



Instituto Politécnico de Tomar
Escola Superior de Tecnologia de Tomar

Sofia Isabel Serras Duarte

Estudo da Produção de Microalgas a Partir de Águas Residuais

Relatório de Estágio

Orientado por:

Doutor Henrique Pinho

Doutora Dina Mateus

Mestre Pedro Granchinho

Relatório de Estágio apresentado ao Instituto Politécnico de Tomar
para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Tecnologia Química

Dedico este trabalho ...

Aos meus pais,

Aos meus avós,

Ao meu irmão

Resumo

Este trabalho, desenvolvido no contexto de estágio curricular, com componente de investigação, nos Laboratórios de Engenharia Química e Ambiente do Lab.IPT do Instituto Politécnico de Tomar, teve como principal objectivo a avaliação da produção de microalgas utilizando como meio de crescimento águas residuais. Para atingir esse objectivo 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 crescimento de microalgas em vários meios, incluindo meios sintéticos e águas residuais; e a avaliação da potencialidade de crescimento a diferentes temperaturas.

Foram utilizadas quatro estirpes de microalgas, *Chlorella sp.*, *Chlorella minutíssima* e *Spyrogira sp.*, e a cianobactéria *Anabaena sp.*, tendo-se estudado o seu crescimento em balão. Visto que os crescimentos de *Anabaena sp.* foram o que produziram melhores resultados nos ensaios em balão, escolheu-se esta espécie para os estudos de crescimento em fotobiorreactores. Dos ensaios efetuados a diferentes temperaturas observou-se que os melhores resultados foram obtidos a cerca de 25 °C com uma água residual proveniente de um tratamento por zonas húmidas construídas. Nessas condições obteve-se uma produtividade de 1,096 g/L e um tempo de duplicação de 2,5 dias. Estes resultados permitem concluir a aparente potencialidade de se usarem águas residuais para a produção de microalgas, procedendo-se à sua integração com uma tecnologia mais limpa de tratamento de águas.

Palavras-chave: Microalgas, águas residuais, açúcares, óleos, integração.

Abstract

This work , developed in the context of curricular / research laboratories in Chemical Engineering and Environment , Polytechnic Institute of Tomar, had as main objectives establishing calibration lines that relate the concentration of algal biomass with optical density microalgae growth in fotobiorreator in different media types and different temperatures and determining the calibration curve for total sugars and reducing sugars , in order to be able to compare the productivity with the sugar concentration . In this framework , developed activities predominantly experimental forum under the three headings : the implementation and validation of analytical techniques , such as determining the nutrient concentration in the aqueous phase , the concentration of biomass in terms of dry and content and reducing sugars ; the capability of growing in various media and growth potential at different temperatures.

Of the four strains of microalgae studied, it was chosen to study *Anabaena sp.* more specific, since this best obtained concentration values when studied. Then, it was possible to prove that the best temperature for the growth of microalgae is a temperature $\pm 25^{\circ} \text{C}$ which achieved a productivity of 1,096 g / L and a doubling time of 2,5 day. As for the media used, it is known that the means M7 and BG11 medium are solely for maintenance, while the effluent tank macrophytes with limestone is a good growth medium.

As for the oil content results were not conclusive, while the results for the reducing sugars was higher than the total sugars, since during the hydrolysis of the starch is fully lowered.

Keywords: Microalgae, growth, sugars, oils, effluent and temperatures.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores, Doutor Henrique Pinho, Doutora Dina Mateus e Mestre Pedro Granchinho, pelo acompanhamento, por toda a ajuda prestada e tempo dispensado para a realização deste projecto.

Ao Eng^o Alcino Serras e à Eng^a Isabel Silva por toda a ajuda prestada em tarefas laboratoriais, e sempre que era necessário algo do laboratório.

À D. Conceição Vale por me ter proporcionado sempre material limpo, para a realização das experiências laboratoriais.

Aos meus colegas Elsa Diogo, Luís Colaço, David Heitor, Joana Pinto, Mário Santos e Rafaela Almeida, pela ajuda prestada ao longo do tempo, pela colaboração e partilha de informação.

Não posso deixar de agradecer ao João Braz, Franclim Medina, André Bordalo, Daniel Gomes, Ana Rafaela, por estarem sempre perto em momentos de aflição, em momentos menos bons, e pelo muito que aturaram! Obrigado a todos os amigos colegas que sempre me deram ânimo e vontade para que este trabalho chegasse ao fim.

Por fim, agradeço à minha família, em especial aos meus pais e aos meus avós, que sem o amor, apoio, consideração, respeito, crença em todas as fases da vida, não seria possível chegar até aqui, muito, muito obrigado a todos!

Índice

| | |
|---|--------------|
| Resumo | vii |
| Abstract | ix |
| AGRADECIMENTOS | xi |
| Índice | xiii |
| Índice de imagens | xvii |
| Índice de figuras | xviii |
| Índice de tabelas | xix |
| Índice de gráficos | xxi |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. <i>Enquadramento</i> | 1 |
| 1.2. <i>Descrição do trabalho desenvolvido</i> | 2 |
| 1.3. <i>Revisão Bibliográfica</i> | 4 |
| 1.3.1. Produção de microalgas – História e Aplicações | 9 |
| 1.3.1.1. <i>Anabaena sp.</i> | 10 |
| 1.3.1.2. <i>Spirogyra sp.</i> | 11 |
| 1.3.1.3. <i>Chlorella sp. e Chlorella minutissima</i> | 12 |
| 1.3.2. Reprodução, metabolismo, regime e sistema de cultivo | 15 |
| 1.3.2.1. Crescimento celular | 15 |
| 1.3.2.2. Produção fotoautotrófica | 17 |
| 1.3.2.3. Produção heterotrófica | 18 |
| 1.3.2.4. Produção mixotrófica | 18 |
| 1.3.3. Efluentes e meios de crescimento | 19 |
| 2. Materiais e métodos | 23 |
| 2.1. <i>Materiais</i> | 23 |
| 2.1.1. Microalgas | 23 |

| | | |
|------------|--|----|
| 2.1.2. | Meios de crescimento..... | 24 |
| 2.1.2.1. | Meio M7..... | 24 |
| 2.1.2.2. | Meio BG11..... | 26 |
| 2.1.2.3. | Efluente das Zonas Húmidas Construídas..... | 26 |
| 2.1.2.4. | Água doce..... | 27 |
| 2.1.3. | Preparação do material utilizado no cultivo..... | 27 |
| 2.1.4. | Reactores..... | 28 |
| 2.1.4.1. | Reactor descontínuo de coluna de bolhas..... | 28 |
| 2.1.4.2. | Reactor descontínuo do tipo air – lift..... | 30 |
| 2.2. | <i>Métodos Experimentais</i> | 31 |
| 2.2.1. | Determinação das rectas de calibração..... | 31 |
| 2.2.1.1. | Quantificação da quantificação da biomassa algal..... | 31 |
| 2.2.1.2. | Extração e hidrólise ácida quantitativa..... | 31 |
| 2.2.1.3. | Determinação colorimétrica do teor em açúcares totais..... | 32 |
| 2.2.1.4. | Determinação colorimétrica do teor em açúcares redutores..... | 32 |
| 2.2.2. | Determinação de CQO do efluente do tanque de calcário..... | 33 |
| 2.2.3. | Determinação do azoto total na água pelo método de Kjeldahl..... | 33 |
| 2.2.4. | Determinação e quantificação de óleos nas microalgas..... | 34 |
| 2.2.5. | Determinação do teor em fósforo total..... | 35 |
| 2.2.6. | Determinação do teor em azoto total..... | 36 |
| 2.3. | <i>Elaboração de curvas de crescimento</i> | 36 |
| 2.3.1. | Crescimento em balão de Erlenmeyer..... | 37 |
| 2.3.1.1. | Crescimento em meio M7..... | 37 |
| 2.3.1.1.1. | Primeiro crescimento das microalgas (Produção de biomassa para as rectas de calibração e análise de açúcares)..... | 37 |
| 2.3.1.2. | Crescimento em meio BG11..... | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.3.1.2.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp, Spirogyra sp, Chlorella sp, Chlorella m. | 38 |
| 2.3.1.2.2. | Segundo crescimento Spirogyra sp, Chlorella sp, Chlorella m. | 38 |
| 2.3.1.2.3. | Terceiro crescimento Spirogyra sp, Chlorella sp, Chlorella m. | 39 |
| 2.3.2. | Ensaio em fotobiorreactor | 39 |
| 2.3.2.1. | Crescimento em meio BG11 | 39 |
| 2.3.2.1.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #1) | 39 |
| 2.3.2.2. | Crescimento em efluente do tanque de macrófitas com calcário | 39 |
| 2.3.2.2.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #2) | 39 |
| 2.3.2.2.2. | Segundo crescimento Anabaena sp. (Reactor #3) | 40 |
| 2.3.2.2.3. | Terceiro crescimento Anabaena sp. (Reactor#4) | 40 |
| 2.4. | <i>Determinação dos parâmetros cinéticos</i> | 43 |
| 2.4.1. | Taxa máxima específica de crescimento | 43 |
| 2.4.2. | Tempo de duplicação | 44 |
| 2.4.3. | Taxa de produtividade | 44 |
| 3. | Resultados e discussão | 45 |
| 3.1. | <i>Determinação das rectas de calibração</i> | 45 |
| 3.1.1. | Quantificação da biomassa algal | 45 |
| 3.1.2. | Açúcares totais e redutores | 52 |
| 3.1.2.1. | Açúcares Totais | 52 |
| 3.1.2.2. | Açúcares Redutores | 53 |
| 3.2. | <i>Elaboração de curvas de crescimento</i> | 55 |
| 3.2.1. | Caracterização do efluente da Zona Húmida Construída | 55 |
| 3.2.2. | Crescimento em Balão de Erlenmeyer | 56 |
| 3.2.2.1. | Crescimento em meio M7 | 56 |
| 3.2.2.1.1. | Crescimento em meio M7 Anabaena sp., Spirogyra sp., Chlorella m., Chlorella sp. | 56 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.2.2. | Crescimento em meio BG11 | 59 |
| 3.2.2.2.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp., Spirogyra sp., Chlorella m., Chlorella sp. | 59 |
| 3.2.2.2.2. | Segundo crescimento Spirogyra sp., Chlorella m., Chlorella sp..... | 61 |
| 3.2.2.2.3. | Terceiro crescimento Spirogyra sp., Chlorella m., Chlorella sp. | 63 |
| 3.2.3. | Ensaio em fotobiorreator..... | 66 |
| 3.2.3.1. | Crescimento em meio BG11 | 66 |
| 3.2.3.1.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor#1)..... | 66 |
| 3.2.3.2. | Crescimentos em efluente das Zonas Húmidas Construídas | 68 |
| 3.2.3.2.1. | Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #2)..... | 68 |
| 3.2.3.2.2. | Segundo crescimento Anabaena sp. (Reactor #3)..... | 70 |
| 3.2.3.2.3. | Terceiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #4)..... | 72 |
| 3.3. | <i>Quantificação de óleos nas microalgas</i> | 74 |
| 3.4. | <i>Quantificação de açúcares totais e redutores</i> | 74 |
| 4. | Conclusão | 77 |
| 5. | Bibliografia | 79 |
| 6. | Apêndices | 83 |
| 6.1. | <i>Tabelas informativas</i> | 83 |
| 6.1.1. | Tabelas de reagentes..... | 83 |
| 6.2. | <i>Registo Fotográfico</i> | 85 |

Índice de imagens

| | |
|--|----|
| Imagem 1 - <i>Anabaena sp.</i> , com ampliação de 400x, em microscópio Olympus CH30..... | 10 |
| Imagem 2 - <i>Spirogyra sp.</i> , com ampliação de 100x, em microscópio Olympus CH30..... | 11 |
| Imagem 3 - <i>Chlorella sp.</i> , com ampliação de 1000x, e <i>Chlorella m.</i> , com ampliação 400x, em microscópio Olympus CH30. | 12 |
| Imagem 4 - A) <i>Spirogyra sp.</i> B) <i>Chlorella sp.</i> C) <i>Anabaena sp.</i> D) <i>Chlorella m.</i> , com ampliação 400x, em microscópio Olympus CH30..... | 23 |
| Imagem 5 - Padrões para a recta de calibração da biomassa algal: A) Padrões em balão de fundo plano antes da filtração; B) Padrões em membrana após filtração..... | 31 |
| Imagem 6 - Determinação do Azoto de Kjeldahl | 34 |
| Imagem 7 - Crescimento em Balão de Erlenmeyer em incubadora..... | 37 |
| Imagem 8 - - Decantação de microalgas..... | 85 |
| Imagem 9 - Filtração por vácuo..... | 85 |
| Imagem 10 - Funil de Buchner com meio para filtração. | 85 |
| Imagem 11 - Papeis de filtro após filtração e secagem para realizar a recta de calibração. | 85 |
| Imagem 12 - Fotobiorreactor após inoculação. | 86 |
| Imagem 13 - Crescimento da microalga <i>Anabaena sp.</i> em PDA..... | 86 |
| Imagem 14 - Crescimento da microalga <i>Anabaena sp.</i> em TSA. | 86 |
| Imagem 15 - Crescimento da microalga <i>Anabaena sp.</i> em TSA. | 86 |
| Imagem 16 - Banho de ultra – sons para determinação de óleos..... | 86 |
| Imagem 17 - Adição de ácido, após banho de ultra – sons..... | 86 |
| Imagem 18 - Adição de água, após adição de ácido..... | 87 |
| Imagem 19 -- Balões de fundo redondo com óleos após evaporação de solventes em rota – vapor. | 87 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 - Constituição genérica de uma alga..... | 10 |
| FIGURA 2 - Tipos de conversão de biomassa algal e produto final..... | 15 |
| FIGURA 3 - Representação esquemática da taxa de crescimento das algas em <i>batch</i> (linha preenchida) e a concentração de nutrientes (linha a tracejado). (Mata, et al., 2010) | 16 |
| FIGURA 4 - Vista aérea de uma lagoa do tipo raceway (Chisti, 2007)..... | 20 |
| FIGURA 5 - Lagoa do tipo raceway em utilização (Daganzo, 2012)..... | 20 |
| FIGURA 6 - Fotobiorreactor do tipo tubular | 20 |
| FIGURA 7 - Fotobiorreactor tubular em coluna de bolhas (Colaço, 2012)..... | 29 |
| FIGURA 8 - Fotobiorreactor do tipo air – lift (Adaptado de (Colaço, 2012))..... | 30 |
| FIGURA 9 - Esquema representativo do ensaios realizados em balão de erlenmeyer..... | 41 |
| FIGURA 10 - Esquema representativo do ensaios realizados em fotobiorreactor..... | 42 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - Medidas fiscais e incentivos financeiros a favor da implementação e desenvolvimento de biocombustíveis na europa. (Brennan, et al., 2010; Vilas Boas, et al., 2010)..... | 6 |
| TABELA 2- Produção típica de biocombustíveis por hectare de produção agrícola, por cultura e por região, 2002 (Institute, 2007)..... | 8 |
| TABELA 3 - Composição do meio m7 | 24 |
| TABELA 4 - Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio m7 | 25 |
| TABELA 5 - Composição do meio BG11 | 26 |
| TABELA 6 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da <i>Spirogyra sp.</i> | 46 |
| TABELA 7 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da <i>Anabaena sp.</i> | 48 |
| TABELA 8 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da <i>Chlorella sp.</i> | 49 |
| TABELA 9 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da <i>Chlorella m.</i> | 51 |
| TABELA 10 - Resultados da absorvância para a recta de calibração dos açúcares totais. | 52 |
| TABELA 11 - Resultados da absorvância para a recta de calibração dos açúcares redutores..... | 54 |
| TABELA 12 - Caracterização do efluente da zona húmida construída. | 55 |
| TABELA 13 - Resultados das concentrações para o crescimento das microalgas em balão de erlenmeyer e em meio M7..... | 57 |
| TABELA 14 - Resultados da concentração para determinação do peso seco. | 59 |
| TABELA 15 - Parâmetros cinéticos do primeiro crescimento em meio BG11..... | 59 |
| TABELA 16 - Resultados do ph das microalgas durante o crescimento. | 60 |
| TABELA 17 - Resultados da concentração para determinação do peso seco. | 61 |
| TABELA 18 - Parâmetros cinéticos do segundo crescimento em meio BG11. | 62 |
| TABELA 19 - Resultados do ph das microalgas durante o crescimento. | 62 |
| TABELA 20 - Resultados da concentração para determinação do peso seco. | 60 |
| TABELA 21 - Parâmetros cinéticos para o terceiro crescimento em meio BG11..... | 60 |

| | |
|---|----|
| TABELA 22 - Evolução do pH das microalgas durante o crescimento. | 65 |
| TABELA 23 - resultados da concentração do crescimento em fotobiorreator para a <i>Anabaena sp.</i> | 67 |
| TABELA 24 - Parâmetros cinéticos para o primeiro crescimento em fotobiorreator em meio BG11. | 67 |
| TABELA 25 - Resultados das absorvâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreator, em efluente das ZHC para a <i>Anabaena sp.</i> | 69 |
| TABELA 26 - Parâmetros cinéticos para o primeiro crescimento em efluente das ZHC. | 69 |
| TABELA 27 - Resultados das absorvâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreator, em efluente das ZHC para a <i>Anabaena sp.</i> | 70 |
| TABELA 28 - Parâmetros cinéticos para o segundo crescimento em efluente das ZHC. | 71 |
| TABELA 29 - Resultados das absorvâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreator, em efluente das ZHC para a <i>Anabaena sp.</i> | 72 |
| TABELA 30 - Parâmetros cinéticos para o terceiro crescimento em efluente das ZHC..... | 73 |
| TABELA 31 - Percentagem de óleos presentes na biomassa algal das diferentes microalgas..... | 70 |
| TABELA 32 - Resultados dos açúcares totais nas microalgas..... | 71 |
| TABELA 33 - Resultados dos açúcares redutores nas microalgas. | 71 |
| TABELA 34 - Resultados dos açúcares totais nas microalgas em estudo. | 71 |
| TABELA 35 - Resultados dos açúcares redutores das microalgas em estudo. | 71 |
| TABELA 36 - Tabelas de reagentes utilizados nos procedimentos experimentais. | 83 |

Índice de gráficos

| | |
|---|----|
| GRÁFICO 1 - Recta de calibração para a <i>Spirogyra sp.</i> | 46 |
| GRÁFICO 2 - Recta de calibração para a <i>Anabaena sp.</i> | 48 |
| GRÁFICO 3 - Recta de calibração para a <i>Chlorella sp.</i> | 50 |
| GRÁFICO 4 - Recta de calibração para a <i>Chlorella m.</i> | 51 |
| GRÁFICO 5 - Recta de calibração para os açúcares totais. | 53 |
| GRÁFICO 6 - Recta de calibração para os açúcares redutores. | 50 |
| GRÁFICO 7 - Curva de crescimento das microalgas, para determinação do peso seco. | 58 |
| GRÁFICO 8 - Linearização da concentração em função do tempo. | 59 |
| GRÁFICO 9 - Variação do pH em função do tempo. | 60 |
| GRÁFICO 10 - Linearização da concentração em função do tempo. | 61 |
| GRÁFICO 11 - Variação do pH em função do tempo. | 63 |
| GRÁFICO 12 - Linearização da concentração em função do tempo. | 60 |
| GRÁFICO 13 - Variação do pH em função do tempo. | 66 |
| GRÁFICO 14 - Linearização da concentração para a <i>Anabaena sp</i> em fotobiorreactor. | 67 |
| GRÁFICO 15 - Variação do pH para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor | 68 |
| GRÁFICO 16 - Linearização da concentração para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC. | 69 |
| GRÁFICO 17 - Variação do pH para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC..... | 70 |
| GRÁFICO 18 - Linearização da concentração para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC. | 71 |
| GRÁFICO 19 - Variação do pH para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC..... | 71 |
| GRÁFICO 20 - Linearização da concentração para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC. | 72 |
| GRÁFICO 21 - Variação do pH para a <i>Anabaena sp.</i> Em fotobiorreactor em efluente das ZHC..... | 73 |

1. Introdução

1.1. Enquadramento

Nos dias de hoje, são imensos os estudos sobre a produção de microalgas para a produção de biocombustíveis, sendo muitos desses estudos dedicados à avaliação da captura de CO₂ pelas microalgas e à possível integração no tratamento de águas residuais.

As microalgas representam vastas potencialidades, desde a simples produção de biomassa, por exemplo para a produção de rações, à obtenção de substâncias de elevado valor comercial, e ainda de matérias-primas para a produção de biocombustíveis, podendo neste campo resolver dois dos aspectos negativos da indústria dos biocombustíveis – a utilização de culturas de alimentação humana ou animal, e a ocupação de solos aráveis pelas culturas energéticas.

A escolha adequada da espécie de microalga envolve diversas questões, tais como a velocidade de crescimento, e a sua composição química. Muitas dessas variáveis podem ser influenciadas por vários factores, tais como o meio de cultura utilizado, a idade do cultivo, a intensidade luminosa, a temperatura, a salinidade e o fotoperíodo. (Campos, et al., 2010)

Nos laboratórios de Química e Ambiente do Lab.IPT, do Instituto Politécnico de Tomar, têm sido desenvolvidos estudos para avaliar o potencial da biomassa algal, para quatro espécies diferentes de microalgas, tanto com o intuito de levar a uma produção em grande escala para a produção de bioetanol, *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.*, bem como para a mitigação do CO₂ e posterior produção de biodiesel, *Chlorella sp.* e *Chlorella minutissima* (Colaço, 2012; Diogo, 2012).

Os resultados verificados nestes estudos mostram que a concentração máxima obtida para a *Anabaena sp.* foi de 0,2 g/L, quando utilizado o meio líquido obtido por lixiviação da argila expandida depois da sua utilização no tratamento de águas pelas Zonas Húmidas Construídas piloto existentes no Lab.IPT, levando no entanto a taxas específicas de crescimento inferiores às obtidas com meios sintéticos (Diogo, 2012).

Em condições semelhantes, verificou-se que a *Chlorella sp.* atingiu uma concentração máxima de 343 mg/L, correspondendo-lhe uma produtividade máxima de 0,031 g/(L.dia) e uma remoção de carbono de 0,8 g para 1,4 L (volume de alimentação do fotobiorreactor) (Colaço, 2012).

Nesse contexto, o objetivo do estágio consistiu na tentativa de otimização da produção da biomassa algal, a validação de técnicas analíticas, o estudo da potencialidade de utilização de efluentes ricos em nutrientes obtidos através do enchimento de Zonas Húmidas Construídas, como meio de crescimento, e por fim a tentativa de otimização do crescimento das microalgas.

O Relatório de estágio encontra-se organizado em seis capítulos. O primeiro capítulo corresponde a um enquadramento e justificação do estudo realizado e à descrição geral da tese escrita. Apresenta-se uma breve revisão bibliográfica onde se aborda a caracterização das quatro espécies de microalgas, bem como alguns meios de crescimento, o uso de efluentes para o seu crescimento, as suas vantagens e desvantagens. É também feita uma pequena abordagem às microalgas no geral como matéria – prima para a produção de biocombustíveis.

No capítulo dois encontram-se referidos os materiais e métodos utilizados para o crescimento e manutenção das microalgas, na avaliação dos ensaios em *batch* e na quantificação analítica de certos parâmetros, e no capítulo três os resultados obtidos e consequente discussão dos mesmos.

No capítulo quatro, são sintetizadas as principais considerações alcançadas neste estudo, bem como sugestões de trabalhos futuros.

1.2. Descrição do trabalho desenvolvido

Este trabalho surge com o intuito de concluir o Mestrado em Tecnologia Química. Para tal, foi realizado um estágio no Instituto Politécnico de Tomar, nos Laboratórios de Química e Ambiente, Lab.IPT, no período compreendido entre Setembro de dois mil e doze e Julho de dois mil e treze.

No ano transato foram abordados dois temas relativamente à produção de microalgas para a produção de bioetanol e a utilização de microalgas para a mitigação de CO₂ industrial. Como seguimento desses estudos, este estágio / investigação teve os seguintes objectivos:

- ✓ Estabelecimento de rectas de calibração que relacionam a concentração de biomassa algal com a densidade óptica;
- ✓ Crescimento da microalga em fotobiorreactor, em diferentes tipos de meio e diferentes temperaturas;
- ✓ Determinação da recta de calibração para açúcares totais e açúcares redutores, de forma a poder comparar a sua produtividade com a concentração de açúcares.

Inicialmente foram feitos crescimentos em pequena escala de modo a conseguir manter sempre inóculos puros e não contaminados, para desta forma ser possível realizar o crescimento em meio de manutenção, M₇, para posteriormente serem feitas as rectas de calibração para a biomassa algal. Estes inóculos foram feitos para as quatro microalgas *Anabaena sp.*, *Spirogyra sp.*, *Chlorella sp.* e *Chlorella minutissima*.

Estes crescimentos em pequena escala serviram também para fazer as rectas de calibração dos açúcares totais e dos açúcares redutores.

De seguida, foram feitos crescimentos em fotobiorreactores para a microalga *Anabaena sp.*, uma vez que anteriormente já se tinham estudado as microalgas *Chlorella sp.* e *Chlorella m.*. O que levou à escolha da microalga *Anabaena sp.* para ser estudada foi o facto de haver pouca informação sobre esta, e quando foram feitos os crescimentos em pequena escala ter sido a que obteve melhores resultados.

Foram realizados vários ensaios em balão de Erlenmeyer com arejamento, utilizando meio de manutenção M₇, que levaram à selecção da estirpe a usar nos crescimentos em fotobiorreactor. Na literatura foi encontrada a referência a outro meio sintético, meio BG11, o qual obteve bons resultados quando estudado. Foram feitos alguns estudos com o meio BG11 antes de serem feitos ensaios em fotobiorreactores, mas estes não foram conclusivos.

Os crescimentos em fotobiorreactores que se seguiram foram realizados com uma água residual do tipo secundário, após tratamento por uma das Zonas Húmidas Construídas (ZHC) existentes no Lab.IPT, cujas características estão disponíveis na literatura (Mateus, et al., 2012)

A água residual utilizada foi objecto de análises com vista à determinação do teor em azoto e em fósforo, nutrientes dos quais as microalgas se alimentam, e que justifica a lógica de se utilizar essa água como meio de crescimento das algas.

Num estágio da Licenciatura de Engenharia do Ambiente e Biológica, da ESTT, e que decorreu em simultâneo com o presente estágio, estudou-se o tratamento de águas residuais de actividades de aquacultura (Santos, et al., 2013). Num trabalho conjunto com os colegas que realizaram esse estágio procedeu-se à realização de ensaios de crescimento das estirpes *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.* em que se utilizou a água residual efluente de um microcosmos de aquacultura. Estes crescimentos foram realizados com um fotobiorreactor em modo contínuo, e com um reactor descontínuo.

1.3. Revisão Bibliográfica

Em 1970 já era feita pesquisa ao nível das tecnologias de energias renováveis, com o intuito de substituir os combustíveis fósseis que se consideravam esgotáveis a curto prazo. Receava-se que a subida dos preços deste tipo de combustíveis pudesse restringir o crescimento da economia mundial. Duma maneira geral, e ao contrário dos combustíveis fósseis, as energias renováveis estão relacionadas com: poupança nas despesas de importação dos combustíveis; redução do custo de transporte de combustíveis; redução de emissões gasosas poluentes; segurança no abastecimento; redução das emissões de CO₂; sequestro de carbono, entre outras (Barbosa, 2009).

Inicialmente, as microalgas foram analisadas como potencial fonte de substituição dos combustíveis fósseis, na década de 1970, mas os custos de produção proibitivos e limitações desencorajaram o desenvolvimento comercial das algas e a posterior produção de combustíveis. Estudos posteriores durante os anos de 1980 e seguintes, mostram uma

grande evolução, permitindo estudar o potencial comercial das microalgas para a produção de biocombustíveis. (Li, et al., 2008)

No âmbito dos objectivos da União Europeia referentes às alterações climáticas e energias renováveis, conhecidos por “20-20-20”, é necessário os estados membros, até ao ano de 2020, reduzirem em 20% as emissões de gases com efeito de estufa (GEE), tendo por base o ano de 1990, produzirem 20% da sua energia a partir de fontes renováveis e melhorarem a eficiência energética em 20%.

Esta avaliação de impacto ambiental é acompanhada por três políticas fundamentais para o acordo Pacote Energia e Clima:

- a) Uma proposta de directiva relativa à promoção das energias renováveis;
- b) Uma proposta de alteração da directiva relativa ao comércio de emissões de EU revendo esse mesmo sistema;
- c) Uma proposta relativa à partilha de esforços para atender a comunidade independente com o compromisso de redução de GEE em sectores não abrangidos pelo sistema europeu de comércio de emissões. (Europeias, 2008)

Os objectivos “20-20-20” surgiram para dar seguimento às metas resultantes do Protocolo de Quioto, que terminaram em 2012, e constituem uma política estratégica europeia de aposta nas energias renováveis e diminuição das emissões dos GEE. Estes objectivos pretendem combater o aquecimento global e contribuir para uma maior sustentabilidade dos países da EU, em geral e dos processos industriais em particular. (Rosa, 2011)

A utilização de biomassa como fonte alternativa à energia primária de origem fóssil tem sido uma excelente alternativa, uma vez que permite uma melhoria da qualidade de vida, em particular no caso de países sem reservas de combustíveis fósseis, diminuindo assim a dependência económico – energética do exterior e reduzindo os impactos negativos resultantes da sua queima. (Paulo, 2011)

Os biocombustíveis, que se definem como combustíveis obtidos a partir da biomassa, permitem que haja o desenvolvimento de uma diversificação de fontes de abastecimento de combustível, da agricultura tradicional, e um melhoramento das

condições económicas das populações do meio rural e uma possível redução da dependência energética dos combustíveis fósseis. (Mata, et al., 2010)

Assim sendo, os biocombustíveis, tais como o biodiesel e a o bioetanol, podem vir a substituir os combustíveis tradicionais, tal como o diesel e a gasolina, até mesmo nos actuais veículos, em muitos casos sem que seja necessária proceder a alterações significativas nos motores. Existe ainda um outro biocombustível, o bio – hidrogénio, que pode ser utilizado como combustível num motor de combustão interna, sendo este o único biocombustível livre de emissões de carbono, dado que da sua oxidação resultam unicamente moléculas de água. (Paulo, 2011)

Ultimamente, já foram propostas medidas fiscais, e incentivos financeiros que favorecem a implementação e o desenvolvimento dos biocombustíveis e a nível europeu.

Tabela 1 - Medidas fiscais e incentivos financeiros a favor da implementação e desenvolvimento de biocombustíveis na Europa. (Brennan, et al., 2010; Vilas Boas, et al., 2010)

| País | Tipos de Incentivo |
|-----------|---|
| Alemanha | Isenção de taxas no biocombustível ao substituir o combustível fóssil. |
| Áustria | Isenção de taxas a 95% para o diéster puro. |
| Bélgica | Isenção de taxas a 100% para projectos piloto com capacidade inferior a 5000 ton/ano. |
| Espanha | Isenção de taxas em projectos experimentais |
| Finlândia | Incentivação fiscal para gasóleo reformulado e para gasolina reformulada. |
| França | Incentivação fiscal adoptada para os ésteres metílicos de óleos vegetais em mistura com o gasóleo e para a mistura ETBE / gasolina. |
| Grécia | Não tem qualquer tipo de incentivo quer fiscal, quer financeiro. |

| | |
|----------|--|
| Irlanda | Não tem qualquer tipo de incentivo quer fiscal, quer financeiro |
| Itália | Isenção de taxas para uma quantidade máxima de $1,25 \times 10^5$ ton de combustível puro. |
| Holanda | Sem incentivo financeiro, mas com pedido de isenção de taxas para o bioetanol. |
| Portugal | Estão isentos do imposto especial sobre o consumo, os óleos minerais que, comprovadamente, sejam produzidos e consumidos no âmbito de projectos piloto de desenvolvimento tecnológico de produtos menos poluentes, reconhecidos como tal pelos Ministros das Finanças e do Ambiente e do Ordenamento do Território, para serem utilizados como carburante ou como combustível, bem como outros produtos destinados aos mesmos fins e, principalmente, os combustíveis provenientes de fontes renováveis. |

A maior das vantagens a nível ambiental de uso de biocombustíveis é a redução dos Gases com Efeito de Estufa (GEE), que são os responsáveis pelo aquecimento global. Para tal, com a assinatura do Protocolo de Quioto previa-se uma redução global até ao ano de 2012 de uma redução de emissões de 5,2% em relação às emissões de 1990. Portugal, entre 2008 e 2012 tinha o compromisso de limitar as suas emissões em 27%. Até à data, ainda não houve retificação do Protocolo de Quioto para saber quais são as próximas metas a serem atingidas, ou se as estabelecidas previamente foram atingidas.

No aspecto político – económico, a grande vantagem é tornar os países mais independentes dos fornecedores de petróleo, não ficando estes sujeitos às variações de mercado, cujos preços têm subido cada vez mais. (Energia, 2012; Ambiente, 2013)

As diversas matérias – primas utilizadas para a produção de biocombustíveis, podem ser agrupadas em duas categorias, a primeira geração, onde as matérias-primas são escolhidas pelo seu teor em açúcar, amido e óleo e podem ser convertidas em combustíveis

líquidos utilizando a tecnologia convencional, e a próxima geração, onde as matérias primas são a biomassa total, e cujas fibras só podem ser convertidas em biocombustíveis líquidos por processos de tecnologia avançada. Uma variável determinante na escolha da matéria – prima adequada é a quantidade de biocombustível que pode ser produzido por hectare. No geral, os amidos, tais como o milho e grãos de trigo, que são cultivados em regiões temperadas, têm rendimentos mais baixos que os açúcares, como os da cana – de – açúcar, que crescem em áreas mais tropicais. Da mesma maneira, as plantas oleaginosas cultivadas em climas temperados, como a soja e a canola, têm rendimentos mais baixos que em áreas mais tropicais na produção de biocombustíveis convencionais, como se pode ver na tabela seguinte. (Institute, 2007)

Tabela 2- Produção típica de biocombustíveis por hectare de produção agrícola, por cultura e por região, 2002 (Institute, 2007)

| Colheita | Rendimento Típico (litro por hectare de terras cultiváveis) | | | | |
|--------------------|---|------|--------|-------|---------|
| | EUA | EU | Brasil | Índia | Malásia |
| Fonte de etanol | | | | | |
| Açúcar de cana | | | 6500 | 5300 | |
| Beterraba sacarina | | 5500 | | | |
| Milho | 3100 | | | | |
| Trigo | | 2500 | | | |
| Cevada | | 1100 | | | |
| Fonte de biodiesel | | | | | |
| Óleo de palma | | | 5000 | | 6000 |
| Colza | | 1200 | | | |
| Óleo de girassol | | 1000 | | | |
| Soja | 500 | 700 | 400 | | |
| Pinhão | | | | 700 | |

Ao longo da próxima década, variadas fontes de amido, açúcar e oleaginosas poderão fornecer a maior parte das fontes de biomassa utilizadas para a produção de biocombustíveis. Aqueles que forem cultivados em regiões tropicais são mais baratos, e podem deslocar uma parcela maior de petróleo do que os biocombustíveis produzidos com

matérias – primas mais temperadas. Já os países europeus, provavelmente, irão importar biocombustíveis ao invés de tentar um crescimento próprio.

A aplicação de algas tem evoluído no tempo, tendo estas utilização no tratamento de efluentes, são fontes de matéria – prima sustentável com potencial para fins energéticos dependendo do seu tipo e quantidade o que influencia a escolha do processo de conversão.

As algas tem algumas vantagens em relação a outro tipo de matérias – primas utilizadas para a produção de biocombustíveis. Estas têm um crescimento não sazonal, fácil manuseamento por serem cultivadas em meio líquido e possibilidade de crescimento em terrenos impróprios para crescimento de culturas alimentares. Podem também crescer tanto em água doces como em água salgada, mas também em efluentes e águas residuais, reduzindo assim o custo no fornecimento de nutrientes e/ou despoluimento das águas. (Miranda, 2011)

1.3.1. Produção de microalgas – História e Aplicações

Na última metade do século tem sido feita uma grande investigação no campo de produção das microalgas e de que modo estas poderão ser utilizadas em vários processos. Foi apenas na década de 1970 que começou o interesse na utilização de microalgas em energias renováveis, quando se deu a primeira crise petrolífera. (Mata, et al., 2010)

Microalgas são um grupo diverso de microorganismos procariotas e eucariotas fotossintéticos, que crescem rapidamente devido à sua simples estrutura. (Li, et al., 2008) Tanto podem ser autotróficos, se forem fotossintéticos, como heterotróficos, se não o forem. Existem microalgas procariotas (cianobactérias) e eucariotas onde se encontram as espécies de algas mais comuns. (Rosa, 2011)

Do ponto de vista prático as microalgas são fáceis de cultivar e por sua vez de se produzir, uma vez que crescem com pouca ou até mesmo sem nenhuma atenção, utilizando água imprópria para consumo humano e fácil de obter nutrientes. Estas produzem-se fotossinteticamente, durante vários dias em ciclos de luz alternados. Têm taxas de crescimento e de produtividade mais elevadas quando comparadas com a silvicultura,

culturas agrícolas e outras plantas aquáticas, exigindo muito menos terreno que outras matérias – primas.

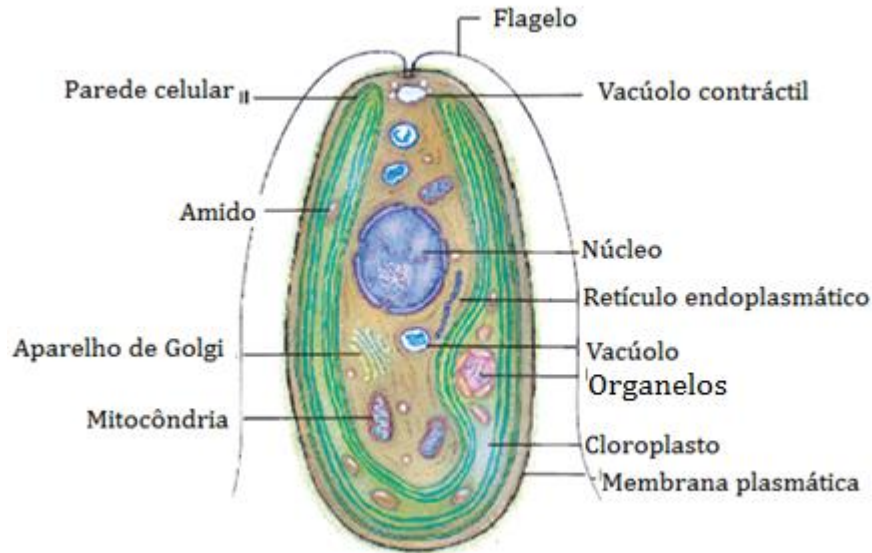


Figura 1 - Constituição genérica de uma alga (Prescott, 2002)

1.3.1.1. *Anabaena sp.*

A *Anabaena sp.*, é uma espécie de alga verde, pertencente ao reino Bacteria, sub – reino Negibacteria, divisão Cyanobacteria, classe *Cyanophyceae*, sub – classe *Nostocophycideae*, ordem *Nostocales*, família *Nostocaceae*, género *Anabaena* e espécie *Anabaena sp.* (Technology, 2013)

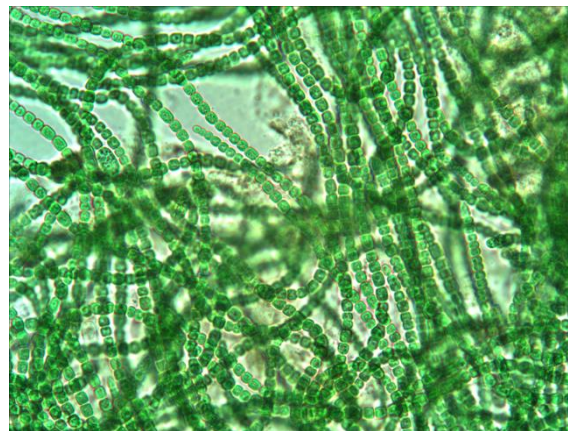


Imagem 1 - *Anabaena sp.*, com ampliação de 400x, em microscópio Olympus CH30.

É uma alga rara em zonas oceânicas com baixas concentrações de nutrientes em específico azoto e fósforo, desenvolvendo-se preferencialmente em águas doces ou salobras, onde existe maior concentração de nutrientes. (Barbosa, 2009)

1.3.1.2. *Spirogyra sp.*

A *spirogyra sp.*, pertencente ao reino Plantae, sub – reino Viridiplantae, divisão Charophyta, classe *Conjugatophyceae*, ordem *Zygnematales*, família *Zygnemataceae*, género *Spirogyra* e espécie *Spirogyra sp.* (Technology, 2013)



Imagem 2 - *Spirogyra sp.*, com ampliação de 100x, em microscópio Olympus CH30.

Esta apresenta dois modos de reprodução distintos. A reprodução assexuada (vegetativa) que ocorre devido à lesão mecânica do filamento ou dissolução da lamela média e esta dá origem a pequenos fragmentos que se transformam em filamentos novos por divisão celular. A reprodução sexuada ocorre por conjugação entre uma célula feminina e uma masculina, e da fusão dos gâmetas resulta um zigósporo que permanece no interior da célula feminina até à sua morte, altura em que é libertado. (Diogo, 2012)

1.3.1.3. *Chlorella sp. e Chlorella minutissima*

As espécies *Chlorella* pertencente ao reino Plantae, divisão chlorophyta, classe *Trebouxiophyceae*, ordem *Chlorellales*, família *Chlorellaceae*, género *Chlorella* e espécie *Chlorella sp. e Chlorella m.* (Technology, 2013)

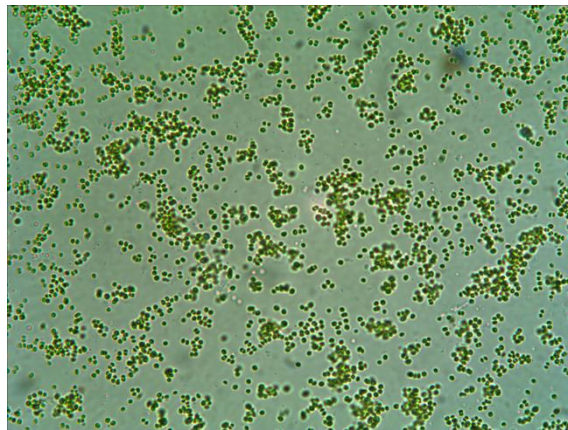
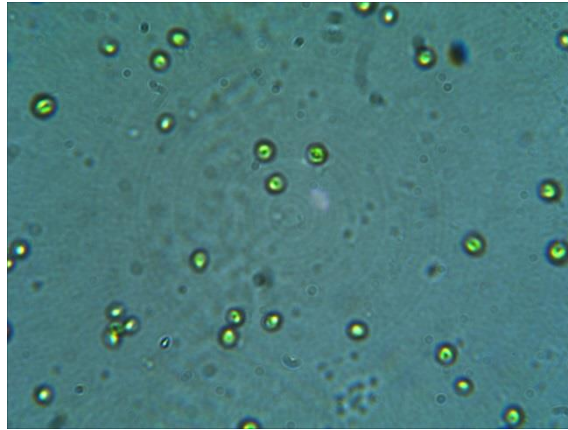


Imagem 3 - *Chlorella sp.*, com ampliação de 1000x, e *Chlorella m.*, com ampliação 400x, em microscópio Olympus CH30.

Estas são unicelulares e de água doce, apresentando forma de vida unicelular ou colonial, e podem acumular pigmentos como clorofila a e b e β – carotenos e xantofilas. A principal fonte de reserva é o amido, porém sob certas condições pode armazenar óleo. A sua reprodução pode ser por divisão binária, esporos assexuais e reprodução sexual. (Colaço, 2012)

As espécies *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.* têm forma filamentosa, enquanto que as espécies *Chlorella sp.* e *Chlorella minutissima* apresentam células individualizadas e

forma esférica. A clorofila a e b são as responsáveis pela coloração verde que estas células possuem.

As microalgas são vistas ultimamente como fonte de combustível renovável. Estas têm potencial de gerar quantidades significativas de biomassa e de óleo, passíveis de serem convertidos em vários tipos de biocombustíveis. Estas têm maior produtividade de biomassa que as culturas terrestres uma vez que necessitam de menor área de cultivo e têm o potencial de reduzir as emissões de gases de efeito de estufa.

A sua produção tem as seguintes vantagens:

- ✓ Elevado rácio de crescimento;
- ✓ Menor necessidade de água que outras culturas vegetais terrestres;
- ✓ Menor ocupação de terrenos;
- ✓ Possibilidade de utilização de terrenos impróprios para agricultura;
- ✓ Utilização de águas residuais urbanas ou industriais como fonte de nutrientes;
- ✓ Custo mais efetivo do cultivo;
- ✓ Possibilidade de obter elevadas concentrações de biomassa e conteúdo oleíco em condições ideais de cultivo;
- ✓ Elevada eficiência de redução de CO₂.

Mas, como tudo, a produção de microalgas também tem as suas desvantagens (Carmo, 2012):

- ✓ Baixa concentração de microalgas na água de cultura;
- ✓ Elevado custo de capital inicial;
- ✓ Adição de nutrientes potencialmente contaminantes;
- ✓ Condições ideais de envolvente muito restritas;
- ✓ Custos de manutenção de equipamentos elevados;
- ✓ Dificuldades de controlo das condições de cultivo quando em larga escala;
- ✓ Elevada utilização de solventes na etapa de extração transesterificação;
- ✓ Elevado dispêndio energético em todas as fases do processamento.

Tal como a matéria – prima derivada das plantas, a matéria – prima das microalgas pode ser utilizada directamente ou transformada em combustíveis líquidos e gasosos por

uma variedade de processos de conversão bioquímica ou termoquímica. A biomassa seca das microalgas pode ser gerada para gerar energia por combustão directa o que no entanto é a alternativa menos atrativa para o uso da biomassa produzida. Também se pode produzir hidrogénio a partir das microalgas por bio fotólise. Os lípidos, mais propriamente triésteres provenientes da combinação do glicerol e do ácido gordo, podem ser separados e isolados das microalgas colhidas e depois convertidas em biodiesel por transesterificação.

A produção de biocombustíveis a partir de microalgas é uma aplicação que ainda não se encontra muito desenvolvida, uma vez que factores económicos e técnicos têm sido alvo de obstáculos. No entanto, existem elevadas potencialidades quer a nível ambiental, quer a nível económico, uma vez que é vantajoso uma vez que se pode substituir fontes não renováveis por fontes renováveis de produção de biocombustíveis ou electricidade.

A nível económico, as vantagens estão relacionadas com o crescimento de uma nova indústria de produção de energia baseada na biorrefinação de substâncias extraídas da biomassa produzida.

A biomassa algal pode ser utilizada em diversas aplicações, devido ao valores nutritivos interessantes que estas têm. Pode constituir um aditivo de ração ou até mesmo ração completa para animais, pode ser comercializada como complementos para alimentação humana, nomeadamente sob a forma de cápsulas. Existem algumas microalgas que produzem compostos de valor acrescentados que podem ser extraídos e têm propriedades interessantes para a indústria farmacéutica ou cosmética. Além destas aplicações, estas podem reduzir a carga ambiental de efluentes de uma unidade industrial, já que estes podem ser utilizados como meio de cultura de microalgas, desde que as suas características químicas e biológicas não ponham em causa o crescimento celular nem a aplicação do produto final.

Se a produção de microalgas for feita de forma sustentável, a biomassa produzida pode constituir uma fonte renovável de geração de energia, sendo que os processos de conversão de energia são os seguintes:

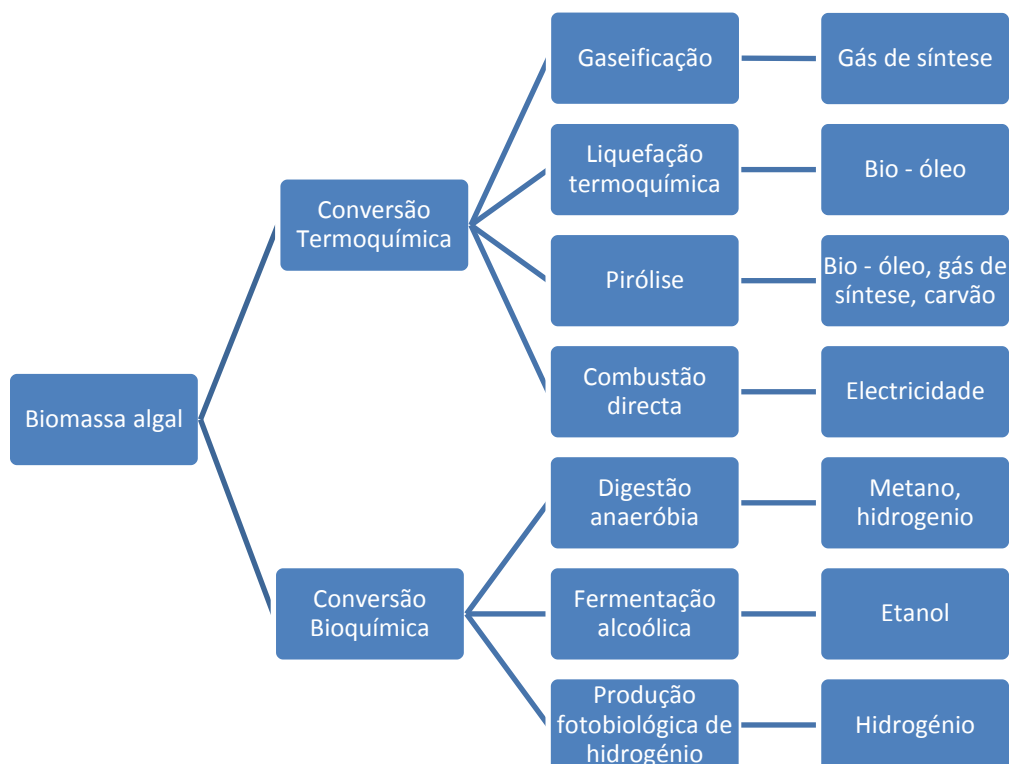


Figura 2 - Tipos de conversão de biomassa algal e produto final

Como se vê, são diversos os produtos que a biomassa algal pode gerar, incluindo diversos biocombustíveis, a geração de energia eléctrica, e a produção de combustíveis mais tradicionais como o gás de síntese (mistura de hidrogénio e dióxido de carbono) e o carvão. (Brennan, et al., 2010)

1.3.2. Reprodução, metabolismo, regime e sistema de cultivo

1.3.2.1. *Crescimento celular*

Quando se constroi uma curva de crescimento, podem ser identificadas seis fases de crescimento principais:

1 – Fase *lag* ou de adaptação, sendo uma fase de intensa actividade celular em que a microalga se adapta ao meio de crescimento, não ocorrendo a divisão celular, e a taxa específica de crescimento é nula;

2 – Fase de aceleração, a qual a taxa de crescimento específico é superior a zero mas inferior à máxima;

3 – Fase de crescimento exponencial, para a qual a taxa específica de crescimento máxima é alcançada;

4 – Fase de desaceleração, onde a taxa de crescimento começa a diminuir;

5 – Fase estacionária, na qual a concentração celular máxima é atingida e a taxa de crescimento específico é continuamente reduzida até se anular.

6 – Fase de morte, na qual há diminuição de células viáveis, e onde poderá ocorrer a lise celular.

A figura seguinte representa a curva de crescimento das algas e a concentração de nutrientes numa cultura em reactor *batch*, onde as seis fases de crescimento estão bem definidas

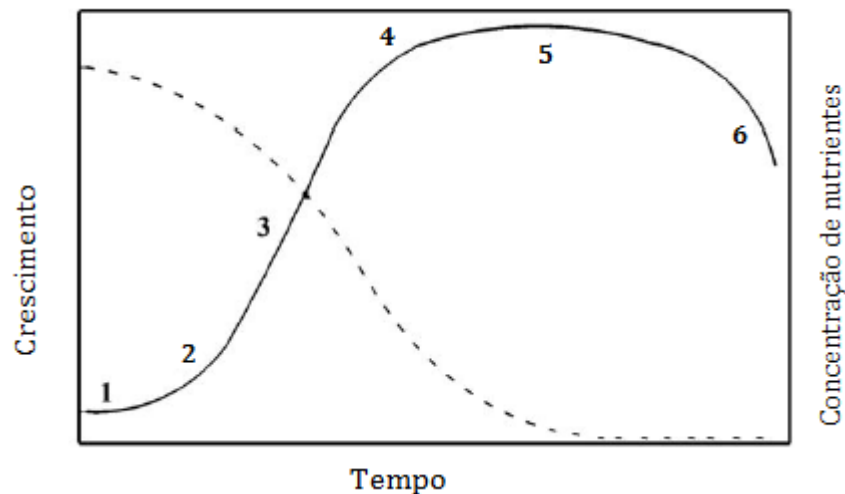


Figura 3 - Representação esquemática da taxa de crescimento das algas em *batch* (linha preenchida) e a concentração de nutrientes (linha a tracejado). (Mata, et al., 2010)

As microalgas quando estão na fase de crescimento exponencial têm uma quantidade de elementos ideal, fazendo com que estas tenham crescimento e mobilidade máximas. No entanto, ao haver um esgotamento de nutrientes, as microalgas entram então na dita fase estacionária. (Mata, et al., 2010)

São ainda alguns os factores que influenciam o crescimento das microalgas. Estes podem ser bióticos, tais como a presença de organismos patogénicos e a competição com outras microalgas; factores abióticos como a luminosidade, temperatura, concentração de nutrientes, pH, salinidade e presença de compostos tóxicos; e factores operacionais como o atrito que a agitação provoca, a taxa de diluição e a profundidade de lagoas a céu aberto. (Colaço, 2012)

A reprodução das microalgas é vegetativa, onde a partir de uma célula mãe, esta se divide em duas células filhas, levando assim a um aumento exponencial do número de indivíduos presentes em função do tempo.

1.3.2.2. Produção fotoautotrófica

As microalgas, através da fotossíntese, podem transformar o dióxido de carbono e a luz em diversas formas de energia química, conjuntamente com outras substâncias presentes no meio podendo formar polissacarídeos, proteínas, lípidos e glúcidos. Sendo que comparativamente com as plantas superiores, as microalgas têm algumas vantagens, sendo uma delas a maior eficiência e maior taxa de crescimento. (Huang, et al., 2010)

Actualmente, a produção fotoautotrófica é das únicas técnica e economicamente viável para a produção de biomassa algal para a produção de não – energia. Os dois sistemas mais utilizados são o de lagoa aberta ou *raceway* ou em fotobiorreactor. A validade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas, bem como as condições climáticas e os custos de terra e água. (Brennan, et al., 2010)

Os requisitos básicos para o crescimento básico deve incluir dióxido de carbono e outros macro e micro nutrientes, bem como a luz. A fonte de carbono pode ser obtida a partir do CO₂ atmosférico ou pode ser obtida a partir de efluentes gasosos libertados pela indústria (Huang, et al., 2010), podendo ser vantajosos desde o processo de síntese

ocorrido em simultâneo com o processo de biorremediação da poluição gasosa. (Vilas Boas, et al., 2010)

1.3.2.3. Produção heterotrófica

Na produção heterotrófica as microalgas têm um crescimento independente da energia luminosa, onde é permitido um controlo mais estável do processo, com menor custo e maior densidade de células. Apesar das microalgas utilizarem luz de forma eficiente, o crescimento fototrófico das mesmas é lento devido a limitações de luz com elevadas densidades celulares, ou à fotoinibição devido ao excesso de luz, especialmente em dias de muita intensidade solar. Devido a estas limitações, o crescimento heterotrófico em fermentadores, pode ser considerado favorável.

A biossíntese de produtos e o crescimento celular são demasiadamente influenciados pelos nutrientes do meio, bem como por factores ambientais, sendo a fonte de carbono o elemento mais importante para a produção de lípidos, dependendo da espécie utilizada. (Brennan, et al., 2010; Huang, et al., 2010)

1.3.2.4. Produção mixotrófica

Na produção mixotrófica o crescimento celular não depende apenas da fotossíntese, sendo que a energia da luz não é a única, e a fonte de carbono não vem directamente do CO₂ como também do carbono contido no meio. As taxas de crescimento das microalgas nas culturas mixotróficas com sistemas de cultura abertos são muito inferiores às da produção heterotrófica.

O sucesso da produção de algas mixotróficas permite então a integração de componentes fotossintéticos e heterotróficos no ciclo diurno. Isto, faz com que se reduza a perda de biomassa, que acontece na fase do ciclo escuro, diminuindo também a quantidade de substâncias orgânicas utilizadas para o crescimento. (Brennan, et al., 2010)

Para controlar o crescimento das microalgas, podemos ter três métodos. Contagem directa de microalgas por microscópio, análise gravimétrica e por densidade óptica. A

partir daqui podem ser determinados alguns parâmetros, tais como a taxa específica de crescimento e a densidade celular máxima.

O uso da densidade óptica tem como base a obstrução física da luz pelas células, isto é, quanto mais a quantidade de células presentes na amostra, maior será a sua absorção de luz e menor a sua transmitância, uma vez que estas são inversamente proporcionais.

Uma vez que as microalgas possuem pigmentos fotossintéticos, é necessário que o comprimento de onda seleccionado não corresponda aos picos de absorção de luz pelos pigmentos. Ao ser seleccionado 570 nm, que se situa numa faixa distante de absorção máxima de luz pelas clorofilas e pelos carotenóides, a absorvância registada será pouco influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, sendo atribuída à obstrução física da passagem de luz pelas células em suspensão.

A cinética de crescimento das microalgas pode ser complexa, se ao invés de ser utilizada uma única espécie, for utilizado uma mistura de espécies. As microalgas necessitam de diversos factores para crescer, entre os quais se destacam uma fonte de carbono, uma fonte de azoto ou fósforo, uma fonte de luz, micro e macro – nutrientes. Porém, existem ainda outros factores, realçando a temperatura, sendo nesse factor de que se baseia este trabalho. É por essa razão que é de extrema importância controlar a temperatura, para que se possam garantir velocidades de crescimento. **(Rosa, 2011)**

1.3.3. Efluentes e meios de crescimento

As águas residuais industriais incluem óleos, detergentes, pesticidas, PCB's e metais pesados, entre outros constituintes são substâncias perigosas, cujas características de toxicidade se aliam muitas vezes a um elevado potencial de persistência e bioacumulação.

A estabilização de uma água residual pode ter lugar em lagoas fotossintéticas ou lagoas naturais. Portugal é um país que apresenta condições climáticas ecologicamente favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos (microalgas e bactérias) envolvidos simbioticamente nestes processos, pelo que o assunto tem sido encarado com crescente interesse.

As lagoas *raceway* são constituídas por uma conjunto de canais que permitem a recirculação da biomassa e do meio de cultura. A necessária circulação e agitação é feita através de um motor com pás, sendo o fluxo guiado por chicanas colocadas nos canais de escoamento. Estas lagoas, funcionam em contínuo, durante o período luminoso, e são alimentadas na parte posterior do motor, sendo a biomassa retirada na parte anterior do motor, tendo o motor de qualquer das formas de trabalhar em contínuo para que haja agitação.

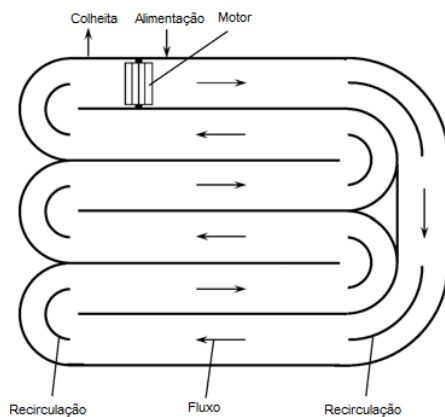


Figura 4 - Vista aérea de uma lagoa do tipo raceway (Chisti, 2007)



Figura 5 - Lagoa do tipo raceway em utilização (Daganzo, 2012)

Este tipo de lagoas são mais baratas que os fotobiorreactores, uma vez que apresentam um menor custo de construção e operação, e é facilitada a sua limpeza. A sua desvantagem é o facto de apresentarem uma baixa produtividade, em relação à sua grande área de ocupação. (Chisti, 2007)

Fotobiorreactores são sistemas de cultura fechados, que podem ser otimizados de acordo com as características fisiológicas e biológicas das espécies de algas. Estes têm vantagem em relação às lagoas abertas, visto que se consegue um melhor controlo das condições de cultivo e dos parâmetros de conhecimento.

Ou seja, mais especificamente, são reactores biológicos construídos em material transparente sobre o qual irá incidir uma fonte de luz. Esta é essencial para a

produtividade, uma vez que é necessária à fotossíntese, mas por outro lado inibe-a, quando em excesso

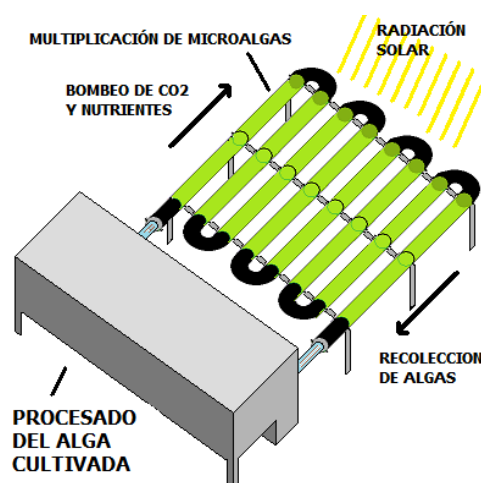


Figura 6 - Fotobiorreator do tipo tubular

Contudo, têm alguns problemas, tais como o seu sobreaquecimento, as incrustações, o elevado custo de construção e a deterioração da biomassa devido à elevada turbulência do meio. (Mata, et al., 2010) Mas, são os mais adequados para culturas utilizando a luz natural, uma vez que expõem a quase totalidade da sua superfície de meio à luz solar.

Na desinfecção o papel das microalgas é duplo uma vez que aumentam a temperatura da água através da conversão de luz e calor e aumentam o pH através da actividade fotossintética. As microalgas são consideradas causa de poluição secundária, adicionando os seus próprios resíduos de decomposição aos efluentes. (Dinis, et al., 2004)

Assim, um meio simples e económico de remover as microalgas da corrente aquosa alargaria a utilização de lagoas como método de tratamento das águas residuais uma vez que para este processo ser efetivo, a matéria em suspensão deve ser eficientemente removida.

Por outro lado, têm sido efetuados estudos com vista a uma maior utilização de microalgas imobilizadas, como forma de ultrapassar os problemas relativos à separação das mesmas da fase líquida. (Dinis, et al., 2004)

Durante este trabalho, foram utilizados meios de crescimento artificiais, para manutenção do banco de microalgas, bem como para inicialmente fazer uma estudo sobre o crescimento das mesmas, sendo de seguida utilizado efluente de enchimento de zonas húmidas construídas, existentes no Lab.IPT.

Nestes meios utilizados há sempre uma preocupação com a quantidade de micronutrientes que é utilizada, uma vez que o carbono, o azoto, o fósforo e o enxofre são os principais constituintes das células. O azoto é dos componentes das bases que constituem o DNA/RNA e é dispensado no meio normalmente em forma de nitratos ou amónia. O fósforo é de elevada importância, sendo também um dos constituintes do DNA/RNA, sendo incluído no meio através do ATP, e na membrana celular. A adenosina trifosfato tem um papel fundamental na transferência de energia durante a fotossíntese. O enxofre, o ferro e outros oligoelementos são também necessários e fundamentais para o desenvolvimento celular. O enxofre é um dos componentes dos aminoácidos cisteína e metionina, que são necessários para a síntese proteica, e quando este não existe, deixa por sua vez de haver síntese proteica.

A fonte de carbono e azoto, o tipo e a intensidade de luz são os principais factores que podem limitar o crescimento celular fotossintético.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Microalgas

Neste trabalho foram utilizadas quatro espécies de algas, uma cianobactéria (*Anabaena sp.*), e três algas unicelulares pertencente à divisão chlorophyta (*Spirogyra sp.*), (*Chlorella sp.*), e (*Chlorella m.*).

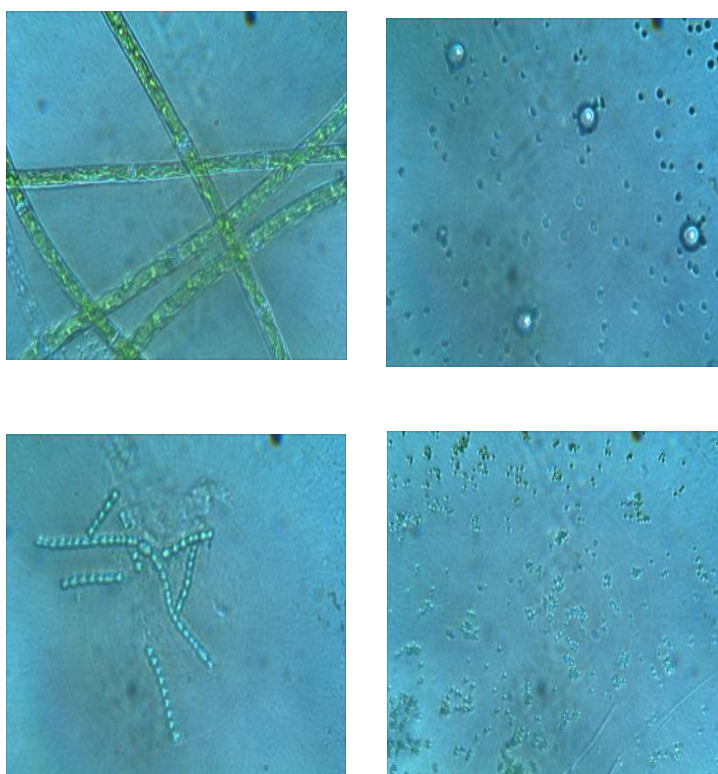


Imagem 4 - A) *Spirogyra sp.* B) *Chlorella sp.* C) *Anabaena sp.* D) *Chlorella m.*, com ampliação 400x, em microscópio Olympus CH30

Estas microalgas foram obtidas na Algoteca do Departamento de Botânica (ACOI) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Foram seleccionadas estas quatro microalgas devido aos teores de açúcares e óleos que estas contêm.

2.1.2. Meios de crescimento

2.1.2.1. Meio M7

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. Foram preparadas soluções – mãe para as soluções que de seguida iriam ser utilizadas para 1 litro de meio M7, com as quantidades que são apresentadas de seguida na tabela.

Tabela 3 - Composição do meio M7

| Reagentes | Solução - mãe (%) | [] g/L | [] mol/L | v (L) | [final] g/L | M (g/mol) |
|--|-------------------|---------|-----------------------|-------|--------------|-----------|
| KNO₃ | 1 | 10 | 0,099 | 0,01 | 0,1 | 101,11 |
| MgSO₄.7H₂O | 0,1 | 1 | 4,06x10 ⁻³ | 0,01 | 0,01 | 246,47 |
| (NH₄)₂HPO₄ | 0,2 | 2 | 0,015 | 0,005 | 0,01 | 132,06 |
| CaSO₄ | solução saturada | - | - | 0,01 | - | 136,14 |
| Extrato de solo | - | - | - | 0,02 | - | - |
| Extrato de musgo | - | - | - | 0,01 | - | - |
| Água destilada | - | - | - | 0,93 | - | - |
| Micronutrientes | - | - | - | 0,005 | 0,015005 | 1834,3 |

Para preparar o extrato de solo, pesou-se 200 g de solo com baixo teor em fertilizantes, ao qual se adicionou 1 litro de água destilada e esterilizou-se fervendo durante 1h. De seguida foi feita uma decantação e filtrou-se o meio aquoso e autoclavou-se uma hora a uma atmosfera e três dias consecutivos, e, após arrefecer foi guardado no frigorífico.

Para obter o extrato de musgo foram pesadas 50 g de musgo seco, adicionando-se 1,5 litros de água destilada, esterilizando-se a ferver durante 1 hora. Após a decantação, foi filtrado o meio aquoso e autoclavado uma hora a uma atmosfera durante três dias consecutivos, para ser guardado em frigorífico.

A adição da vitamina B₁₂ ($5 \times 10^{-6} g$) à solução final esterilizada foi feita após a adição da solução de micronutrientes, que se encontra apresentada na tabela seguinte.

Tabela 4 - Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio M7

| Reagentes | Solução - mãe (%) | [] g/L | [] mol/L | v (L) ; m (g) | [final] g/L | M (g/mol) |
|--|-------------------|-------------------|---------------------------------|---------------|--------------|-----------|
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 | 1 | $3,48 \times 10^{-3}$ | 0,001 | 0,001 | 287,54 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 0,1 | 1 | $5,92 \times 10^{-3}$ | 0,002 | 0,002 | 169,02 |
| HBo ₃ | 0,2 | 2 | 0,032 | 0,005 | 0,01 | 61,83 |
| Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 0,02 | 0,2 | $6,87 \times 10^{-1}$ | 0,005 | 0,001 | 290,93 |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,02 | 0,2 | $8,01 \times 10^{-3}$ | 0,005 | 0,001 | 24,96 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,0005 | 5,00E-03 | $2,00 \times 10^{-5}$ | 0,001 | 0,000005 | 429,68 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | – | 7 | 0,025 | 0,7 g | | 278,02 |
| EDTA | – | Sol. I 4 | Sol. I $1,55 \times 10^{-3}$ | 0,8 g | | 292,25 |
| | | Sol. II 0,0454 | Sol. II 0,014 | | | |

As soluções I e II foram autoclavadas em separado, e ao fim de arrefecerem foram juntas, sendo que:

- Solução I: 881 mL de água destilada e solução stock dos sais sem FeSO₄.7H₂O , e 0,4 g de EDTA;
- Solução II: 100 mL de água destilada e 0,7 g de FeSO₄.7H₂O com 0,4 g de EDTA.

2.1.2.3. Meio BG11

Foi testado um novo de crescimento, que segundo (Rao, et al., 2007) teve resultados satisfatórios em ensaios realizados. Este meio chamado de BG11, foi modificado uma vez que não existia o reagente *Citrato férrico amoniacal (FAC)*, sendo substituído por *Sulfato de ferro (III) amoniacal dodecahidratado (FAS)*, na proporção correcta¹, e de seguida o procedimento foi seguido pelo do autor. De início foi feito segundo indicações dadas pelo autor, que se apresentam na tabela seguinte.

Tabela 5 - Composição do meio BG11

| Reagentes | [Final] g/L |
|--|--------------|
| NaNO₃ | 1,5 |
| K₂HPO₄ | 0,04 |
| CaCl₂.H₂O | 0,036 |
| MgSO₄.7H₂O | 0,075 |
| Na₂CO₃ | 0,02 |
| EDTA | 0,001 |
| C₆H₈O₇.H₂O | 0,006 |
| NH₄Fe(SO₄)₂.12H₂O | 0,011 |

2.1.2.4. Efluente das Zonas Húmidas Construídas

Por norma, as zonas húmidas construídas (ZHC) são utilizadas para o tratamento de efluentes, apresentando-se como uma tecnologia adequada a pequenos algerados, alternativa aos tradicionais sistemas intensos de lamas activadas, leitos percoladores, entre outros.

¹FAC - C₆H₈FeNO₇ – M=262 g/mol em 0,006g FAC temos 0,00128 g de Fe e 0,00032 g de N. Então em FAS – NH₄Fe(SO₄)₂.12H₂O – M=482 g/mol temos 0,011 de Fe e 0,011 de N que é o que é necessário pesar de FAS.

São descritas como um sistema complexo, composto fundamentalmente por água, substratos, plantas, resíduos orgânicos provenientes do decaimento das plantas, invertebrados e uma diversidade de microrganismos.

Estas são opções menos consumidoras de energia e menos geradoras de subprodutos indesejáveis do que os sistemas convencionais de tratamento, tanto químico como biológicos.

Tanto nas zonas húmidas artificiais como nas naturais, as transformações sofridas pelos poluentes são semelhantes às que ocorrem nos sistemas convencionais de tratamento. No entanto, as fontes de energia utilizadas nas zonas húmidas são naturais e renováveis: energia solar, energia eólica, energia das águas e energia armazenada na biomassa e nos solos. (Vaz, 2010)

A água residual usada em alguns crescimentos foi recolhida à saída de uma ZHC piloto existente no Lab.IPT, cujas características e operação estão descritas na literatura (Mateus, et al., 2012).

2.1.2.5. Água doce

A água doce utilizada nos sistemas de aquacultura, implementados em laboratório, foi recolhida no Rio Nabão, na localidade de Porto de Cavaleiros. (Santos, et al., 2013)

2.1.3. Preparação do material utilizado no cultivo

Todo o material e meios que foram utilizados foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Os balões de Erlenmeyer receberam tampões de algodão e gazes envolvidos por papel de alumínio antes da esterilização. O material de vidro foi 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 adotaram-se procedimentos de segurança estabelecidos para laboratórios de microbiologia, para se evitarem contaminações, tais

como desinfetar a bancada de trabalho no início e no fim de cada utilização e trabalhar na zona de esterilidade garantida pelo bico de gás (Bunsen).

2.1.4. Reactores

Nestes ensaios foram utilizados dois tipos de reactores, de coluna de bolhas e air – lift, e uma tipologia de operação, descontínuo.

2.1.4.1. *Reactor descontínuo de coluna de bolhas*

O fotobiorreactor escolhido é do tipo tubular com coluna de bolhas, uma vez que existe facilidade na sua montagem / desmontagem, permitindo que haja lavagem entre crescimentos. O material escolhido para o fotobiorreactor foi o acrílico devido ao seu fácil dimensionamento e transparência permitindo a passagem da luz. As bolhas ascendentes na coluna homogeneizam o meio diminuindo a sedimentação da microalga, para que se possa seguir o crescimento sem haver falsos resultados uma vez que as microalgas ao sedimentarem ficam no fundo do fotobiorreactor.

O reactor é constituído por dois tubos cilíndricos concêntricos, sendo o interior o reactor em si, e o cilindro de fora a camisa de termostatização. A espessura dos cilindros é de 3 mm, altura 49,5 cm e diâmetro 7 cm.

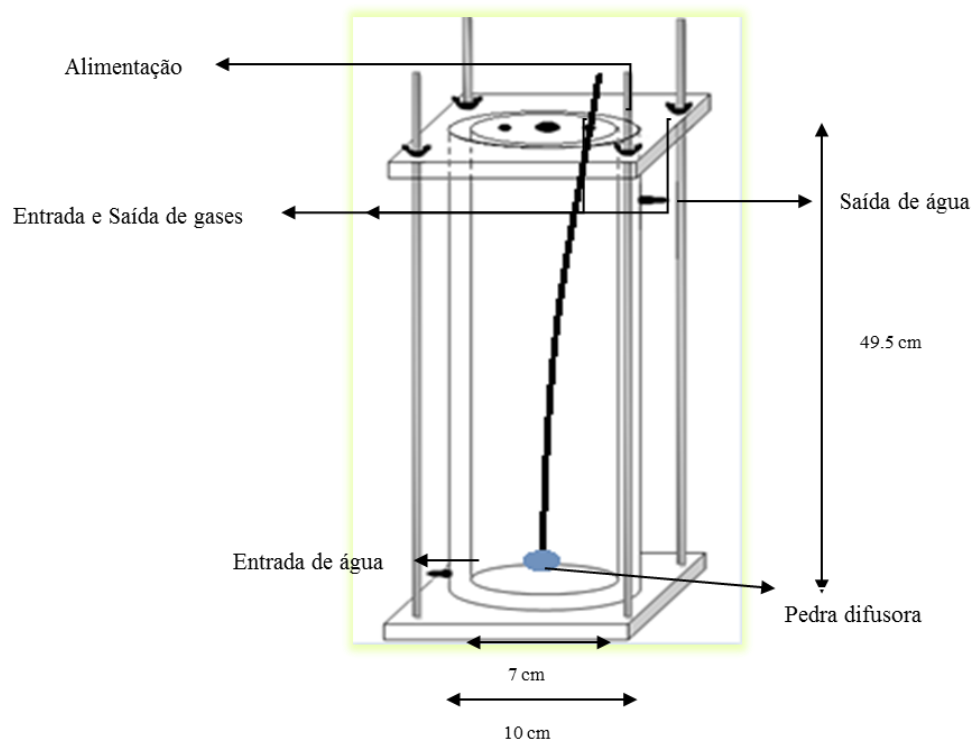


Figura 7 - Fotobiorreator tubular em coluna de bolhas (Colaço, 2012)

A camisa tem um diâmetro de 10 cm e altura de 49,5 cm. Foram cortadas bases quadradas com dois encaixes rebaixados de 3mm de largura e espessura, com 4 furos onde entram os varões roscados de inox para selagem do reator. A tampa do reator contém mais três furos, dois de 6 mm para passagem das mangueiras de ar e de CO₂, e outro de 10 mm para alimentação do reator.

A estanquicidade do reator foi garantida pela utilização de *o-rings* de diâmetro igual ao dos encaixes cortados nas bases.

O reator apresenta um volume útil de 1,9L e uma razão área superficial/volume de valor 57m⁻¹. (Colaço, 2012)

2.1.4.2. Reactor descontínuo do tipo air – lift

Neste reactor foi introduzido dentro da camisa interna um separador, para que possa funcionar em “air-lift”.

O reactor do tipo “air-lift”, faz com que haja circulação constante, acompanhada do arejamento que já havia nos reactores anteriores. Servia para que não houvesse deposição das microalgas no fundo do reactor, nem que estas floculassem.

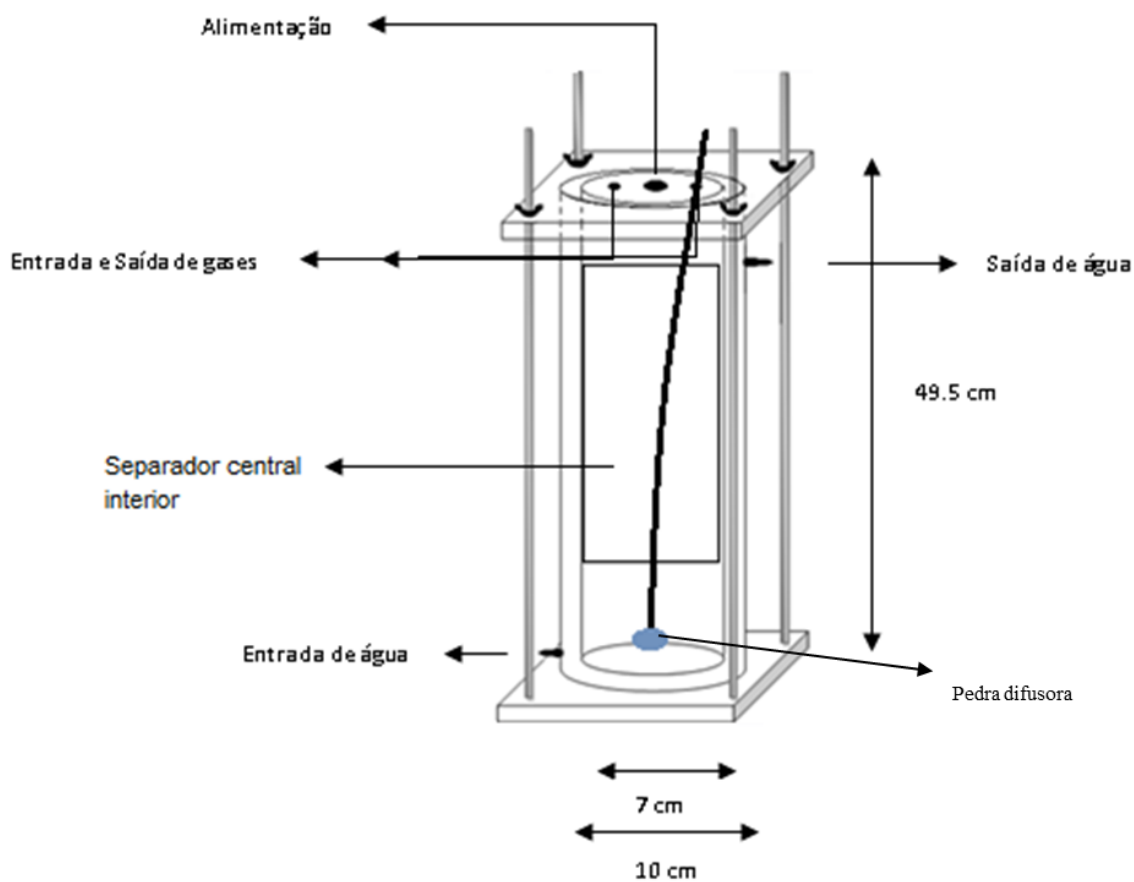


Figura 8 - Fotobiorreator do tipo air – lift (Adaptado de (Colaço, 2012))

2.2. Métodos Experimentais

2.2.1. Determinação das rectas de calibração

2.2.1.1. *Quantificação da biomassa algal*

A quantificação da biomassa algal para seguir os crescimentos foi feita com base no método espectrofotométrico. Para tal estabeleceram-se rectas de calibração para as quatro espécies de microalgas a fim de relacionar a absorvância com o respetivo peso seco.

A partir de uma suspensão mãe de microalga prepararam-se, por diluição e em balão volumétrico de 50 mL, 10 suspensões padrão de acordo com o indicado na imagem 5. De seguida leram-se as absorvâncias a 570 nm, contra um branco de água destilada, no espectrofotómetro DRLANGE Cadas 100 e procedeu-se à determinação do respetivo peso seco.

A determinação do peso seco das culturas de microalgas foi realizada filtrando as suspensões padrão anteriormente preparadas. Primeiramente, este foi decantado até estabilizar o sobrenadante, sendo de seguida filtrado a vácuo por funis, com filtros de membrana de nitrato de celulose com porosidade de 0,45 μm , diâmetro de 47 mm da ALBET, fabricado na Alemanha. Após a filtração, os filtros foram secos em estufa a 80°C, durante 24 h e pesados.

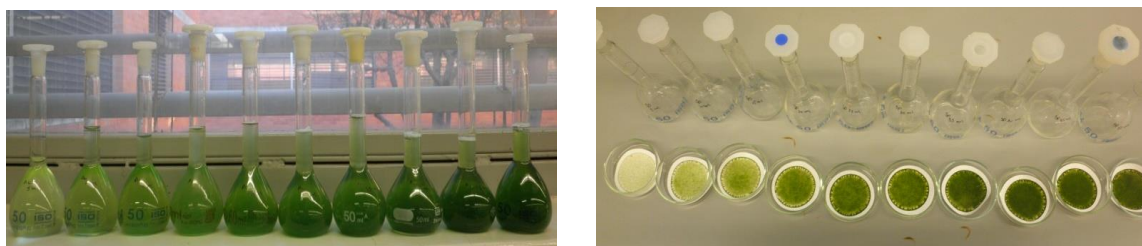


Imagem 5 - Padrões para a recta de calibração da biomassa algal: A) Padrões em balão de fundo plano antes da filtração; B) Padrões em membrana após filtração.

2.2.1.2. *Extração e hidrólise ácida quantitativa*

A hidrólise ácida quantitativa permite determinar a concentração total de açúcares, garantindo a hidrólise total da biomassa.

Num tubo de ensaio, com 0,0500 g de biomassa seca, foram adicionados 0,5 mL de ácido sulfúrico 72% (m/v). De seguida, foi colocado num banho termostaticado a 30°C durante 1h. O conteúdo foi transferido para um frasco de schott de 100 mL e adicionou-se 9 mL de água destilada, diluindo o ácido sulfúrico para uma concentração final de 4% (m/v). Depois do frasco de schott bem rolhado, foi levado a autoclave durante 1h a 120°C. Adaptado de (Miranda, 2011)

De seguida foi feita uma filtração simples, com filtros de papel com diâmetro de 125 mm (Albert, Filtration & Separation Technology DP 145 125), para balões volumétricos de fundo plano de 100 mL e fez-se o volume com água destilada.

2.2.1.3. Determinação colorimétrica do teor em açúcares totais

O teor em açúcares totais foi determinado pelo método do reagente fenol – sulfúrico (FS).

A 1 mL de amostra, devidamente diluída, foi adicionado igual volume de solução de fenol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (96% (m/v)). A mistura foi homogeneizada em agitador de vórtice. A reação ocorreu durante 10 min, tendo o tubo de ensaio arrefecido durante 15 min a temperatura ambiente.

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

Foi construída uma recta de calibração com concentração entre 10 e 100 mg/L de glucose.

2.2.1.4. Determinação colorimétrica do teor em açúcares redutores

O teor em açúcares redutores foi determinado pelo método do reagente de ácido 3,5 – dinitrossalicílico (DNS).

A 0,5 mL de amostra, devidamente diluída, foi adicionado igual volume de reagente DNS num tubo de ensaio. A mistura foi homogeneizada em agitador de vórtice e

incubada num banho a 100°C durante 5 min. De seguida, deixou-se repousar durante 10 minutos até atingir a temperatura ambiente e adicionou-se 5 mL de água destilada.

A densidade óptica de cada mistura foi lida espectrofotometricamente a 540 nm contra um ensaio em branco, onde a amostra foi substituída por água destilada.

A concentração de açúcares redutores da amostra foi obtida a partir de uma recta de calibração com concentrações de glucose entre 0,05 e 1,5 g/L.

2.2.2. Determinação de CQO do efluente do tanque de calcário

A carência química de oxigénio foi determinada pelo método do dicromato adaptado ao termo – reactor VELP tipo ECO6.

Num tubo de reactor adicionar 400 mg de sulfato de mercúrio, 10 mL de dicromato de potássio 0,25N, 30 mL de ácido sulfúrico e 20 mL de amostra, por esta ordem. De seguida, adicionar 5 ou 6 pérolas em vidro e colocar logo de seguida o condensador. Programar e ligar o termo – reactor a 150°C durante 120 minutos.

Depois de removido o tudo de reactor deixar arrefecer e adicionar 60 mL de água destilada. Titular de seguida o excesso de dicromato de potássio com uma solução aferida de sulfato de ferro (II) e amónio 0,125N, na presença de 2 a 3 gotas de solução indicadora de ferroína. O ponto de viragem é indicado, pela mudança de cor azul, amarela, esverdeada e por fim castanha.

2.2.3. Determinação do azoto total na água pelo método de Kjeldahl

O valor obtido com este método corresponde à soma do azoto orgânico e do azoto amoniacal.

A 100 mL de água destilada num tubo de digestão adicionar 7 g de sulfato de potássio anidro, 350 mg de óxido de mercúrio e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A digestão é feita, primeiramente, durante 60 minutos a 200°C e depois mais 120 minutos a 370°C, servindo o aquecimento inicial para evaporar a água.

De seguida deixar arrefecer os tubos q a uma temperatura entre 50°C e 60°C. Depois do arrefecimento, procede-se á destilação, onde se coloca um erlenmeyer na unidade de destilação, e a amostra no respectivo tubo.

De seguida programa-se o destilador para Sp = 200°C, H₂O = 100 mL, H₃BO₃ = 25 mL e NaOH = 70 mL; tempo de destilação 2 minutos e 15 segundos; vapor = 100%.



Imagem 6 - Determinação do Azoto de Kjeldahl

2.2.4. Determinação e quantificação de óleos nas microalgas

Para a quantificação de lípidos totais foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), só que modificada.

Cada amostra foi triturada e pesada para ser transferida para um tubo de centrifuga. Por cada grama de amostra adicionar 5 mL de clorofórmio e 10 mL de metanol. De seguida, a mistura é sujeita a ultra-sons durante 10 minutos, para ser adicionar mais 5 mL de clorofórmio e 9 mL de água destilada, seguindo-se ultra-sons durante mais 5 minutos. De seguida as amostras são deixadas a extrair durante 2 horas, e agitados no vórtex por 30 segundos e centrifugadas de seguida durante 5 minutos, a 5000 rpm e 16°C para separar as

fases, sendo a fase orgânica a inferior, e a fase inorgânica a superior. A fase orgânica é cuidadosamente recolhida para um balão de vidro de fundo redondo, previamente seco e tarado, repetiu-se o processo de extração com adição à amostra de mais 10 mL de clorofórmio. A fracção lipídica recolhida na fase orgânica para o balão foi seca num evaporador rotativo para eliminar o solvente e ser posteriormente pesada. (Tavares, 2009)

2.2.5. 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.

Pipetaram-se para frascos autoclaváveis 50,0mL de amostra e adicionou-se 2 a 3 de indicador de fenolftaleína. Caso a amostra obtenha a cor rósea, adiciona-se NaOH gota a gota até a cor desaparecer. Seguidamente adicionaram-se 1,0 mL 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 2 a 3 gotas 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 2 a 3 gotas 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.

2.2.6. 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.

Pipetaram-se para frascos autoclaváveis 10,0mL de amostra e adicionou-se 5,0mL 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.

2.3. Elaboração de curvas de crescimento

Ao longo do crescimento foram retiradas amostras, para avaliar o crescimento celular pelo método espectrofotométrico a 570 nm.

2.3.1. Crescimento em balão de Erlenmeyer

2.3.1.1. Crescimento em meio M7

2.3.1.1.1. Primeiro crescimento das microalgas (*Produção de biomassa para as rectas de calibração e análise de açúcares*)

Os ensaios de crescimento das microalgas decorreram em laboratório, onde inicialmente as condições ambientais eram as de temperatura e humidade ambiente, dentro de balões de Erlenmeyer, e de seguida foram incubadas a $\pm 24^{\circ}\text{C}$, numa incubadora Stuart scientific orbital incubator SI50.

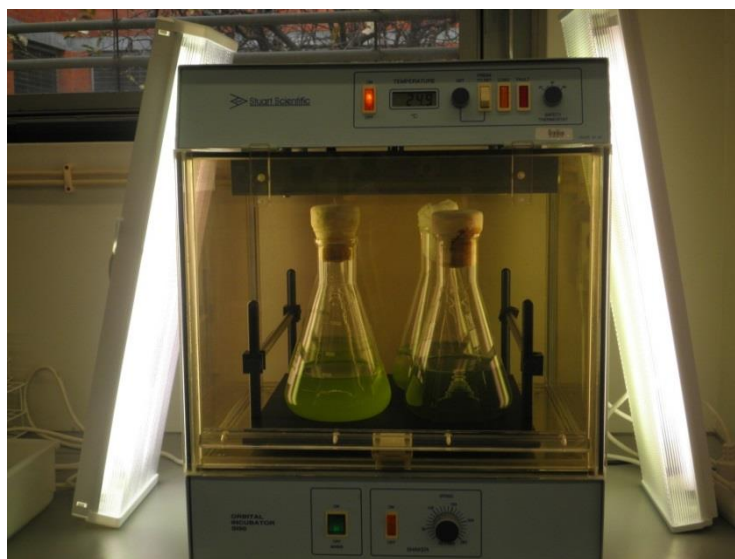


Imagem 7 - Crescimento em Balão de Erlenmeyer em incubadora

A iluminação artificial é garantida por lâmpadas fluorescentes GLO T8 Liner Fluorescent Bulbs, com fotoperíodo de 12 horas (ciclo luz / escuro), cujos espectros fotossintéticos abrangem a zona do espectro fotossintético ideal para aquários com plantas. As lâmpadas escolhidas foram a Flora – Glo e a Sun – Glo. A primeira porque tem o pico na zona azul do espectro e a segunda porque vai complementar com radiação na zona vermelha. As lâmpadas são de 61 cm, 20 Watts e 25 mm de diâmetro, da marca Hagen e fabricadas no Japão. (Diogo, 2012)

O inóculo inicial foi feito de 1:9 em meio M7, num total de 100 mL. Posteriormente foram adicionados 20 mL de meio M7, e feita uma segunda inoculação de 1:5 em meio M7. Esta última inoculação foi feita quando as microalgas foram incubadas.

O crescimento das microalgas foi quantificado pelo método indireto, medindo a densidade óptica em tomas de 5 mL, recolhidas sob atmosfera esterilizada à chama do bico de Busen. As medições de absorvância foram lidas a um comprimento de onda de 570 nm em espectrofotómetro DRLANGE Cadas 100, que seguiu a Lei de Lambert – Beer, lei que valia a obstrução à passagem da luz.

O pH foi também controlado através de medições feitas em aparelho CRISON Microph2000. E uma vez que peso seco também foi quantificado, tal como a medição do pH foi feita, sabe-se que este é função do CO₂ dissolvido e que decresce com a respiração aumentando proporcionalmente com o aumento da fotossíntese.

2.3.1.2. Crescimento em meio BG11

2.3.1.2.1. Primeiro crescimento *Anabaena sp*, *Spirogyra sp*, *Chlorella sp*, *Chlorella m*.

Os ensaios de crescimento das microalgas decorreram em laboratório. O primeiro crescimento, dos 0 dias aos 19 dias, foi realizado em incubadora em balão de Erlenmeyer de 300 mL, e sem arejamento, com temperatura controlada de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e com um inoculo de 10% (10 mL de microaldas + 90 mL de meio BG11 fresco). Foi também garantida iluminação artificial por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas

2.3.1.2.2. Segundo crescimento *Spirogyra sp*, *Chlorella sp*, *Chlorella m*.

O segundo crescimento foi realizado a temperatura ambiente média de $\pm 15^{\circ}\text{C}$, em balão de Erlenmeyer de 2L, e sem arejamento, fora da incubadora com um inóculo de 1% (10 mL de microalga e 1000 mL de meio BG11 fresco). Para este crescimento também a iluminação artificial foi garantida por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas

2.3.1.2.3. *Terceiro crescimento Spirogyra sp, Chlorella sp, Chlorella m.*

O terceiro crescimento foi realizado a temperatura ambiente medida constantemente de $\pm 15^{\circ}\text{C}$, em balão de Erlenmeyer de 2L, e sem arejamento, fora da incubadora com um inóculo de 1% (10 mL de microalga e 1000 mL de meio BG11 fresco). Para este crescimento também a iluminação artificial foi garantida por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas Primeiro crescimento em BG11 em reactor.

2.3.2. Ensaaios em fotobiorreactor

Das quatro algas para as quais foram feitos crescimento, optou-se pela *Anabaena sp* para ser inoculada em fotobiorreactor para ser estudado em pormenor o seu crescimento, e quais as condições óptimas de crescimento.

2.3.2.1. *Crescimento em meio BG11*

2.3.2.1.1. *Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #1)*

O primeiro inóculo foi de 10% (140 mL de microalga e 1400 mL de meio BG11 fresco). Aqui, foi controlada a temperatura da camisa, mantendo o meio a temperatura sempre constante de $25^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para além da temperatura, este foi mantido com arejamento de 1% em oxigénio (O_2), a caudal de ± 200 mL/min. Foi também garantida a iluminação artificial por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas.

2.3.2.2. *Crescimento em efluente do tanque de macrófitas com calcário*

2.3.2.2.1. *Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #2)*

Este crescimento foi feito a partir do efluente da ZHC, para se poder testar as condições de crescimento em meio não esterilizado.

O inóculo foi de 10% (140 mL de microalga e 1400 mL de efluente da ZHC). Durante este crescimento procedeu-se ao controlo de temperatura através de circulação de água quente na camisa do fotobiorreactor, mantendo o meio a temperatura sempre constante de $25^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Para além da temperatura, este foi mantido com arejamento, a caudal constante. Foi também garantida a iluminação artificial por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas.

2.3.2.2.2. Segundo crescimento *Anabaena sp.* (Reactor #3)

Este crescimento foi feito a partir do efluente da ZHC, para se poder testar as condições de crescimento em meio não esterilizado.

O inóculo foi de 10% (140 mL de microalga e 1400 mL de efluente da ZHC). Neste crescimento também se controlou a temperatura, mantendo o meio a temperatura sempre constante de $15^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para além da temperatura, este foi mantido com arejamento a caudal de ± 200 mL/min. Foi também garantida a iluminação artificial por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas.

2.3.2.2.3. Terceiro crescimento *Anabaena sp.* (Reactor#4)

Este crescimento foi feito a partir do efluente da ZHC, para se poder testar as condições de crescimento em meio não esterilizado.

O inóculo foi de 10% (140 mL de microalga e 1400 mL de efluente da ZHC). Neste crescimento também se controlou a temperatura, mantendo o meio a temperatura sempre constante de $29^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para além da temperatura, este foi mantido com arejamento a caudal constante. Foi também garantida a iluminação artificial por duas lâmpadas fluorescentes GLO T8 LinerFluorescente Bulbs (Flora – Glo e Sun – Glo), com fotoperíodo de 12 horas. Os esquemas seguintes resumem esquematicamente os ensaios e crescimentos realizados para facilitar a leitura do capítulo seguinte:

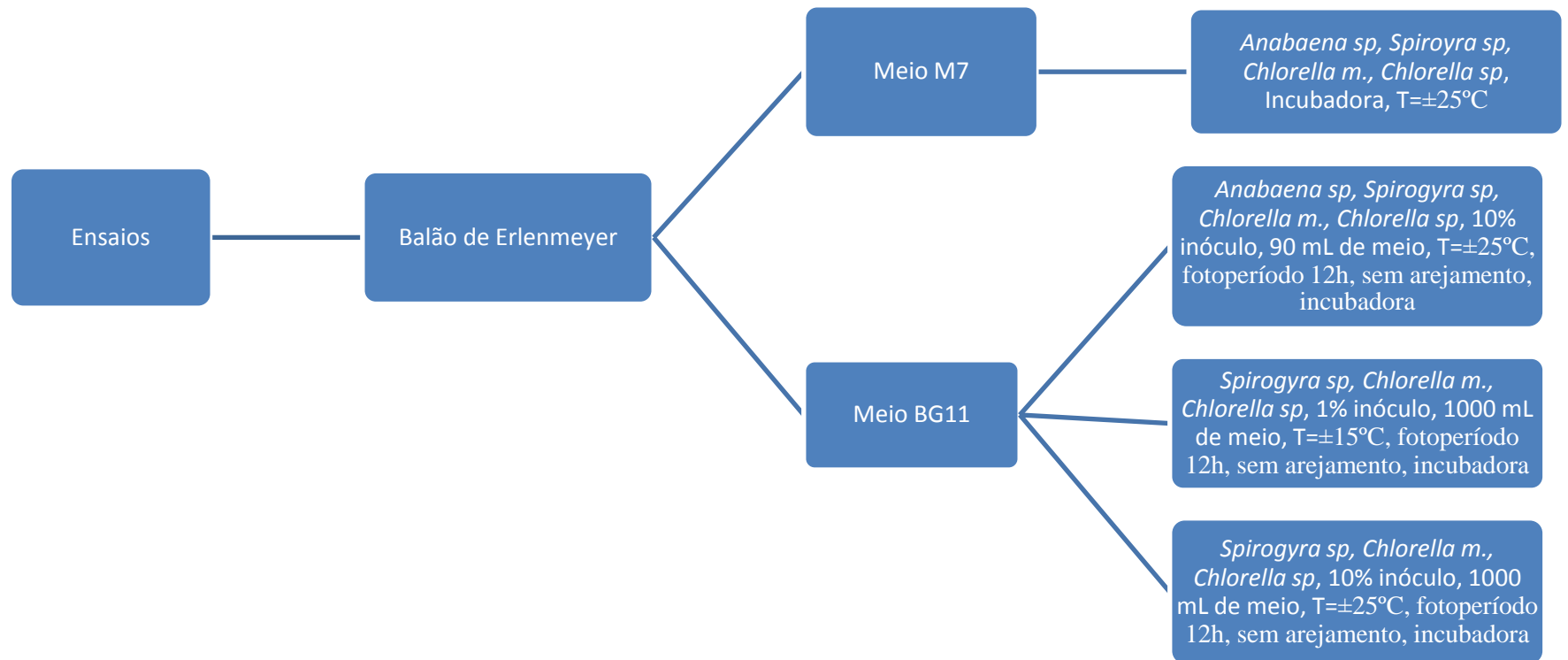


Figura 9 - Esquema representativo do ensaios realizados em Balão de Erlenmeyer

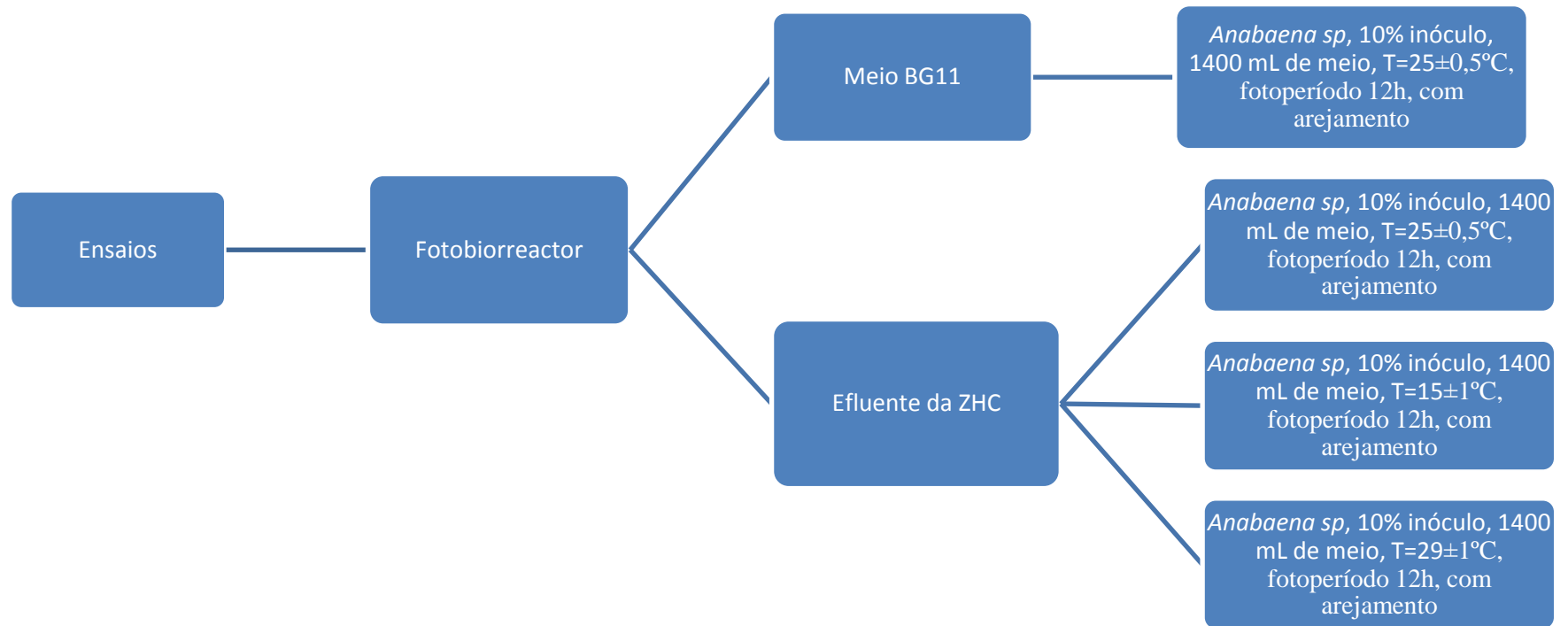


Figura 10 - Esquema representativo do ensaios realizados em Fotobiorreactor

2.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

Certos parâmetros, tais como, a taxa máxima específica de crescimento, μ (dia^{-1}), a concentração mássica máxima, C_{max} (mg/L), a produtividade máxima, P_{max} ($\text{mg}/(\text{L.dia})$) e o tempo de duplicação da biomassa podem assim ser calculados, durante o crescimento equilibrado, já a duplicação da biomassa é acompanhada da duplicação de todas as outras propriedades (proteínas, DNA, RNA, e outras moléculas orgânicas).

2.4.1. Taxa máxima específica de crescimento

O crescimento, por norma, apresenta uma cinética equivalente a uma reação de primeira ordem:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1)$$

Onde:

dX/dt – Variação da concentração de biomassa em relação ao tempo ($\text{mg}/(\text{L.dia})$);

X – Concentração da biomassa (mg/L);

μ - Taxa específica de crescimento (dia^{-1}).

Durante a fase de crescimento exponencial, esta equação pode ser integrada entre X_{t_0} e X_t , no intervalo de tempo em que dura a fase de crescimento exponencial.

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{X} \cdot dX = \int_0^t \mu \cdot dt \quad (2)$$

sendo esta uma função exponencial, logo o seu crescimento é equilibrado fazendo com que μ seja constante, obtendo-se a seguinte equação:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t \Leftrightarrow \ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (3)$$

A equação 3 corresponde à linearização da equação 2 e apresenta como declive a taxa específica de crescimento.

2.4.2. Tempo de duplicação

A taxa específica de crescimento relaciona-se com o tempo médio de duplicação (t_d) para a população, por substituição de $X = 2X_0$ e $t = t_d$ na função exponencial. Assim, temos que:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4)$$

2.4.3. Taxa de produtividade

A taxa de produtividade é calculada relacionado o valor da biomassa seca da microalga pelo valor do volume de meio do reator.

$$Tp = \frac{\text{Biomassa seca}}{\text{Volume reator}} \quad (5)$$

3. Resultados e discussão

3.1. Determinação das rectas de calibração

3.1.1. Quantificação da biomassa algal

Este ensaio teve como objetivo estabelecer e otimizar a curva de calibração para cada espécie de microalga, com base no método espectrofotométrico, para se poder relacionar o valor de absorvância obtido com o peso seco da biomassa algal. Após o crescimento da biomassa, foi feita uma decantação para preparação dos vários padrões, para se proceder à medição das respectivas absorvâncias e determinação do seu peso seco.

A tabela 6, 7, 8 e 9 apresentam os resultados de absorvância e biomassa seca de cada uma das algas, bem como os gráficos 1, 2, 3 e 4 apresentam as curvas de calibração de cada uma das microalgas para acompanhar o crescimento de cada uma delas.

Sabendo que a lei de Lamber – Beer, que é seguida neste crescimento é válida para valores de absorvância entre 0,100 nm e 0,800 nm, pode-se constatar que os valores que das rectas de calibração não são os melhores, mesmo obtendo valores de coeficientes de correlação muito bons.

Tabela 6 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da *Spirogyra sp.*.

| V Sol. Mãe (mL) | Absorvância | Papel filtro (g) | Papel filtro + biomassa (g) | Biomassa seca (g) | Concentração (g/L) |
|-----------------|-------------|------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| 0 | 0,000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 |
| 5 | 0,016 | 0,0925 | 0,0941 | 0,0016 | 0,032 |
| 10 | 0,056 | 0,0936 | 0,0957 | 0,0021 | 0,042 |
| 15 | 0,084 | 0,0938 | 0,0995 | 0,0057 | 0,114 |
| 20 | 0,129 | 0,0958 | 0,1037 | 0,0079 | 0,158 |
| 25 | 0,13 | 0,0937 | 0,1026 | 0,0089 | 0,178 |
| 30 | 0,232 | 0,0939 | 0,1033 | 0,0094 | 0,188 |
| 35 | 0,207 | 0,0938 | 0,1063 | 0,0125 | 0,25 |
| 40 | 0,219 | 0,0937 | 0,1078 | 0,0141 | 0,282 |
| 45 | 0,223 | 0,0961 | 0,1096 | 0,0135 | 0,270 |
| 50 | 0,351 | 0,0935 | 0,1075 | 0,0140 | 0,280 |

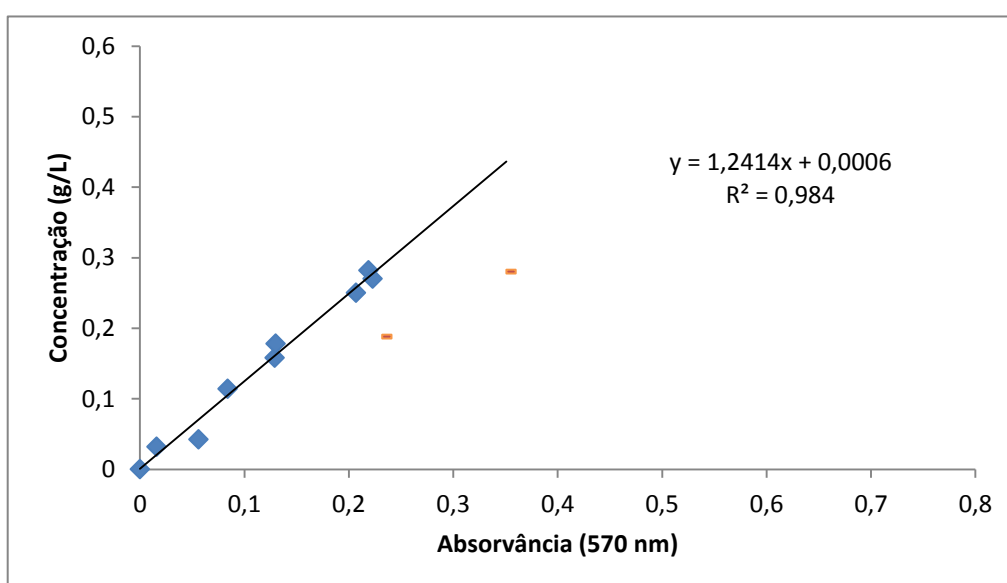


Gráfico 1 - Recta de calibração para a *Spirogyra sp.*.

O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0,984 o que indica uma boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 1,2414 * \text{ABS (570nm)} + 0,0006$$

Tabela 7 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da *Anabaena sp.*

| V Sol. Mãe (mL) | Absorvância | Papel filtro (g) | Papel filtro + biomassa (g) | Biomassa seca (g) | Concentração (g/L) |
|-----------------|-------------|------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| 0 | 0,000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 |
| 5 | 0,045 | 0,0928 | 0,0956 | 0,0028 | 0,056 |
| 10 | 0,089 | 0,0945 | 0,1008 | 0,0063 | 0,126 |
| 15 | 0,161 | 0,0937 | 0,1031 | 0,0094 | 0,188 |
| 20 | 0,209 | 0,0961 | 0,1090 | 0,0129 | 0,258 |
| 25 | 0,282 | 0,0934 | 0,1084 | 0,0150 | 0,300 |
| 30 | 0,349 | 0,0920 | 0,1097 | 0,0177 | 0,354 |
| 35 | 0,364 | 0,0949 | 0,1145 | 0,0196 | 0,392 |
| 40 | 0,435 | 0,0937 | 0,1175 | 0,0238 | 0,476 |
| 45 | 0,493 | 0,0936 | 0,1160 | 0,0224 | 0,448 |
| 50 | 0,535 | 0,0924 | 0,1190 | 0,0266 | 0,532 |

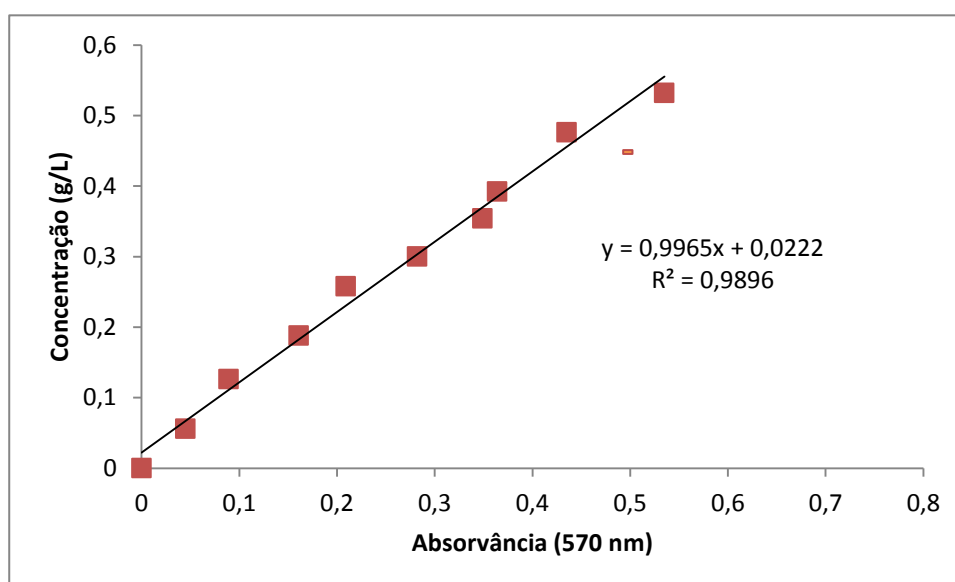


Gráfico 2 - Recta de calibração para a *Anabaena sp.*

O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0,9896 o que indica uma muita boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 0,9965 * \text{ABS (570nm)} + 0,0222$$

Tabela 8 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da *Chlorella sp.*.

| V Sol. Mãe (mL) | Absorvância | Papel filtro (g) | Papel filtro + biomassa (g) | Biomassa seca (g) | Concentração (g/L) |
|-----------------|-------------|------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| 0 | 0,000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 |
| 5 | 0,054 | 0,0946 | 0,0964 | 0,0018 | 0,036 |
| 10 | 0,145 | 0,0948 | 0,1001 | 0,0053 | 0,106 |
| 15 | 0,226 | 0,0933 | 0,1004 | 0,0071 | 0,142 |
| 20 | 0,300 | 0,0945 | 0,1041 | 0,0096 | 0,192 |
| 25 | 0,331 | 0,0933 | 0,1055 | 0,0122 | 0,244 |
| 30 | 0,437 | 0,0942 | 0,1089 | 0,0147 | 0,294 |
| 35 | 0,512 | 0,0942 | 0,1104 | 0,0162 | 0,324 |
| 40 | 0,598 | 0,0941 | 0,1136 | 0,0195 | 0,390 |
| 45 | 0,665 | 0,0937 | 0,1153 | 0,0216 | 0,432 |
| 50 | 0,724 | 0,0968 | 0,1203 | 0,0235 | 0,470 |

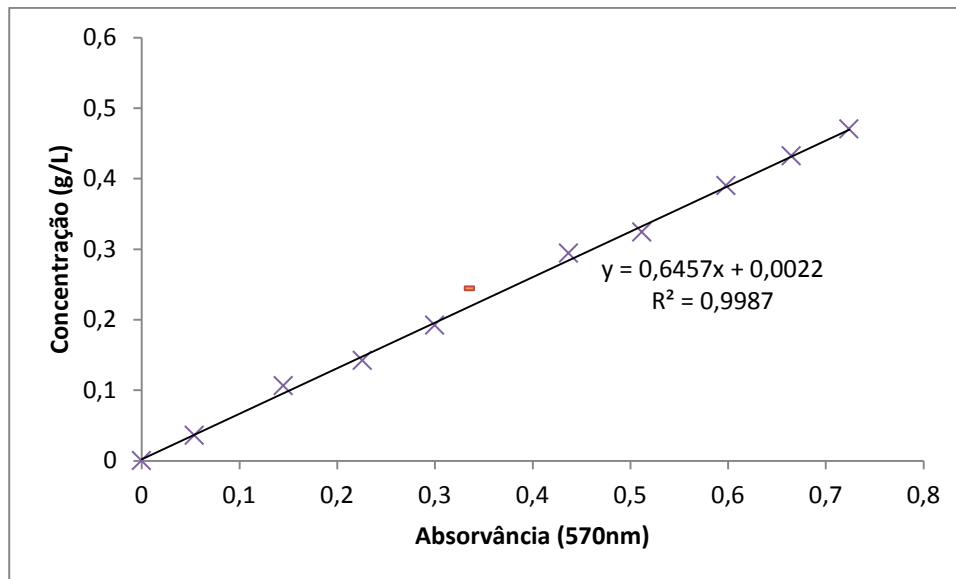


Gráfico 3 - Recta de calibração para a *Chlorella sp.*.

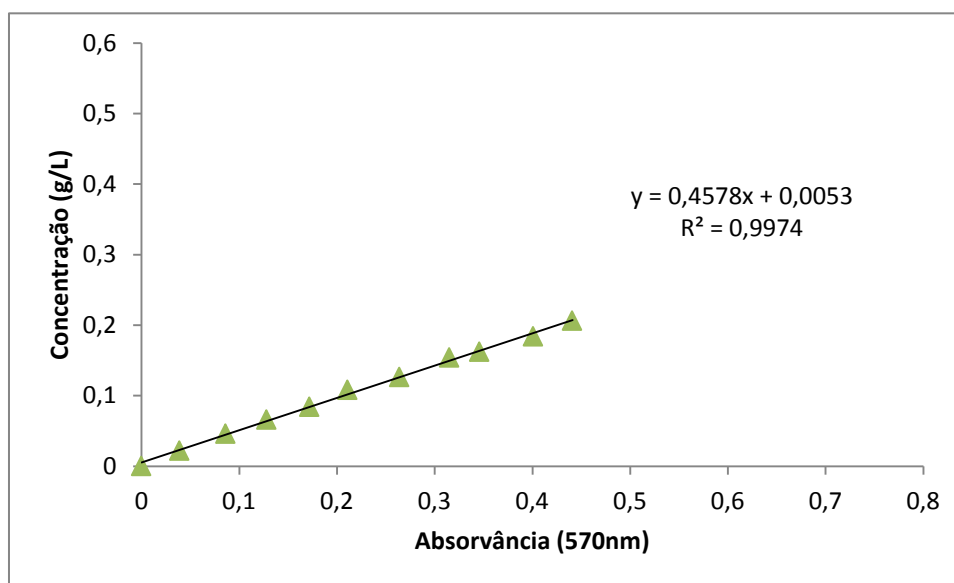
O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0,9987 o que indica uma muita boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 0,6457 * \text{ABS (570nm)} + 0,0022$$

Tabela 9 - Resultados da absorvância, do peso da biomassa e da concentração para a recta de calibração da *Chlorella m.*.

| V Sol. Mãe (mL) | Absorvância | Papel filtro (g) | Papel filtro + biomassa (g) | Biomassa seca (g) | Concentração (g/L) |
|-----------------|-------------|------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------|
| 0 | 0,000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,000 |
| 5 | 0,039 | 0,0955 | 0,0966 | 0,0011 | 0,022 |
| 10 | 0,086 | 0,0935 | 0,0958 | 0,0023 | 0,046 |
| 15 | 0,128 | 0,0984 | 0,1017 | 0,0033 | 0,066 |
| 20 | 0,172 | 0,0944 | 0,0986 | 0,0042 | 0,084 |
| 25 | 0,211 | 0,0952 | 0,1006 | 0,0054 | 0,108 |
| 30 | 0,264 | 0,0954 | 0,1017 | 0,0063 | 0,126 |
| 35 | 0,315 | 0,0939 | 0,1016 | 0,0077 | 0,154 |
| 40 | 0,346 | 0,0939 | 0,1020 | 0,0081 | 0,162 |
| 45 | 0,401 | 0,0940 | 0,1032 | 0,0092 | 0,184 |
| 50 | 0,441 | 0,0945 | 0,1048 | 0,0103 | 0,206 |

**Gráfico 4** - Recta de calibração para a *Chlorella m.*.

O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0.9974 o que indica uma muita boa relação entre a concentração da biomassa algal com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 0,4578 * \text{ABS (570nm)} + 0,0053$$

3.1.2. Açúcares totais e redutores

A determinação colorimétrica do teor de açúcares nas microalgas, foi realizada como descrito anteriormente no capítulo 2 pelos métodos do reagente FS e do reagente DNS. Nas tabelas e gráficos seguintes estão representadas as rectas de calibração para os métodos de avaliação do teor em açúcares totais e açúcares redutores em termos de glucose.

3.1.2.1. Açúcares Totais

Os resultados obtidos para a determinação da recta de calibração referente à análise do teor em açúcares totais estão representados na tabela 10 e gráfico 5.

Tabela 10 - Resultados da absorvância para a recta de calibração dos açúcares totais.

| [glucose] mg/L | Absorvância (490 nm) |
|----------------|----------------------|
| 0 | 0,000 |
| 10 | 0,100 |
| 20 | 0,198 |
| 30 | 0,302 |
| 40 | 0,376 |
| 50 | 0,432 |
| 60 | 0,525 |
| 70 | 0,543 |
| 80 | 0,674 |
| 100 | 0,907 |

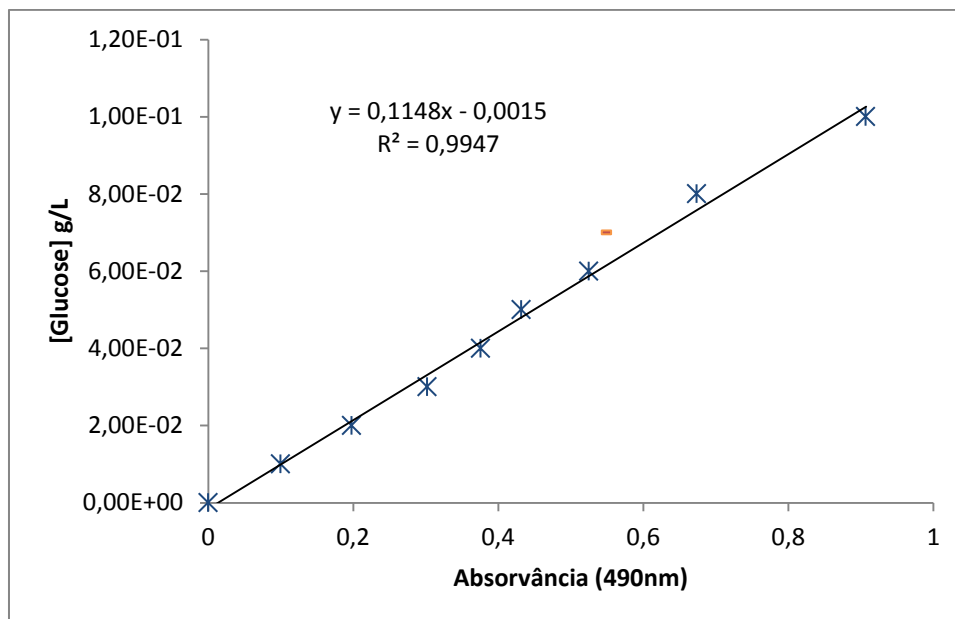


Gráfico 5 - Recta de calibração para os açúcares totais.

O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0,9947 o que indica uma muita boa relação entre a concentração de glucose com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 0,1148 * \text{ABS (490nm)} - 0,0015$$

3.1.2.2. Açúcares Redutores

Os resultados obtidos para a determinação da recta de calibração referente à análise do teor em açúcares redutores estão representados na tabela 11 e gráfico 6.

Tabela 11 - Resultados da absorvância para a recta de calibração dos açúcares redutores.

| [glucose] g/L | Absorvância (540 nm) |
|---------------|----------------------|
| 0 | 0 |
| 0,075 | 0,005 |
| 0,15 | 0,043 |
| 0,3 | 0,127 |
| 0,45 | 0,207 |
| 0,6 | 0,289 |
| 0,75 | 0,358 |
| 0,9 | 0,451 |
| 1,05 | 0,543 |
| 1,2 | 0,628 |
| 1,35 | 0,741 |
| 1,5 | 0,818 |

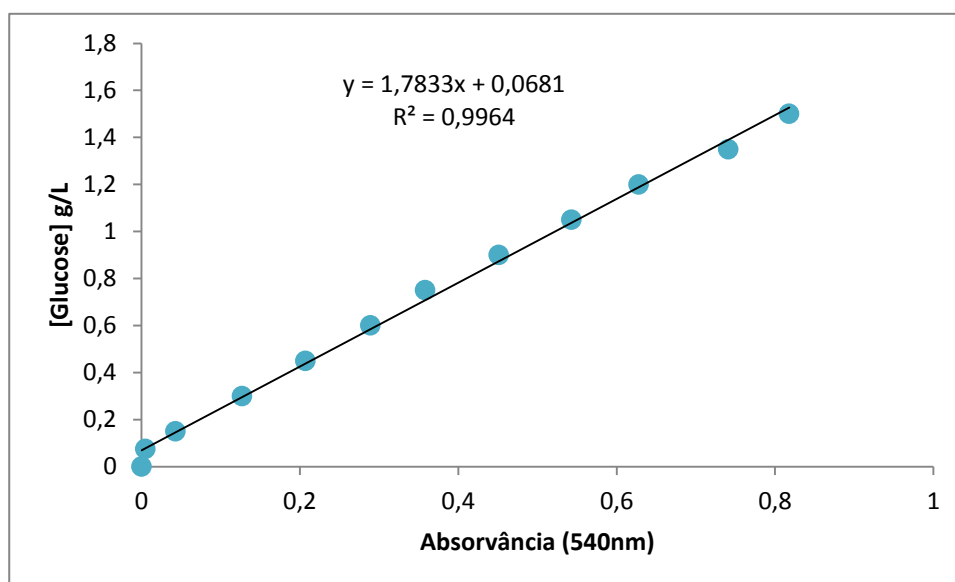


Gráfico 6 - Recta de calibração para os açúcares redutores.

O coeficiente de correlação dos dados com a recta obtida, é de 0,9964 o que indica uma muita boa relação entre a concentração de glucose com a absorvância lida em espectrofotómetro.

Se se quiser obter a concentração quando lida a absorvância utiliza-se a expressão:

$$C \text{ (g/L)} = 1,7833 * \text{ABS (540nm)} + 0,0681$$

3.2. Elaboração de curvas de crescimento

O objetivo destes ensaios, foi de avaliar o crescimento com diferentes meios de composição, bem como com diferentes condições de crescimento.

Os meios de crescimento utilizados foram os seguintes:

- O meio de nutrientes indicado para a manutenção das microalgas (M7);
- O meio de nutrientes de cultura autotrófica (BG11);
- O meio que resultou do efluente da Zona Húmida Construída;
- O meio proveniente da aquocultura.

Na tabela 13 e nos gráficos 7 apresenta-se a curva de crescimento das microalgas em termos de absorvância e de concentrações, respetivamente, em meio M7, tendo-se observado uma evolução equivalente para todas as microalgas. Não houve leituras de pH, uma vez que o meio e a sua evolução já tinham sido estudados anteriormente.

3.2.1. Caracterização do efluente da Zona Húmida Construída

Uma vez que não era conhecida a composição do efluente da ZHC, foram realizados ensaios, a cada nova inóculo, para determinar o teor em fósforo, azoto e carência química de oxigénio.

Tabela 12 - Caracterização do efluente da Zona Húmida Construída.

| | Azoto total /mg/L) | Fósforo total (mg/L) | COD (mg/L) |
|-------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Reactor #2 | 14,60 | 3,48 | 23,25 |
| Reactor #3 | 15,85 | 7,90 | 32,50 |
| Reactor #4 | 7,65 | 6,49 | 47,5 |
| Reactor #5 | 5,77 | 6,55 | 26,5 |
| Reactor #6 | 5,77 | 6,55 | 26,5 |

3.2.2. Crescimento em Balão de Erlenmeyer

3.2.2.1. Crescimento em meio M7

3.2.2.1.1. Crescimento em meio M7 *Anabaena sp.*, *Spirogyra sp.*, *Chlorella m.*, *Chlorella sp.*

Para este crescimento simplesmente foram medidos os valores de absorvância para posterior cálculo da concentração, uma vez que consideramos um processo de fed – batch, uma vez que ao longo do tempo ia sendo adicionado meio fresco. Pela mesma razão não foram calculadas taxas de crescimento, uma vez que houve muitas perturbações devido às sucessivas adições.

Tabela 13 - Resultados das concentrações para o crescimento das microalgas em Balão de Erlenmeyer e em meio M7.

| Tempo (dias) | Concentração Spirogyra (g/L) | Concentração Anabaena (g/L) | Concentração Chlorella m. (g/L) | Concentração Chlorella sp (g/L) |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|--|
| 0 | 0,534 | 0,435 | 0,144 | 0,526 |
| 14 | 0,506 | 0,296 | 0,075 | 0,235 |
| 17 | 0,156 | 0,095 | 0,028 | 0,054 |
| 24 | 0,153 | 0,133 | 0,046 | 0,086 |
| 29 | 0,215 | 0,192 | 0,054 | 0,116 |
| 31 | 0,230 | 0,227 | 0,057 | 0,123 |
| 38 | 0,151 | 0,275 | 0,066 | 0,169 |
| 52 | 0,367 | 0,389 | 0,116 | 0,303 |

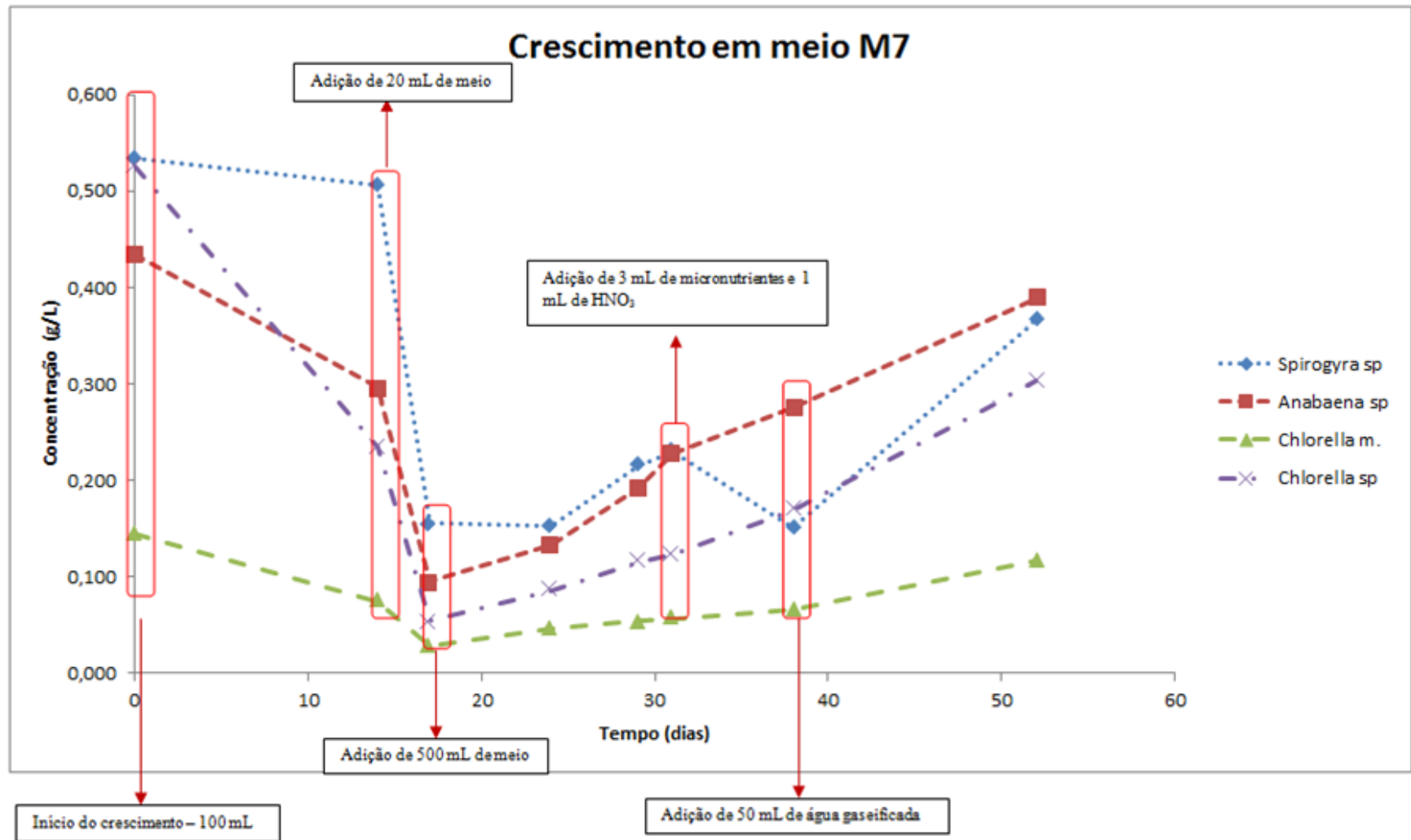


Gráfico 7 - Curva de crescimento das microalgas em processo batch, para determinação do peso seco.

3.2.2.2. Crescimento em meio BG11

3.2.2.2.1. Primeiro crescimento *Anabaena sp.*, *Spirogyra sp.*, *Chlorella m.*, *Chlorella sp.*

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 14, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 8, e de evolução do pH, no gráfico 9, apresentadas de seguida.

Tabela 14 - Resultados da concentração para determinação do peso seco.

| Tempo (dias) | Concentração <i>Spirogyra sp</i> (g/L) | Concentração <i>Anabaena sp</i> (g/L) | Concentração <i>Chlorella m.</i> (g/L) | Concentração da <i>Chlorella sp</i> (g/L) |
|--------------|--|---------------------------------------|--|---|
| 0,00 | 0,212 | 0,288 | 0,073 | 0,273 |
| 4,00 | 0,193 | 0,421 | 0,090 | 0,370 |
| 11,00 | 0,383 | 0,445 | 0,079 | 0,332 |
| 19,00 | 0,357 | 0,554 | 0,098 | 0,416 |

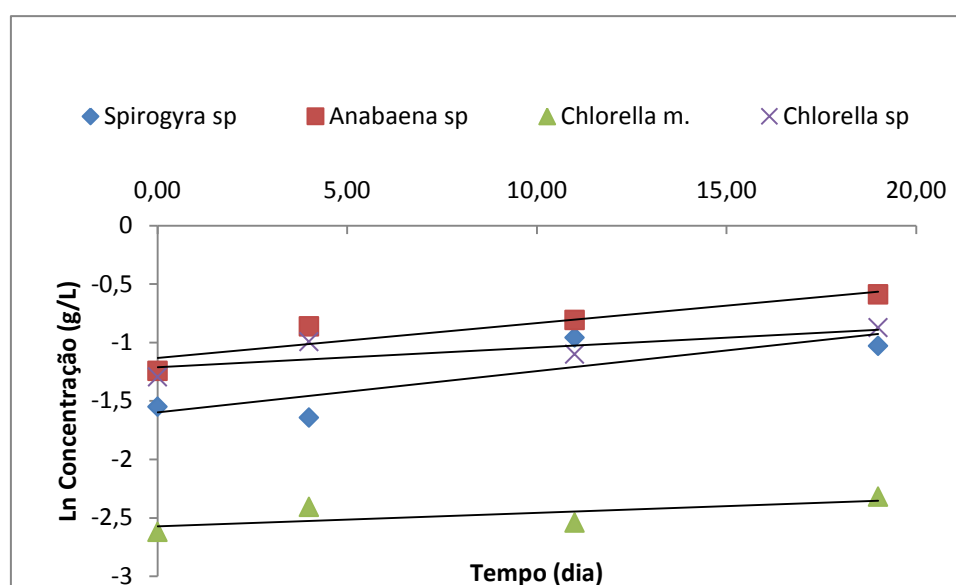


Gráfico 8 - Linearização da concentração em função do tempo.

Tabela 15 - Parâmetros cinéticos do primeiro crescimento em meio BG11.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r^2 |
|---------------------|----------------------------|----------|--------|
| <i>Spirogyra sp</i> | 0,0353 | 20 | 0,7025 |
| <i>Anabaena sp</i> | 0,0299 | 23 | 0,8290 |
| <i>Chlorella m.</i> | 0,0115 | 60 | 0,5035 |
| <i>Chlorella sp</i> | 0,0169 | 41 | 0,6287 |

Através da visualização gráfica, pode-se concluir que as quatro microalgas não apresentam uma curva de crescimento característica, não apresentando uma fase estacionária nem a fase de morte, mostrando apenas uma fase de crescimento exponencial, mas com uma taxa específica máxima, constante e muito baixa. Este facto explica-se pelo facto de o meio BG₁₁ não ser um meio de crescimento mas sim de manutenção da microalga.

| Tempo (dias) | pH Spirogyra sp | pH Anabaena sp | pH Chlorella m. | pH Chlorella sp |
|--------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 9,38 | 9,38 | 8,63 | 9,50 |
| 4 | 9,62 | 9,97 | 8,55 | 9,85 |
| 11 | 10,07 | 10,07 | 8,74 | 9,72 |
| 19 | 9,80 | 10,14 | 8,72 | 9,74 |

Tabela 16 - Resultados do pH das microalgas durante o crescimento.

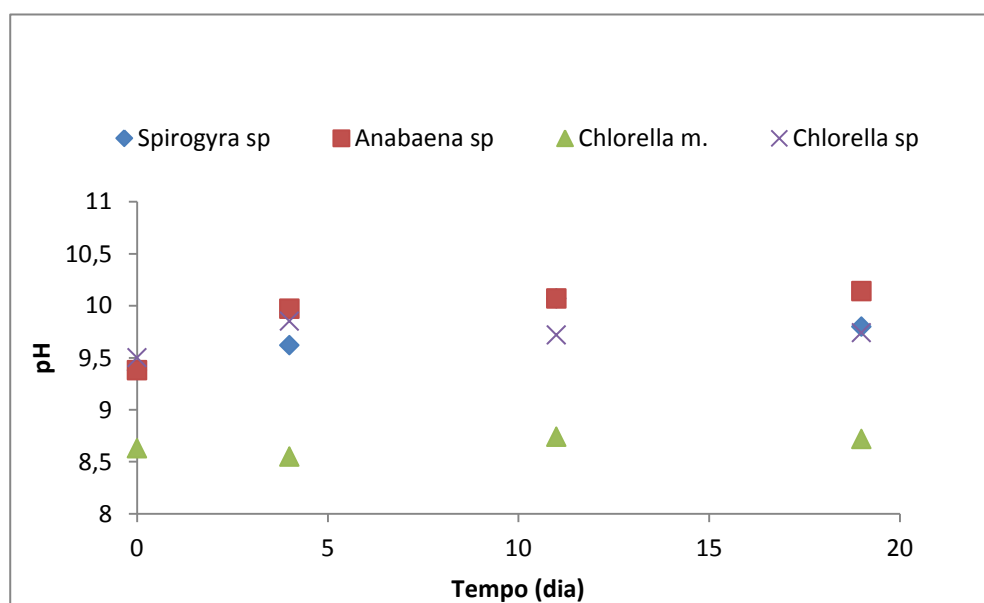


Gráfico 9 - Variação do pH em função do tempo.

Por observação do gráfico pode-se observar que o pH foi aumentando de uma forma linear ao longo do crescimento.

3.2.2.2. Segundo crescimento *Spirogyra sp.*, *Chlorella m.*, *Chlorella sp.*

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 17, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 10, e de evolução do pH, no gráfico 11, apresentadas de seguida.

Tabela 17 - Resultados da concentração para determinação do peso seco.

| Tempo (dias) | Concentração <i>Spirogyra sp</i> (g/L) | Concentração <i>Chlorella m.</i> (g/L) | Concentração da <i>Chlorella sp</i> (g/L) |
|--------------|--|--|---|
| 0 | 0,038 | 0,022 | 0,039 |
| 2 | 0,040 | 0,020 | 0,054 |
| 5 | 0,055 | 0,024 | 0,060 |
| 9 | 0,059 | 0,035 | 0,087 |
| 12 | 0,061 | 0,035 | 0,095 |
| 14 | 0,090 | 0,039 | 0,111 |
| 16 | 0,094 | 0,043 | 0,106 |
| 19 | 0,151 | 0,043 | 0,074 |
| 20 | 0,095 | 0,044 | 0,109 |
| 21 | 0,116 | 0,045 | 0,113 |
| 23 | 0,094 | 0,041 | 0,122 |
| 26 | 0,078 | 0,043 | 0,118 |
| 28 | 0,107 | 0,043 | 0,128 |

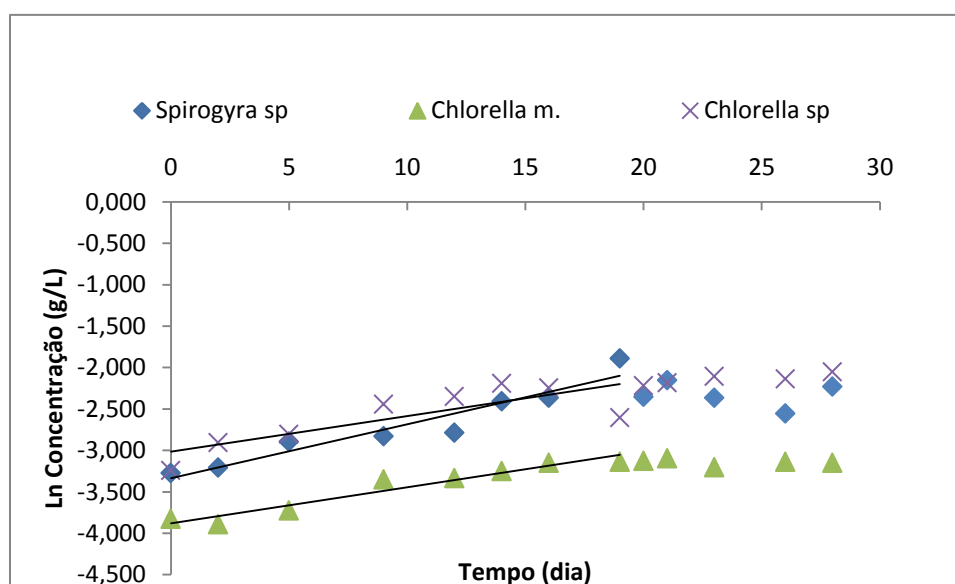


Gráfico 10 - Linearização da concentração em função do tempo.

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos do segundo crescimento em meio BG11.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² |
|---------------------|----------------------------|----------|----------------|
| <i>Spirogyra sp</i> | 0,0650 | 11 | 0,9153 |
| <i>Chlorella m.</i> | 0,0435 | 16 | 0,9380 |
| <i>Chlorella sp</i> | 0,0429 | 16 | 0,6464 |

Através da visualização gráfica, pode-se concluir que as quatro microalgas não apresentam uma curva de crescimento característica, mostrando uma fase de crescimento exponencial e uma fase estacionária, mas com uma taxa específica máxima, constante e muito baixa.

Tabela 19 - Resultados do pH das microalgas durante o crescimento.

| Tempo (dias) | pH Spirogyra sp | pH Chlorella m. | pH Chlorella sp |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 7,74 | 7,81 | 7,99 |
| 2 | 8,83 | 7,98 | 9,56 |
| 5 | 9,00 | 8,03 | 9,42 |
| 9 | 9,19 | 8,21 | 9,95 |
| 12 | 9,15 | 8,28 | 9,76 |
| 14 | 9,80 | 8,52 | 10,05 |
| 16 | 10,09 | 8,69 | 9,92 |
| 19 | 10,59 | 8,92 | 9,90 |
| 20 | 10,52 | 8,92 | 10,02 |
| 21 | 10,58 | 8,72 | 9,93 |
| 23 | 10,32 | 8,77 | 9,75 |
| 26 | 9,97 | 8,64 | 9,64 |
| 28 | 10,41 | 8,57 | 9,52 |

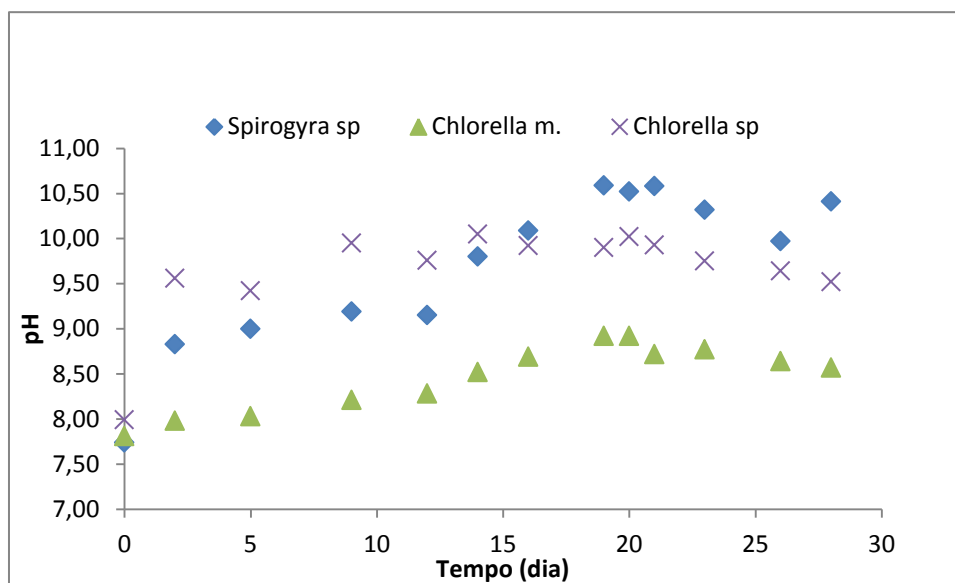


Gráfico 11 - Variação do pH em função do tempo.

Por observação do gráfico pode-se observar que o pH foi aumentando de uma forma linear ao longo do crescimento.

Pode-se analisar entre o primeiro e o segundo crescimento feito em meio BG11, que com o aumento da temperatura a taxa de crescimento das microalgas é mais alta. Isto não se deve necessariamente ao fato de haver variação na temperatura, mas poderá ser do volume de meio, uma vez que no primeiro crescimento era de ± 100 mL e no segundo crescimento era de ± 1500 mL, tendo como consequência a limitação de CO_2 , uma vez que o tamanho do filme é maior, devido ao seu volume, e porque o crescimento é feito sem arejamento.

3.2.2.2.3. Terceiro crescimento *Spirogyra sp.*, *Chlorella m.*, *Chlorella sp.*

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 20, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 12, e de evolução do pH, no gráfico 13, apresentadas de seguida.

Tabela 20 - Resultados da concentração para determinação do peso seco.

| Tempo (dias) | Concentração <i>Spirogyra sp.</i> (g/L) | Concentração <i>Chlorella m.</i> (g/L) | Concentração da <i>Chlorella sp.</i> (g/L) |
|--------------|---|--|--|
| 0 | 0,025 | 0,020 | 0,042 |
| 3 | 0,022 | 0,022 | 0,047 |
| 6 | 0,050 | 0,032 | 0,069 |
| 10 | 0,061 | 0,034 | 0,089 |
| 13 | 0,047 | 0,038 | 0,098 |
| 15 | 0,085 | 0,046 | 0,126 |
| 17 | 0,104 | 0,041 | 0,127 |
| 20 | 0,086 | 0,047 | 0,151 |
| 23 | 0,318 | 0,047 | 0,141 |
| 26 | 0,228 | 0,054 | 0,181 |
| 28 | 0,087 | 0,054 | 0,188 |
| 30 | 0,142 | 0,057 | 0,200 |
| 33 | 0,393 | 0,060 | 0,226 |

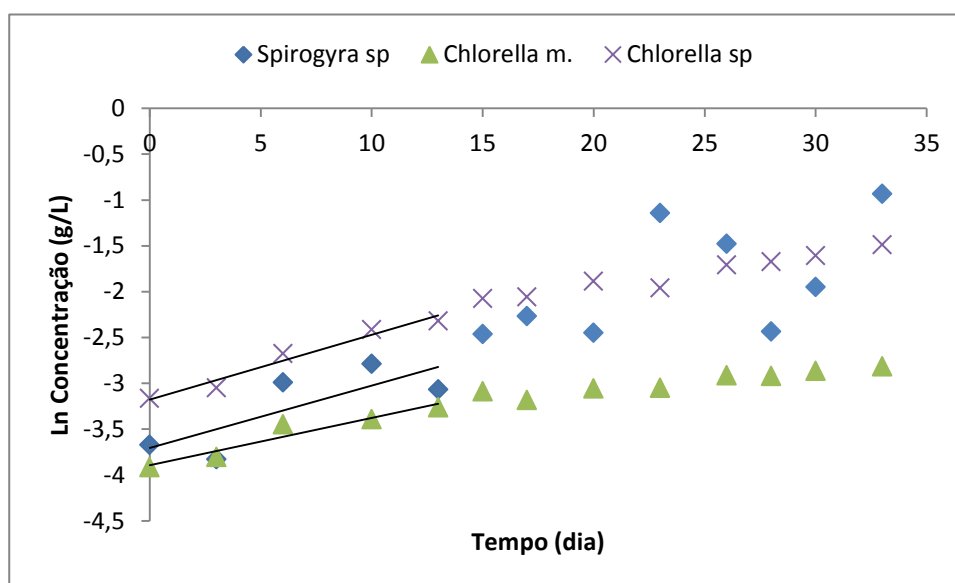


Gráfico 12 - Linearização da concentração em função do tempo.

Tabela 21 - Parâmetros cinéticos para o terceiro crescimento em meio BG11.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² |
|---------------------|----------------------------|----------|----------------|
| <i>Spirogyra sp</i> | 0,0680 | 10 | 0,6127 |
| <i>Chlorella m.</i> | 0,0515 | 13 | 0,9188 |
| <i>Chlorella sp</i> | 0,0705 | 10 | 0,9652 |

Através da visualização gráfica, pode-se concluir que as três microalgas não apresentam uma curva de crescimento característica, mostrando uma fase de crescimento exponencial e uma fase estacionária, mas com uma taxa específica máxima, constante e muito baixa. Este facto explica-se pelo facto de o meio BG11 pode não ser o melhor meio para o crescimento das microalgas.

Tabela 22 - Evolução do pH das microalgas durante o crescimento.

| Tempo (dias) | pH <i>Spirogyra sp.</i> | pH <i>Chlorella m.</i> | pH <i>Chlorella sp.</i> |
|--------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 | 7,45 | 7,74 | 7,85 |
| 3 | 7,8 | 8,04 | 9,08 |
| 6 | 8,54 | 8,23 | 9,59 |
| 10 | 9,39 | 8,17 | 9,87 |
| 13 | 9,38 | 8,36 | 9,95 |
| 15 | 9,48 | 8,48 | 9,76 |
| 17 | 9,6 | 8,4 | 10,02 |
| 20 | 9,42 | 8,41 | 9,51 |
| 23 | 9,5 | 8,45 | 9,54 |
| 26 | 9,71 | 8,53 | 10,06 |
| 28 | 9,47 | 8,47 | 9,71 |
| 30 | 10,3 | 8,64 | 9,46 |
| 33 | 9,8 | 8,24 | 9,46 |

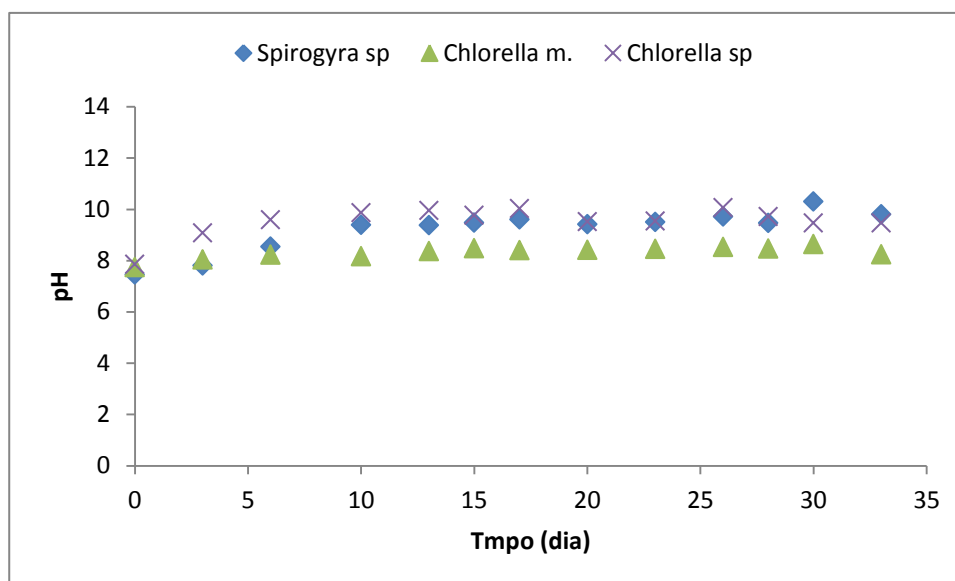


Gráfico 13 - Variação do pH em função do tempo.

Por observação do gráfico 13 pode-se observar que o pH aumentou apenas ligeiramente ao longo do crescimento.

Dos gráficos anteriores, referentes ao crescimento em meio BG11, sabemos que o que obteve a taxa específica de crescimento mais elevada foi a espécie *Spirogyra sp*, uma vez que tem os valores menos alterados.

Quanto à evolução do pH nos vários crescimentos ao longo do tempo, regista-se um aumento de pH durante a fase de crescimento.

3.2.3. Ensaio em fotobiorreator

3.2.3.1. Crescimento em meio BG11

3.2.3.1.1. Primeiro crescimento *Anabaena sp.* (Reactor#1)

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 23, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 14 e de evolução do pH, no gráfico 15, apresentadas de seguida.

Tabela 23 - Resultados da concentração do crescimento em fotobiorreactor para a *Anabaena sp.*.

| Crescimento (h) | Absorvância (570nm) | pH | Concentração (g/L) |
|-----------------|---------------------|------|--------------------|
| 0,00 | 0,060 | 8,99 | 0,082 |
| 2,75 | 0,095 | 8,86 | 0,117 |
| 5,75 | 0,184 | 9,26 | 0,206 |
| 6,75 | 0,224 | 9,24 | 0,245 |
| 7,79 | 0,284 | 9,28 | 0,305 |
| 8,92 | 0,309 | 9,19 | 0,330 |
| 9,75 | 0,329 | 9,26 | 0,350 |
| 12,75 | 0,269 | 6,55 | 0,290 |
| 13,77 | 0,468 | 9,43 | 0,489 |
| 14,69 | 0,431 | 8,16 | 0,452 |

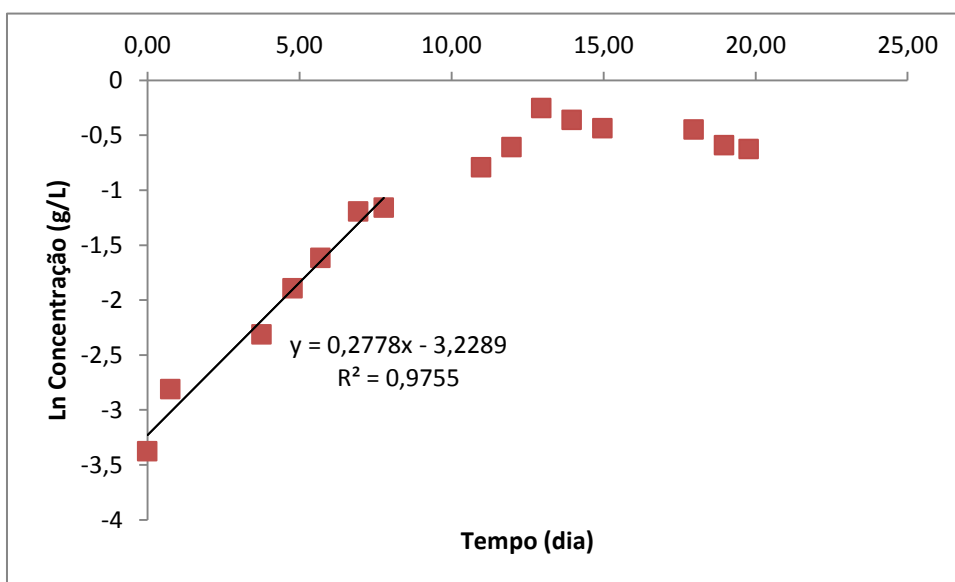


Gráfico 14 - Linearização da concentração para a *Anabaena sp* em fotobiorreactor.

Tabela 24 - Parâmetros cinéticos para o primeiro crescimento em fotobiorreactor em meio BG11.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² | Produtividade |
|---------------------|----------------------------|----------|----------------|---------------|
| <i>Anabaena sp.</i> | 0,1700 | 4 | 0,9932 | 0,243 (g/L) |

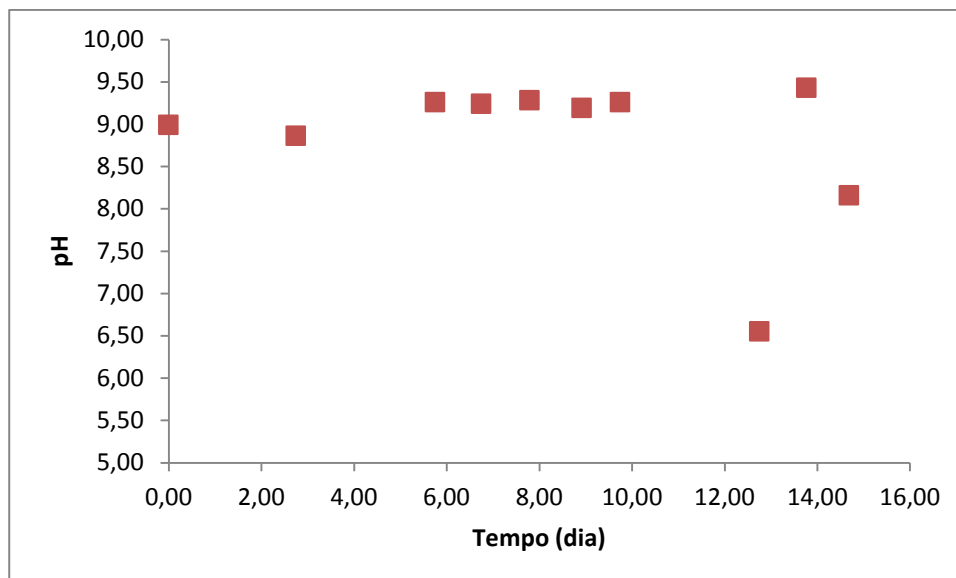


Gráfico 15 - Variação do pH para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor

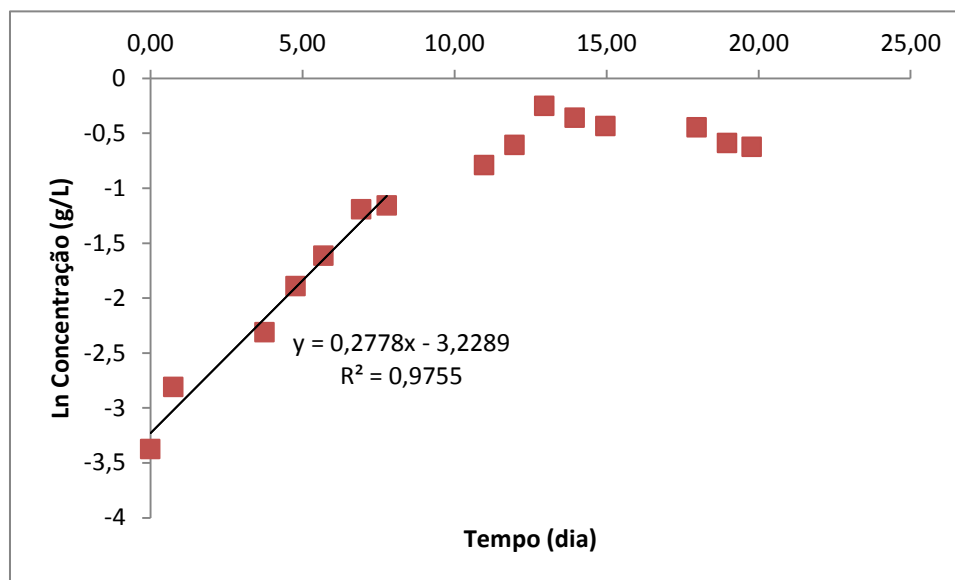
3.2.3.2. *Crescimentos em efluente das Zonas Húmidas Construídas*

3.2.3.2.1. *Primeiro crescimento Anabaena sp. (Reactor #2)*

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 25, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 16 e de evolução do pH, no gráfico 17, apresentadas de seguida.

Tabela 25 - Resultados das absorvâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreactor, em efluente do tanque de macrófitas para a *Anabaena sp.*.

| Crescimento (dia) | Absorvância (570nm) | pH | Concentração (g/L) |
|-------------------|---------------------|-------|--------------------|
| 0,00 | 0,012 | 8,99 | 0,034 |
| 0,75 | 0,038 | 8,90 | 0,060 |
| 3,75 | 0,077 | 7,21 | 0,099 |
| 4,77 | 0,129 | 9,25 | 0,151 |
| 5,69 | 0,177 | 9,10 | 0,199 |
| 6,94 | 0,282 | 8,46 | 0,303 |
| 7,77 | 0,293 | 9,34 | 0,314 |
| 10,98 | 0,433 | 9,26 | 0,454 |
| 11,98 | 0,524 | 9,30 | 0,544 |
| 12,95 | 0,758 | 9,18 | 0,778 |
| 13,96 | 0,677 | 10,04 | 0,697 |
| 14,96 | 0,626 | 10,15 | 0,646 |
| 17,96 | 0,618 | 10,11 | 0,638 |
| 18,97 | 0,534 | 9,79 | 0,554 |
| 19,78 | 0,515 | 9,30 | 0,535 |

**Gráfico 16** - Linearização da concentração para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.**Tabela 26** - Parâmetros cinéticos para o primeiro crescimento em efluente das ZHC.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² | Produtividade |
|--------------------|----------------------------|----------|----------------|---------------|
| <i>Anabaena sp</i> | 0,277 | 2 | 0,9755 | 1,096 (g/L) |

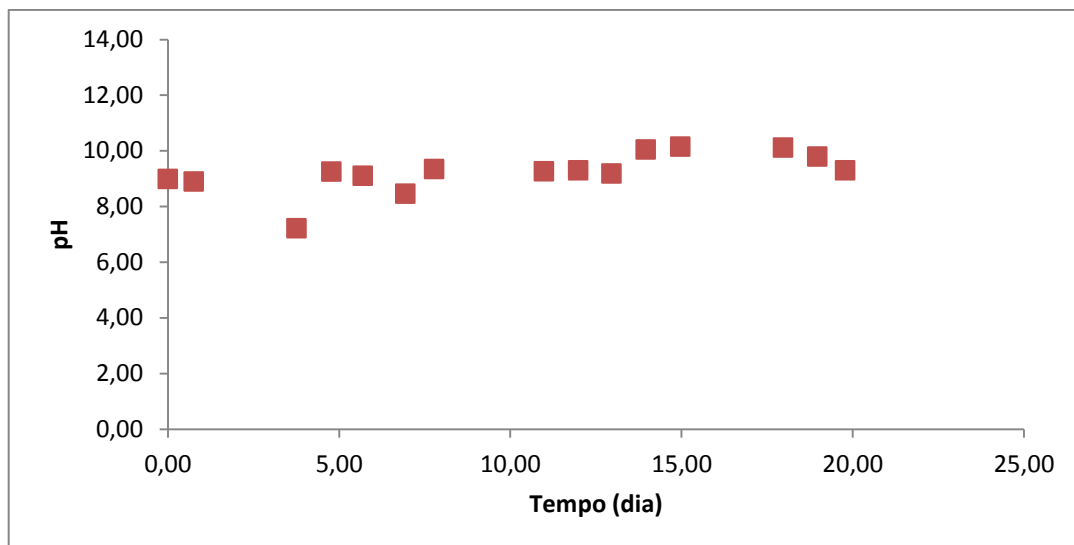


Gráfico 17 - Variação do pH para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.

3.2.3.2.2. Segundo crescimento *Anabaena sp.* (Reactor #3)

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 27, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 18, e de evolução do pH, no gráfico 19, apresentadas de seguida.

Tabela 27 - Resultados das absorvâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreactor, em efluente das ZHC para a *Anabaena sp.*.

| Crescimento (dia) | Absorvância (570nm) | pH | Concentração (g/L) |
|-------------------|---------------------|------|--------------------|
| 0,00 | 0,001 | 7,64 | 0,023 |
| 1,93 | 0,028 | 8,70 | 0,050 |
| 3,74 | 0,036 | 8,81 | 0,058 |
| 6,92 | 0,088 | 9,06 | 0,110 |
| 8,95 | 0,125 | 9,08 | 0,147 |
| 10,95 | 0,150 | 9,02 | 0,172 |
| 13,93 | 0,181 | 9,06 | 0,203 |
| 15,93 | 0,228 | 9,19 | 0,249 |
| 17,93 | 0,257 | 8,82 | 0,278 |
| 20,93 | 0,285 | 8,74 | 0,306 |
| 22,93 | 0,298 | 8,77 | 0,319 |
| 27,93 | 0,323 | 8,80 | 0,344 |
| 29,93 | 0,336 | 8,75 | 0,357 |
| 31,92 | 0,344 | 8,78 | 0,365 |
| 34,93 | 0,292 | 8,65 | 0,313 |

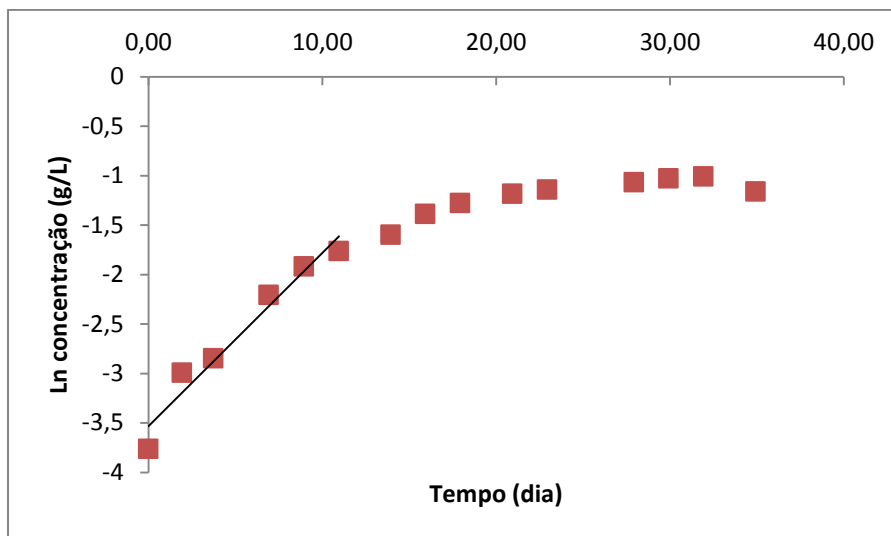


Gráfico 18 - Linearização da concentração para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.

Tabela 28 - Parâmetros cinéticos para o segundo crescimento em efluente das ZHC.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² | Produtividade |
|--------------------|----------------------------|----------|----------------|---------------|
| <i>Anabaena sp</i> | 0,175 | 4 | 0,9544 | 0,711 (g/L) |

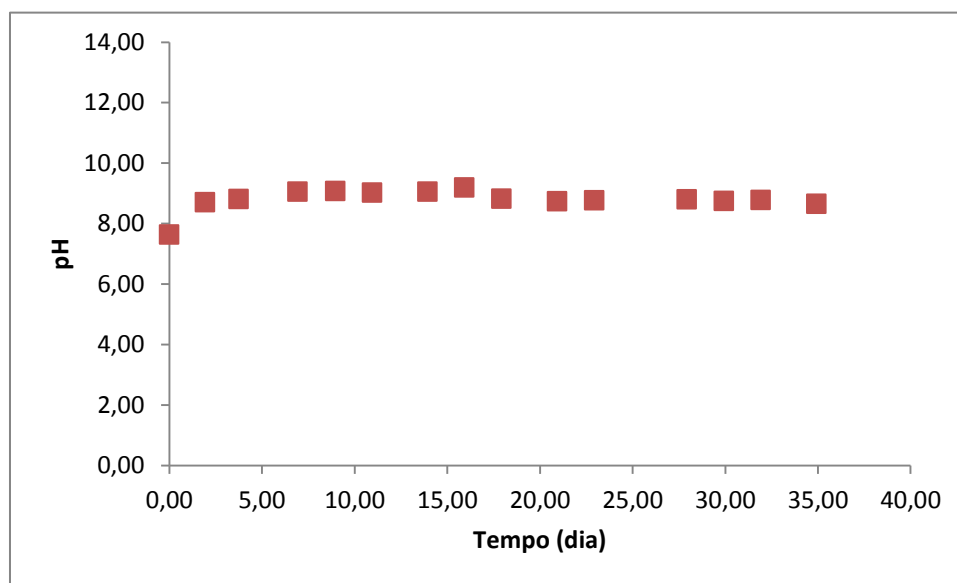


Gráfico 19 - Variação do pH para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.

3.2.3.2.3. Terceiro crescimento *Anabaena sp.* (Reactor #4)

Após a recolha de absorvância e do valor de pH do meio, foram calculadas as respectivas concentrações, visíveis na tabela 29, através da curva de calibração estabelecida anteriormente, tendo resultado a curva de crescimento, no gráfico 20, e de evolução do pH, no gráfico 21, apresentadas de seguida.

Tabela 29 - Resultados das absrovrâncias, pH e concentração do crescimento em fotobiorreactor, em efluente das ZHC para a *Anabaena sp.*

| Crescimento (dia) | Absorvância (570nm) | pH | Concentração (g/L) |
|-------------------|---------------------|------|--------------------|
| 0,00 | 0,000 | 7,91 | 0,022 |
| 1,00 | 0,009 | 9,12 | 0,031 |
| 2,00 | 0,014 | 9,04 | 0,036 |
| 4,98 | 0,027 | 9,20 | 0,049 |
| 6,98 | 0,062 | 9,29 | 0,084 |
| 8,98 | 0,062 | 9,34 | 0,084 |
| 11,98 | 0,178 | 9,59 | 0,200 |
| 13,99 | 0,109 | 9,62 | 0,131 |
| 18,98 | 0,171 | 9,18 | 0,193 |
| 20,98 | 0,146 | 9,27 | 0,168 |
| 22,99 | 0,187 | 9,39 | 0,209 |
| 25,98 | 0,200 | 9,00 | 0,222 |
| 27,98 | 0,248 | 7,41 | 0,269 |
| 29,98 | 0,226 | 9,15 | 0,247 |
| 32,98 | 0,232 | 8,26 | 0,253 |

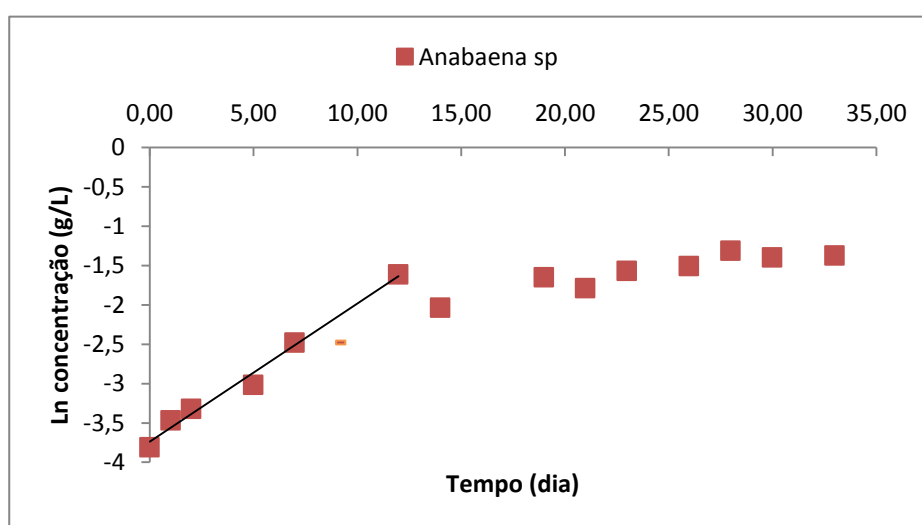
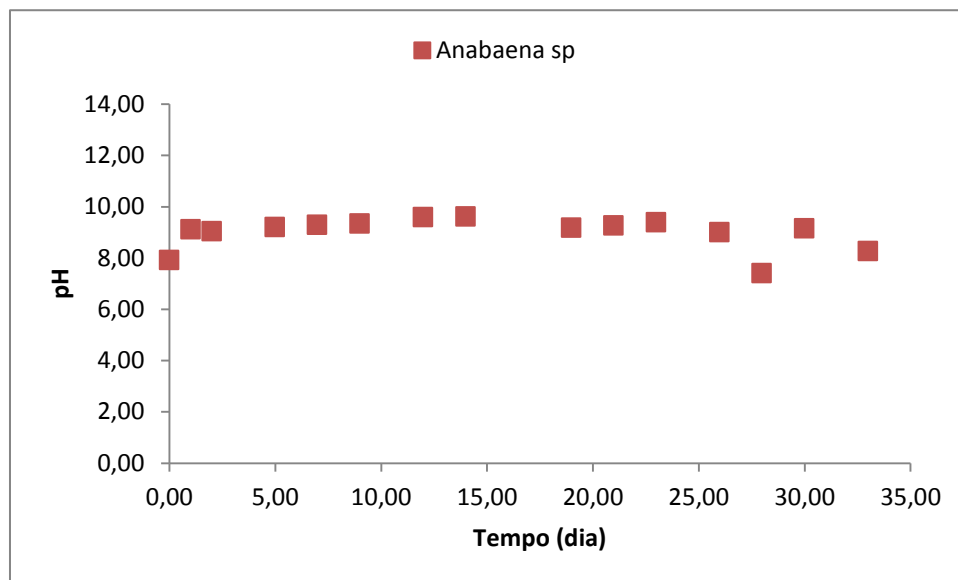


Gráfico 20 - Linearização da concentração para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.

Tabela 30 - Parâmetros cinéticos para o terceiro crescimento em efluente das ZHC.

| | μ (dia ⁻¹) | Td (dia) | r ² | Produtividade |
|--------------------|----------------------------|----------|----------------|---------------|
| <i>Anabaena sp</i> | 0,176 | 3 | 0,9866 | 0,56 |

Gráfico 21 - Variação do pH para a *Anabaena sp.* em fotobiorreactor em efluente das ZHC.

Após ter sido escolhida a microalga *Anabaena sp.*, para um estudo mais específico, obteve-se tanto uma taxa específica de crescimento mais elevada como uma maior concentração final de biomassa. Este reactor operou a uma temperatura de $25^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante aproximadamente 20 dias.

O segundo e terceiro crescimento, com temperatura de $15^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $29^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, respectivamente, alcançou-se uma taxa específica de crescimento muito semelhante, e uma produtividade de 0,711 g/L e de 0,56 g/L, respectivamente, ficando muito aquém do esperado.

Já os resultados das medições de pH mostram a mesma tendência dos ensaios em meio BG11, realizados em balão de Erlenmeyer, isto é, o valor de pH acompanha o crescimento celular, havendo valores mais elevados nas inoculações com maior crescimento.

3.3. Quantificação de óleos nas microalgas

Para determinar a percentagem de óleos presentes nas microalgas utiliza-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ Gordura} = \frac{m_1 - m_2}{m_3} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

m_1 – massa balão + massa da gase orgânica (g)

m_2 – massa balão (g)

m_3 – massa amostra (g)

Tabela 31 - Percentagem de óleos presentes na biomassa algal das diferentes microalgas.

| Microalga | % Gordura |
|---------------------------|------------------|
| <i>Spirogyra sp.</i> | 86,48 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#1) | 345,38 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#2) | 161,22 |
| <i>Chlorella sp.</i> | 10,66 |

Não foram feitas mais análises do teor de óleos à biomassa dos restantes reactores uma vez que a quantidade de amostra precisa para efectuar a análise não era a suficiente, o que levaria a uma alteração dos valores finais, da mesma forma que já os valores obtidos, uma vez que a biomassa não foi sempre a mesma teve resultados que aparentemente não são concordantes.

Destes valores não concordantes, obtivemos também valores completamente fora do normal, sobre os quais não vamos tirar conclusões.

3.4. Quantificação de açúcares totais e redutores

Relativamente às tabelas 34 e 35, estão os resultados obtidos em termos de açúcares totais e açúcares redutores, respetivamente, obtidos para cada uma das microalgas. As primeiras análises realizadas foram das microalgas utilizadas para as rectas de calibração.

Segundo, (Miranda, 2011) a percentagem de açúcares redutores é superior à percentagem de açúcares totais. Isso foi verificado na nossa análise, excetuando para as microalgas *Spirogyra sp* e *Anabaena sp*, que tiveram maior percentagem de açúcares totais do que de açúcares redutores.

Isto pode ser explicado devido à hidrólise ácida realizada antes dos métodos FS e DNS, uma vez que a hidrólise poderá converter toda a glucose em monómeros, fazendo com que a presença de amido seja diminuída.

As tabelas 32 e 33 foram elaboradas através de crescimentos realizados no fim do ano transacto. Daí haver crescimentos em meio M7 e em Filtralite, sobre os quais também não iremos retirar quaisquer tipos de conclusão.

Tabela 32 - Resultados dos açúcares totais nas microalgas.

| Microalgas | Biomassa (g) | [Glucose] mg/L | Diluição | [Glucose] (250 mL) | % Açúcares totais |
|---------------------------|--------------|----------------|----------|--------------------|-------------------|
| <i>Spirogyra sp.</i> (F) | 0,0300 | 73,59 | | 18,397 | 61,325 |
| <i>Spirogyra sp.</i> (M7) | 0,1000 | 96,90 | 1 : 2 | 24,225 | 24,225 |
| <i>Anabaena sp.</i> (F) | 0,0500 | 73,25 | | 18,312 | 36,625 |
| <i>Anabaena sp.</i> (M7) | 0,1000 | 113,20 | 1 : 2 | 28,300 | 28,300 |

Tabela 33 - Resultados dos açúcares redutores nas microalgas.

| Microalgas | Biomassa (g) | [Glucose] g/L | Diluição | [Glucose] (250 mL) | % Açúcares redutores |
|---------------------------|--------------|---------------|----------|--------------------|----------------------|
| <i>Spirogyra sp.</i> (F) | 0,03 | 0,0681 | | 0,0170 | 56,750 |
| <i>Spirogyra sp.</i> (M7) | 0,1 | 0,1449 | 1 : 2 | 0,0362 | 36,220 |
| <i>Anabaena sp.</i> (F) | 0,05 | 0,0681 | | 0,0170 | 34,050 |
| <i>Anabaena sp.</i> (M7) | 0,1 | 0,1449 | 1 : 2 | 0,0362 | 36,220 |

Tabela 34 - Resultados dos açúcares totais nas microalgas em estudo.

| Microalgas | Diluição | Absorvância | % Açúcares totais |
|---------------------------|----------|---------------|-------------------|
| <i>Spirogyra sp.</i> | 1:2 | 0,069 | 2,57 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#1) | 1:2 | 0,064 | 2,34 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#2) | 1:2 | 0,308 | 2,26 |
| <i>Chlorella sp.</i> | - | 0,520 | 11,64 |
| <i>Chlorella m.</i> | - | 0,481 | 10,75 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#3) | 1:2 | 0,044 / 0,254 | 6,24 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#4) | 1:2 | 0,427 / 0,036 | 10,03 |

Tabela 35 - Resultados dos açúcares redutores das microalgas em estudo.

| Microalgas | Absorvância | % Açúcares redutores |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>Spirogyra sp.</i> | 0,041 | 28,24 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#1) | 0,040 | 27,89 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#2) | 0,385 | 25,16 |
| <i>Chlorella sp.</i> | 0,017 | 21,11 |
| <i>Chlorella m.</i> | 0,021 | 19,68 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#3) | 0,000 / 0,000 | 13,62 |
| <i>Anabaena sp.</i> (R#4) | 0,064 / 0,004 | 25,75 |

4. Conclusão

Após a realização dos ensaios descritos, conclui-se que a microalga *Anabaena sp.* é mais eficiente que as restantes três espécies em estudo, daí se ter optado por fazer um estudo de crescimento relativamente ao meio e à temperatura com esta microalga.

Pela análise dos parâmetros cinéticos conclui-se que esta se adapta a um melhor crescimento a uma temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, onde atingiu valores de taxa específica de crescimento, tempo de duplicação e produtividade mais elevados.

Assim sendo, e tendo em conta a possível produção de biocombustíveis esta tem um valor de açúcares totais e açúcares redutores bastante mais elevados do que as restantes espécies, sendo que estes valores rondam aproximadamente os 7% e 25%, respectivamente.

Em relação ao valor dos óleos, este não foi conclusivo, uma vez que os valores obtidos experimentalmente foram incoerentes. Mas, sabe-se por estudos anteriores, que as microalgas *Anabaena sp.* e *Spirogyra sp.* são indicadas para produção de bioetanol, uma vez que a sua composição em açúcares é muito mais elevada que a composição dos óleos, e as microalgas *Chlorella sp.* e *Chlorella m.* mais indicadas para a produção de biodiesel devido ao seu elevado teor de óleos.

Assim sendo, em trabalhos futuros, uma vez que o meio proveniente das zonas húmidas construídas foi produtivo, recomenda-se um possível crescimento numa escala maior, isto é, em lagoas do tipo race way, que podem mesmo ser efectuadas nos Laboratórios do Lab.IPT uma vez que existem protótipos destas. Ensaios nesses sistemas poderão ser interessantes para comparar com os resultados obtidos em fotobiorreactor. Se for possível por em prática este tipo de estudos poder-se-á conseguir melhores resultados com as análises de açúcares totais e redutores, bem como dos óleos, visto que se conseguiria maior quantidade de biomassa algal, tal como é necessário para a realização destes ensaios.

Em relação ao estudo do meio e dos fotobiorreactores, é de salientar que a manutenção do banco de algas deverá continuar a ser feita com o meio de manutenção M7, mas aquando da sua inoculação deve ser feito previamente um inóculo com a alga e o meio de crescimento. Em relação aos fotobiorreactores, estes não devem ser do tipo air – lift uma vez que há imensas dificuldades de operação, havendo muita agregação de biomassa às paredes.

Poder-se-ia no entanto, tentar crescimento em fotobiorreactores na horizontal, uma vez que é referenciado em diversos artigos que estes conseguem uma maior produtividade quando comparados com os fotobiorreactores na vertical.

Por fim, é possível afirmar que os resultados do estágio apontam para um cenário favorável de produção de microalgas com águas residuais, em particular das obtidas das Zonas Húmidas Construídas, criando-se assim uma integração de duas tecnologias “verdes”. A rendibilidade desta integração não deixa de estar dependente da evolução das técnicas de separação das algas da fase líquida. Refira-se que os crescimentos foram realizados sem se proceder à desinfecção da água residual, o que é um aspecto positivo para a sustentabilidade da produção de algas. Não se deixa também de reconhecer que a menos que se consiga implementar um processo eficiente de recuperação das microalgas, será necessário proceder à desinfecção ou a outra forma de inertização das microalgas que possam permanecer na água, antes de esta ser descartada no ambiente.

5. Bibliografia

- Ambiente, Agência Portuguesa do. 2013.** Agência Portuguesa do Ambiente. *Ambiente Portugal - Ambição para o Futuro*. [Online] 23 de 09 de 2013. <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=81&sub2ref=119&sub3ref=500>.
- Barbosa, Ana Teresa Perdigão. 2009.** Produção de biohidrogénio pela cianobactéria *Anabaena* sp. 7120 e mutantes. Lisboa : Faculdade de Ciência e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Outubro de 2009.
- Brennan, L. e Owende, P. 2010.** Biofuels from microalgae - A Review of technologies for production, processing, and extractions of bio - fuels and co - products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* . 2010, Vol. 14, 557-577, pp. 557-577.
- Campos, Viviane Borges, Barbarino, Elisabete e Lourenço, Sérgio de Oliveira. 2010.** Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. Tomar : s.n., 22 de Fevereiro de 2010. pp. 339 - 347.
- Carmo, Magda Patrícia Santos. 2012.** Biodiesel de micro - algas: balanço energético e económico. Aveiro, Portugal : s.n., 2012.
- Chisti, Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. 2007, Vol. 25, 294-306.
- Colaço, Luis. 2012.** Utilização de microalgas para mitigação de CO2 industrial. Tomar, Portugal : s.n., Dezembro de 2012.
- Daganzo, Juan M. 2012.** Repsol. *Blog de Innovación Tecnológica*. [Online] 07 de Junho de 2012. [Citação: 25 de Novembro de 2013.] <http://blogs.repsol.com/web/innovacion/inicio/blogs/las-microalgas-echan-carreras-en-la-piscina>.
- Dinis, M. Alzira, Monteiro, Álvaro e Boaventura, Rui. 2004.** Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. Porto : s.n., 2004.
- Diogo, Elsa Maria dos Santos. 2012.** Utilização de Algas na Produção de Bioetanol. Tomar, Portugal : s.n., Dezembro de 2012.
- Energia, Portal. 2012.** *Portal Energia - Energias Renováveis*. [Online] 23 de 09 de 2012. <http://www.portal-energia.com/protocolo-de-quioto/>.

Europeias, Comissão das Comunidades. 2008. Package of Implementation measures for the EU's objectives on climate change renewable energy for 2020. Bruxelas : s.n., 2008.

Huang, GuanHua; Chen, Feng; Wei, Dong, Zhang, XueWu; Chen, Gu. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. 2010, Vol. 87, 38-46, pp. 38-46.

Institute, Worldwatch. 2007. *Biofuels for Transport - Global Potential and Implications for Sustainable Energy and Agricultures*. USA : Earthscan, 2007.

Li, Yanqun; Horsman, Mark; Wu, Nan; Lan, Christopher Q; Calero - Dubois, Nathalie. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnology*. 12 de Março de 2008, Vol. 24, 815-820, pp. 815-820.

Mata, Teresa M., Martins, António A. Martins e Caetano, Nidia S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010, Vol. 14, 217-232, pp. 217-232.

Mateus, D.M.R., Vaz, M.M.N. e Pinho, H.J.O. 2012. Fragmented limestone wastes as a constructed wetland substrate for phosphorus removal. *Ecological Engineering*. 2012, Vol. 41 (1), 65-69.

Miranda, J. R. P. C. 2011. Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmusobliquus*. Caparica : FCT - Universidade Nova de Lisboa, 2011.

Paulo, Vanessa Patrícia Faria. 2011. *Optimização da Produção de Açúcares por Microalgas para a Produção de Bioetanol*. Lisboa : ISA - Universidade Técnica de Lisboa, 2011.

Prescott, L. 2002. *Microbiology, 5 ed.* s.l. : McGraw - Hill, 2002.

Rao, A. R.; Dayananda, C.; Sarada, R.; Shamala, T. R.; Ravishankar, G. A.. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technology*. 2007, Vol. 98 (3), pp. 560-564.

Rosa, Jorge M. C. 2011. *Modelação e Optimização de uma Unidade de Produção de Microalgas*. Coimbra : Universidade de Coimbra, 2011.

Santos, M. A. G. e Almeida, R. S. 2013. *Tratamento e Valorização de Águas Residuais Provenientes de Aquacultura de Água Doce*. Tomar : Instituto Politécnico de Tomar, 2013.

Tavares, João Evandro Brandão. 2009. Cultivo de microalgas do género *Brotryococcus* visando a produção do biodiesel. Lisboa : F.C - Universidade de Lisboa, 2009.

Technology, Ocean Harvest. 2013. *Algaebase*. [Online] 30 de Março de 2013.
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=65635&sk=80&from=results.

— . **2013.** *Algaebase*. [Online] 30 de Março de 2013.
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=145049&sk=20&from=results.

— . **2013.** *Algaebase*. [Online] 30 de Março de 2013.
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51509&sk=0&from=results.

— . **2013.** *Algaebase*. [Online] 30 de Março de 2013.
http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=34616&-session=abv4:BC51F792080f52E7EEUr194CE44.

Vaz, Mafalda M. N. 2010. Zonas Húmidas Artificiais em Biotecnologia Ambiental. Avaliação das Capacidades Adsorventes do Calcário Moleanos Como Material de Enchimento em Leitões Construídos para Remoção de Fósforo. Tomar : Instituto Politécnico de Tomar, 2010.

Vilas Boas, Patrícia e Soraia, Tânia. 2010. *Microalgas aplicadas à produção de biodiesel*. Tomar : Escola Superior de Tecnologia de Tomar - IPT, 2010.

6. Apêndices

6.1. Tabelas informativas

6.1.1. Tabelas de reagentes

Tabela 36 - Tabelas de reagentes utilizados nos procedimentos experimentais.

| NOME | PM (g/mol) | FÓRMULA | PUREZA | OUTRAS CARACTERÍSTICAS | MARCA | UTILIZAÇÃO |
|----------------------------------|------------|---|--------------------|------------------------|-----------------|------------|
| Ácido 3,5 - dinitrossalícilico | 228,12 | $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$ | Puro | --- | Merck | AR |
| Ácido bórico | 61,83 | H_3BO_3 | P.A. | >99% | Pronalab | MC |
| Ácido cítrico | 210,14 | $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ | | | Pronalab | MC |
| Ácido sulfúrico | 98,08 | H_2SO_4 | P.A. | 95% d= 1,84 | Panreac | AT, RC |
| Cloreto de cálcio hidratado | 147,02 | $CaCl_2 \cdot H_2O$ | p.a. | | Merck | MC |
| Carbonato de sódio | 105,99 | Na_2CO_3 | | 99,8% | Panreac | MC |
| D(+)- Glucose monohidratado | 198,17 | $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ | Para microbiologia | $\geq 99\%$ | Fluka | AT; AR |
| EDTA | 372,24 | $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot 2H_2O$ | --- | 98,5% | May&Baer | MC |
| Fenol | 94,11 | C_6H_6O | --- | 99% | Pranlys | AT |
| Fosfato de amônio | 132,06 | $(NH_4)_2HPO_4$ | P.A. | $\geq 96\%$ | Panreac | MC |
| Fosfato monoácido de potássio | 174,18 | K_2HPO_4 | | 99% | Riedel - deHaën | MC |
| Hidróxido de sódio | 40,00 | $NaOH$ | --- | 98,7% | JMGS | AR |
| Nitrato de cobalto hexahidratado | 237,98 | $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | --- | --- | Riedel - deHaën | MC |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|--|------|-------------|-----------------|----|
| Nitrato de potássio | 101,11 | KNO_3 | --- | 99% | Pareac | MC |
| Nitrato de sódio | 84,99 | NaNO_3 | | 99,5% | Sigma - Aldrich | MC |
| Molibdato de sódio | 241,95 | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | --- | 99% | May&Baker | MC |
| Sulfato de cálcio | 136,14 | CaSO_4 | --- | --- | Fisher Chemical | MC |
| Sulfato de cobre pentahidratado | 249,69 | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | --- | $\geq 99\%$ | Pronalab | MC |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | 246,49 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | P.A. | 99,5% | Pronalab | MC |
| Sulfato de ferro (III) amoniacal | 482,19 | $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | | 98,5% | Panreac | MC |
| Sulfato ferroso heptahidratado | 278,02 | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | P.A. | $>98\%$ | Fluka | MC |
| Sulfato de manganês hidratado | 169,02 | $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | --- | $\geq 99\%$ | Riedel - deHaën | MC |
| Sulfato de zinco heptahidratado | 287,54 | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | --- | $\geq 99\%$ | Panreac | MC |
| Tartarato duplo de sódio e potássio | 282,22 | $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | --- | $\geq 99\%$ | Analar | AR |
| Vitamina B ₁₂ | 1355,39 | $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$ | | | AppliChem | MC |

6.2. Registo Fotográfico



Imagem 8 - - Decantação de microalgas.



Imagem 9 - Filtração por vácuo

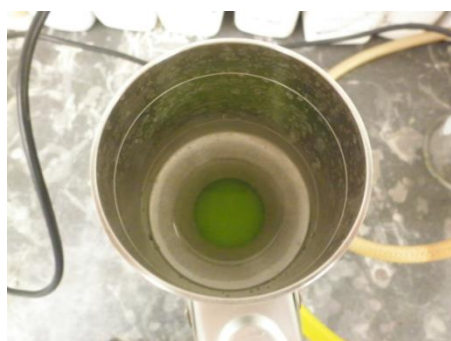


Imagem 10 - Funil de Buchner com meio para filtração.

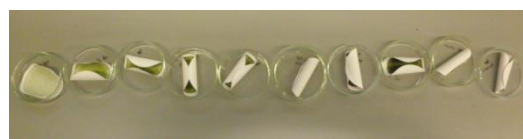


Imagem 11 - Papeis de filtro após filtração e secagem para realizar a recta de calibração.



Imagem 12 - Fotobiorreactor após inoculação.



Imagem 13 - Crescimento da microalga *Anabaena sp.* em PDA.

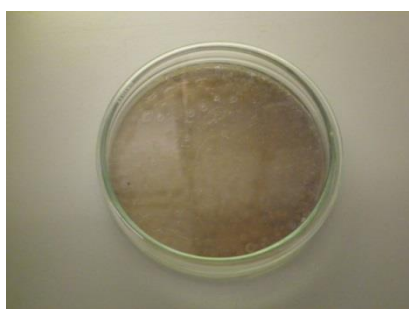


Imagem 14 - Crescimento da microalga *Anabaena sp.* em TSA.



Imagem 15 - Crescimento da microalga *Anabaena sp.* em TSA.



Imagem 16 - Banho de ultra – sons para determinação de óleos.



Imagem 17 - Adição de ácido, após banho de ultra – sons.

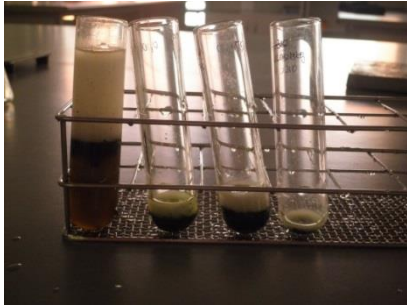


Imagem 18 - Adição de água, após adição de ácido.



Imagem 19 -- Balões de fundo redondo com óleos após evaporação de solventes em rota – vapor.