componente é a clorofila, de cor verde. Existem também plastos vermelhos, os eritroplastos (do grego *eritros*, vermelho. Noutra categoria temos os leucoplastos (do grego *leukos*, branco), que não contêm pigmentos.

Os plastos surgem, basicamente, a partir de estruturas citoplasmáticas denominadas proplastos, pequenas bolsas esféricas, com cerca de 0,2 μm de diâmetro, delimitadas por duas membranas. No interior dos proplastos existem DNA, enzimas e ribossomos, mas não existe tilacóides nem clorofila. Os proplastos são capazes de se dividir e são herdados de geração em geração celular, transmitindo-se de pais para filhos pelas gametas.

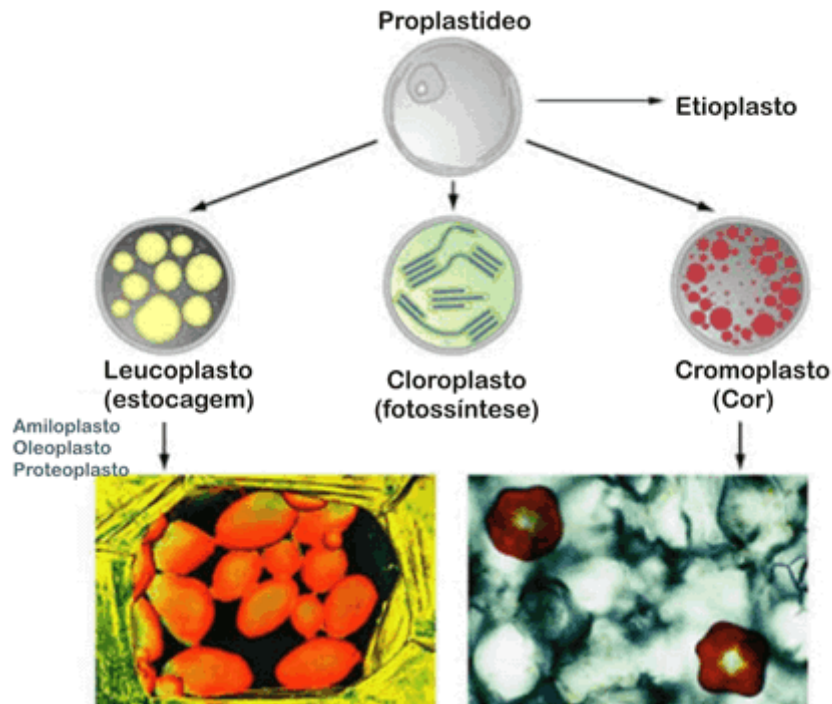


Figura 1.8 – Origem dos plastos.

Os cloroplastos ou os leucoplastos podem acumular grandes quantidades de amido, polissacarídeo sintetizado a partir da glicose. O amido pode ocupar totalmente o interior da organela, que se transforma em uma estrutura conhecida como amiloplasto ou grão de amido. Os amiloplastos são grandes reservatórios de amido, que em momentos de necessidade (se faltar glicose) pode se reconvertida em glicose e utilizado pela alga.

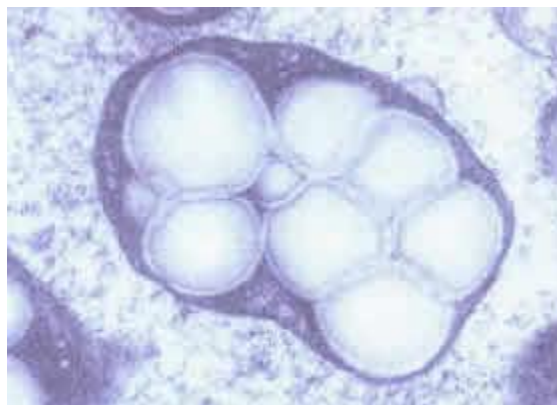


Figura 1.9 - Amiloplastos ou grãos de amido.

A capacidade de multiplicação dos plastos e suas semelhanças bioquímicas com os seres procariontes atuais sugerem que essas organelas tiveram como ancestrais bactérias

fotossintetizantes primitivas, que há centenas de milhões de anos estabeleceram uma relação de cooperação com células eucariontes [16].

O número de divisões e classes que incluem as algas variam de um sistema de classificação para outro, de autor para autor, depende se é baseada no tipo de habitat, abundância, no conteúdo em clorofila e tipo de pigmentos, natureza química dos produtos de armazenamento e constituintes da parede celular.

Utilizaremos a classificação que engloba as algas em 8 divisões:

Divisão 1 : Cyanophyta

Constituída pelas algas azuis ou cianobactérias que diferem de todas as demais algas na sua organização celular e assemelham-se às bactérias. São procarióticas (as suas células não possuem um núcleo organizado) unicelulares, filamentosas ou coloniais. Apresentam uma variedade de cores, que inclui o verde, azul, vermelho, castanho, amarelo e até mesmo o preto, devido às diferentes combinações dos pigmentos fotossintéticos: clorofila *a*, carotenóides e ficobiliproteínas [15].

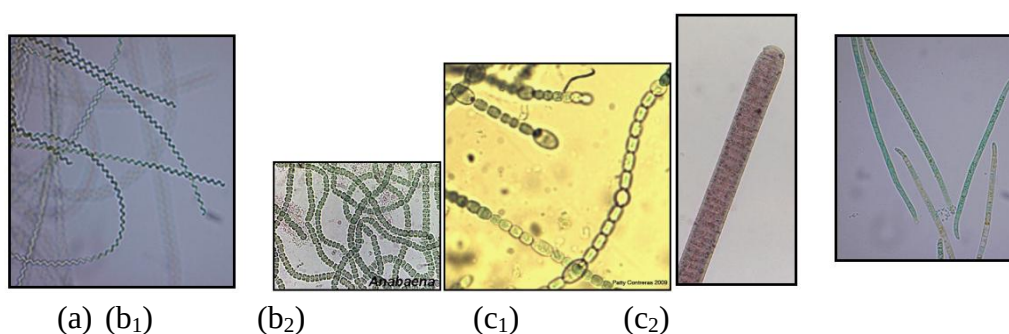


Figura 1.10 - Algumas espécies de Cianobactérias. (a) *Spirulina* sp.; (b₁) e (b₂) *Anabaena* sp.; (c₁) e (c₂) *Oscillatoria* sp. [17].

Habitam em água doce ou salgada, bem como em ambientes terrestres e fontes termais ou em associação com fungos (formando os líquenes), vegetais ou certos animais, não possuem núcleo diferenciado nem organelas citoplasmáticas (procariontes) e os pigmentos

localizam-se em lamelas citoplasmáticas (tilacóides) e não chegam a constituir um cloroplasto.

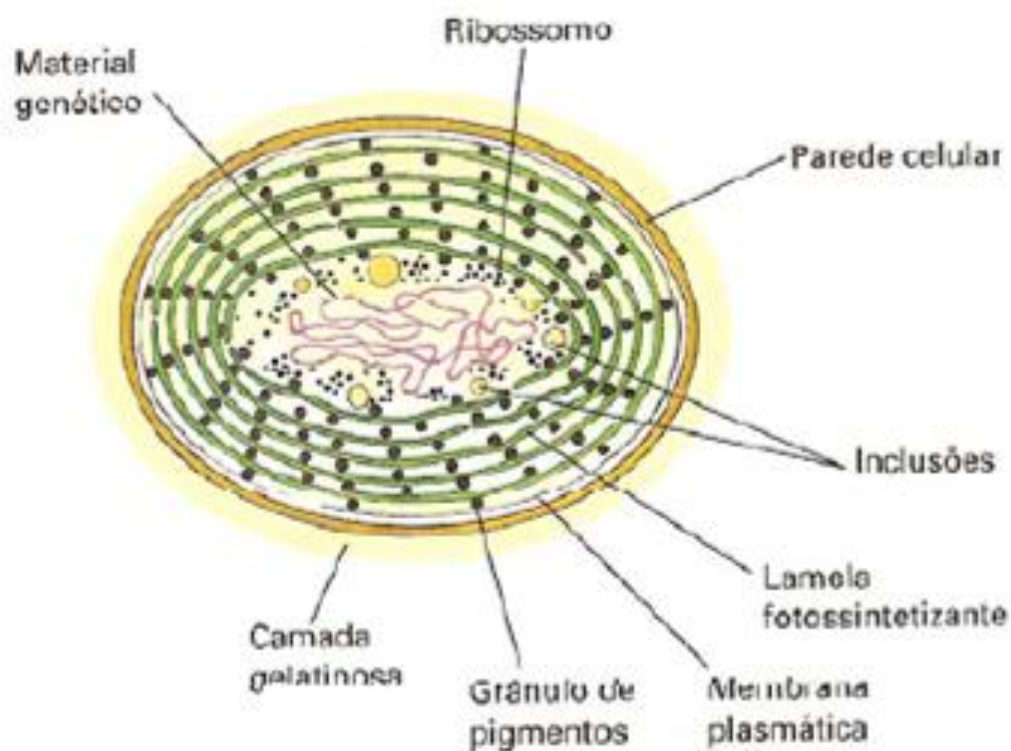


Figura 1.11 – Organização celular das algas azuis ou cianobactérias [18].

Algas azuis unicelulares como *Chlorococcus*, multiplicam-se por divisões celulares sucessivas, seguidas da separação dos produtos das divisões como células individuais. A reprodução por fragmentação também pode ocorrer em *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Anabaena*, que são filamentosas. Os filamentos de muitas espécies de *Oscillatoria* são móveis, bem como seus hormogônios. Células especializadas com paredes espessas e maiores que as células vegetativas aparecem em certas cianófitas filamentosas e são chamadas de acinetos (esporos de resistência). Muitas espécies também produzem heterocistos, que são estruturas especializadas para a fixação de N_2 (possuem nitrogenase) [15].

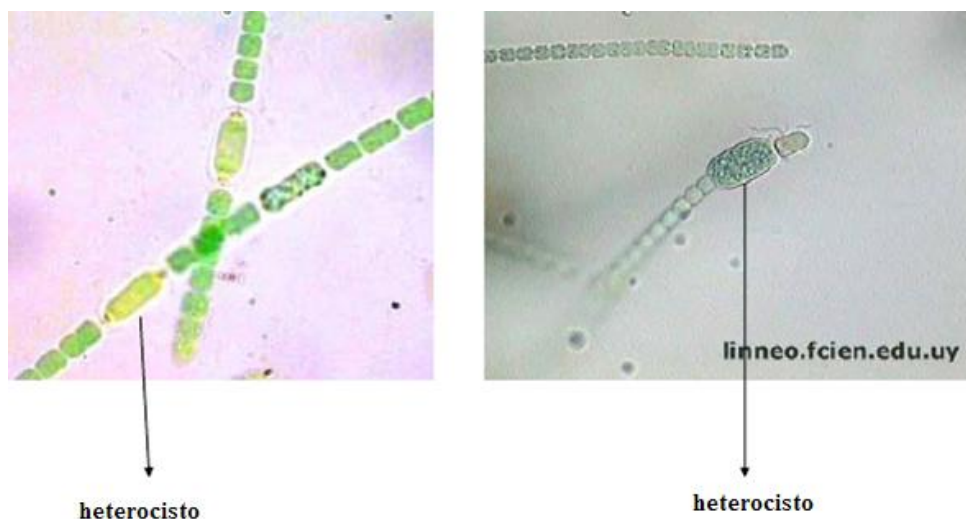
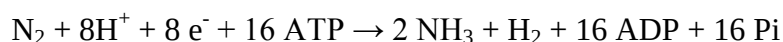


Figura 1.12 – Exemplo de cianobactérias heterocísticas [18].

Nestes encontra-se, protegida do oxigênio, a enzima nitrogenase, cuja principal função é a fixação de azoto atmosférico (fonte de azoto para as células), reduzindo-o a amoníaco com consumo de moléculas de ATP.



A amónia (NH_4^+) é posteriormente convertida em glutamina, através da glutamina sintetase, que passa então para as células vegetativas adjacentes.

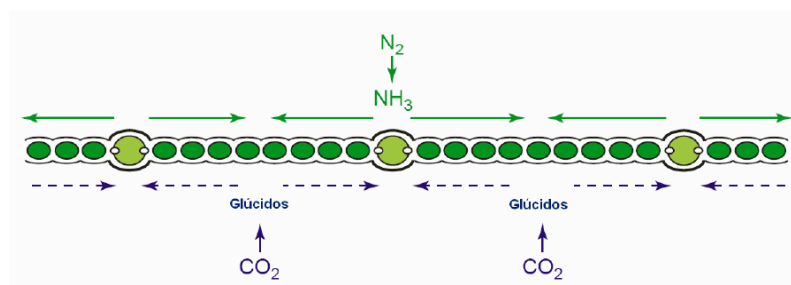


Figura 1.13 - Fornecimento de azoto, pelos heterocistos, sob a forma de glutamina às células vegetativas vizinhas, enquanto estas fornecem glúcidos.

As cianobactérias heterocísticas como a *Anabaena sp.* são raras em zonas oceânicas oligotróficas (o termo aplicado à água que apresenta muito baixas concentrações de nutrientes, especialmente compostos de fosfato e azoto), desenvolvendo-se preferencialmente em águas de baixa temperatura, doces ou salobras (evitando zonas tropicais, de águas quentes), onde existe uma maior concentração de nutrientes, tal como o ferro, úteis ao seu desenvolvimento [19].

Algumas cianofíceas vivem em associação com outros vegetais. Casos bem conhecidos são os que vivem em cavidades especiais no talo de *Anthoceros* (Briófita) e em cavidades nas folhas flutuantes de *Azolla* (Pteridófita aquática). A associação com fungos para formar os líquenes é muito comum. As algas azuis classificam-se numa classe única: *Cyanophyceae* subdivididas em quatro ordens: *Chroococcales*, *Pleurocapsales*, *Chamaesiphonales* e *Hormogonales* (cuja reprodução sexuada não é conhecida) [15].

Divisão 2 : Chlorophyta

As algas verdes quanto à sua morfologia podem ser Unicelulares como por exemplo *Closterium* sp., *Volvox* sp. e *Spirogyra* ou Pluricelulares como as *Oedogonium*, *Cladophora aegagropila*, *Caulerparacemosa*, *Caulerpataxifolia*, *Alimeda*, *Chara globulares*, *Nitella*, *Nitella*, *Ulva* ou alface do mar [20].

Incluem-se nesta divisão as algas verdes. Contém clorofila a, b, carotenóides e várias xantofilas (principalmente luteína). As células contêm de um a muitos núcleos (cenocíticas) e desde um até muitos cloroplastos com as formas mais diversas. Apresentam amido como material de reserva (nos pirenóides) e a composição da parede celular é pectina e celulose.

São de distribuição tão ampla quanto as algas azuis, porém têm predominância nas formações de água doce. Há muitas formas tubulares e membranosas marinhas. Existem representantes unicelulares, coloniais, filamentosos, membranosos e tubulares.

A reprodução sexuada vai desde a isogamia (gâmetas que se produzem e se fecundam são semelhantes em tamanho e estrutura) até oogamia (formação e subsequente fusão de um gâmeta feminino, grande e geralmente pouco móbil, com um gâmeta masculino pequeno, geralmente, de grande mobilidade).

Além disso, em muitos géneros ocorre reprodução assexuada por zoósporos, por ex.: *Chlamydomonas*. A reprodução assexuada pode-se fazer por simples divisão, pela dissociação de filamentos ou pela formação de zoósporos, aplanósporos ou autósporos [15].

A *Spirogyra sp.* apresenta dois modos de reprodução distintos. A reprodução vegetativa (assexuada) ocorre devido a fragmentação, isto é, pode ocorrer lesão mecânica do filamento ou dissolução da lamela média e este dá origem a pequenos fragmentos que, por sua vez, se transformam em filamentos novos por divisão celular. A reprodução sexuada (Figura 1.14) ocorre por conjugação entre uma célula feminina (que recebe o gameta) e uma masculina (que doa) e, da fusão dos gametas resulta um zigósporo que permanece no interior da célula feminina até à sua morte, altura em que é libertado. Em condições favoráveis o zigósporo divide-se por meiose produzindo quatro núcleos haplóides, dos quais três degeneram e apenas um continua funcional. Durante a germinação rompem-se as paredes do zigósporo e surge um pequeno fragmento que, por repetidas divisões mitóticas se torna num filamento novo [13].

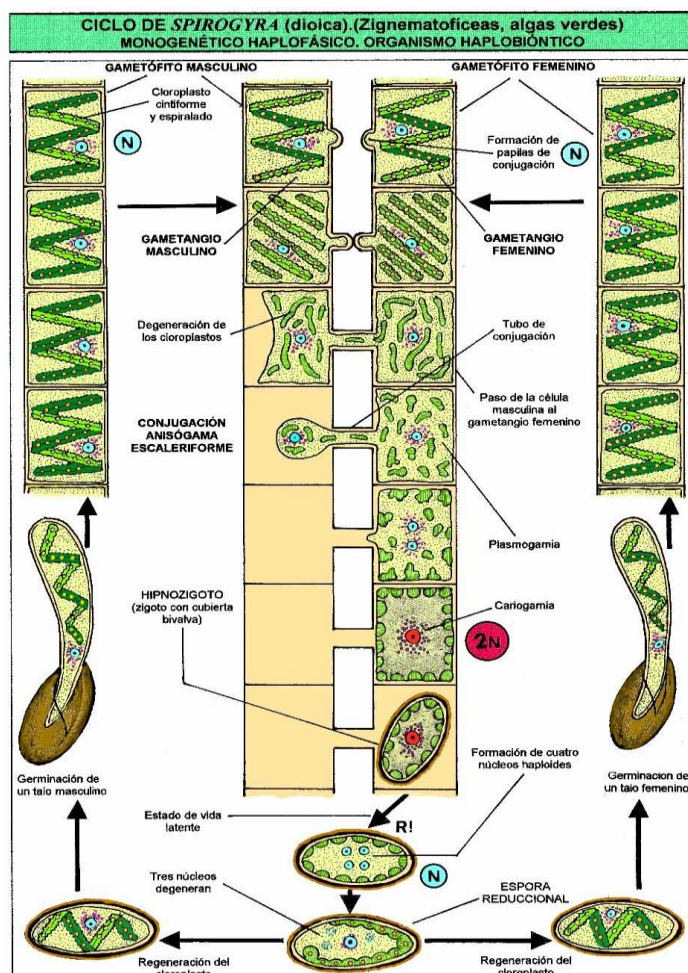


Figura 1.14 - Reprodução sexuada na *Spirogyra sp.* - Dois filamentos colocam-se lado a lado; Desenvolvem-se protuberâncias em cada filamento; O conteúdo da célula doadora (esq) migra através do tubo de conjugação para a célula receptora; Divisão meiótica; Degeneram 3 dos 4 núcleos; O zigósporo forma filamento novo [21].

Em certas espécies não há, basicamente, paredes transversais ou septos dividindo as células ao longo de toda a fase vegetativa do ciclo vital. Tais células não divididas e multinucleadas são chamadas **cenocíticas** e resultam de repetidas divisões nucleares sem a formação de paredes celulares. *Codiummagnum*, a maior clorófitica conhecida, é um membro desta linha evolutiva e pode atingir até 8 metros de comprimento.

Clorófiticas **multicelulares**: um dos passos mais críticos na história dos vegetais foi a transição da condição de célula solitária, tal como *Chlamydomonas*, para de multiplicidade celular. Encontram-se vários tipos de multiplicidade celular entre as clorófiticas, dependendo do plano no qual as divisões ocorrem. Nas divisões que se restringem a um único plano, resultarão filamentos, as divisões em dois planos, podem originar filamentos ramificados ou lâminas planas e as divisões a formarem três planos, haverá a formação de um corpo tridimensional como ocorre em *Ulva* (alface do mar) [14].

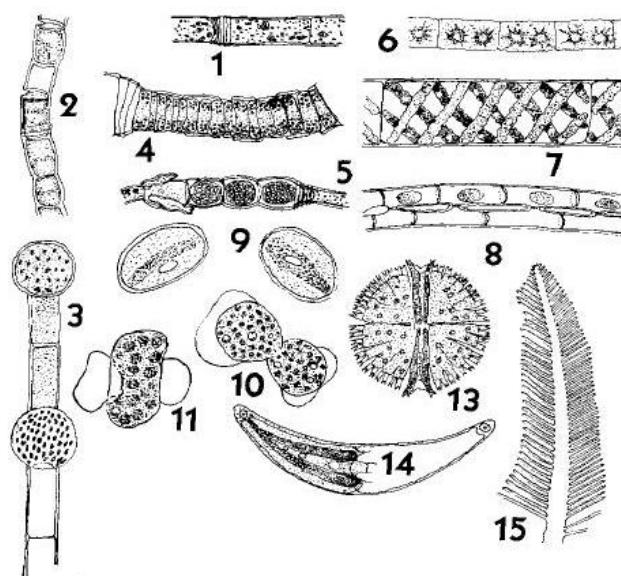


Figura 1.15 - Representação esquemática de algumas clorófitas. 1-5: *Oedogonium* (1. filamento vegetativo; 2. filamento formando zoósporo; 3. dois oogônios; 4. formação de zoósporos; 5. oogônios de outra espécie). 6- *Zygnema* (filamento vegetativo). 7- *Spirogyra*, célula vegetativa e 8- zigotos. 9 a 11- *Mesotaenium* (indivíduos vegetativos, início da copulação, zigoto jovem e mais velho, respectivamente). 13- *Micrasterias* (indivíduo). 14- *Closterium* (indivíduo). 15 *Bryopsis* (parte superior de um indivíduo).

Divisão 3 : Euglenophyta

Os euglenóides, como são chamados, são unicelulares flagelados e conhecidos através de exemplos como *Euglena*, *Phacus* e *Trachelomonas*. Não apresentam parede celular, mas

sim uma película ou lórica (em *Trachelomonas*). Vivem em água doce, mas podem habitar água salgada, geralmente são mixotróficos e alguns heterotróficos.

Possuem clorofila *a* e *b* e carotenóides. Armazenam carboidratos na forma de paramido(carboidrato de reserva, que corresponde a agregações lineares de glicose (beta-1-3-glucano), que se forma fora do cloroplasto.

A reprodução dá-se por divisão celular. As células se dividem longitudinalmente formando duas células novas idênticas. Não há reprodução sexuada conhecida. As formas são flageladas, sendo um flagelo longo emergente com pêlos muito finos num dos lados e um outro flagelo pequeno, não emergente.

Divisão 4 : Chrysophyta

É constituída por três grandes classes: Chrysophyceae, Xanthophyceae e Bacillariophyceae.

Classe Chrysophyceae

Apresentam uma coloração "marrom dourada" e apresentam clorofila *a*, *c* -caroteno e xantofilas (luteína e fucoxantina). É frequente a impregnação das paredes celulares com carbonato de cálcio (CaCO_3). Ocorre nesta classe a formação de estatósporos.

A maioria é unicelular e colonial, flagelada (2 flagelos diferentes). Seu material de reserva é a crisolaminarina e óleo. Ex: *Synura*, *Mallomonas*, *Dinobryom*.

Classe Xanthophyceae

Algas verde-amarelas, com clorofila *c*, na maioria unicelular, flagelada (2 flagelos lisos de tamanhos diferentes), algumas filamentosas, cenocíticas e coloniais. Vivem preferencialmente em água doce. Material de reserva: crisolaminarina e óleo.

Classe Bacillariophyceae (Diatomáceas)

As diatomáceas diferem das demais Crisófitas pela ausência de flagelos (presentes apenas em alguns gametas masculinos) e pela parede celular peculiar (dividida em duas partes) de compostos pécticos com material silicioso.

Divisão 5 : Phaeophyta (cerca de 1.500 sp)

Composta pelas algas pardas ou marrons, um grupo quase totalmente marinho. Compreendem a maior parte das algas nas águas salgadas. Podem atingir de 20 a 30 metros de profundidade. São menos comuns nos trópicos, mas aparecem como *Sargassum*, por exemplo, atingindo enormes dimensões [15].



Figura 1.16 – *Sargassum*, exemplo de algas pardas [22].

Não há nessa divisão organismos unicelulares nem gregários. Várias feófitas são filamentosas ou ramificadas e algumas formam delgadas lâminas. Apresentam além da clorofila *a*, a clorofila *c* como pigmento acessório. Possuem vários carotenóides, inclusive a fucoxantina (abundante), que é responsável pela cor marrom-escuro ou verde-oliva característica do grupo.

Os materiais de reserva são a laminarinae o manitol, mas podem também acumular lipídios. A parede celular assemelha-se muito às clorofíceas e aos vegetais superiores, formada por celulose, ácidos algínicos e uma camada externa bem desenvolvida de compostos mucilaginosos. A parede celular ainda apresenta algina, que é uma substância viscosa de considerável importância como estabilizador, emulsificador e na indústria de papel. A reprodução sexuada pode ser por iso, aniso ou oogamia. Os ciclos vitais da maioria das feofíceas apresentam alternância de gerações (heteromórficas).

Divisão 6 : Rhodophyta (cerca de 4000 sp)

São as algas vermelhas de água salgada na maioria, mas ocorrem alguns poucos gêneros de água doce também (pouco mais de 100 sp).

As ficobilinas mascaram a clorofila *a*, dando-lhes a cor característica. As rodofíceas se encontram em profundidades maiores do que quaisquer dos outros grupos, já tendo sido observadas em profundidades de até 175 m. Apresentam além, das ficobilinas como pigmento acessório, a clorofila *d*. Denomina-se amido florídeo o material de reserva (carboidrato). As paredes celulares de celulose e pectina, apresentam uma série de substâncias mucilaginosas cujas moléculas baseiam-se na galactose (p.e., o agar e o carragenano ou carragenina). O talo pode ser unicelular (apenas 3 gêneros), filamentoso, pseudo-parenquimatoso de origem filamentosa e alguns foliáceos.

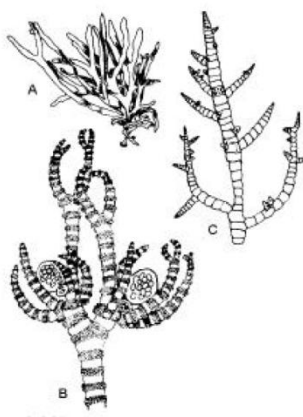


Figura 1.17 - Representação esquemática do aspecto geral do talo de algumas rodófitas. A) *Rhodymenia*; B e C) *Champia*. Em C é possível observar os tetrasporângios.

Reprodução sexuada por oogamia. Meiose espórica (alternância de gerações). Não existem formas flageladas. Produzem ágar e carrageninas. Numa parte das Rodofíceas formam-se bastantes incrustações de carbonato de cálcio, recebendo o nome de algas coralígenas. Tais algas são extremamente importantes na formação de recifes de corais, algumas vezes até substituindo os animais na formação do recife.

Divisão 7 : Pyrrophyta

Também chamados de Dinoflagelados, a maior parte dos membros dessa divisão são organismos unicelulares, biflagelados, muitos dos quais são marinhos e outros de água doce. São conhecidas cerca de 2100 sp, muitas abundantes e de alta produtividade no plâncton marinho.

Os dinoflagelados apresentam 2 flagelos que se movem no interior de dois sulcos, um dos quais circunda a célula como um cinto e o outro mostra-se perpendicular àquele. A oscilação dos flagelos nos respectivos sulcos faz com que o organismo gire como um pião grande se movimenta. Uma grande parte dos dinoflagelados apresenta placas de celulose duras que formam uma parede (teca) como se fosse uma armadura. As placas encontram-se no interior da membrana plasmática e não no seu exterior como a parede celular da maioria das algas. A maior parte dos dinoflagelados contém clorofilas *a* e *c*, mascaradas por carotenóides. Há algumas espécies heterotróficas desprovidas de pigmentos e a substância de reserva é o amido.

Muitos dinoflagelados são **bioluminescentes**, capazes de converter a energia química em energia luminosa, fluorecendo as águas à noite como por exemplo, *Noctiluca scintillans*. O dinoflagelado *Gymnodinium breve* é o responsável pela maioria das marés vermelhas e suas consequências no Golfo do México. OBS: O mar vermelho, aparentemente, recebeu esse nome graças aos “blooms” de *Trichodesmium*, uma cianobactéria vermelha.

Os dinoflagelados simbiotes não possuem tecas e ocorrem como células esféricas douradas, chamadas zooxantelas. Essas são responsáveis principalmente pela produtividade fotossintética que possibilita o desenvolvimento de recifes de coral em águas tropicais, notoriamente pobres em nutrientes. Os tecidos dos corais podem conter cerca de 30.000 dinoflagelados / ml. Neste caso, os dinoflagelados produzem ao invés de amido glicerol, que é directamente usado na nutrição dos corais.

Divisão 8 : Haptophyta

Principalmente água salgada, mas com algumas espécies de água doce geralmente unicelulares, com dois flagelos lisos iguais ou não no tamanho. Se caracterizam por apresentarem o **haptonema** que é um tipo de flagelo geralmente em espiral pelo qual o organismo pode se fixar em substratos. Podem ter o corpo coberto por escamas orgânicas (celulose) ou inorgânicas (CaCO_3 os cocolitoforídeos). O material de reserva é crisolaminarina e os pigmentos são Clorofila e fucoxantina [15].

1.4 Reprodução, metabolismo, regime e sistemas de cultivo

A reprodução no cultivo de microalgas é predominantemente vegetativa, em que a célula mãe se divide em duas células filhas, levando ao aumento exponencial do número de indivíduos presentes em função do tempo.

A massa celular pode ser avaliada por métodos directos, envolvendo a pesagem ou contagem, e por métodos indirectos que podem ser relacionados com a densidade óptica, fluorescência in vivo, concentração de pigmentos (principalmente clorofila a) e concentração de carbono.

A utilização de medidas de densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física à passagem da luz pelas células seguindo a Lei de Lambert-Beer que relaciona o aumento da concentração de células com o aumento da absorvância [23].

O crescimento dos seres vivos é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção da célula. A utilização das algas pelo homem é antiga e os primeiros registros de cultivo de algas são encontrados na China (2.700 a.C.). Ao longo do tempo optimizou-se as potencialidades do cultivo de algas e diferentes possibilidades de utilização.

Tradicionalmente os países que cultivam algas – Algacultura – são os Asiáticos, como Japão, China e Coréia. No início estes cultivos eram voltados para a produção de alimentos, especializando-se apenas em cultivo de algas comestíveis. Nas ultimas décadas por incentivo de indústrias de processamento de algas, muitos países se especializaram nesta forma de cultivo, como Chile, Peru, Brasil, Japão, China, Espanha, Namíbia, Venezuela, França, Estados Unidos e Cuba, dentre outros.

O cultivo de macroalgas realiza-se, tradicionalmente, em bancos naturais. Para que não ocorra destruição desse bancos naturais o manejo deve de odedecer a um conhecimento da sua biologia, do método de coleta, da quantidade e qualidade sazonais dos ficocolóides (polissacarídeos coloidais extraídos de algas).

As macroalgas podem ser cultivadas em baías e estuários, onde ocorre um aporte de água fluvial, no entanto são difíceis de serem cultivadas em locais com alto índice de turbidez. Este método de cultivo de algas funciona através da sua coleta em bancos naturais e posteriormente fixando-as em redes em locais onde exista variação de maré. São fixas geralmente em redes horizontais na coluna de água, onde possui luminosidade adequada para o crescimento, pois um excesso de luz pode causar fotoinibição [14].



Figura 1.18 - Produção de macroalgas [14].

O cultivo de microalgas apresenta elevada produtividade em biomassa seca, representando menor gasto de área de cultivo em relação a macroalgas. O cultivo de microalgas pode ser

realizado em diversos terrenos, como áreas desérticas, inclusive com solo degradado. Esse cultivo pode gerar diversas colheitas ao longo do ano o que tem dado origem ao desenvolvimento de diversas metodologias para o seu cultivo. Os sistemas mais comuns são as lagoas fotossintéticas e os fotobioreactores fechados [1].

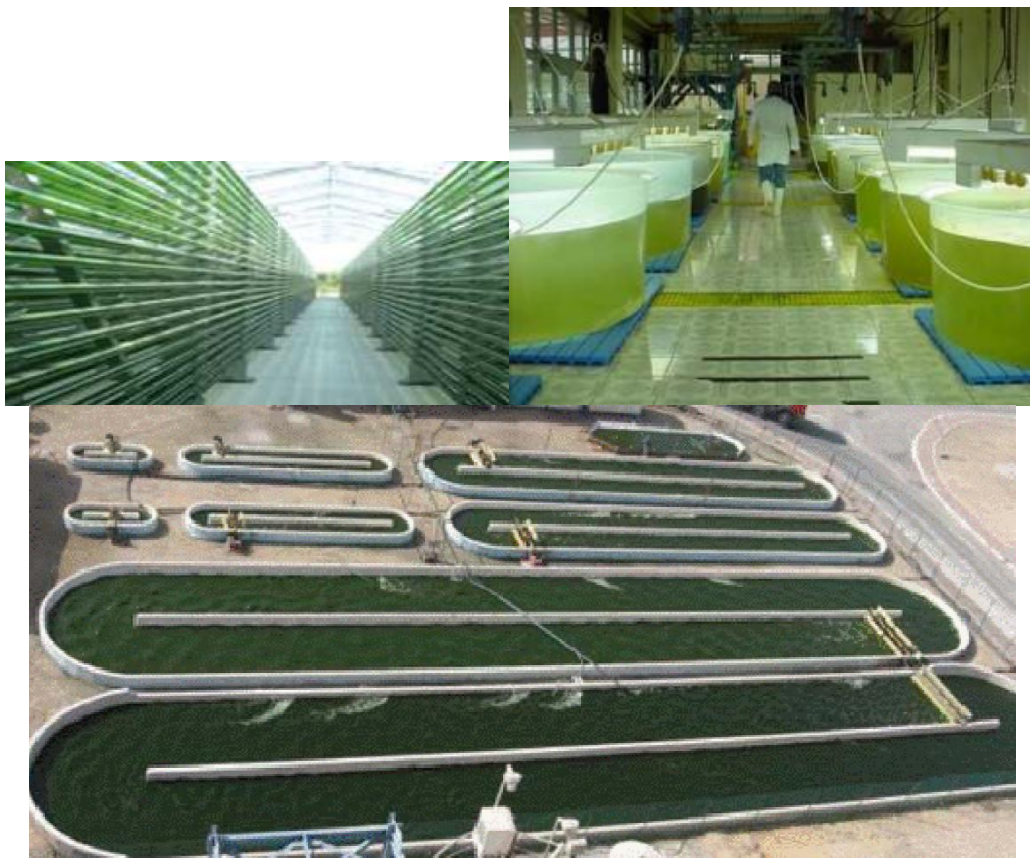


Figura 1.19 - Exemplos de sistemas de cultivo de microalgas [24].

A produção de microalgas é um processo muito versátil, quer em relação à fonte de energia utilizada quer em relação ao método de produção. Embora a maior parte das microalgas cresça fotoautotroficamente, pela conversão da energia solar em energia química através da fotossíntese, com consumo de carbono inorgânico, (nomeadamente dióxido de carbono) várias espécies apresentam também metabolismo heterotrófico e mixotrófico. No metabolismo heterotrófico, a fonte de energia é exclusivamente carbono orgânico, geralmente sob a forma de glucose e/ou acetato não existindo necessidade de energia luminosa. Algumas espécies de microalgas apresentam um metabolismo mixotrófico e

conseguem simultaneamente realizar a fotossíntese e consumir carbono inorgânico e orgânico, o que permite aumentar a sua produtividade.

A produção de microalgas heterotróficas é realizada em fermentadores e a produção de microalgas autotróficas e mixotróficas é realizada em sistemas iluminados como os fotobiorreactores e as lagoas fotossintéticas [1].

Tabela 1.7 - Categorias nutricionais de organismos [25].

Fonte de energia (para produzir matéria orgânica)	Fonte de carbono	
	Autotróficos (utilizam CO ₂ ou CO) - produtores	Heterotróficos (utilizam compostos orgânicos) - consumidores
Fototróficos (utilizam luz solar)	Fotoautotróficos (CO ₂) Ex: plantas e algas	Fotoheterotróficos (compostos orgânicos como álcool)
Quimiotróficos (utilizam a energia de compostos químicos)	Quimioautotróficos (CO) Ex: algumas bactérias (como as bactérias nitrificantes)	Quimioheterotróficos (compostos orgânicos) Ex: animais, fungos e a maioria das bactérias.

Tradicionalmente para estuda-se o crescimento dos organismos em descontínuo e em sistema fechado (batch). Quando se inocula uma população viável num meio de cultura com adequada fonte de energia, o crescimento dessa população tem várias fases típicas de crescimento, descritas na Figura 1.19. A fase de crescimento corresponde a um aumento exponencial da densidade populacional em que todos os constituintes da biomassa presente aumentam com a mesma taxa específica (μ).

Quando se representa graficamente o logaritmo natural da densidade populacional em função do tempo, deste crescimento exponencial, obtém-se uma relação linear em que o seu declive corresponde ao valor da taxa específica de crescimento. Esta taxa é um parâmetro muito importante porque o seu uso, além de prever como vai evoluir a

concentração da população também é um indicador da resposta dessa população às condições e ao meio de crescimento [26].

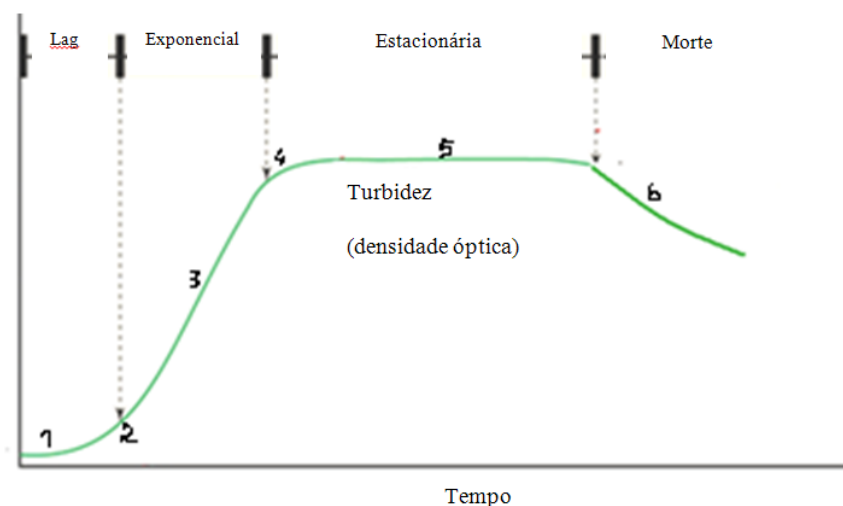


Figura 1.20 - Ciclo de crescimento em sistema fechado. (1) Fase de latência ou lag, $\mu = 0$; (2) Fase de aceleração, $\mu < \mu_{\max}$; (3) Fase exponencial, $\mu = \mu_{\max}$; (4) Fase de desaceleração, $\mu < \mu_{\max}$; (5) Fase estacionária, $\mu = 0$; (6) Fase de morte [26].

As diferentes fases de crescimento têm as seguintes características:

- ❖ **Fase de latência (fase Lag)** – é a fase que se segue à inoculação da estirpe num novo meio nutritivo. É uma fase relativamente curta, caracterizada por não ocorrer crescimento ou mesmo decorrer um declínio da cultura. As condições em que se encontra o inóculo inicial têm uma forte influência na duração desta fase. Uma cultura iniciada a partir de um inóculo retirado de em fase exponencial de crescimento terá uma fase de latência muito curta, ou esta poderá nem se verificar se a transferência para o novo meio se verificar nas mesmas condições de luz, temperatura e salinidade.
- ❖ **Fase de aceleração** – curto período em que a população entra numa fase de crescimento mais rápido.

- ❖ **Fase exponencial**– é a fase em que ocorre um aumento constante do número de organismos na cultura. O ritmo de crescimento da população é uma medida do aumento da biomassa ao longo do tempo. A duração da fase exponencial em culturas depende do tamanho do inóculo, do ritmo de crescimento, do meio utilizado e das condições físicas de crescimento nomeadamente luz e temperatura.
- ❖ **Fase de desaceleração** – ocorre um declínio no crescimento da cultura. Normalmente este declínio acontece quando um requisito para a divisão celular se torna limitante ou alguma coisa inibe a reprodução. Nesta fase a concentração celular é geralmente muito alta e uma exaustão em termos de nutrientes, limitação de dióxido de carbono e luz (cria-se o fenómeno de sombreamento entre as células) tornam-se as principais causas do declínio do crescimento.
- ❖ **Fase estacionária** – é caracterizada por ausência de crescimento e em pouco tempo as células começam a sofrer alterações bioquímicas. Uma limitação em azoto pode resultar numa redução do conteúdo proteico, alterações no conteúdo lipídico e de carboidratos. Uma limitação em termos de luz resulta num aumento de pigmentos.
- ❖ **Fase de morte** – ocorre quando o metabolismo celular já não pode ser mantido. As culturas de algumas estirpes, cianobactérias por exemplo, perdem a pigmentação enquanto outras podem rebentar mantendo no entanto a coloração.

Uma vez determinada a curva de crescimento para cada estirpe e para determinadas condições, é possível estimar a densidade à qual uma cultura deve de estar antes de ser transferida para novo meio [27].

Em meios mais complexos, contendo por exemplo dois substratos como fonte de carbono e energia, os organismos podem controlar a utilização destes, de modo a que um seja consumido primeiro e só depois o outro. As fontes de energia rapidamente metabolizáveis reprimem a formação de enzimas necessárias ao catabolismo dos substratos energéticos mais dificilmente utilizáveis, fenómeno conhecido por repressão catabólica. Nestas condições, o declive da recta não é constante e surgem breves intervalos (fases de latência)

que correspondem à adaptação das células ao novo substrato. Este tipo de crescimento é designado por crescimento diáuxico.

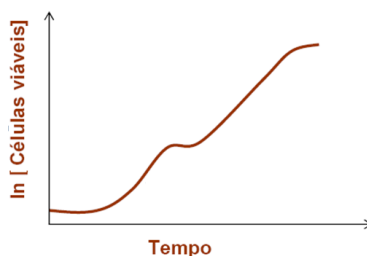


Figura 1.21 - Curva de crescimento diáuxico.

A concentração de um dos nutrientes pode tornar-se limitante e existe declínio da taxa de crescimento (fase de desaceleração). Posteriormente, o esgotamento de nutrientes e/ou acumulação de produtos inibitórios do metabolismo, levam a que os organismos deixem de se dividir (fase estacionária). Alguns organismos podem sobreviver longos períodos de tempo sem perda de viabilidade, usando reservas endógenas, enquanto que outros começam a morrer, logo que entram em fase estacionária, levando a que a taxa de crescimento se anule. A fase de morte (perda de capacidade de divisão celular) ocorre devido a efeitos de metabolitos tóxicos, ou à autólise das células por enzimas líticas [26].

1.5 Influência dos factores ambientais

A produtividade em biomassa de algas e a taxa fotossintética são dependentes de factores ambientais como a luz, temperatura, salinidade e nutrientes. Estes afectam também os padrões e metabolismo celular e consequentemente a composição dinâmica das células. Para se poder atingir a produtividade máxima as necessidades nutricionais devem ser satisfeitas assim como a temperatura, por exemplo, deve de estar numa região óptima.

No processo de carboxilação as moléculas de CO_2 são fixadas e é na fase escura da fotossíntese que este processo é favorecido devido a baixas razões de O_2/CO_2 . Este processo está em competição com a fotorrespiração e o carbono orgânico é convertido em CO_2 sem nenhum ganho metabólico. Para melhorar os rendimentos nos cultivos em massa

de microalgas é necessário minimizar os efeitos da fotorrespiração através do enriquecimento com CO_2 além do que está presente no ar. Na fotossíntese utiliza-se CO_2 atmosférico, água e sais minerais e produz-se complexas moléculas orgânicas e oxigênio molecular, que é utilizado no processo de respiração.

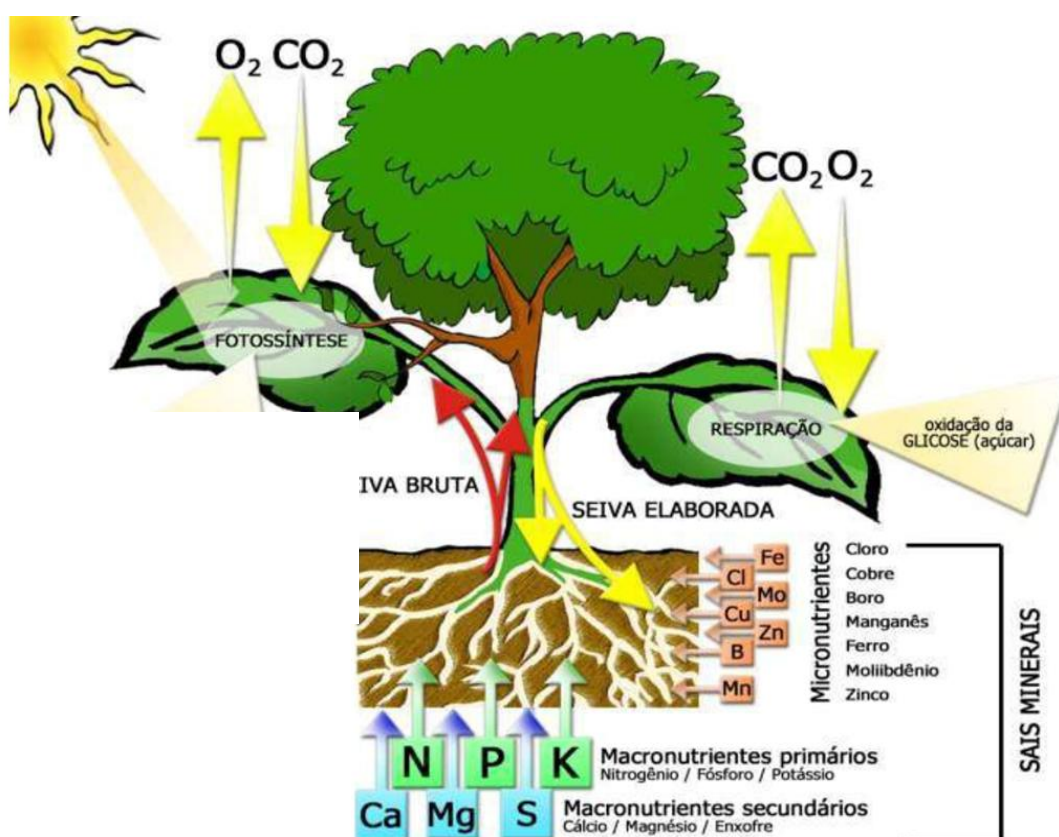


Figura 1.22- Fotossíntese e respiração celular - processos distintos e ambos realizados por vegetais, algas e também por algumas bactérias [28].

Para que a fotossíntese ocorra, os pigmentos fotossintéticos devem absorver a energia de um fóton de determinado comprimento de onda e, então, utilizar essa energia para iniciar uma cadeia de eventos da fase fotoquímica da fotossíntese.

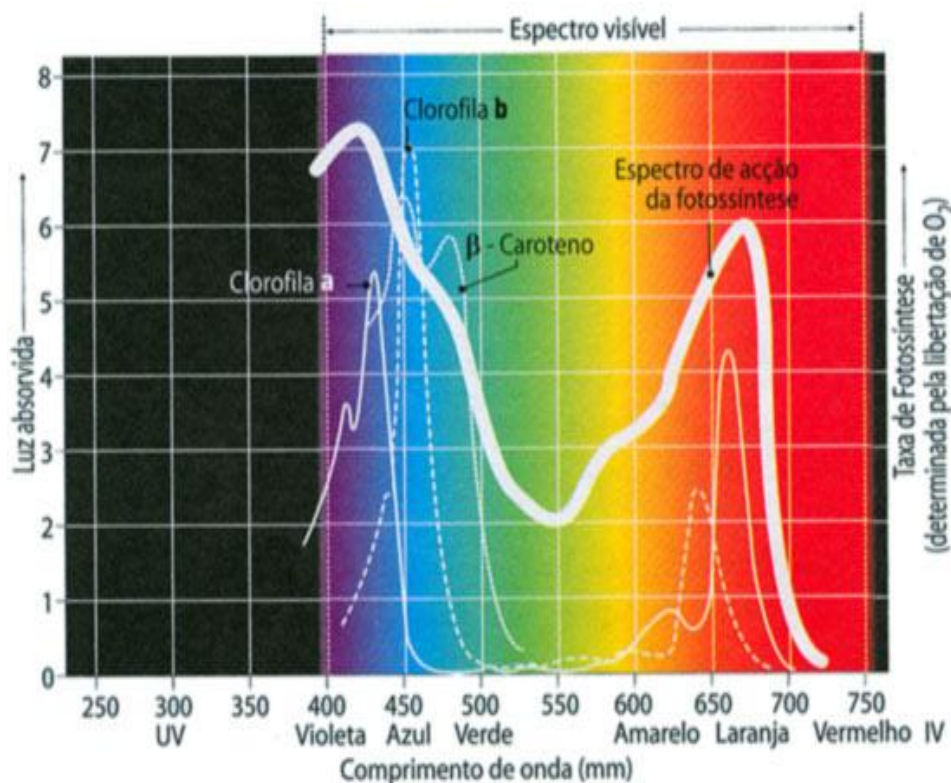


Figura 1.23- Comprimentos de onda do espectro da luz visível mais eficazes na realização da fotossíntese.

O que chamamos de luz visível (ou luz branca) corresponde a uma faixa do espectro da radiação solar cujo comprimento de onda situa-se entre 400 e 750nm [29].

Os nutrientes, substâncias presentes no ambiente que participam do anabolismo e catabolismo celular, estão divididos em dois grandes grupos em função da disponibilidade: os macronutrientes (Carbono, Oxigênio, Azoto, Hidrogênio, Fósforo, Enxofre, Potássio, Sódio e Cálcio) e os micronutrientes (Cloro, Crômio, Cobalto, Cobre, Manganês, Molibdênio, Níquel, Selênio, Tungstênio, Vanádio, Zinco e Ferro). O carbono corresponde à base de todas as moléculas orgânicas. Entre os procariotas melhor estudados até ao momento, a maioria requer algum tipo de composto orgânico como fonte de carbono, o qual pode ser de diferentes variedades (aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, bases nitrogenadas, etc.). O hidrogênio é um elemento que está presente em proteínas, açúcares e demais moléculas orgânicas [30].

Os nutrientes podem também estar classificados quanto à sua função bioquímica:

Grupo 1 – Nutrientes que fazem parte dos compostos de carbono – N e S – Este grupo de elementos essenciais é formado pelos compostos orgânicos das plantas, assimilando-os por meio de reacções bioquímicas envolvendo oxidações e reduções.

- **Grupo 2** – Nutrientes importantes para o armazenamento de energia e integridade estrutural – P, Si e B - Os elementos deste grupo encontram-se comumente presentes nos tecidos vegetais sob a forma de fosfato, borato e ésteres silicato, em que o grupo elementar está ligado ao grupo hidroxilo de uma molécula orgânica.
- **Grupo 3** – Nutrientes que permanecem no vegetal na sua forma iónica – K, Ca, Mg, Cl, Mn e Na – Presentes nos tecidos vegetais na forma de iões livres ou ligados a substâncias tais como ácidos pépticos, presentes na parede celular do vegetal. De especial importância são seus papéis como cofactores enzimáticos na regulação dos potenciais osmóticos.
- **Grupo 4** – Nutrientes que estão envolvidos nas reacções de redução-oxidação (redox) – Fe, Zn, Cu, Ni e Mo – Os elementos deste grupo desempenham importantes funções em reacções envolvendo transporte de electrões [31].

Tabela 1.8 - Os elementos essenciais à nutrição vegetal, as suas funções e identificação de sintomas de deficiência [31].

Elementos essenciais		Funções	Possíveis sintomas de deficiência
Macronutrientes	N (Nitrogénio)	• Componente essencial do protoplasma e de enzimas	Inibe o crescimento vegetal - enfezamento ou nanismo.
	S (Enxofre)	• Componente do protoplasma e de enzimas	Os sintomas da deficiência de enxofre são similares aos da deficiência de nitrogénio, incluindo clorose, e redução do crescimento.

(Continuação da tabela 1.8)

	P (Fósforo)	• Metabolismo basal; • Síntese (fosforilação)	Perturbação dos processos reprodutores (floração e maturação retardada), enfezamento
	K (Potássio)	• Efeito coloidal (promove hidratação); • Sinergismo com NH_4^+ e Na^+; • Antagonismo com Ca^{++} • Activação de enzimas (fotossíntese, nitrato-redutase); • Osmorregulação (estômatos)	Balanço hídrico perturbado, extremidades secas, enrugamento das margens das folhas mais velhas e apodrecimento da raiz
	Mg (Magnésio)	• Regulação da hidratação (antagonismo com Ca^{++}); • Metabolismo basal (fotossíntese, transferência de fosfatos); • Sinergismo com Mn e Zn.	Crescimento enfezado e clorose (não é produzido suficiente clorofila).
	Ca (Cálcio)	• Regulação da hidratação (antagonismo com Ca^+ e Mg^{++}); • Activador de enzimas (amilase, ATPase); • Regulador do crescimento em extensão basal.	Perturbação no crescimento por divisão (células pequenas). Extremidades secas. Deformação das folhas e crescimento das raízes prejudicado.

(Continuação da tabela 1.8)

Micronutrientes	B (Boro)	• Transporte e metabolismo de carboidratos; • Metabolismo do fenol; • Activação de reguladores do crescimento (crescimento de tubos polínicos).	Perturbação do crescimento e reduzida ramificação das raízes.
	Cl (Cloro)	• Efeito coloidal (aumenta a hidratação); • Aumenta a activação de enzimas (fotossíntese).	Enrolamento das folhas e engrossamento das raízes
	Fe (Ferro)	• Metabolismo basal (reacções redox); • Metabolismo do N; • Síntese da clorofila	Sob condições de deficiência extrema ou prolongada, as nervuras podem tornar-se cloróticas também, fazendo com que toda a folha se torne branca.
	Mn (Manganês)	• Metabolismo basal (oxidases, fotossíntese, transferência de fosfatos); • Estabiliza a estrutura dos cloroplastos; • Metabolismo do N; • Síntese do ácido nucleico; • Sinergismo com Mg e Zn.	Inibição do crescimento. Clorose e necroses em folhas jovens.

(Continuação da tabela 1.8)

	Zn (Zinco)	• Formação de clorofila; • Activador de enzimas; • Metabolismo basal; • Degradação de proteínas; • Biossíntese de reguladores de crescimento	Descoloração das folhas mais velhas
	Cu (Cobre)	• Metabolismo basal (fotossíntese, oxidases); • Metabolismo do N; • Metabolismo secundário	Extremidades secas. Enrolamento das folhas e clorose em folhas jovens
	Mo (Molibdénio)	• Fixação do N (redutases); • Metabolismo do P; • Absorção e translocação de Fe	Perturbação do crescimento. Escurecimento das margens das folhas
	Ni (Níquel)	• Componente da urease (mobilização do N durante a germinação); • Catalisa a hidrólise da ureia em NH_3 e CO_2	Sintomas de deficiência pouco documentados.

Dos macronutrientes primários, o fósforo é absorvido em menores quantidades que os demais, sua presença é indispensável para o crescimento e produção vegetal. Interfere nos processos de fotossíntese, respiração, armazenamento e transferência de energia, divisão celular, crescimento das células. Por interferir em vários processos vitais deve haver um suplemento adequado de fósforo desde a germinação, principalmente em plantas de ciclo curto.

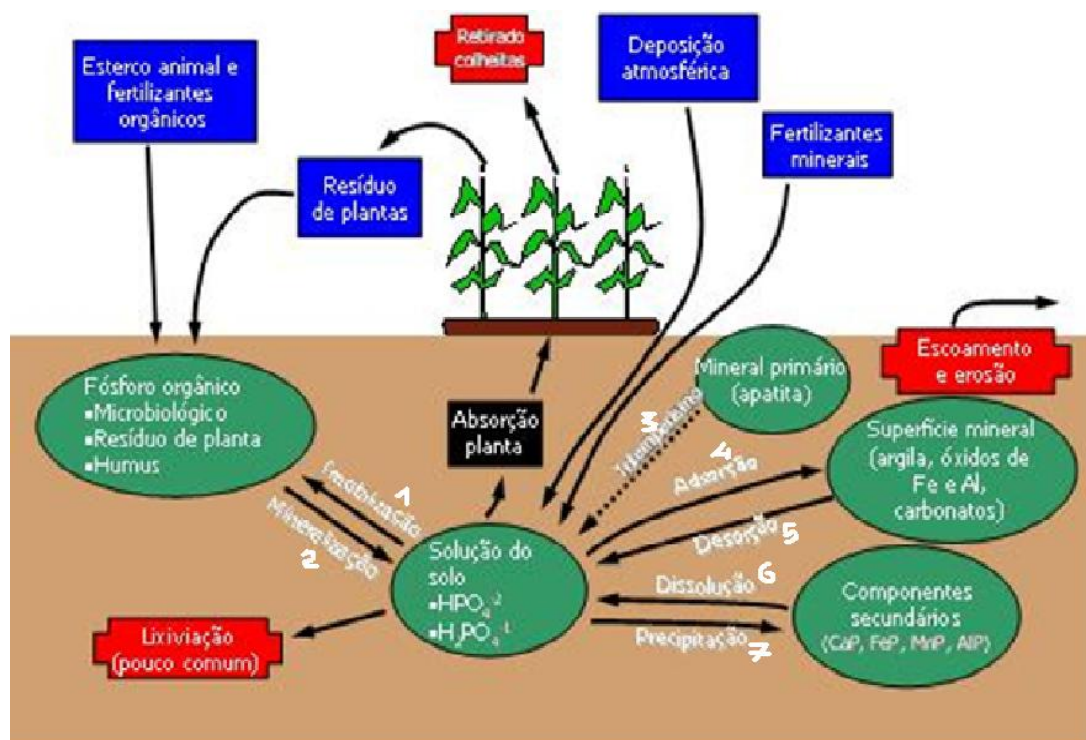


Figura 1.24 - Ciclo do Fósforo, (1) Imobilização; (2) Mineralização; (3) Intemperismo; (4) Adsorção; (5) Desorção; (6) Dissolução; (7) Precipitação, (componente (), entrada (Entrada), saída (Saída)) [32].

O fósforo presente nos sistemas aquáticos pode ter origem a partir de diversas fontes por exemplo pela erosão das rochas, deposição de poeiras e gases vulcânicos, aerossóis marinhos, pela fertilização de solos agrícolas e por descargas de águas residuais contendo P. Sob a forma de fosfato dissolvido, o fósforo é facilmente absorvido pelas plantas, incorporado no seu material orgânico e passado através da cadeia alimentar, desde os produtores até aos consumidores e decompositores. A decomposição da matéria orgânica

morta, pela acção das bactérias, é uma das fontes de libertação do fósforo que pode ser reutilizado por outros organismos em desenvolvimento.

O nitrogénio é um elemento abundante e está presente no ar atmosférico em percentagens aproximadas de 70%. Este elemento está constantemente a entrar e a sair da atmosfera, o seu reservatório [33].

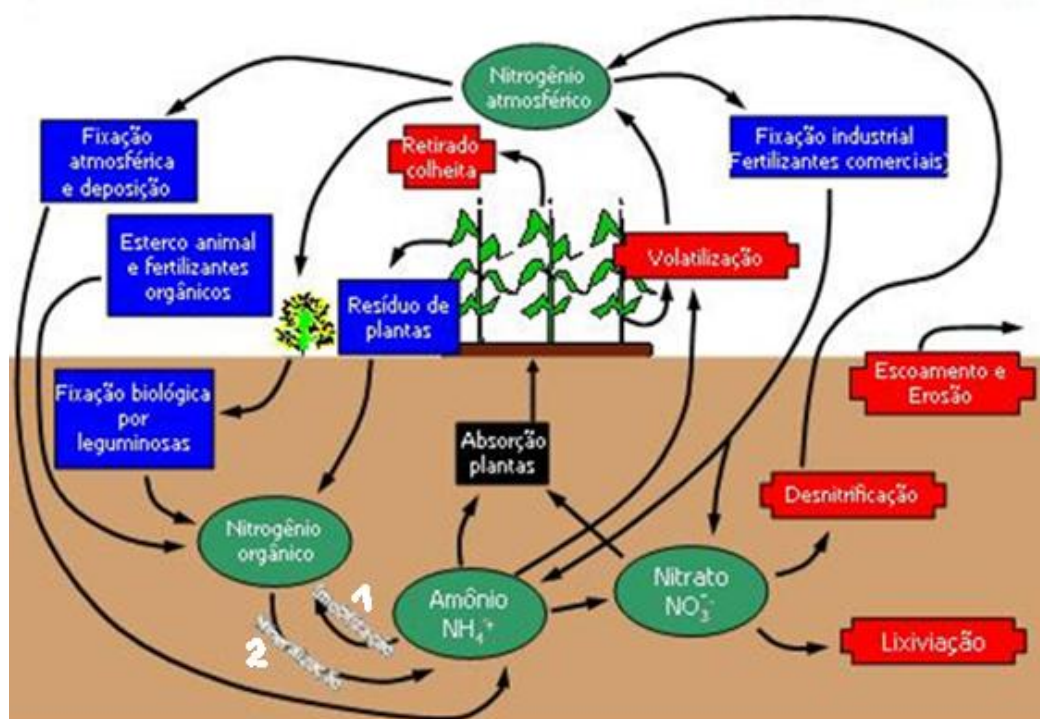


Figura 1.25 - Ciclo do nitrogénio, (1) Imobilização; (2) Mineralização, (componente (), entrada (Entrada), saída (Saída)) [34].

A forma elementar do nitrogénio é captado pelos organismos fixadores (de nitrogénio) que o transformam em nitrogénio inorgânico ou seja nitrogénio na forma de amónia (NH_4) e nitrato (NO_3). Tal como acontece com o fósforo, a morte e decomposição dos organismos devolvem o nitrogénio ao ambiente.

Dos vários nutrientes que podem afectar a taxa de produtividade primário, o fósforo é, em águas doces, o factor limitante mais frequente, especialmente na forma de ortofosfato iónico (PO_4^{3-}). Após o fósforo o factor químico limitante é o nitrogénio e para um crescimento óptimo a razão dos compostos de fósforo para os de nitrogénio deve de ser de cerca de 1:10 [33].

1.6 Objectivos do estágio e estrutura da tese

O trabalho desenvolvido teve como principais objectivos: a implementação e criação de condições, e conhecimentos que permitam otimizar a produção de biomassa algal de forma integrada no processo de tratamento de águas residuais, através de zonas húmidas construídas; a validação de técnicas analíticas, tais como a determinação da concentração de nutrientes na fase aquosa, o teor de biomassa em termos secos e o teor de açúcares totais e redutores; o estudo da potencialidade de utilização de lixiviados, ricos em nutrientes, obtidos de argilas expandidas usadas como enchimento de zonas húmidas construídas, como meio de crescimento de micro e de macroalgas; a avaliação e tentativa de optimização do crescimento das microalgas e das macroalgas.

Esta tese apresenta-se dividida em quatro capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma breve introdução ao tema abordado. No Capítulo 2 descreve-se os materiais utilizados incluindo a concepção em laboratório dos fotobioreactores e as metodologias realizadas para as análises. O Capítulo 3 apresenta e discute os vários resultados obtidos. No Capítulo 4 estão descritas as principais conclusões e sugestões de trabalhos futuros nesta área. É também apresentado um Anexo com informações relativas aos reagentes químicos utilizados ao longo deste trabalho.

Durante a realização deste trabalho compararam-se diferentes meios de crescimento com vista a otimizar a produção de biomassa, determinou-se o teor em açúcares da macroalga e o seu consumo de nutrientes. Para as microalgas estudou-se a cinética de crescimento, em função do meio de crescimento, determinando-se a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Algas

Neste trabalho foram utilizadas três espécies de algas, uma cianobactéria (*anabaenas*sp.) e duas algas pertencentes à divisão chlorophyta: a macroalga *Cladophora aegagropila* (pluricelular) e a microalga *spirogyras*sp. (unicelular).

A macroalga foi adquirida numa loja de artigos para aquários e foi escolhida pelo interesse em determinar os seus teores em açúcares, visto que a sua capacidade de remoção de matéria orgânica, compostos de fósforo e azoto, clarificação da água e redução de odores já estava referenciada [35].

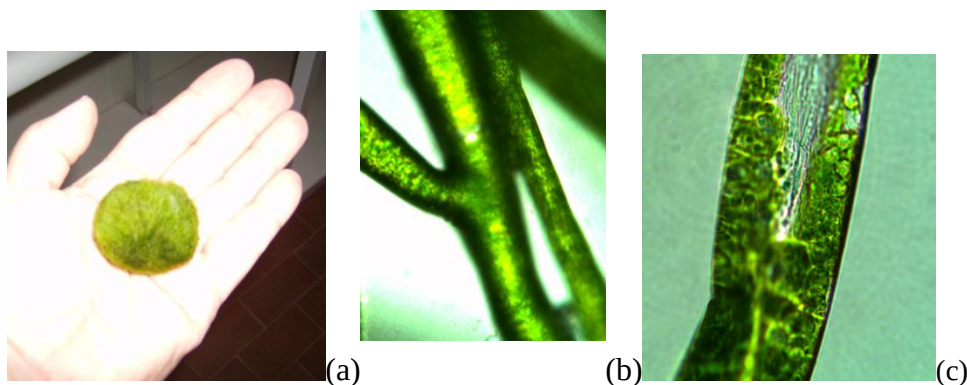


Figura 2.1 - Macroalga *Cladophora aegagropila* – “MossBall”; (a) macroalga em tamanho natural; (b) e (c) observação ao microscópio numa ampliação x400.

Esta macroalga pertence ao género *Aegagropila*, família *Cladophoraceae* e filo (divisão) *Chlorophyta*. Pode ser encontrada em lagos pouco profundos, requer áreas bem iluminadas e apresenta aspectos similares com as plantas superiores. Pode apresentar uma forma plana tipo tapete mas o mais comum é apresentar uma forma aproximadamente esférica devida às correntes de água, que no caso de apresentar muita turbulência divide em pedaços mais pequenos e molda a macroalga. É protegida em

certas zonas do Japão onde foi declarada como “Especial Tesouro Nacional Japonês”. É também possível encontra-las no Reino Unido, Islândia e Suécia [36].

As duas microalgas foram seleccionadas principalmente pelos seus conhecidos teores em açúcares [1]. No critério de escolha também contou o facto de que os pré-inóculos usarem o mesmo meio de cultura (L-M7) e serem filamentosas, o que teoricamente facilita o processo de colheita da biomassa.

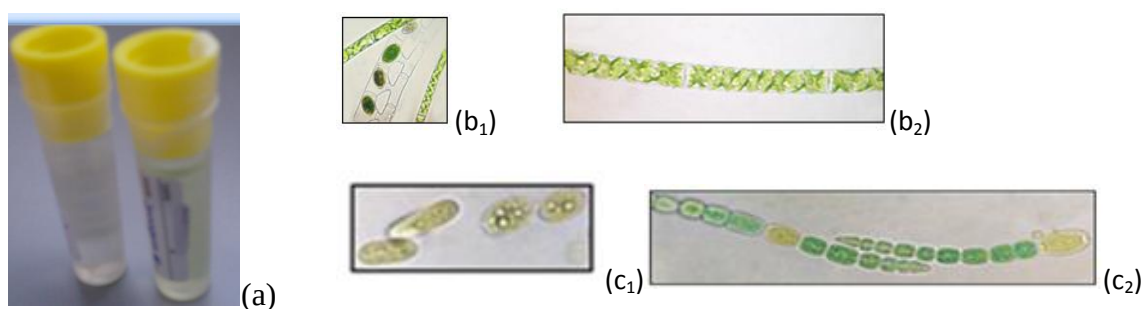


Figura 2.2 – Microalgas (a) Pré-inóculo das microalgas; (b₁) e (b₂) *Spirogyra* sp.[37]; (c₁) e (c₂) *Anabaena* sp. [38].

Estas microalgas foram obtidas na Algoteca do Departamento de Botânica (ACOI) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Segundo informação disponibilizada pela ACOI, a *Spirogyra* (pertencente ao género *spirogyra*, família *Zygnemataceae*, filo (divisão) Chlorophyta e reino Protista), foi colhida em Portugal, entre Marviçais e Moncorvo [37]. A microalga *Anabaena* (pertencente ao género *anabaena*, família *Nostocaceae*, filo (divisão) Cyanobacteria e reino Monera), foi também colhida Portugal, na região de S. Silvestre [38].

2.1.2 Meios de crescimento das algas

2.1.2.1 Meio de crescimento da macroalga

O crescimento das macroalgas *Cladophora* *egagropila* foi realizado em aquários com arejamento, tendo-se acompanhado a variação do peso de cada macroalga, o pH e o teor de nutrientes no meio líquido. Usaram-se dois aquários, inicialmente com 2 litros de água destilada em cada. Num deles colocou-se 1 kg de argila expandida (Filtralite® MR,

doravante designado por substrato A), supostamente rica em nutrientes por ser proveniente de uma instalação piloto de tratamento de efluentes líquidos por Zonas Húmidas Construídas, ZHC (instalação existente na ESTT e já descrita na literatura [39]). No outro aquário colocou-se 600 g de substrato “Sera Floredepot” e 500 g de areão vulcânico (substrato S). O substrato foi adquirido junto com a macroalga, sendo indicado pelo fornecedor. Os aquários referidos estão representados na Figura 2.3.

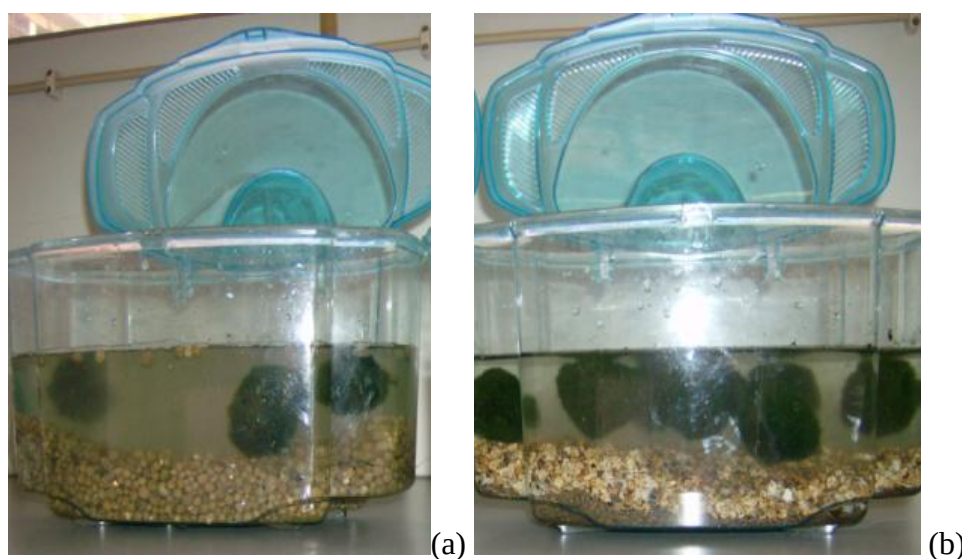


Figura 2.3 - Aquários com macroalgas instalados no laboratório: (a) o substrato utilizado é a argila expandida rica em nutrientes (substrato A); (b) fundo constituído por duas camadas separadas (substrato S): no fundo o substrato Sera Floredepot (camada fértil), coberto por areão vulcânico (camada inerte).

O substrato “SeraFloredepot” (substrato S) é composto por turfa tratada, areia limpa, oligo-elementos e sais nutritivos indispensáveis para o crescimento das plantas aquáticas. Este substrato está isento de nitratos e fosfatos, para inibir o desenvolvimento nos aquários de algas, o que no neste trabalho pode funcionar como factor limitante. Este substrato tem como função, não só ser o sistema de fertilização mas também o substrato de fixação [40].

O material poroso (camada inerte), é a área de fixação de microrganismos que realizam diversas funções, tais como decompor a matéria orgânica e libertar os nutrientes convertidos em formas disponíveis para as macroalgas. Estas funções devem também ser conseguidas quando se utiliza a argila expandia. Crê-se que durante a utilização

deste material como enchimento das ZHC se terá desenvolvido um biofilme (meio biologicamente activo que permitiu a degradação dos poluentes das águas residuais tratadas nas ZHC, Figura 2.4).



Figura 2.4 - (a) Instalação piloto de uma zona húmida existente no departamento de Engenharia Química, desde 2005, no Instituto Politécnico de Tomar em que o enchimento dos tanques é a argila expandida; (b) Análise microscópica da argila expandida; (c) Superfície da argila expandida com bactérias produzindo uma área de biofilme.

Utilizou-se a argila da expandida no aquário, como alternativa ao substrato S, por se supor que fora das ZHC, e em contacto com a água no aquário das macroalgas, se verificaria a libertação dos nutrientes para o meio líquido, servindo para alimentar as algas.

O aproveitamento da argila, após a sua função nas ZHC, representa uma via de valorização deste material, que, livre dos nutrientes, poderá voltar a ser usado nas mesmas ou noutras ZHC. O Processo, em ciclo quase fechado, está representado na Figura 2.5: as macroalgas crescem assimilando os nutrientes presentes na argila, e a biomassa pode ser convertida em biocombustíveis; a argila, após liberta dos nutrientes pode voltar a ser usada como enchimento nas ZHC.

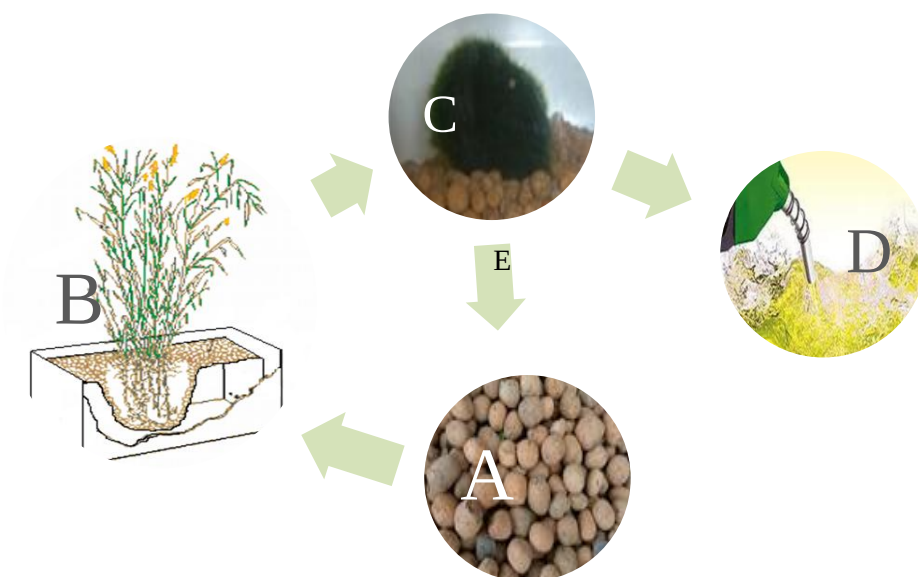


Figura 2.5 - Utilização da argila expandida e sua regeneração. (A) utilização comum em construção civil como, por exemplo, isolante térmico e acústico, em agregados de betão leve, enchimento, projectos de jardinagem, aterros, entre outros; (B) Enchimento de zonas húmidas (wetlands) construídas para o tratamento de águas residuais; (C) Utilização dos materiais minerais ricos em nutrientes para o crescimento de macroalgas; (D) produção de bioetanol; (E) material regenerado após a extracção de nutrientes.

Na ZHC piloto de onde se retirou a argila expandida usada neste estudo, utiliza-se um afluente composto por metanol, como fonte de carbono, e fertilizante Nitrofoska Azul Especial 12-12-17s (+2), como fonte de nutrientes, para simular a composição de efluentes a tratar. A composição do fertilizante consta na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Teores dos elementos nutritivos da Nitrofoska Azul Especial 12-12-17s (+2) [41].

12%	Azoto (N) total 6,5% Azoto (N) amoniacal 5,5% Azoto (N) nítrico
12%	Pentóxido de Fósforo (P₂O₅) solúvel em citrato de amónio neutro e em água 6% solúvel em água
17%	Óxido de Potássio (K₂O)
2%	Óxido de Magnésio (MgO) total
15%	Trióxido de enxofre (SO₃) total
5%	Óxido de Cálcio (CaO) total
0,02%	Boro (B) total
0,01%	Zinco (Zn) total

*Pobre em cloro

2.1.2.2 Meio de crescimento das microalgas

Para o estudo do crescimento das microalgas, comparou-se o crescimento no meio de cultura de manutenção M7 com outros os meios de crescimento:

- um meio com a mesma composição do meio M7, mas 4 vezes mais concentrado – meio M7-4x;
- um meio aquoso proveniente da extracção de nutrientes da argila expandida – meio A;
- uma solução aquosa obtida por diluição de um adubo líquido universal KB (NPK 6-3-6).

A preparação do meio de cultura M7 seguiu o procedimento descrito pela Algoteca do Departamento de Botânica (ACOI) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Inicialmente prepararam-se cada uma das soluções-mãe em balões de Erlenmeyer conforme indicado na Tabela 2.2, de seguida preparou-se 1 litro de meio M7 com os volumes indicados. A preparação dos extractos indicados na tabela é descrita no seguimento.

Tabela 2.2 - Composição do meio líquido M7.

	Solução-mãe (%)	V (ml)	Concentração final (mg/L)
KNO ₃	1	10	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	10	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2	5	10
CaSO ₄	Solução saturada	10	-
Extracto de solo	-	20	-
Extracto de <i>Sphagnum</i>	-	10	-
Água destilada	-	930	-
Micronutrientes	-	5	-

Para preparar o “Extracto de solo”, pesou-se 200g de solo com baixo teor em fertilizantes ao qual se adicionou 1 litro de água destilada e esterilizou-se fervendo durante 1 h. Após decantação, filtrou-se o meio aquoso e autoclavou-se uma hora a uma atmosfera em três dias consecutivos, e, após arrefecer guardou-se no frigorífico. Para obter o “Extracto de *Sphagnum*” pesou-se 50g de *Sphagnum* seco, adicionou-se 1,5 litros de água destilada e esterilizou-se fervendo durante 1 h. Após decantação, filtrou-se o meio aquoso e autoclavou-se uma hora a uma atmosfera em três dias consecutivos, e, após arrefecer guardou-se no frigorífico. Adicionou-se vitamina B₁₂ (5×10^{-6} g) à solução final esterilizada após autoclavagem. A composição da solução de micronutrientes referida na Tabela 2.2 consta da Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Composição da solução dos micronutrientes.

	Solução-mãe (%)	Solução de micronutrientes	Concentração final (mg/L)
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.1	1.0 ml	1
MnSO ₄ 4H ₂ O	0.1	2.0 ml	2
H ₃ Bo ₃	0.2	5.0 ml	1
Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0.02	5.0 ml	1
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.02	5.0 ml	1
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.0005	1.0 ml	0,005
Água destilada	-	981 ml	-
FeSO ₄ 7H ₂ O	-	0.7 g	-
EDTA (Titriplex III, Merck)	-	0.8 g	-

Autoclavou-se em separado as soluções I e II, ejuntaram-se após arrefecerem, sendo:

- **Solução I:** 881mL de água destilada e solução stock dos sais sem FeSO₄ e 0,4g de EDTA;
- **Solução II:** 100mL de água destilada e 0,7g de FeSO₄ com 0,4g de EDTA [42].

O meio NPK foi obtido a partir do Adubo líquido universal KB [43]. Segundo o fornecedor do adubo, a composição é dada por:

- 6% de Azoto (N) total, sendo 3,3% nítrico e 2,7% amoniacal;
- 3% de Anídrico de Fósforo (P₂O₅) solúvel em água;
- 6% de Óxido de Potássio (K₂O) solúvel em água.
- Oligo-elementos solúveis em água – 0,01% de Boro (B); 0,002% de Cobre (Cu) total quelatado por DTPA; 0,03% de Ferro (Fe) total quelatado por DTPA; 0,01% de Manganês (Mn) total quelatado por DTPA; 0,001% de Molibdénio (Mo) total; 0,002% de Zinco (Zn) total quelatado por DTPA.

2.2 Métodos experimentais

2.2.1 Crescimento da macroalga

Os ensaios de crescimento da macroalga decorreram no laboratório, sobre bancadas junto a janelas onde receberam luz natural. A sala não era climatizada e a temperatura oscilou em torno do valor de $24^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. As culturas estão sujeitas a arejamento por pequenos períodos intermitentes ao longo do dia, este arejamento assegura também a agitação do meio líquido.

Conforme referido na secção 2.1.2.1, testou-se o crescimento da macroalga nos substratos A e S.

Os ensaios com o substrato A tiveram o objectivo de testar o poder “adubante” da argila expandida através da quantificação do consumo de nutrientes pelas macroalgas. Esta quantificação centrou-se no fósforo visto que ele é o nutriente que mais frequentemente é o factor limitante para produtividade de algas e plantas [33]. Os compostos de fósforo tendem a formarsais de baixa solubilidade, por exemplo óxidos de ferro e de alumínio ou de carbonato de cálcio em meios alcalinos. A formação destes sais deve ser uma das principais razões da contribuição da argila expandida na remoção de compostos de fósforo pelas ZHC. Em contacto com água, é expectável que parte destes sais se dissolvam, retornando o fósforo ao meio aquoso. Para determinar a quantidade de fósforo que se hidrolisa na água em função do tempo realizaram-se alguns ensaios seguidamente descritos.

Num balão de Erlenmeyer colocou-se 25 g de argila Filtralite[®] MR (retirada de uma das ZHC piloto, com nutrientes adsorvidos) em 250 mL de água destilada. Passados 14 dias retirou-se amostra de líquido para realizar a análise do fósforo total. De seguida retirou-se todo o líquido e substituiu-se por novos 250 mL de água destilada. Passados outros 14 dias voltou-se a retirar nova amostra.

Em paralelo também se retirou amostras do tanque com as macroalgas para analisar o fósforo aqui existente e por diferença encontrar o valor do fósforo consumido pelas macroalgas.

2.2.2 Crescimento das microalgas

Os ensaios de crescimento decorreram no laboratório, nas mesmas condições ambientais que os estudos de crescimento das macroalgas, utilizando-se balões de Erlenmayer como fotobioreactores (Figura 2.6.)



Figura 2.6 - Configuração do fotobioreactor.

As culturas foram também sujeitas a arejamento por pequenos períodos intermitentes ao longo do dia. Este arejamento assegura também a mistura do meio de cultura. A iluminação artificial é garantida por lâmpadas fluorescentes GLO T8 Linear Fluorescent Bulbs, com fotoperíodo de 12 h (ciclo luz/escuro), cujos espectros fotossintéticos abrangem a zona do espectro fotossintético ideal para aquários com plantas. Neste trabalho as lâmpadas escolhidas foram a Flora-Glo e a Sun-Glo. A primeira porque tem o pico na zona azul do espectro e a Sun-Glo que vai complementar com radiação na zona vermelha. Ambas as lâmpadas são de 61 cm, 20 Watts e 25 mm de diâmetro, da marca Hagen e fabricadas no Japão.

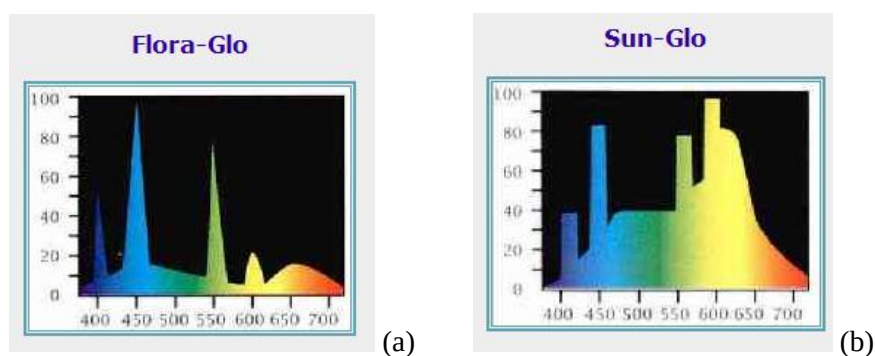


Figura 2.7 – Diferentes espectros fotossintéticos que as lâmpadas fluorescentes GLO T8 Linear FluorescentBulbs reproduzem. (a) Sun-Glo: Temperatura de cor 4200 K, 1300 Lúmen e 125 Lux; (b) Flora-Glo: Temperatura de cor 2800 K, 650 Lúmen e 90 Lux [44].

O crescimento das microalgas foi quantificado pelo método indirecto, usando medições da absorvância para um comprimento de onda de 570 nm, seguindo a Lei de Lambert-Beer em que avalia a obstrução à passagem da luz, e por quantificação de peso seco e medição de pH sabendo que este é função do CO_2 dissolvido e que decresce com a respiração aumentando proporcionalmente com o aumento da fotossíntese.

2.2.2.1 Preparação do material utilizado no cultivo

Todos os materiais e meios usados no cultivo foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Os balões de Erlenmeyer receberam tampões de algodão e gaze envolvidos por papel de alumínio antes da esterilização. O material de vidro foi previamente lavado com água destilada e seco em estufa. Para a preparação dos meios de cultivo, manuseio de materiais esterilizados, repicagem do banco de células e de inóculos adoptaram-se procedimentos de segurança estabelecidos para laboratórios de microbiologia, com o objectivo de se evitar contaminações, tais como desinfectar a bancada de trabalho no início e término de cada utilização e trabalhar na zona de esterilidade garantida pelo bico de gás (Busen).

2.2.2.2 Manutenção do banco de células

Para a manutenção do banco de células foram adoptados dois procedimentos:

- 1) Repicagens na proporção de 1:10 (1 mL da cultura antecessora para 9 mL de meio de cultura, M7, novo). Foram mantidas três gerações em que as repicagens tinham períodos entre 10 a 15 dias. Estes meios foram agitados suavemente de forma manual uma vez ao dia.
- 2) Repicagem em balões de Erlenmeyer – fotobioreatores com fotoperíodo de 12 h (ciclo luz/escuro), agitação e arejamento por ar comprimido - em que a diluição prevista para a realização dos ensaios era 1:10 (1 mL da cultura antecessora para 9 mL de meio de cultura novo ou 40 mL da cultura antecessora para 360 mL de meio de cultura novo) mas como se retirou regularmente amostras para o controlo de crescimento (medindo o pH e a Absorvância) resultou que as diluições foram sendo diferentes de modo a maximizar a quantidade de biomassa disponível para a repicagem seguinte [23].

2.2.3 Metodologias Analíticas para as Macroalgas

2.2.3.1 Determinação do Peso Seco

Pesou-se uma macroalga e foi seca em estufa a 80°C durante 24 h num cadinho previamente seco e tarado. O conjunto foi seco até se registar peso constante.

2.2.3.2 Hidrólise Ácida Quantitativa

A hidrólise ácida quantitativa (HAQ) permite determinar a concentração total de açúcares. Para garantir a hidrólise total da biomassa seca ela foi primeiro reduzida a fragmentos de pequenas dimensões, num almofariz, facilitando o ataque do ácido.

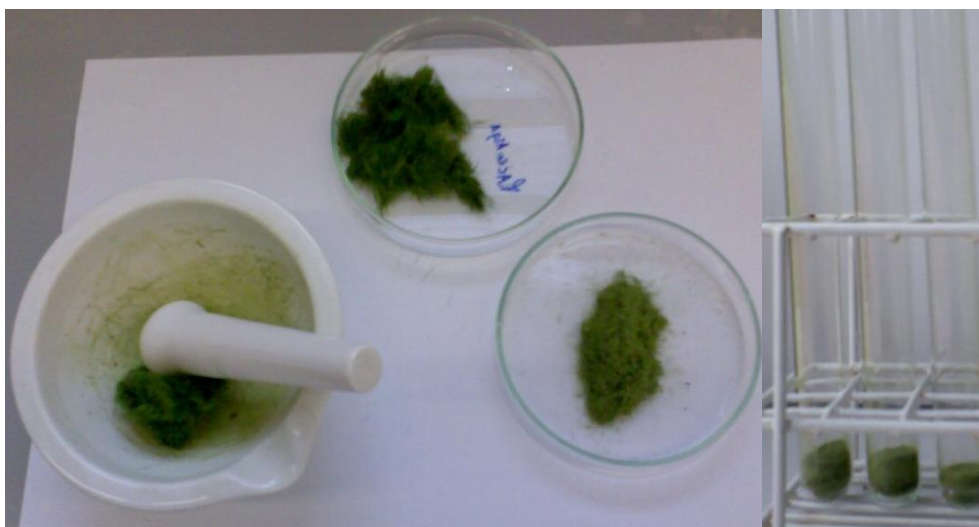


Figura 2.8 – Preparação da macroalga para a hidrólise ácida quantitativa.

Num tubo de ensaio largo, com 0,5 g de biomassa seca (ou quantidade equivalente de biomassa húmida), foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico 72% (m.m^{-1}). Foi seguidamente colocado num banho termostatzado a 30 °C durante 1 h. O conteúdo do tubo foi então transferido para um frasco rolhado de 250 mL e foram adicionados 139 mL de água destilada. O frasco, devidamente fechado, foi colocado na autoclave durante 1 h à temperatura de 120 °C. Este procedimento foi realizado em triplicado e guardado no frigorífico até posterior utilização. Quando se hidrolisou a biomassa, apenas se procedeu à separação física das 2 fases por filtração.

2.2.3.3 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Totais

O teor em açúcares totais foi determinado pelo “método do reagente fenol-sulfúrico” (FS). Inicialmente foi preparada uma solução de fenol 5 % (m.v-1), dissolvendo 50 g de fenol e diluindo a 1 litro, que se conservou em frasco escuro.

A 1 mL de amostra, devidamente diluída, foi adicionado igual volume da solução de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi, posteriormente, homogeneizada em agitador de vórtice. A reacção ocorreu durante 10 minutos, tendo o tubo de ensaio sido, no fim, colocado num banho de água fria durante 15 minutos. A

densidade óptica de cada mistura foi lida num espectrofotómetro a 490 nm contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água destilada.

A concentração em açúcares totais da amostra foi obtida a partir de uma recta de calibração com concentrações entre 10 e 100 mg/L de glucose [1].

2.2.3.4 Determinação Colorimétrica do Teor em Açúcares Redutores

O teor em açúcares redutores foi determinado pelo “método do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico” (DNS). Para a preparação do reagente DNS dissolveu-se, à temperatura ambiente, 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 mL de NaOH 2 N e 250 mL de água destilada. Juntou-se 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio e fez-se a 500 mL com água desmineralizada. Guardou-se num frasco escuro.

Em tubos de ensaio, misturou-se 0,5 mL do reagente de DNS com 0,5 mL de amostra. Mergulharam-se os tubos num banho de água a 100°C durante 5 minutos, após a mistura arrefecer adicionou-se 5 mL de água destilada. A absorvância da solução final foi lida ao comprimento de onda de 540 nm, contra um branco de água destilada que sofreu o mesmo tratamento.

A concentração em açúcares redutores da amostra foi obtida a partir de uma recta de calibração com concentrações entre 100 e 1000 mg/L de glucose [45].

2.2.3.5 Determinação do Teor em Fósforo Total

O teor em fósforo total foi determinado segundo o “método do ácido ascórbico”. O processo de determinação do teor em fósforo total passa por transformar todo o fósforo presente em ortofosfatos (são os compostos de fósforo mais comuns) por oxidação. Este método baseia-se na reacção em meio ácido do molibdato de amónio e do tartarato de potássio e antimónio com o ortofostato formando o ácido molibdatofosfórico que é reduzido pelo ácido ascórbico, dando origem a uma cor azul intensa se estivermos na presença do ião fosfato. Foi utilizado o espectrofotómetro *Cadas 100* sendo as leituras

da cor realizadas contra o branco (apenas água destilada) a um comprimento de onda de 880 nm em células de vidro.

Para a preparação do reagente combinado misturou-se as soluções de ácido sulfúrico 5N, tartarato de potássio e antimónio, molibdato de amónio e ácido ascórbico nas proporções de 100:10:30:60 respectivamente.

Foram efectuadas as rectas de calibração para soluções padrão de fosfato de sódio de teor igual a 1000 mg fosfato/L que por diluições prepararam-se soluções de concentrações compreendidas entre 1 e 10 mg/L.

Pipetaram-se para frascos autoclaváveis 50,0mL de amostra e adicionou-se 0,05mL de indicador de fenolftaleína. Caso a amostra obtenha a cor rósea, adiciona-se ácido sulfúrico 5,4 M gota a gota até a cor desaparecer. Seguidamente adicionaram-se 1,0mL de ácido sulfúrico 5,4 M e 0,4 g de persulfato de amónio. A mistura foi levada à autoclave durante 30 minutos à temperatura de 120 °C. Após arrefecer voltou-se a adicionar 0,05mL de indicador de fenolftaleína e adicionou-se hidróxido de sódio 1M gota a gota até aparecimento de uma coloração rosa ténue. Transferiram-se as amostras para balões de 100mL, aferindo o volume com água destilada. Pipetaram-se 50,0mL para balões de Erlenmeyere adicionou-se 0,05mL de indicador de fenolftaleína. Adicionou-se ácido sulfúrico 5N gota a gota, até a cor rósea (caso apareça) desaparecer. De seguida adicionaram-se 8,0mL de reagente combinado e misturou-se bem. Passados 10 minutos mediu-se a absorvância contra o branco a um comprimento de onda de 880nm [46].

2.2.3.6 Determinação do Teor em Azoto Total

A determinação do teor total em azoto é semelhante à determinação do fósforo total uma vez que se usa a oxidação das diferentes formas de azoto (nitritos, nitratos, azoto amoniacal e as formas orgânicas). Este ensaio é normalmente dificultado por diversas interferências e não existe nenhum método completamente isento de erro. Neste caso determinou-se o azoto total usando o “método espectrofotométrico do 2,6-dimetilfenol”. Este processo tem por base a formação do 4-nitro-2,6-dimetilfenol resultante da reacção dos nitratos com 2,6-dimetilfenol em presença dos ácidos sulfúrico, ortofosfórico e amidossulfónico.

Foram efectuadas as rectas de calibração para as soluções padrão de nitrato de sódio de teor 1000 mg nitrato/L, que por diluição se prepararam as soluções de concentrações compreendidas entre 5 e 50 mg/L.

Pipetaram-se para frascos autoclaváveis 10,0mL de amostra e adicionou-se 05,0mL de reagente de digestão, agitando-se bem os frascos depois de rolhados. Levou-se à autoclave durante 30 minutos a 120°C. Após arrefecer adicionou-se 1mL de tampão borato (preparada pela dissolução em água destilada de 6,2g de ácido bórico e de 0,8g de hidróxido de sódio num volume final de 1000 mL).

Transferiu-se para um balão de 50mL perfazendo com água destilada. Para um balão de Erlenmeyer de 100mL dispensaram-se 35,0mL de mistura ácida (1000mL de ácido sulfúrico concentrado, 1000mL de ácido ortofosfórico concentrado e 0,08g de ácido amidossulfónico). De seguida pipetaram-se 5,0mL de amostra e adicionaram-se 5,0mL da solução de 2,6-dimetilfenol e misturou-se bem. Passados 10 minutos mediu-se a absorvância contra o branco ao comprimento de onda de 324nm [47].

2.2.3.7 Determinação da Concentração de Fosfatos

A concentração de fosfatos foi determinada segundo o “método do ácidoascórbico”. Foram efectuadas as rectas de calibração para soluções padrão de fosfato de sódio de teor igual a 1000 mg fosfato/L que por diluições prepararam-se soluções de concentrações compreendidas entre 1 e 10 mg/L. Pipetaram-se 50,0mL para balões de Erlenmeyer adicionou-se 0,05mL de indicador de fenolftaleína. Adicionou-se ácido sulfúrico 5N gota a gota, até a cor rósea (caso apareça) desaparecer. De seguida adicionaram-se 8,0mL de reagente combinado e misturou-se bem. Passados 10 minutos, mas antes de passar 30 minutos, mediu-se a absorvância contra o branco a um comprimento de onda de 880nm [46].

2.2.3.8 Determinação da Concentração de Nitratos

A concentração de nitratos foi determinada segundo o “método espectrofotométrico do 2,6-dimetilfenol”. Foram efectuadas as rectas de calibração para as soluções padrão de nitrato de sódio de teor 1000 mg nitrato/L, que por diluição se prepararam as soluções

de concentrações compreendidas entre 5 e 50 mg/L. Para um balão de Erlenmeyer de 100mL dispensaram-se 35,0mL de mistura ácida (1000mL de ácido sulfúrico concentrado, 1000mL de ácido ortofosfórico concentrado e 0,08g de ácido amidossulfónico). De seguida pipetaram-se 5,0mL de amostra e adicionaram-se 5,0mL da solução de 2,6-dimetilfenol e misturou-se bem. Passados 10 minutos mediu-se a absorvância contra o branco ao comprimento de onda de 324 nm [47].

2.2.4 Metodologias Analíticas para as Microalgas

Para a realização dos ensaios de análise dos crescimentos das microalga, foi interrompido o arejamento durante 24 h para promover a sedimentação da biomassa microalgal, visto este tipo de cultura ser muito diluída. No final desse período foi removido o sobrenadante e aproveitada a biomassa sedimentada.

2.2.4.1 Determinação da Biomassa Seca

A determinação da biomassa seca das amostras de cultura foi realizada filtrando um volume conhecido de cultura sob vácuo, depois de homogeneizada num agitador de vórtice, utilizando filtros secos de membrana de celulose com porosidade de 45 µm, e diâmetro 47 mm da Whatman GmbH, fabricado na Alemanha. Após a filtração, os filtros foram secos a 105 °C durante 24 h até peso constante. Foram realizadas diluições com valores entre 0,1 e 1 para elaborar a recta de calibração com pelo menos cinco pontos [23]. Para a toma de ensaio usou-se um volume de 55 mL. Evitou-se volumes superiores devido à colmatação do filtro durante o processo de filtração. Verificou-se erros associados a colheita de cada amostra devido à dificuldade de homogeneizar correctamente visto que estas algas são filamentosas e difíceis de desagregar. Após determinada a massa algal mediu-se a densidade óptica, num espectrofotómetro *Cadas 100*, para a elaboração da curva de calibração (densidade óptica *versus* biomassa seca). A absorvância, que é proporcional a obstrução à passagem de luz, foi lida a 570 nm.

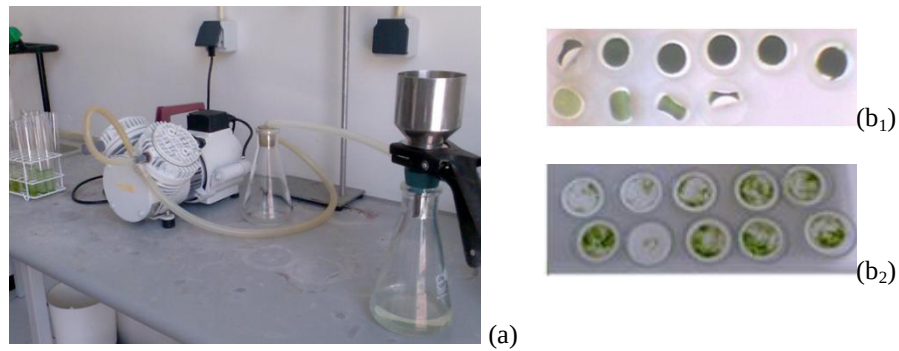


Figura 2.9 - Filtração a vácuo usando um balão kitasato e funil, ligado por mangueiras a um frasco de segurança (a). Filtros com os resíduos das microalgas das diferentes diluições (valores entre 0,1 e 1) usadas na construção das respectivas rectas de calibração; (b₁) *Anabaenasp.*; (b₂) *Spirogyrasp.*.

2.2.4.2 Elaboração de Curvas de Crescimento

Ao longo do crescimento foram retiradas amostras para avaliar o crescimento celular pelo método espectrofotométrico a 570 nm, determinou-se a taxa específica decrescimento (μ) e o tempo de duplicação (t_d) ou geração para as várias condições.

3. Resultados e Discussão

3.1 Rectas de calibração dos vários métodos

3.1.1 Açúcares Totais e Redutores

A determinação colorimétrica do teor de açúcares na macroalga foi realizada, como já foi descrito, por dois métodos: o do reagente FS e o do reagente de DNS. Apresentam-se nas Figuras 3.1 e 3.2 as rectas de calibração para os métodos de avaliação do teor em açúcares totais e açúcares redutores em termos de glucose.

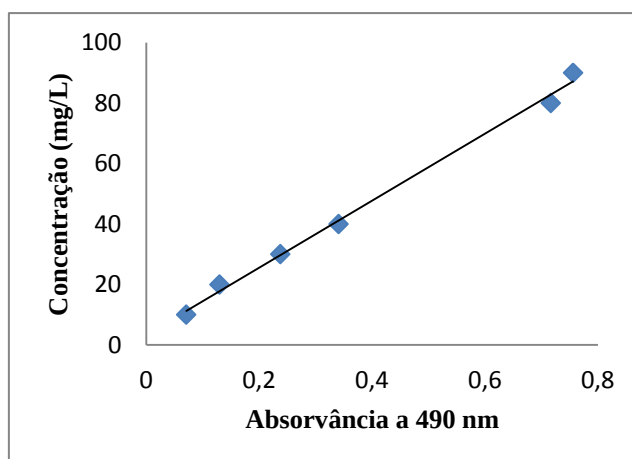


Figura 3.1 - Recta de calibração para avaliar o teor em açúcares totais, em termos de glucose, com o reagente FS.

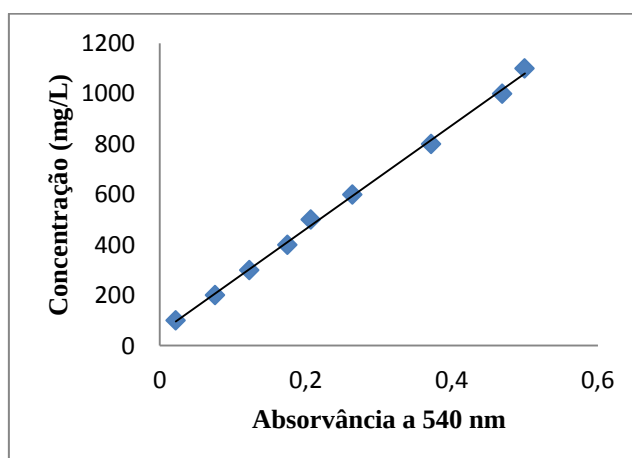


Figura 3.2 - Recta de calibração para avaliar o teor em açúcares redutores, em termos de glucose, com o reagente DNS.

Em ambos os métodos obteve-se um bom ajuste linear como se pode verificar a partir dos coeficientes de correlação apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros das rectas de calibração para os diferentes métodos de determinação dos açúcares.

Método de Análise	Declive da Recta	Ordenada na Origem	r^2
Método do reagente fenol-sulfúrico (Açúcares Totais)	110,7	3,426	0,9955
Método do reagente de ácido 3,5-dinitrossalicílico (Açúcares Redutores)	2059	50,33	0,9983

3.1.2 Teor em fósforo total, azoto total, fosfatos e nitratos.

Foram efectuadas as rectas de calibração para os métodos: “do ácido ascórbico” para avaliar o teor em fósforo total e fosfatos, e “do 2,6-dimetilfenol” para avaliar o teor em azoto total e nitratos.

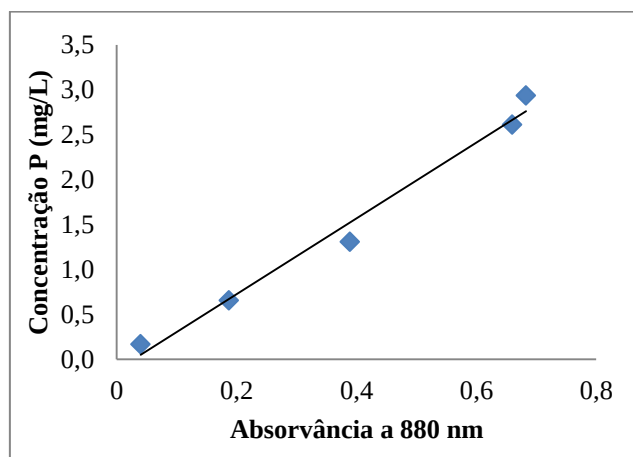


Figura 3.3 - Recta de calibração para avaliar o teor em fósforo total.

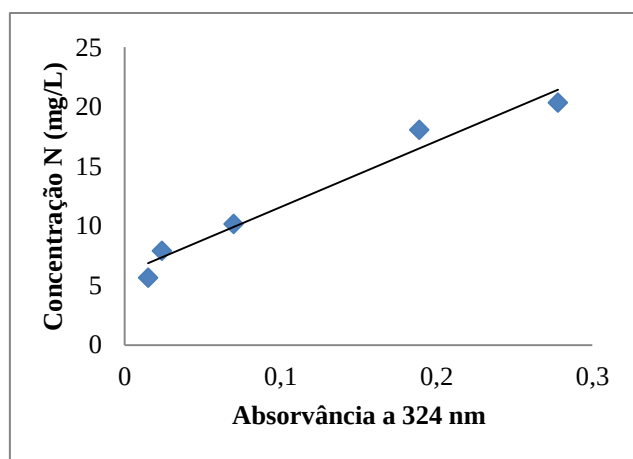


Figura 3.4 - Recta de calibração para avaliar o teor em azoto total.

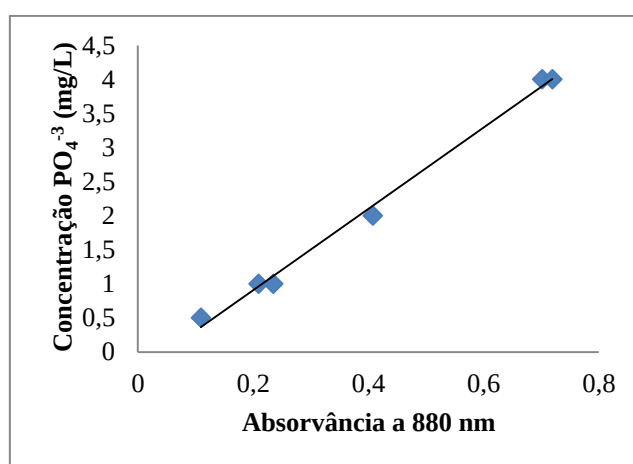


Figura 3.5 - Recta de calibração para avaliar o teor em fosfatos.

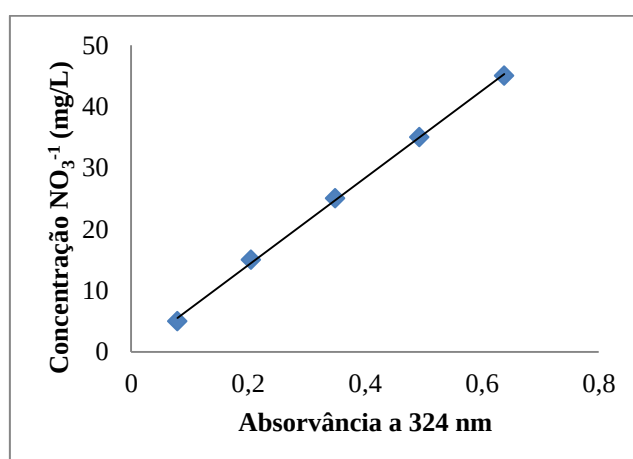


Figura 3.6 - Recta de calibração para avaliar o teor em nitratos.

Obteve-se um bom ajuste linear para todos os métodos, como se pode verificar na Tabela 3.2. O azoto total apresenta o pior coeficiente de correlação possivelmente por se ter trabalhado no limite inferior de validade da lei de Lambert-Beer.

Tabela 3.2 – Parâmetros das rectas de calibração para os diferentes métodos de determinação dos nutrientes.

Método de Análise	Declive da Recta	Ordenada na Origem	r^2
Método do ácido ascórbico(Fósforo Total)	4,778	-0,129	0,9931
Método do 2,6-dimetilfenol(Azoto Total)	56,98	5,713	0,9702
Método do ácido ascórbico(Fosfatos)	5,968	-0,287	0,9947
Método do 2,6-dimetilfenol(Nitratos)	71,07	-0,075	0,9993

3.2 Estudos efectuados com a macroalga *Cladophora aegagropila*

3.2.1 Ensaio de crescimento

Inicialmente colocaram-se as macroalgas num aquário com substrato substrato Sera Floredepot e areão vulcânico (substrato S) para simular as condições em que estas se encontravam quando foram adquiridas permitindo uma adaptação gradual às novas condições existentes no laboratório. Pesaram-se no dia em que chegaram e novamente passados 13 dias registando $8,94 \pm 0,98$ g e $9,03 \pm 1,34$ respectivamente (Tabela 3.3). O diâmetro médio de cada macroalga é de $4,2 \pm 0,2$ cm.

Tabela 3.3 - Variação do peso de cada uma das 10 macroalgas.

Peso (g)	1º dia	13º dia
Macroalga ₁	7,01	6,82
Macroalga ₂	8,08	7,62
Macroalga ₃	8,48	8,23
Macroalga ₄	8,75	8,32
Macroalga ₅	8,82	8,84
Macroalga ₆	9,07	9,43
Macroalga ₇	9,09	9,48
Macroalga ₈	9,73	9,73
Macroalga ₉	10,13	10,55
Macroalga ₁₀	10,28	11,27
Média	8,94± 0,98	9,03±1,34

Após este período de adaptação usou-se uma das macroalgas para determinar o teor em açúcares e quatro foram colocadas noutra aquário mas agora no substrato A em que se controlou o seu peso e pH. Para a referida macroalga obteve-se 38,82% de açúcares totais dos quais 22,39% são açúcares redutores. As outras macroalgas foram mantidas em substrato e areão e testou-se a sua reprodução dividindo duas macroalgas em quatro pedaços aproximadamente iguais como se pode observar na Figura 3.7. Este corte foi feito sem grande rigor tentando apenas cortar pelo centro onde se encontra uma zona mais áspera semelhante a raízes entrelaçadas. Cada um dos pedaços foi enrolado sem grande aperto com linhas comuns para tentar obrigar as macroalgas a crescerem numa forma esférica, um destes pedaços não se enrolou para verificar se o seu crescimento pode ser sob a forma de tapete pois na natureza estas macroalgas podem ser encontradas na forma de tapetes ou com forma esférica, em zonas em que as correntes as arrastam e as quebram e moldam. Estas últimas despertam mais interesse mas é puramente estética.

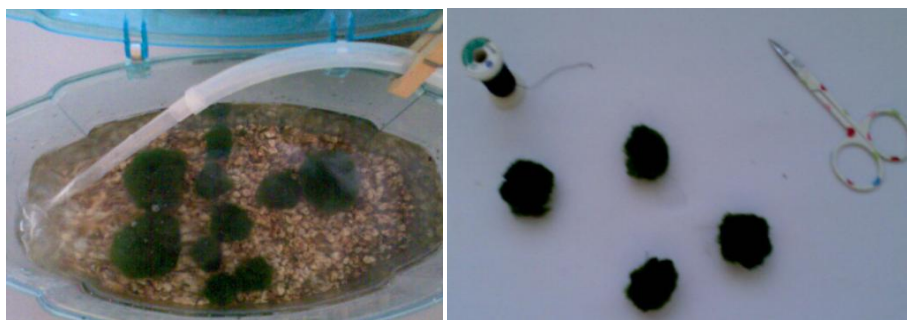


Figura 3.7 – Ensaio de reprodução das macroalgas.

Fizeram-se pesagens regulares das quatro macroalgas que foram transferidas para o substrato A e observou-se que estas apresentam um aumento de peso gradual mas muito lento o que pode ser um problema para a sua exploração à escala industrial. O substrato A consiste em argila expandida, retirada de zonas húmidas construídas em funcionamento nas instalações da ESTT. Na tabela 3.4 indica-se a evolução ao longo do tempo do peso das quatro macroalgas.

Tabela 3.4 - Variação do peso das macroalgas no meio A.

Peso (g)	1º dia	21º dia	42º dia	65º dia	95º dia
Macroalga ₁	8,84	9,20	9,11	9,37	9,59
Macroalga ₂	10,38	10,20	10,34	10,10	10,24
Macroalga ₃	10,55	10,51	10,60	10,73	10,81
Macroalga ₄	11,27	11,41	11,36	11,43	11,56
Média	10,26	10,33	10,35	10,41	10,55

Fizeram-se seis medições ao pH, a amostras colhidas no substrato A e no substrato S, com início no dia 07-05-2012 e a última medição foi no dia 26-09-2012 representadas na Figura 3.8. Verificou-se alcalinização do meio de cultura o que é indicador que as macroalgas estão a assimilar o dióxido de carbono dissolvido no meio aquoso e logo a realizar fotossíntese.

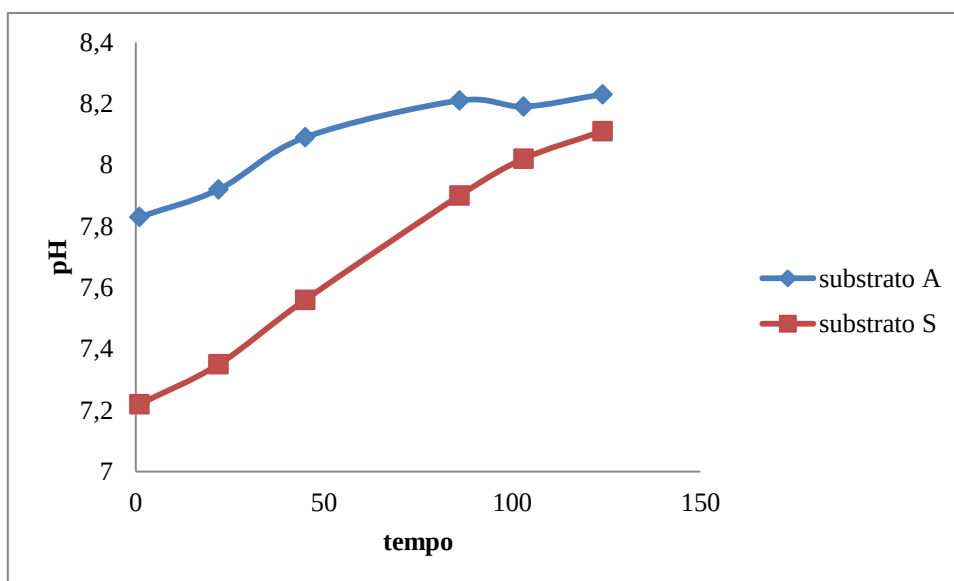


Figura 3.8 - Variação do valor do pH em função do tempo.

3.2.2 Estimativa do consumo de nutrientes pela macroalga

O crescimento das macroalgas no substrato A foi acompanhado por ensaios em branco, com o mesmo período de tempo. Nos ensaios em branco, avaliou-se a libertação dos nutrientes (compostos de azoto e de fósforo) pela argila para a água. Durante o crescimento das algas, é expectável que os nutrientes necessários sejam obtidos da argila, pelo que pelos ensaios em branco se tentou avaliar a disponibilidade destes nutrientes, e por comparação, tentar avaliar o consumo pelas algas.

De trabalhos anteriores conhece-se que a argila adsorve os compostos de fósforo, por processos físico-químicos, mas não interage de forma significativa com os compostos de azoto [39]. Assim, no caso dos compostos de azoto a avaliação do consumo é mais simples, por comparação directa com os ensaios em branco. Mas, no caso dos compostos de fósforo, é necessário ter em conta o equilíbrio entre a fase líquida e a fase sólida.

Admitindo que a libertação dos compostos de fósforo pela argila segue a mesma isotérmica de adsorção, obtida em estudos anteriores e dada pela equação (1) [39],

tentou-se estimar a quantidade de compostos de fósforo existentes na argila, a partir da análise da concentração na fase líquida e procedendo a um balanço de massa.

$$W\left(\frac{\text{mgP}}{\text{g}}\right) = W_{\text{max}} \frac{k \times C_{\text{eq}}}{1 + k \times C_{\text{eq}}} \quad (1)$$

Dados: $W_{\text{max}} = 0,669512 \text{ mgP/g}$

e $k = 0,00511$

Em que:

C_{eq} = concentração de equilíbrio de fósforo na solução (mg/L);

W = quantidade de fósforo adsorvido (mg/g_{sólido});

K = constante que descreve a afinidade entre o fósforo e o sólido (L/mg);

Constante W_{max} = adsorção máxima.

Na Figura 3.9 representa-se de forma esquemática os resultados obtidos após os primeiros 14 dias de crescimento das algas no substrato A, e os resultados obtidos no ensaio em branco. No caso do sistema com as algas, a concentração de compostos de fósforo obtida por análise é de 2,67 mg/L. Por aplicação da equação (1), a concentração na fase sólida é estimada como sendo de $9,01 \times 10^{-3} \text{ mg/g}$. Tendo em conta que o volume da fase líquida é de 2 L e a massa de argila é de 1000 g, os valores anteriores permitem calcular que existe 5,34 mg de fósforo na fase líquida (P_{liq}), e 9,01 mg de fósforo no substrato (P_{sol}).

Na mesma figura indicam-se os resultados obtidos no ensaio em branco efectuado em paralelo, em que a quantidade de argila é de 25 g, e de água de 250 mL. Neste caso verifica-se que a quantidade de fósforo no global (soma da fase líquida com a sólida), é de 0,79 mg.

Com estes resultados é possível estimar o consumo aparente de fósforo pelas quatro macroalgas. A partir do ensaio em branco, e considerando a razão entre a massa de argila de 1000:25, ou seja, quarenta vezes superior no tanque das algas, calcula-se a quantidade de fósforo que deveria existir no tanque das macroalgas:

$$P_{\text{global}} = 0,79 \text{ mg} \times 40 = 31,6 \text{ mg}$$

A diferença entre este valor e o estimado pela análise permite obter o consumo aparente:

$$\text{Consumo} = 31,6 - 14,35 \text{ mg} = 17,25 \text{ mg}$$

Considerando apenas a composição na fase líquida, o valor do consumo é obtido por:

$$\text{Consumo} = 0,59 \text{ mg} \times 40 - 5,34 \text{ mg} = 18,26 \text{ mg}$$

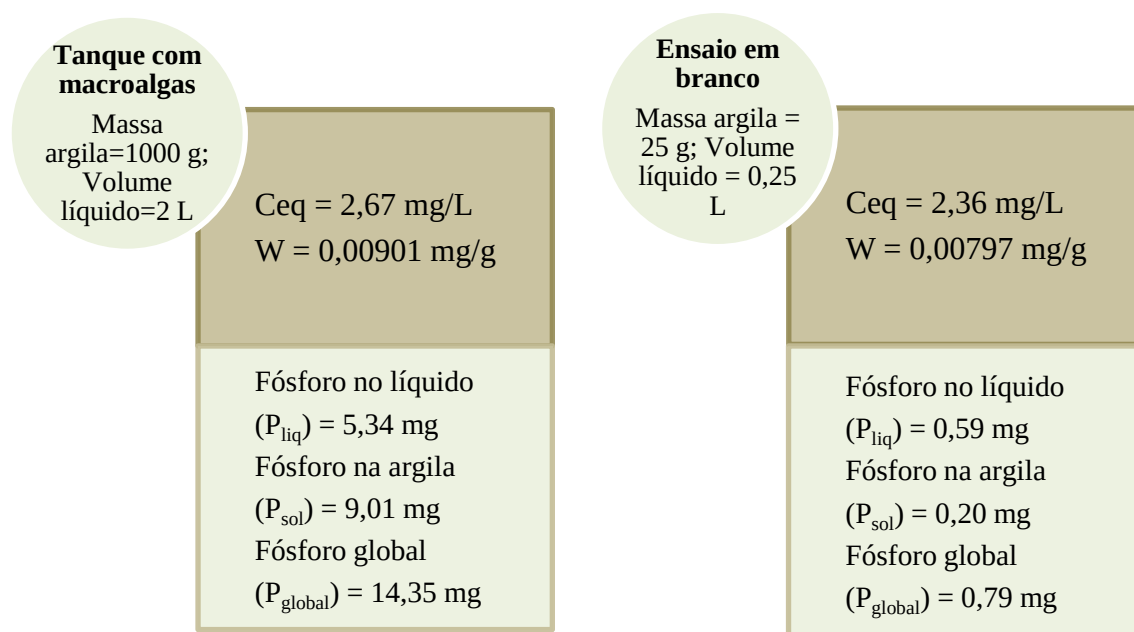


Figura 3.9 – Distribuição mássica do fósforo entre as fases líquida e sólida após 14 dias de contacto.

Os valores de consumo estimados pelas duas alternativas, são suficientemente semelhantes, o que permite optar por se calcular apenas o consumo em função da análise da fase líquida, não se estando dependente da utilização da isotérmica.

Após os primeiros 14 dias de crescimento, procedeu-se à substituição da fase líquida por água destilada, tanto no tanque das algas como no balão com a argila usada para o ensaio em branco. Passados 15 dias, voltou a analisar-se o teor de fósforo na fase líquida, cujos resultados se indicam na Figura 3.10, em tudo semelhante à Figura 3.9. Fazendo os mesmos cálculos já descritos, o consumo aparente neste período é de 9,91 mg de fósforo, ao se usar a isotérmica, ou de 10,6 mg caso se considera a composição apenas da fase líquida.

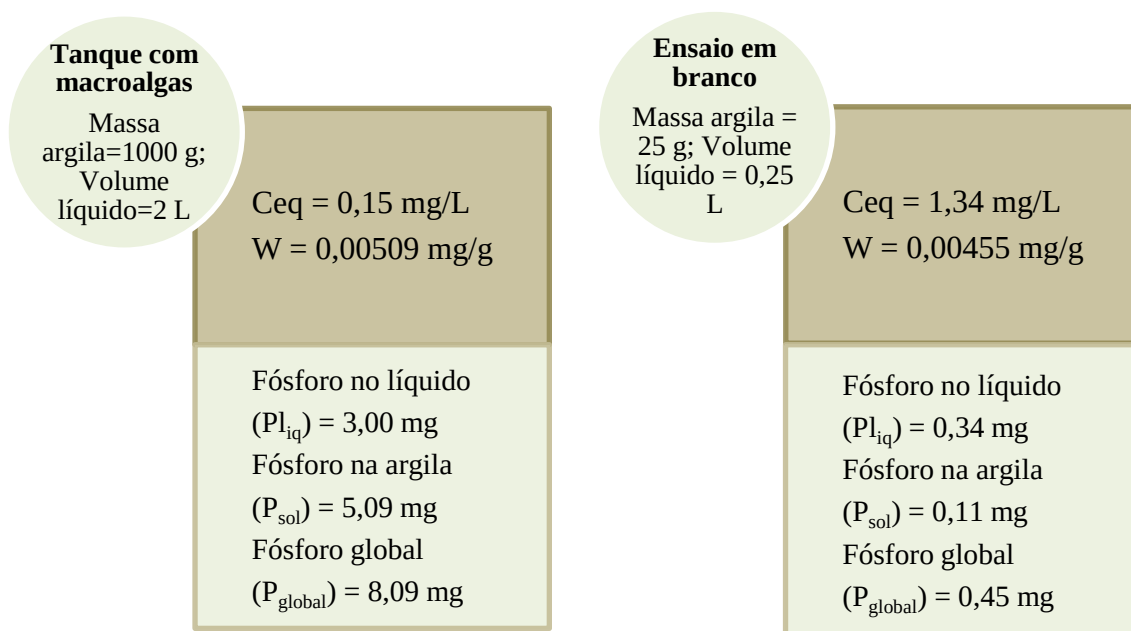


Figura 3.10 - Distribuição mássica do fósforo entre as fases líquida e sólida após mais 15 dias (em que se retirou todo o líquido mas manteve-se a mesma argila).

Novamente os valores obtidos são bastante aproximados, o que confirma que se pode optar por calcular o consumo apenas em função do fósforo na fase líquida e desprezar a contribuição do fósforo no sólido obtidos pela isotérmica de Langmuir.

Após este período de tempo verifica-se que ainda existe fósforo na solução o que assegura as necessidades deste nutriente das macroalgas.

Nos dois períodos descritos, também se procedeu à determinação do teor de azoto no meio líquido, tanto no tanque como no balão que corresponde ao ensaio em branco. Os resultados estão indicados nas Figuras 3.11 e 3.12.

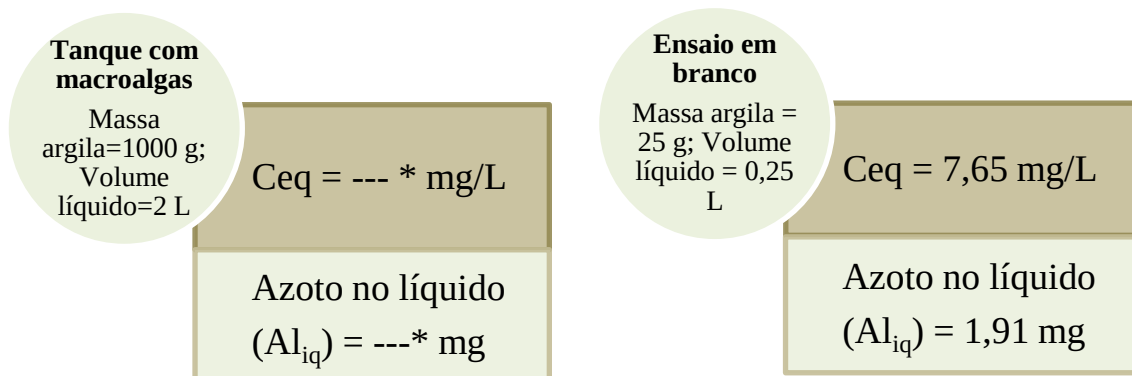


Figura 3.11 - Quantidade de azoto na fase líquida após 14 dias de contacto.

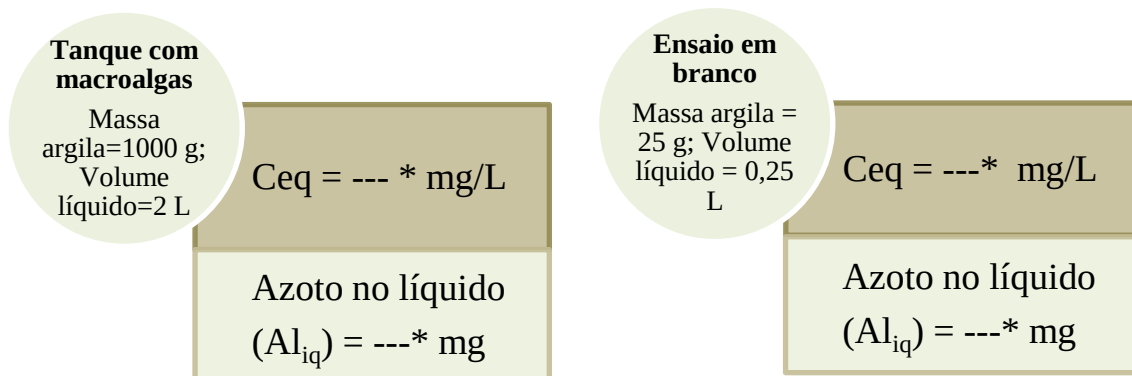


Figura 3.12 – Quantidade de azoto na fase líquida após mais 15 dias (em que se retirou todo o líquido mas manteve-se a mesma argila).

*Nas análises efectuadas ao conteúdo do tanque com as macroalgas, tanto no primeiro período de tempo como no segundo, bem como no caso da fase líquida referente ao segundo ensaio em branco, não foi possível determinar o teor de azoto, visto que se

verificaram valores inferiores ao limiar do método de análise. Apenas se pode inferir que a concentração em Azoto Total é inferior a 5,7 mg/L, que corresponde ao valor mínimo da curva de calibração usada.

Ao se admitir que os valores de teor de azoto indicados nas figuras com “--- *” são nulos, o consumo estimado no primeiro período de 14 dias é de 76,4 mg ($1,91 \text{ mg} \times 40$).

Considerando que para um crescimento óptimo a razão entre fósforo e azoto será de 1:10 [33] então neste sistema verifica-se que o azoto é o factor limitante ao crescimento. Em estudos futuros, dever-se-á estudar a melhor solução para corrigir esta assimetria.

3.3 Estudos efectuados com as microalgas *Spirogyra sp.* e *Anabaena sp.*

3.3.1 Caracterização das microalgas

No dia seguinte à recepção dos inóculos realizaram-se observações ao microscópio em que se verificou não existirem contaminações, Figura 3.13.

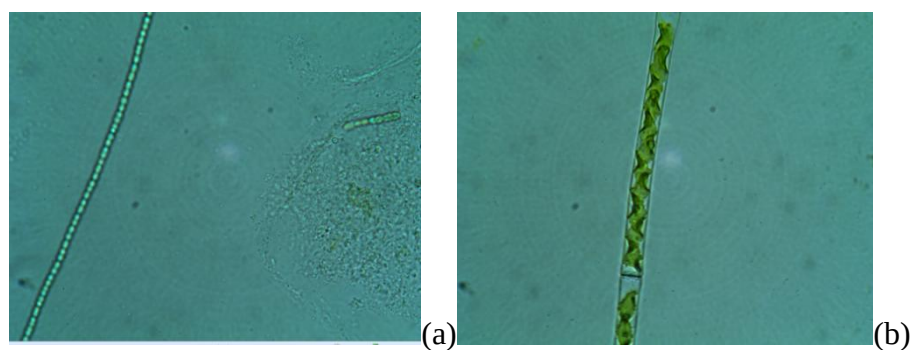


Figura 3.13 - Observação ao microscópio, numa ampliação x400, das espécies:

(a) *Anabaenas*p; (b) *Spirogyras*p.

A caracterização das microalgas foi feita no microscópio usando uma escala específica para cada ampliação em que a correspondência é:

- 26 pixel (em média) corresponde a $10\mu\text{m}$ na ampliação 100x;
- 104 pixel (em média) corresponde a $10\mu\text{m}$ na ampliação 400x;
- 254 pixel (em média) corresponde a $10\mu\text{m}$ na ampliação 1000x.

Ao caracterizar a microalga *Anabaenasp.* verificou-se que, em média, o eixo maior do heterocisto mede $6,55\mu\text{m}$ e o eixo menor $5,66\mu\text{m}$. O comprimento total de cada filamento ronda os $190,5\mu\text{m}$ e o comprimento de cada célula é em média $3,6\pm 0,4\mu\text{m}$ e o seu diâmetro é $3,7\pm 0,4\mu\text{m}$.

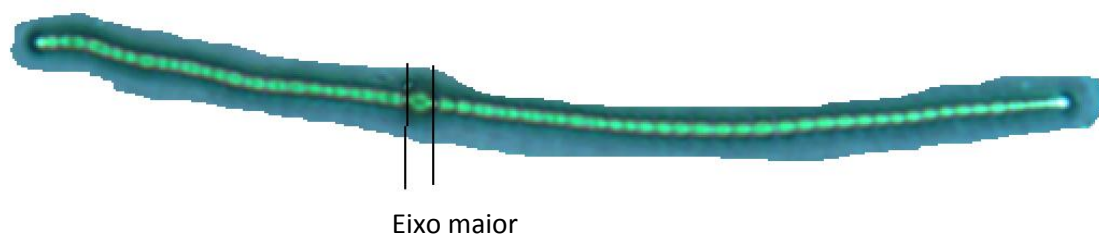


Figura 3.14 – Observação ao microscópio, numa ampliação 400x, da espécie *Anabaena sp.*.

Durante as observações ao microscópio para a caracterização da *Spirogyra sp.* verificou-se que estes filamentos eram demasiado longos e emaranhados para se determinar correctamente o seu comprimento pelo que se caracterizou apenas o comprimento médio de cada septo e do seu diâmetro.

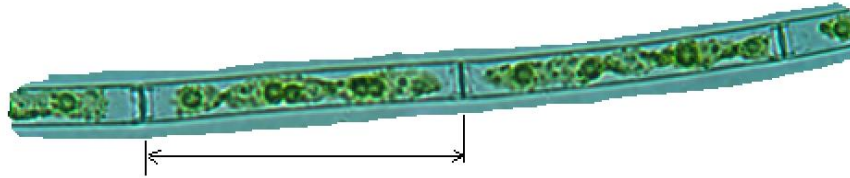


Figura 3.15 – Observação ao microscópio, numa ampliação 400x, da espécie *Spirogyra sp.*.

Para o comprimento de cada septo verificou-se em média $127 \pm 13 \mu\text{m}$ para uma ampliação de 100x e $108 \pm 12 \mu\text{m}$ para uma ampliação de 400x. O diâmetro médio é de $18 \pm 2 \mu\text{m}$ para uma ampliação de 100x e para a ampliação de 400x os valores obtidos foram $12,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$.

3.3.2 Rectas de calibração para acompanhar o crescimento pelo método espectrofotométrico

O objectivo destes ensaios foi: estabelecer a curva de calibração, com base no método espectrofotométrico, de forma a relacionar a absorvância com o peso seco da biomassa algal. Após o crescimento da biomassa foi feita uma decantação, preparados padrões procedendo-se de seguida à medição da sua absorvância e determinação do respectivo peso seco, de acordo com o explicado no capítulo de materiais e métodos.

Nas Figuras 3.16 e 3.17 apresentam-se as rectas de calibração obtidas para a *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.* respectivamente e na tabela 4.5 os parâmetros das linearizações.

As rectas de calibração deveriam contemplar valores de absorvância superiores aos ensaiados, no entanto por simples decantação não foi possível obter valores de concentração mais elevados.

No caso da microalga *Spirogyra sp.* o coeficiente de correlação obtido é bastante baixo o que pode ser explicado pelo facto desta microalga formar colónias muito longas originando filamentos difíceis de quebrar por agitação, o que dificulta grandemente a aplicação do método espectrofotométrico, bem como a recolha de amostras homogéneas.

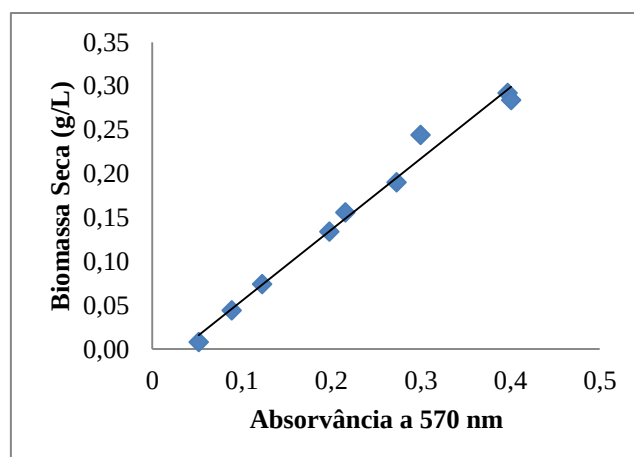


Figura 3.16 - Recta de calibração para a *Anabaenasp.*.

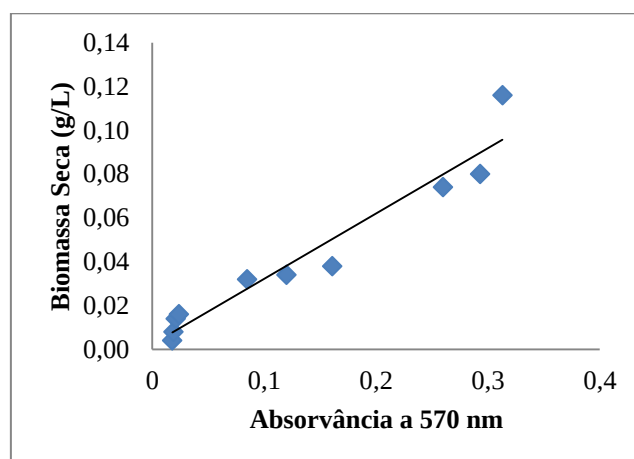


Figura 3.17 – Recta de calibração para a *Siprogyra sp.*.

Tabela 3.5 - Parâmetros das rectas de calibração para as microalgas *Anabaena sp.* e *Siprogyra sp.*.

	Declive da Recta	Ordenada na Origem	r^2
<i>Anabaenasp.</i>	0,811	-0,0262	0,987
<i>Spirogyrasp.</i>	0,298	0,0024	0,933

3.3.3 Estudos de crescimento

Os ensaios de crescimento das microalgas foram realizados em balões de Erlenmeyer tapados com rolhas de gaze e com uma pipeta incorporada para promover o arejamento.

O objectivo destes ensaios foi avaliar o crescimento em meios com diferente composição

Conforme descrito na secção 2, foram utilizados os seguintes meios de crescimento:

- O meio de nutrientes indicado para a manutenção da microalgas (M7);
- O mesmo meio, mas com concentração dos seus constituintes quatro vezes superior (M7-4X);
- O meio NPK, que consiste na diluição de um adubo líquido composto;
- O meio A, que resultou da lixiviação da argila expandida.

Visto que não se conhecia a composição do meio A, procedeu-se a ensaios para determinar o teor de fósforo e de azoto neste meio. Para o efeito, simulou-se o equilíbrio entre os nutrientes na fase sólida e na fase líquida, deixando 25g do sólido em 250mL de água destilada em agitação lenta no agitador orbital durante os períodos de 24 h e 48 h. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Determinação em mg/L dos teores libertados, em equilíbrio, no meio A.

	24 h	48 h
Fósforo total (mg/L)	1,67	1,99
Azoto total (mg/L)	8,45	7,25
Fosfatos (mg/L)	3,20	3,53
Nitratos (mg/L)	5,18	5,75

Por observação dos resultados optou-se por considerar que o equilíbrio se atingiu ao fim de 48 horas, considerando-se como aproximação razoável os valores de 2 mg/L para a concentração em fósforo total e 8 mg/L para a concentração em azoto total. Considerando que para um crescimento óptimo a razão entre fósforo e azoto será de 1:10 [33] então neste meio o azoto vai ser o factor limitante.

Na Figura 3.18 apresentam-se as curvas de crescimento obtidas para a *Anabaena sp.* O meio que permitiu a obtenção da taxa específica de crescimento mais elevada foi o M7, tendo-se registado uma maior concentração final de biomassa para o meio M7-4x. No entanto estes valores não são substancialmente superiores aos meio M7 simples. De

realçar que apesar no meio A conduzir a valores ligeiramente inferiores aos dos meios M7-4x (máximo de concentração obtido foi de 0,21 g/L correspondente ao 49º dia para M7-4x e de 0,17 g/L correspondente ao 46º dia para o meio A) trata-se do aproveitamento de um subproduto o que constitui uma grande mais valia.

O meio NPK foi o que conduziu a piores resultados tendo-se obtido apenas 0,031 g/L de biomassa, registou-se ainda uma morte prematura neste meio, mesmo após vários ensaios com correcção do pH.

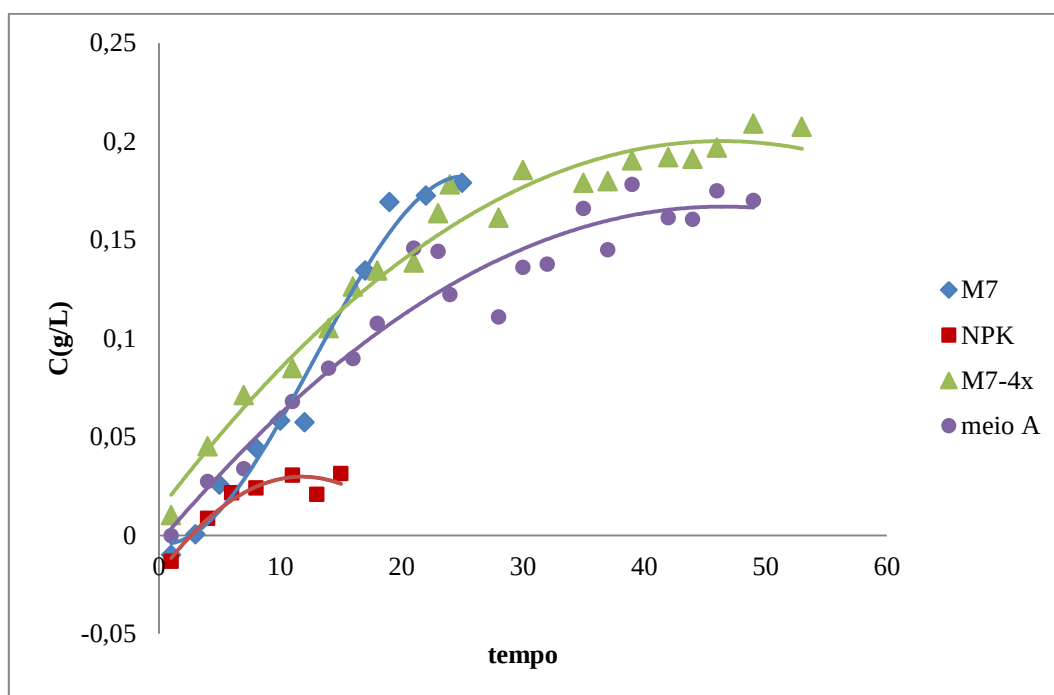


Figura 3.18 - Crescimento da *Anabaenasp.* em diferentes meios de cultura. (M7 (◆), fertilizante comercial NPK 6-3-6 (■), meio M7 4x mais concentrado (▲), meio aquoso proveniente da desabsorção da argila expandida (●)).

Na Tabela 3.7 apresentam-se os resultados da taxa específica de crescimento (μ) e do tempo de duplicação (t_d) para as várias condições. O termo de duplicação ou geração é usado como medida de tempo que leva a população a duplicar. A taxa específica de crescimento relaciona-se com o tempo médio de duplicação através da equação:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (2)$$

O valor de μ depende da estirpe e é fortemente influenciado pelas condições do meio de cultura sendo tanto maior quanto mais favoráveis elas forem para a actividade celular [26].

Tabela 3.7 - Taxa específica de crescimento da *Anabaena sp.*

Meio de crescimento	Período correspondente à fase exponencial (1º dia – último dia)	Taxa específica de crescimento (d^{-1})	Tempo de duplicação (d)
M7	1 - 17	0,130	5,3
M7-4x	1 - 23	0,062	11,2
Meio A	4 - 21	0,099	7,0

Na Figura 3.19 apresenta-se a evolução do pH nos vários meios de crescimento ao longo do tempo de crescimento, em todos os casos à a registar um aumento do pH durante a fase de crescimento. No caso do meio NPK, foi efectuado controlo do pH após se ter verificado em ensaios anteriores caso do meio NPK, foi efectuado controlo do pH após se ter verificado em ensaios anteriores morte prematura associada a valores muito elevados de pH. Contudo, como já foi anteriormente referido, não se conseguiu obter concentrações superiores.

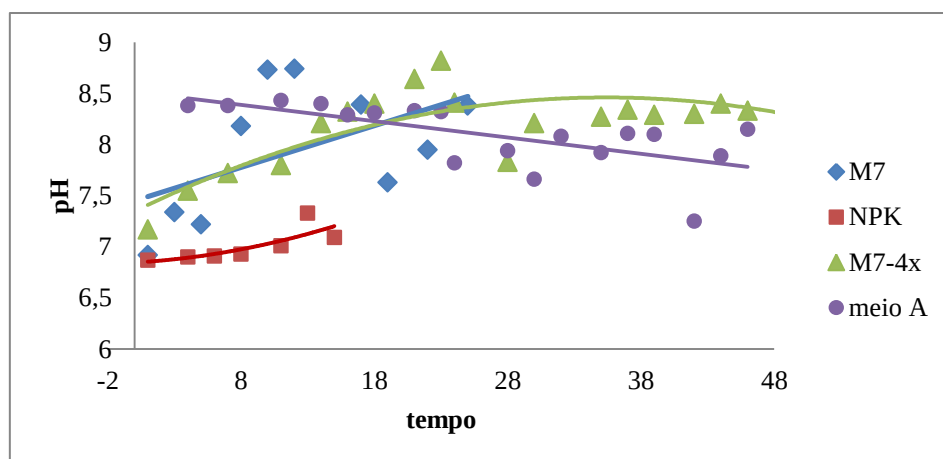


Figura 3.19 - Evolução do pH nos diferentes meios de cultura da *Anabaena sp.*

A alcalinização do meio de cultura ocorre em várias algas, e está relacionado com a dissociação do dióxido de carbono na água e sua assimilação pelo microrganismo. Quando o dióxido de carbono atmosférico se solubiliza em água, origina bicarbonato, que se dissocia em carbonato. O carbonato por sua vez é convertido a dióxido de carbono pela microalga durante a fase escura, ocorrendo a liberação de um íon hidróxido. As algas, que realizam fotossíntese, são capazes de utilizar a energia fotossintética para forçar a bomba de dióxido de carbono (caso esta exista, neste trabalho a adição de CO_2 foi feita apenas incorporado no arejamento de ar comprimido) a produzir mais íons hidróxido, o que facilita a solubilização e aumento da concentração deste gás no meio de cultura, tornando a fotossíntese mais eficiente. Quando os microrganismos iniciam a fase de morte, a liberação de íons hidróxido diminui e o valor de pH desce, como resultado da dissolução do dióxido de carbono na água [1].

Na Figura 3.20 apresentam-se os resultados obtidos para o crescimento da *Spirogyra sp.* nos meios testados. Em relação ao meio M7 verificou-se que o máximo da concentração de 0,12 g/L correspondente ao 25º dia, em relação ao meio KPK o máximo de concentração foi de 0,02 g/L correspondente ao 15º dia.

Para esta microalga os melhores resultados obtiveram-se com o meio M7, onde se atingiu um máximo de concentração de 0,12 g/l no 25º dia. Os resultados mais fracos foram obtidos com os meios A e NPK onde a concentração máxima atingida foi de cerca de 0,02 g/L.

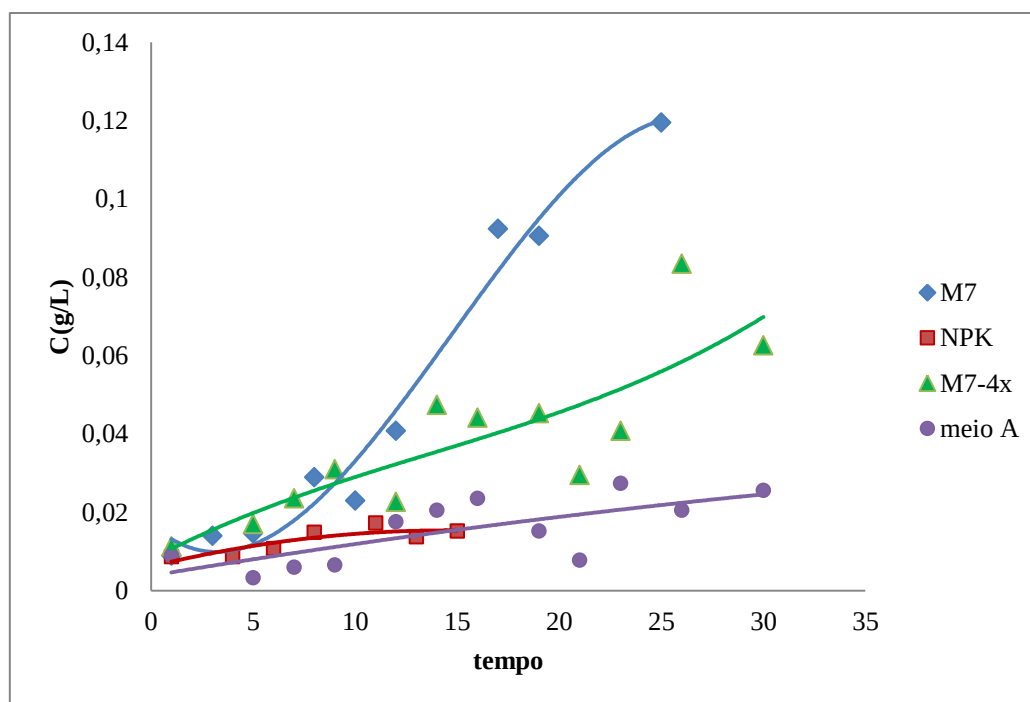


Figura 3.20 - Crescimento da *Spirogyrasp.* em diferentes meios de cultura. (M7 (◆), fertilizante comercial NPK 6-3-6 (■), meio M7 4x mais concentrado (▲), meio aquoso proveniente da desabsorção da argila expandida (●)).

Tabela 3.8 - Taxa específica de crescimento da *Spirogyra sp.*

Meio de crescimento	Período correspondente à fase exponencial (1º dia – último dia)	Taxa específica de crescimento (d^{-1})	Tempo de duplicação (d)
M7	1 - 17	0,137	5,1
M7-4x	1 - 14	0,113	6,1
Meio A	4 - 15	0,186	3,7

Os resultados das medições ao pH mostram a mesma tendência dos ensaios anteriores, ou seja acompanham o crescimento celular, verificando-se os valores mais elevados nos meios em que houve maior crescimento. No caso do meio NPK o comportamento em termos de pH é mais uma vez anômalo.

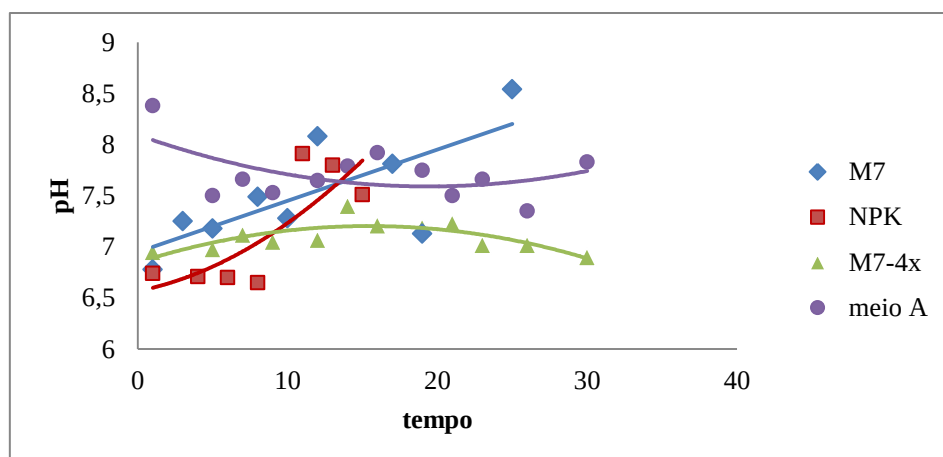


Figura 3.21 - Evolução do pH nos diferentes meios de cultura da *Spirogyra sp.*

4. Conclusões

Neste trabalho estudou-se a viabilidade da utilização de algas como matéria-prima para a produção de bioetanol, avaliou-se o crescimento em diferentes meios e determinou-se os açúcares totais e redutores da macroalga. Para trabalhos futuros seria interessante otimizar os métodos de quantificar os diversos açúcares produzidos pelas algas e realizar a fermentação alcoólica. Sugere-se também enriquecer os meios com injeção de CO₂, estudar os efeitos das variáveis temperatura, intensidade luminosa e concentração de azoto no substrato A (a argila expandida) e no meio A (o lixiviado da argila expandida).

Nos ensaios de crescimento em que se usou o substrato A ou o meio A, deduziu-se que o azoto deve ser um dos factores limitantes ao crescimento das macro e das microalgas. Esta observação resulta de se ter verificado que as concentrações no equilíbrio entre a argila expandida e a fase líquida são de 2 mg/L para a concentração em fósforo total e 8 mg/L para a concentração em azoto total, o que representa uma razão de 1:4. Para um crescimento óptimo a razão entre fósforo e azoto deveria ser de 1:10 [33].

Verificou-se que o teor em açúcares totais, para a macroalga *Cladophora aegagropila*, é de 38,8% dos quais 22,4% são açúcares redutores, o que leva a concluir que esta espécie pode ser adequada para a produção de bioetanol, mas que dependerá da etapa de fermentação. Se o teor de açúcares dá boas perspectivas para o uso desta macroalga, por outro lado, o seu crescimento é lento, o que pode representar um obstáculo para a viabilidade da produção à escala industrial.

Estudou-se a cinética de crescimento das microalgas *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.*, com diferentes meios de crescimento, tendo-se determinado a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação. A concentração máxima obtida foi de 0,21 g/L para a *Anabaena sp.*, quando o meio de crescimento usado é o M7-4x (meio cuja composição é quatro vezes superior à composição do meio de manutenção, M7, recomendado para as microalgas utilizadas). Com o meio A, obteve-se uma concentração máxima de 0,17 g/L. No caso da *Spirogyra sp.*, os melhores resultados foram respectivamente de 0,12 g/L e de 0,08 g/L para o meio M7 e M7-4x. Esta alga cresceu, mas de forma muito

lenta, no meio A, obtendo-se uma concentração máxima de 0,03 g/L. Porém, os resultados do crescimento da *Spirogyra sp.*, no meio A não são conclusivos, e será importante tentar verificar no futuro o efeito de um ensaio de crescimento mais longo.

Não houve tempo para analisar a composição em açúcares nas microalgas. Neste caso, existem dados disponíveis na literatura, mas será interessante proceder a essas análises no futuro.

O trabalho desenvolvido, além de pretender criar uma linha de investigação de produção de algas para a obtenção de bioetanol, tinha como objectivo avaliar a potencialidade de se usar a matriz de enchimento de zonas húmidas construídas como fonte de nutrientes para as algas. Nos laboratórios de Engenharia Química e Ambiente, da Escola Superior de Tecnologia de Tomar, existem várias zonas húmidas construídas à escala piloto. Nestas instalações usam-se diferentes matrizes, que servem para suportar o crescimento de plantas macrófitas, e que podem também participar nos processos de depuração dos efluentes líquidos. Com o tempo, essas matrizes ficam saturadas com os poluentes existentes nos efluentes, em particular compostos de fósforo e de azoto. Comprovou-se que é possível usar directamente essa matriz rica em nutrientes, no caso trata de uma argila expandida, para utilização directa como substrato no crescimento das macroalgas. Ou, após lixiviação com água, no crescimento das microalgas. No caso das macroalgas, não se garantiu que aquele substrato potenciase o crescimento, mas verificou-se que não prejudica a subsistência das macroalgas. No caso do lixiviado, referido como meio A, apesar de conduzir a menores produtividades, não obsta à continuação de testes futuros, visto que existe sempre uma mais-valia pelo facto de evitar-se o gasto de materiais de crescimento das microalgas, e permitir regenerar a matriz.

Bibliografia

- [1] Miranda, J. R. P. C.; “Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmusobliquus*”; Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Energia e Bioenergia; FCT-UNL; Caparica; 2011. Disponível em <http://run.unl.pt/bitstream/10362/5997/1/Miranda_2011.pdf>, consultado a 03-11-2011.
- [2] http://europa.eu/legislation_summaries/energy/external_dimension_enlargement/l27037_pt.htm, consultado a 04-11-2011.
- [3] http://ec.europa.eu/environment/air/pdf/nat_prog/portugal_pt.pdf, consultado a 05-11-2011.
- [4] EurObserv'ER, “BiofuelsBarometer”, Lejournaldesénergiesrenouvelables, N° 204, 69-93, Julho 2011. Disponível em <http://www.eurobserv-er.org/pdf/biofuels_2011.pdf>, consultado a 04-11-2011.
- [5] <http://www.pordata.pt/Portugal/Ambiente+de+Consulta/Gr%c3%a1fico>, consultado a 04-11-2011.
- [6] http://www.portal-energia.com/os-biocombustiveis-em-portugal/_, consultado a 04-11-2011.
- [7] <http://www.greenyber.pt/>, consultado a 03-11-2011.
- [8] <http://dl.dropbox.com/u/20828815/2011%20AEBIOM%20Annual%20Statistical%20Report.pdf>, consultado a 03-11-2011.
- [9] <http://www.ladebio.org.br/download/bioetanol-2a-geracao-de-biomassa-residual.pdf>, consultado a 12-11-2011.
- [10] http://www.inmetro.gov.br/painelsetorial/palestras/especificacaoInternational_JoseFelix.pdf, consultado a 12-11-2011.
- [11] <http://www.sebrae.com.br/setor/agroenergia/o-setor/etanol/materias-primas/>, consultado a 12-11-2011.

-
- [12] <http://knol.google.com/k/francisco-quiumento/biocombust%C3%ADveis/2t1el7k7dcy4s/79#>, consultado a 03-11-2011.
- [13] Paulo, V. P. F.; “Optimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol”; Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar; Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa; Lisboa; 2011. Disponível em <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4100/1/TESE_Vanessa%20Paulo%20vers%C3%A3o%20final.pdf>, consultado a 20-08-2012.
- [14] <http://www.oilgae.com/algae/pro/eth/eth.html> , consultado a 11-04-2012.
- [15] Anónimo, “Introdução à Biologia Vegetal”. Instituto de Física de São Carlos, 2011. Disponível em <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio3/outros/01-Sistem%E1tica.pdf>>, consultado a 19-01-2012.
- [16] <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia/cito30.php>, consultado a 19-01-2012.
- [17] <http://www.ohio.edu/plantbio/vislabs/algaeimage/Cyanobacteria.htm>, consultado a 19-01-2012.
- [18] <http://dc130.4shared.com/doc/U4yzwanf/preview.html> , consultado a 19-01-2012.
- [19] Barbosa, A., T., P.; “Produção de Biohidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. PCC 7120 e mutantes”; Universidade Nova de Lisboa; Monte de Caparica; 2009. Disponível em <<http://www.pluridoc.com/Site/FrontOffice/default.aspx?module=Files/FileDescription&ID=4980&state=FD>> , consultado a 08-12-2011.
- [20] <http://www.ohio.edu/plantbio/vislabs/algaeimage/Chlorophyta.htm>, consultado a 19-01-2012.
- [21] <http://www.uniovi.es/bos/Asignaturas/Botanica/9.htm>, consultado a 19-01-2012.

- [22] http://www.coralcoe.org.au/news_stories/batfish/imagegallery.html, consultado a 11-04-2012.
- [23] Gris, L. R. S.; “Produção da Macroalga *Nannochloropsis oculata* em Fotobiorreator Airlift”; Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Porto Alegre; 2011.
- Disponível em
<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/29403/000776581.pdf?sequence=1>>, consultado a 03-11-2011.
- [24] Marenzi, G., Material didático da disciplina de Maricultura. UNIVALI, (Material digital), 2010. Disponível em <<http://www.renovables-energia.com/2009/05/cultivo-de-microalgas-para-produzir-biocombustiveis/>>, consultado a 08-11-2011.
- [25] <http://pt.scribd.com/doc/48526564/ppt-Os-reinos-da-vida>, consultado a 10-12-2011.
- [26] Ferreira, W. F.C., Sousa, C. F.; “Microbiologia”; Volume 1, Lidel – Edições Técnicas, Lda; ISBN: 978-972-757-024-9; Lisboa, 1998
- [27] <http://www.cienciaviva.pt/rede/oceanos/1desafio/Cianobacterias%20-%20curva%20de%20crescimento.pdf>, consultado a 15-01-2011.
- [28] <http://www.slideshare.net/zelia49/apresentao-de-slide-7-ano>, consultado a 11-04-2011.
- [29] <http://www.prof2000.pt/users/geologia/testes/quiz.htm>, consultado a 11-04-2011.
- [30] <http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/nutricao/nutricao.html>, consultado a 25-11-2011.
- [31] http://www.aquahobby.com/articles/b_nutricao_vegetal.php, consultado a 25-11-2011.
- [32] http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_fosforo.aspx, consultado a 25-11-2011.

-
- [33] Carapeto, C., “Poluição das águas”; Universidade Aberta; Lisboa 1999.
- [34] http://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_nitrogenio.aspx, consultado a 25-11-2011.
- [35] <http://www.tiendanimal.pt/bola-musgo-agua-para-aquarios-p-7498.html>, consultado a 21-11-2011.
- [36] Amano, T., “The Aquarium Plant Handbook”, Oriental Aquarium (S) Pte Ltd, Singapore, 2002.
- [37] http://acoi.ci.uc.pt/spec_detail.php?cult_id=2808, consultado a 11-12-2011.
- [38] http://acoi.ci.uc.pt/spec_detail.php?cult_id=2097, consultado a 11-12-2011.
- [39] Mateus D.M.R., Pinho H.J.O., “Phosphorus Removal by Expanded Clay - Six Years of Pilot-Scale Constructed Wetlands Experience”, Water Environment Research, Volume 82, Number 2, doi:10.2175/106143009X447894, 2010.
- [40] <http://crystalred.eu/produto/1608/sera-floredepot%C2%AE-47-kg>, consultado a 14-12-2011.
- [41] <http://www.agrosiembra.com.ar/Nitrofoska%20Azul%20Especial.htm>, consultado a 17-01-2012.
- [42] http://acoi.ci.uc.pt/medium_composition_info.php?cult_id=2808, consultado a 11-12-2011.
- [43] <http://www.liscampo.com/jardim/KB/ADUBOS-LQUIDOS/ADUBO-UNIVERSAL>, consultado a 17-01-2012.
- [44] <http://ca-en.hagen.com/File/1942b213-6723-484d-9b88-66c9796ca534>, consultado a 17-12-2011.
- [45] Mateus, D., “Sebenta de Engenharia de Bioprocessos”, Instituto Politécnico de Tomar (IPT), 2011.

-
- [46]Greenberg,A.E., Clesceri, L.S. e Eaton, A.d., Ed., “Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 18th. Ed., A.P.H.S., A.W.W.A. e W.E.E., Washington, 1992.
- [47]Sawer, C.N., McCarty, P.L. e Parkin, G.F., “Chemistry for EnvironmentalEngineering”, 4th. Ed., McGraw-Hill, Singapore, 1994.

ANEXO I – REAGENTES QUÍMICOS

Os reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental encontram-se discriminados na Tabela I.1.

Tabela I.1 – Lista dos reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental

Nome	PM	Fórmula	Pureza	Outras características	Marca	Utilização
Ácido 3,5-dinitrossalicílico	228,12	$C_7H_6O_5 \cdot H_2O$	puro	---	Merck	AR
Ácido acético glacial	60,05	$C_2H_4O_2$	---	99,5%	Panreac	Az T
Ácido ascórbico	176,13	$C_8H_8O_6$	p.a	$\geq 99\%$	Fluka	F; FT
Ácido amidossulfónico	97,09	NH_2SO_3H	---	99,5%	Riedel-deHaën	N; AzT
Ácido bórico	61,83	H_3BO_3	p.a.	$>99\%$	Pronalab	N; AzT; CA
Ácido ortofosfórico	98,00	H_3PO_4	---	$d=1,71$	Pronalab	N; AzT
Ácido sulfúrico	98,08	H_2SO_4	p.a.	95% $d=1,84$	Panreac	AT; RC; F; FT; N; AzT
D(+)- Glucose monoidratado	198,17	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Para microbiologia	$\geq 99\%$	Fluka	AT; AR
EDTA	372,24	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	---	98,5%	May&Baker	CA
Fenol	94,11	C_6H_6O	---	99%	Pronalys	AT
Fosfato de amónio	132,06	$(NH_4)_2HPO_4$	---	$\geq 96\%$	Panrerac	CA
Fosfato de sódio monobásico	119,98	H_2NaO_4P	p.a.	$\geq 99\%$	Fluka	F; FT
Hidróxido de sódio	40,00	$NaOH$	---	98,7%	JMGS	AR; FT; AzT
Nitrato de cobalto hexahidratado	237,98	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	---	---	Riedel-deHaën	CA
Nitrato de potássio	101,11	KNO_3	---	99%	Panreac	CA
Nitrato de sódio	84,99	$NaNO_3$	p.a.	99,5%	Sigma-Aldrich	N; AzT
Molibdato de amónio tetrahidratado	1235,86	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	---	$\geq 99\%$	Pronalab	F; FT
Molibdato de sódio	241,95	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	---	99%	May&Baker	CA
Persulfato de amónio	228,20	$(NH_4)_2S_2O_8$	---	$\geq 98\%$	Riedel-deHaën	FT

Continuação da tabela I.1.

Nome	PM	Fórmula	Pureza	Outras características	Marca	Utilização
Persulfato de potássio	270,33	$K_2S_2O_8$	---	98%	Panreac	AzT
Sulfato de cálcio	136,14	CaO_4S	---	---	Fisher Chemical	CA
Sulfato de cobre pentahidratado	249,69	$CuSO_4.5H_2O$	---	$\geq 99\%$	Pronalab	CA
Sulfato de magnésio heptahidratado	246,49	$MgSO_4.7H_2O$	p.a.	99,5%	Pronalab	CA
Sulfato ferroso heptahidratado	278,02	$FeSO_4.7H_2O$	p.a.	>98%	Fluka	CA
Sulfato de manganês hidratado	169,02	$MnSO_4.H_2O$	---	$\geq 99\%$	Riedel-deHaën	CA
Sulfato de zinco heptahidratado	287,54	$ZnSO_4.7H_2O$	---	$\geq 99\%$	Panreac	CA
Solução indicadora de fenolftaleína	318,33	$C_{20}H_{14}O_4$	---	---	Himedia	F; FT
Tartarato duplo de sódio e potássio	282,22	$C_4H_4KNaO_6.4H_2O$	---	$\geq 99\%$	Analar	AR

AR – açúcares redutores
AT – açúcares totais
Az T – azoto total
N – nitratos (NO_3)

CA – crescimento de algas (M7)
RC – ensaios de ruptura celular
FT – fósforo total
F – fosfatos (PO_4)