



DAVID MIGUEL
MARTINS SOUSA

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA AGROALIMENTAR
PARA PRODUZIR SCP ATRAVÉS
DA CULTURA DE MICROALGAS**

Relatório de Dissertação do Mestrado em
Engenharia Biológica e Química

ORIENTADORA

Professora Doutora Carla Amarelo Santos

Dezembro 2019

DAVID MIGUEL
MARTINS SOUSA

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA
INDÚSTRIA AGROALIMENTAR
PARA PRODUZIR SCP ATRAVÉS
DA CULTURA DE MICROALGAS**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de
Figueiredo Gameiro (ESTBarreiro/IPS)

Orientadora: Professora Doutora Carla Amarelo
Santos (ESTBarreiro/IPS)

Vogal: Doutora Teresa Lopes da Silva (LNEG)

Dezembro 2019

VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR PARA PRODUZIR SCP ATRAVÉS DA CULTURA DE MICROALGAS

Mestrado em Engenharia Biológica e Química

Ramos de Processos Biotecnológicos

Dissertação

2019-2020

À minha Família

O pessimista vê dificuldade em cada oportunidade; o otimista vê oportunidade em cada dificuldade.

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Após terminar esta dissertação, não posso deixar de agradecer a todos intervenientes que de alguma forma me acompanharam nesta jornada muito importante não só a nível académico, mas também a nível pessoal.

Quero começar por deixar um agradecimento à minha família, por toda a força que me deram, ao longo desta etapa.

Às funcionárias do bar da ESTBarreiro/IPS, Manuela Ribeiro e Rosa Mota, pela disponibilização das borras de café, à Engenheira Irina Carvalho, da Empresa Fomento da Indústria do Tomate, por ter disponibilizado amostras de repiso de tomate e aos Engenheiros Miguel Cachão e Ana Chambel, da AVIPE, por terem disponibilizado os resíduos de borras e repiso de uva, resíduos estes que serviram como base para o desenvolvimento deste trabalho de investigação.

Quero também deixar um grande agradecimento à minha orientadora a Professora Doutora Carla Santos e à minha colega de laboratório Ana Alves, que me acompanharam e ajudaram ao longo destes meses de investigação e o ânimo que me deram nos momentos mais difíceis que aconteciam durante este estudo.

Aos meus amigos da Sociedade Filarmónica Gualdim Pais, pelo incentivo e o carinho que me deram para terminar esta dissertação.

A todos vós, expresso aqui a minha maior gratidão!

RESUMO

A produção intensiva de produtos agrícolas, como os legumes e frutas, tem vindo a aumentar ano após ano e consequentemente, têm-se registado um aumento da produção de resíduos, derivados a transformação desses mesmos produtos. Muitas vezes este setor apresenta grandes dificuldades em tratar esses resíduos, muitos deles ricos em carbono orgânico, servindo como um substrato ideal para o crescimento de microalgas.

Este trabalho de investigação teve como objetivo o estudo do crescimento de *Chlorella protothecoides* em quatro resíduos agroindustriais, o repiso de tomate, as borras de café, as borras de uva e o repiso de uva, que serviram como fonte de carbono orgânico. Face a estes resíduos, as borras de uva, foram o resíduo que apresentou melhores crescimentos apresentando uma taxa específica de crescimento 20% superior à taxa de crescimento em meio MCV.

Realizaram-se quatro ensaios do tipo batch, onde se começou por utilizar meio MCV, como suplemento aos substratos de resíduo, terminando na utilização apenas dos resíduos como substrato para as culturas de crescimento. Verificou-se também que a microalga apresentou uma grande afinidade com o resíduo de repiso de tomate, registando-se na generalidade dos ensaios um pico de produção de biomassa deste resíduo.

Neste ensaio ainda se verificou que a utilização de resíduos do setor da agroindústria, para o crescimento de microalgas, tem de ser cauteloso de forma a evitar que partículas sobrenadantes, provenientes dos resíduos, possam vir a influenciar na medição de parâmetros e ter um conhecimento claro da composição total destes resíduos de forma a detetar eventuais agentes inibidores do crescimento da *C. protothecoides*.

PALAVRAS-CHAVE: *Chlorella protothecoides*, resíduos agroindustriais, crescimento heterotrófico, fonte de carbono

ABSTRACT

The intensive production of agricultural products, such as vegetables and fruits, increases year after year and, consequently, records an increase in waste production, derivative of the transformation of these same products. This sector often has great difficulties in treating these wastes, many of them rich in organic carbon, and because of that, it is an ideal substrate for microalgae growth.

The objective of this research was to study the growth of *Chlorella protothecoides* in four agrowastes, which are tomato pomace, coffee grounds, grape pomace and grape grounds, which served as organic carbon source. Face these residues, the grape grounds, it was the residue wich shows a better microalgae growth, with a specific growth rate 20% higher than the growth rate in MCV medium.

Four batch-type assays were performed, where began to use MCV media as a complement to waste substrates, ending only in the use of waste as a substrate for growing crops. It was also found that the microalga had a high affinity with tomato pomace, registering as a generality of tests a peak of biomass production in this agrowaste.

In this essay, it was also achieved that the use of agrowastes for microalgae growth should be done carefully in order to prevent particules in supernatants from waste these wastes and having a clear knowledge of the total composition of these residues in order to detect any growth inhibitors of *C. protothecoides* it's also important.

KEYWORDS: *Chlorella protothecoides*, agrowastes, carbon source, heterotrophic growth.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ENQUADRAMENTO GERAL E OBJETIVOS.....	1
1.2 CHLORELLA PROTOTHECOIDES.....	2
1.2.1 PRODUÇÃO DE SINGLE CELL PROTEIN	3
1.2.2 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO	3
1.2.3 CRESCIMENTO HETEROTRÓFICO	4
1.2.4 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO.....	4
1.3 TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS.....	5
1.3.1 RACEWAY PONDS	5
1.3.2 FOTOBIORREATORES TUBULARES HORIZONTAIS	6
1.3.3 FOTOBIORREATORES FLAT-PLATES	6
1.3.4 FERMENTADORES	7
1.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE SUBSTRATO	8
1.4.1 RESÍDUOS DE TOMATE	8
1.4.2 RESÍDUOS DE CAFÉ.....	9
1.4.3 RESÍDUOS DE UVA.....	9

1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS	9
1.5.1 EXTRAÇÃO MECÂNICA.....	10
1.5.2 EXTRAÇÃO FÍSICA.....	10
1.5.3 EXTRAÇÃO POR SOLVENTES	10
1.5.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1 ESCOLHA DA MICROALGA.....	12
2.2 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CRESCIMENTO	12
2.2.1 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO.....	12
2.2.2 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO.....	13
2.2.2.1 MEIO MSC.....	13
2.2.2.2 MEIO BORRAS DE CAFÉ	14
2.2.2.3 MEIO REPISO DE TOMATE.....	14
2.2.2.4 MEIO REPISO DE UVA	15
2.2.2.5 MEIO BORRA DE UVA.....	15
2.3 INÓCULO DE CHLORELLA PROTOTHECOIDES.....	15
2.3.1 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO.....	15
2.3.2 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO.....	16
2.4 ENSAIOS DE CRESCIMENTO DE CHLORELLA PROTOTHECOIDES	16
2.4.1 ENSAIO 1	16
2.4.2 ENSAIO 2	17
2.4.3 ENSAIO 3	18

2.4.4 ENSAIO 4	18
2.5 METODOLOGIAS ANALÍTICAS	21
2.5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS	21
2.5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES.....	22
2.5.3 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO	22
2.5.4 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA.....	22
2.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS	23
2.6.1 TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO	23
2.6.2 TAXA MÉDIA DE CONSUMO DE SUBSTRATO	23
2.6.3 PRODUTIVIDADE	24
2.6.4 RENDIMENTO.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR.....	28
3.2 ESTUDO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS, NO CRESCIMENTO DE CHLORELLA PROTOTHECOIDES.....	30
3.2.1 TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DA <i>C. PROTOTHECOIDES</i>	30
3.2.1.1 ENSAIO 1	30
3.2.1.2 ENSAIO 2	33
3.2.1.3 ENSAIO 3	35
3.2.1.5 ENSAIO 4	37
3.2.2 TAXA MÉDIA DE CONSUMO DE SUBSTRATO	40
3.2.3 PRODUTIVIDADE	44
3.2.4 RENDIMENTO.....	44
4. CONCLUSÕES FINAIS	46

5. BIBLIOGRAFIA 48

ANEXOS 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Chlorella Protothecoides</i> (Ampliação 400x-Laboratórios ESTBarreiro/IPS)	2
Figura 2: Raceway ponds, também conhecidos por lagoas fotossintéticas. (Fonte: AlgaeForBiofuels)	5
Figura 3: Fotobiorreatores tubulares horizontais. (Fonte: Algatech International)	6
Figura 4: Fotobiorreatores Flat-Plate. (Fonte: NanoVoltaics, Inc)	7
Figura 5: Fermentadores para crescimento de microalgas. (Fonte:AlgaEurope)	7
Figura 6: Resíduo de tomate (Fonte: ESTBarreiro/IPS)	8
Figura 7: Resíduos de café. (Fone: Laboratórios ESTBarreiro/IPS)	9
Figura 8: Crescimento de <i>C. protothecoides</i> nos meios produzidos a partir de resíduos do ensaio 4.	20
Figura 9: Representação gráfica da quantificação de sólidos voláteis e sólidos fixos, nos resíduos em estudo	29
Figura 10: Representação gráfica da concentração de açúcares redutores nos diferentes substratos produzidos a partir dos resíduos de tomate, café e uva (g (açúcares redutores)/L)	30
Figura 11: Curva de crescimento e variação de pH da <i>C. protothecoides</i> , nos meios de cultura MCV, repiso de tomate e borras de café, ao longo do ensaio 1.	31
Figura 12: Representação logarítmica do crescimento de biomassa das culturas de <i>C. protothecoides</i> , no ensaio 1.	32
Figura 13: Crescimento exponencial de <i>C. protothecoides</i> , no ensaio 1.	32
Figura 14: Curva de crescimento e variação de pH da <i>C. protothecoides</i> , nos meios de cultura MSC, repiso de tomate e borras de café, ao longo do ensaio 2.	34
Figura 15: Curvas de crescimento e variação de pH das culturas de crescimento de <i>C. protothecoides</i> , com os substratos de repiso de tomate, borras de café e MSC, no ensaio 3	35
Figura 16: Representação gráfica das curvas de crescimento e da variação do pH, dos meios com repiso de tomate e borras de uvacafé, no ensaio 4.	37

Figura 17: Curvas de crescimento nos meios de borras de uva, com e sem diluição, no ensaio 4.	38
Figura 18: Curvas de crescimento nos meios de repiso de uva, com e sem diluição, no ensaio 4.	39
Figura 19: Representação gráfica do consumo de açúcares redutores nos meios de crescimento com repiso de tomate e borras de café, no ensaio 1 (A), no ensaio 2 (B), no ensaio 3 (C) e no ensaio 4 (D).	41
Figura 20: Representação gráfica do consumo de açúcares redutores nos meios de crescimento com repiso de uva (A) e borra de uva (B), no ensaio 4.	43
Figura 21: Valores dos padrões de açúcares redutores para a realização da reta de calibração.	51
Figura 22: Representação gráfica do logatimo natural das concentrações de biomassa, no ensaio 2.	52
Figura 23: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de <i>C. protothecoides</i> , para a determinação da taxa específica de crescimento, no ensaio 2.	52
Figura 24: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, no ensaio 3.	53
Figura 25: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de <i>C. protothecoides</i> , para a determinação da taxa específica de crescimento, no ensaio 2.	53
Figura 26: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com repiso de tomate e borra de café, no ensaio 4.	54
Figura 27: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com borra de uva, no ensaio 4.	54
Figura 28: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com repiso de uva, no ensaio 4.	55
Figura 29: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de <i>C. protothecoides</i> , para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com repiso de tomate e borras de café, no ensaio 4.	55

Figura 30: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com borras de uva, no ensaio 4. 56

Figura 31: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com repiso de uva, no ensaio 4 56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição da biomassa da <i>Auxenochlorella protothcoides</i> (% peso seco) ^[13]	3
Tabela 2: Taxas específicas de crescimento de microalgas, nos crescimentos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (h^{-1}).	4
Tabela 3: Composição do repiso de tomate (b.h-base húmida; b.s.-base seca) ^[25]	8
Tabela 4: Solução A, para fazer o meio MCV	12
Tabela 5: Solução B, para fazer o meio MCV	13
Tabela 6: Solução C, para fazer o meio MCV	13
Tabela 7: Composição do meio MSC.....	13
Tabela 8: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de borras de café.....	14
Tabela 9: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de repiso de tomate	14
Tabela 10: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de repiso de uva	15
Tabela 11: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de borra de uva.....	15
Tabela 12: Composição dos ensaios para cada substrato no ensaio 1.	16
Tabela 13: Composição dos meios de crescimento no ensaio 2	17
Tabela 14: Composição dos meios de crescimento no ensaio 3	18
Tabela 15: Composição dos meios de crescimentos de resíduo de tomate e café no ensaio 5	19
Tabela 16: Composição dos meios de crescimento do resíduo de uva sem diluição no ensaio 5.	19
Tabela 17: Composição dos meios de crescimento do resíduo de uva com diluição no ensaio 5.	20
Tabela 18: Composição em sólidos voláteis, fixos e humidade, nos resíduos de tomate, café e uva.....	28
Tabela 19: Concentração de açúcares redutores nos substratos nos quatro resíduos em estudo.....	29

Tabela 20: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 1.	31
Tabela 21: Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td), nas diferentes culturas de crescimento do ensaio 1.	33
Tabela 22: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 2	34
Tabela 23: Taxa específica de crescimento, dos meios de crescimento MSC, repiso de tomate e borras de café, do ensaio 2.....	35
Tabela 24: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 3.	36
Tabela 25: Taxa específica de crescimento, dos meios de crescimento MSC, repiso de tomate e borras de café, do ensaio 3.....	36
Tabela 26: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida nos resíduos de repiso de tomate e borras de café e respetivo desvio padrão, no ensaio 4	37
Tabela 27: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida no resíduo de borra de uva, diluído e não diluído, e respetivo desvio padrão, no ensaio 4.....	38
Tabela 28: Biomassa de <i>C. protothecoides</i> produzida no resíduo de repiso de uva, diluído e não diluído, e respetivo desvio padrão, no ensaio 4.....	39
Tabela 29: Taxa de crescimento dos meios com repiso de tomate, borras de café e repiso e borras de uva (com e sem diluição), no ensaio 4.	40
Tabela 30: Concentração de açúcares redutores nos substratos em cada ensaio, tendo em conta as diluições efetuadas.	40
Tabela 31: Taxa média de consumo de substrato nos quatro ensaios realizados neste trabalho de investigação.	42
Tabela 32: Produtividade máxima das culturas de crescimento de <i>C. protothecoides</i> , realizados neste estudo.	44
Tabela 33: Rendimento das culturas de crescimento de <i>C. protothecoides</i> nos diferentes resíduos (g biomassa / g açúcares redutores)	45

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação I: Determinação dos sólidos voláteis	21
Equação II: Determinação dos sólidos fixos.....	21
Equação III: Determinação da taxa específica de crescimento	23
Equação IV: Determinação da taxa média de consumo de substrato.....	23
Equação V: Determinação da produtividade de biomassa de <i>Chlorella protothecoides</i>	24
Equação VI: Determinação do rendimento de produção de <i>Chlorella protothecoides</i>	25

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

(por ordem alfabética)

<i>C. protothecoides</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
g	grama
h	hora
L	Litro
NaOH	Hidróxido de sódio
SF	Sólidos fixos
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
TD	Tempo de duplicação

Símbolos Gregos

μ Taxa específica de crescimento, h^{-1}

$Y_{P/S}$ Rendimento de biomassa de microalga em relação ao substrato (g biomassa /g açúcares redutores);

P_x Produtividade de biomassa (g/(L.h));

r_s Taxa média de consumo de substrato (g/(L.h));

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENQUADRAMENTO GERAL E OBJETIVOS

As microalgas têm sido tema de uma tremenda pesquisa e desenvolvimento nas últimas décadas devido ao seu grande potencial como uma matéria prima para biocombustíveis, assim como para produzir pigmentos de alto económico e nutracêuticos, tanto para humanos como para animais. Apesar dos investimentos na tecnologia até aos dias de hoje, o maior obstáculo para a comercialização é o alto custo de produção de biomassa e a respetiva extração de produtos de interesse.^[1]

Com o aumento da população mundial, estimando-se para o ano de 2050, uma população de nove bilhões de pessoas, as microalgas são apontadas pela comunidade científica como uma fonte alternativa na alimentação (fonte de proteína) humana e animal, bem como para o tratamento de águas residuais domésticas e industriais, tendo como mais valia a não utilização de terra arável e a utilização de tecnologias de produção que permitem baixos consumos de água.^{[2],[3],[4]}

Atualmente estão a ser exploradas muitas oportunidades que permitem aumentar a eficiência ou eliminar custos irrelevantes no processo de produção de microalgas. Estas oportunidades passam pelo aumento do rendimento de produção de biomassa, aumento de produção de lípidos e outros compostos de interesse, integração de fluxos de resíduos, ricos em azoto, fósforo e carbono e também a diminuição dos custos de infraestrutura.^[1]

Havendo a necessidade da redução de custos, de modo a viabilizar a tecnologia de produção de microalgas e aumentar a sua escala de produção, são apontadas como hipótese a utilização de milho em pó hidrolisado, xarope de sorgo e águas residuais, como fonte de azoto, fósforo e carbono, de modo a aumentar o rendimento de produção de biomassa, promovendo desta forma um crescimento heterotrófico ou mixotrófico. No entanto estas duas formas de crescimento anteriormente referidas, teriam um rendimento maior com a utilização de glucose (comercial), mas a sua utilização a escalas industriais seria economicamente inviável, para aplicações de baixo valor comercial.^[5]

As indústrias agroalimentares portuguesas produzem anualmente grandes quantidades de resíduos após processamento das suas matérias-primas frutas ou vegetais constituídos de peles e grainhas, maioritariamente. Estes resíduos podem ser o substrato de microalgas, sendo assim uma fonte alternativa de carbono orgânico.^{[6],[7]}

É a partir deste problema que se realizou o presente trabalho de investigação, tendo como objetivo o estudo da produtividade de biomassa de microalga da espécie *Chlorella*

protothecoides, utilizando quatro resíduos agroalimentares: borras de café, repiso de tomate, borras de uva e repiso de uva.

1.2 CHLORELLA PROTOTHECOIDES

A *Chorella protothecoides*, figura 1, é uma microalga eucariota, unicelular, de água doce e que não possui mobilidade, pertencente ao *Filo Chlorophyta*. A sua forma é esférica, possui uma parede celular fina, o seu diâmetro está compreendido entre os 2 e os 10 μm , reproduz-se de forma assexuada e a sua temperatura ótima de crescimento é de 28°C. [8]

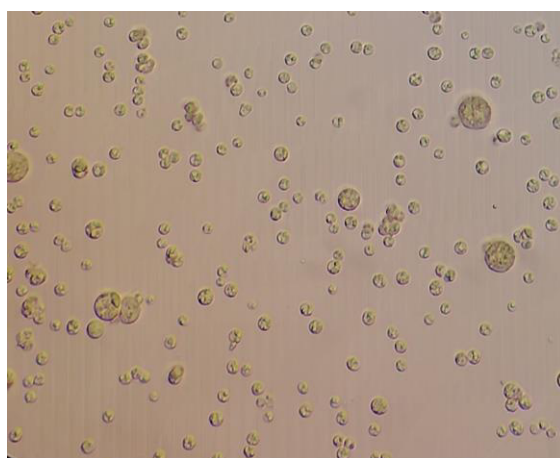


Figura 1: *Chlorella Protothecoides* (Ampliação 400x-Laboratórios ESTBarreiro/IPS)

Esta espécie é uma das microalgas mais utilizadas quer a nível de investigação, quer a nível industrial, pode crescer de forma autotrófica, heterotrófica e mixotrófica, isto sob diferentes condições de cultura. Portanto, a *C. protothecoides*. devido à sua capacidade de crescer em diferentes meios, pode ser utilizada como fonte de alimentação para aquacultura, suplementos de nutrição humana e produtos farmacêuticos e como matéria prima para a produção de biocombustíveis. [9],[10],[11]

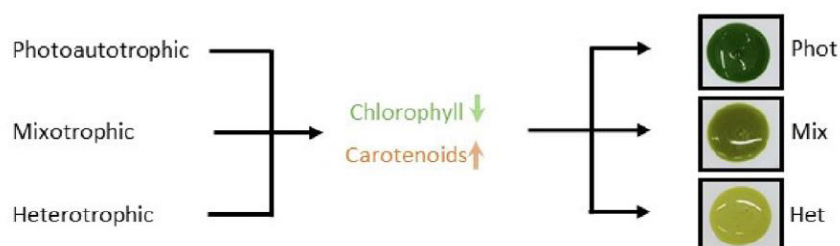


Figura 2- Coloração da microalga nos crescimentos fotoautotróficos, mixotróficos e heterotróficos. [12]

Tabela 1: Composição da biomassa da *Chlorella protothcoides* (% peso seco) ^[13]

Elemento	Quantidade (% peso seco biomassa)	Elemento	Quantidade (% peso seco biomassa)
Carbono	49,12	Zinco	5,1 x10 ⁻³
Oxigénio	32,26	Cobre	2,7 x10 ⁻³
Hidrogénio	7,03	Manganês	4,1 x10 ⁻³
Azoto	8,07	Cobalto	0,31 x10 ⁻³
Fósforo	1,18	Molibdénio	0,009 x10 ⁻³
Magnésio	0,19	Boro	0,04 x10 ⁻³
Enxofre	0,11	Crómio	0,4 x10 ⁻³
Ferro	0,12	Chumbo	0,02 x10 ⁻³

1.2.1 PRODUÇÃO DE *SINGLE CELL PROTEIN*

Single cell protein (SCP) são proteínas extraídas do cultivo de biomassa microbiana, que podem ser utilizadas como suplemento proteico para dietas alimentares, substituindo fontes convencionais de alto valor económico, como a farinha de soja e a farinha de peixe, permitindo desta forma aliviar o problema da escassez de proteínas. Além disso, a bioconversão de resíduos agrícolas e industriais em alimentos ricos em proteínas tem um benefício adicional de tornar o produto final mais rentável. Para além disso, a utilização de resíduos agrícolas também seria uma alternativa economicamente viável, ao serem utilizados como substratos para produzir *single cell protein*.^[14]

1.2.2 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO

O crescimento autotrófico, também conhecido por crescimento fotoautotrófico, refere-se ao crescimento de microalgas através da captura de luz solar e de dióxido de carbono atmosférico convertendo-os em energia química através de reações de fotossíntese, deste modo, é promovido o desenvolvimento de clorofilas, resultando numa pigmentação verde. Neste tipo de crescimento é também utilizada uma fonte de carbono (CO₂) de forma a manter as funções

celulares da microalga. Apesar de ser o tipo de crescimento com menores custos, a nível de substratos, a produtividade de biomassa de microalga é limitada uma vez que está diretamente dependente da luz solar e da temperatura.^{[1],[10],[15]}

1.2.3 CRESCIMENTO HETEROTRÓFICO

O crescimento heterotrófico refere-se à utilização de compostos de carbono orgânico, como única fonte de carbono e energia, promovendo assim a produção de luteína, com uma pigmentação amarela. Este tipo de crescimento, elimina a dependência de luz solar, ao contrário do crescimento autotrófico, permitindo desta forma uma maior produtividade de biomassa microalgal. No entanto, o crescimento heterotrófico tem algumas desvantagens nomeadamente nos custos associados aos meios de carbono orgânico, maioritariamente provenientes da açúcares redutores; a diminuição da pigmentação e da produção de fitoquímicos pelas células das microalgas, uma vez que este tipo de crescimento é operado em condições de ausência de luz; a necessidade de utilizar meios estéreis, de modo a evitar contaminações, que reduzam a produtividade; e a produção de dióxido de carbono durante a respiração, que pode atingir concentrações inibitórias ao crescimento.^{[1],[15]}

1.2.4 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO

Este tipo de crescimento resulta da combinação entre o crescimento autotrófico e heterotrófico, utilizando simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, é simultaneamente consumido dióxido de carbono e substrato orgânico como fontes de carbono.^[17] A taxa específica de crescimento da cultura mixotrófica é, portanto, aproximadamente a soma das taxas específicas de células sob condições fotoautotróficas e heterotróficas.^[8]

Através da tabela 2 podemos comparar as taxas específicas de crescimento nestes três tipos de crescimento.

Tabela 2: Taxas específicas de crescimento de microalgas, nos crescimentos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (h^{-1}).

Crescimento Autotrófico (h^{-1})	Crescimento Heterotrófico (h^{-1})	Crescimento Mixotrófico (h^{-1})
0,02 ^[18]	0,1 ^[5]	0,07 ^[19]

1.3 TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE MICROALGAS

Nos últimos anos tem sido feita investigação e desenvolvimento das tecnologias de cultivo de microalgas, de forma a aumentar as suas taxas de produtividade, dado que estes microrganismos podem ser um grande potencial para a alimentação humana e animal, bem como para setores da indústria farmacêutica, cosmética e energia. Desta forma, é necessário um aumento de escala, bem como a redução nos custos de produção. ^[20]

As microalgas são cultivadas numa ampla gama de sistemas de cultivo. A produção heterotrófica é realizada em biorreatores convencionais (fermentadores), já o cultivo autotrófico por ser feito em sistemas abertos (lagoas rasas-raceway ponds) ou fechados (fotobiorreatores). Os sistemas mais usados em larga escala e em bases comerciais são sistemas abertos. ^{[17],[20]}

1.3.1 RACEWAY PONDS

Os raceway ponds, figura 2, são um sistema aberto de produção de microalgas, caracterizado por tanques ou lagoas rasas, pouco profundos com uma profundidade não mais de 30 cm, abertas ao meio ambiente, utilizando a luz solar como fonte de energia natural, sendo a cultura agitada por um sistema mecânico de braço ou paddlewheel. A circulação tem que ser executada de forma contínua evitando a deposição da biomassa. ^[21]

Visto que se trata de um sistema aberto, este sistema de cultivo está sujeito a diversos fatores que reduzem a produtividade de biomassa: ^[20]

- **Alterações de temperatura** diárias e sazonais: resultam em significativas perdas de água;
- **Aparecimento de outras espécies de microalgas e outros microrganismos:** competição com a microalga de interesse;
- **Grandes perdas para a atmosfera:** a injeção de dióxido de carbono torna-se pouco eficiente.



Figura 2: Raceway ponds, também conhecidos por lagoas fotossintéticas. (Fonte: AlgaeForBiofuels)

1.3.2 FOTOBIORREATORES TUBULARES HORIZONTAIS

Os fotobiorreatores tubulares horizontais, figura 3, são um sistema fechado de produção, sendo caracterizados por uma grande eficiência luminosa. A produção de microalgas neste sistema oferece grandes vantagens face às tecnologias de produção em sistema aberto: ^{[17],[21]}

- **Diminuição** dos riscos de contaminação, permitindo um maior controlo sobre as condições de cultura,
- **Baixas** perdas de água e de dióxido de carbono introduzido, possibilitando uma maior produtividade de biomassa por unidade de área.

No entanto, os fotobiorreatores apresentam uma grande desvantagem ao requererem um elevado custo de construção, operação e manutenção, constituindo desta forma uma grande limitação da aplicação de microalgas produzidas neste sistema. A utilização deste sistema em grande escala apenas é economicamente viável na aplicação de microalgas para a produção de compostos de elevado valor acrescentado. Para além dos fotobiorreatores horizontais existem também fotobiorreatores em painel vertical (flat-plate e verticais). ^[20]



Figura 3: Fotobiorreatores tubulares horizontais. (Fonte: Algatech International)

1.3.3 FOTOBIORREATORES FLAT-PLATES

Os fotobiorreatores flat-plate, figura 4, são sistemas fechados de produção de microalgas constituídos por painéis de vidro, acrílico ou PVC, com alvéolos no interior por onde circula a cultura de microalgas. Estes reatores são concebidos de forma a maximizarem o aproveitamento de luz solar, sendo deste modo um dos sistemas com uma maior taxa de produtividade por unidade de área, no que diz respeito a fotobiorreatores.

Neste tipo de reatores o ar é injetado na base fornecendo o dióxido de carbono necessário, ao mesmo tempo que fornece a agitação necessária para homogeneizar a cultura em crescimento, ou seja, garantir que todas as células estejam expostas à mesma quantidade de luz solar. Uma vez que esta tecnologia apresenta grandes eficiências na circulação homogeneia da cultura no sistema, uma baixa acumulação de oxigénio e baixos custos operacionais, os reatores flat-plate têm despertado interesse na sua aplicação numa perspetiva industrial. ^{[17],[22]}



Figura 4: Fotobiorreatores Flat-Plate. (Fonte: NanoVoltaics, Inc)

1.3.4 FERMENTADORES

Os fermentadores, figura 5, são os biorreatores mais comuns para a produção de microalgas em cultivo heterotrófico e mixotrófico, apresentando como grande vantagem, face aos outros tipos de reatores, a possibilidade de controlar as condições de crescimento, nomeadamente pH, temperatura, concentração de O_2 e CO_2 e agitação.^[23]

No caso do cultivo heterotrófico, para uma produção em grande escala, são utilizados fermentadores com paredes em aço, garantindo assim condições de escuridão total. Estes fermentadores podem ser colocados no interior ou exterior de instalações, dependendo do seu tamanho. Cada fermentador para este tipo de cultivo pode chegar aos 100.000 l de volume de trabalho, permitindo altas densidades entre os 30 e os 100 g/l.^[20]

No caso do cultivo mixotrófico, são utilizados fermentadores com paredes em vidro ou acrílico, de forma a permitir a entrada de luz para as células, no entanto, por motivos de rentabilidade, derivados do custo de operação e substratos utilizados, ainda não são utilizados fermentadores em grande escala para o cultivo mixotrófico.^{[20],[23]}



Figura 5: Fermentadores para crescimento de microalgas. (Fonte:AlgaEurope)

1.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE SUBSTRATO

As indústrias agroalimentares portuguesas produziram em 2016, segundo a PORDATA, 216 863 toneladas de resíduos de origem animal e vegetal demonstram dificuldades em gerir os resíduos, quer a nível logístico, quer a nível de custos para operações de tratamento. Os resíduos vegetais, nomeadamente os derivados do processamento frutas e vegetais, poderão vir a ser utilizados para a produção de substratos para o crescimento de microalgas, ou seja, a sua utilização como fontes de carbono orgânico alternativas.^[24]

1.4.1 RESÍDUOS DE TOMATE

O tomate é um dos frutos mais utilizados na indústria alimentar a nível mundial e contém uma gama de flavonoides e ácidos fenólicos, na sua composição, sendo por isso um fruto de interesse a nível nutricional. Após o seu processamento é formado um resíduo, designado por repiso, figura 6, constituído por peles, sementes e ainda quantidades residuais de polpa que não foi totalmente extraída durante o processamento deste fruto.^[25]



Figura 6: Resíduo de tomate (Fonte: ESTBarreiro/IPS)

O repiso de tomate é constituído em média por 61,5% de peles e 38,5% de sementes, apresentando uma composição de acordo com a referenciada na tabela 3.^[26]

Tabela 3: Composição do repiso de tomate (b.h-base húmida; b.s.-base seca)^[26]

Valores	Humidade (g. 100g ⁻¹ b.h.)	Componentes Secos (g. 100g ⁻¹ b.s.)			
		Fibra (Alimentar)	Carboidratos disponíveis	Proteína	Lípidos
Mínimo	62,27 ± 0,54	48,62 ± 0,77	6,73	1,81 ± 0,49	11,17 ± 2,32
Máximo	70,14 ± 0,37	53,97 ± 1,01	14,47	23,25 ± 1,26	16,73 ± 0,51

A presença dos compostos enumerados na tabela 3, no repiso de tomate, indicam que este resíduo, ainda contém compostos nutricionais nomeadamente hidratos de carbono, que podem ser valorizados noutras aplicações. Atualmente, este resíduo é aplicado como complemento na alimentação animal, fornecendo água, fibras, hidratos de carbono e lípidos.

1.4.2 RESÍDUOS DE CAFÉ

O café é um dos produtos agrícolas de maior importância no comércio, no entanto, é estimado que apenas 6% da sua colheita é utilizada para a preparação da bebida de café, sendo o restante considerado resíduo, vulgarmente conhecido por borras de café.^{[27],[28]}

Nos últimos anos, as borras de café, figura 7, têm atraído uma grande atenção, dado que são produzidas em grandes quantidades e representam um grande perigo de contaminação, quando descarregadas para o meio ambiente.^[28]

As borras de café apresentam como suas principais características: teores de azoto relativamente elevados e muito reduzidos nos casos do fósforo e potássio, um pH na gama do ácido e uma granulometria muito reduzida, tornando-se deste modo, um resíduo com potencial para a produção de substratos para o cultivo de microalgas.^[29]



Figura 7: Resíduos de café. (Fonte: Laboratórios ESTBarreiro/IPS)

1.4.3 RESÍDUOS DE UVA

Os resíduos resultantes da vitivinicultura são de natureza diversa, sendo estes as massas, os engaços, as borras, os precipitados de tartarato e os ramos da poda da vinha. Estes resíduos podem ainda ter duas origens a produção do vinho branco ou tinto, apresentando características distintas e únicas.

1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A utilização de resíduos para o crescimento de microalgas, requerem que sejam feitos determinados pré-tratamentos para extrair alguns compostos do interior das células vegetais. Os pré-tratamentos podem ser classificados como físicos, quando se utilizam processos mecânicos e térmicos, químicos, quando se adiciona um ácido ou uma base para converter o amido

em açúcares redutores e enzimáticos, desempenhando a mesma função que os processos químicos mas de forma mais suave (menos tóxica).^[30]

A extração é uma operação físico-química de transferência de massa, onde os sólidos solúveis e voláteis podem ser extraídos. Os processos mais comuns de extração, na indústria, são os processos de prensagem e o uso de solventes. No entanto, estes processos acarretam alguns inconvenientes nomeadamente o elevado custo dos equipamentos e sua operação e a utilização de grandes quantidades de solventes, pondo em causa a qualidade dos produtos finais.^{[31],[32]}

1.5.1 EXTRAÇÃO MECÂNICA

Os métodos de extração mecânica são processos onde é utilizada a prensagem e a trituração como técnicas principais, tendo como objetivo a remoção de óleos do interior de partículas como grãos de cereais. Para além destes dois métodos, é também muito utilizada a extração térmica.^[33]

1.5.2 EXTRAÇÃO FÍSICA

A extração física de compostos ocorre quando se pretende extrair compostos a partir das suas características físicas, ou seja, a partir da sua densidade volúmica/mássica onde é possível separar compostos a partir de decantação e peneiração, no caso de líquidos e sólidos, respetivamente; a partir da temperatura, onde se utiliza uma combinação de água e a aplicação de calor, de forma a aumentar o gradiente de dissolução de compostos no interior das células vegetais. A destilação, também é uma técnica muito utilizada, na indústria, sendo utilizada para separar compostos com pontos de ebulição diferente, num líquido.^[34]

1.5.3 EXTRAÇÃO POR SOLVENTES

A extração por solventes utiliza compostos químicos de forma a penetrar na matrix sólida de um determinado produto, onde os compostos de interesse, os solutos, se dissolvem no solvente, onde posteriormente se separa o soluto do solvente por métodos físicos ou químicos, permitindo desta forma extrair os compostos de interesse.^[35]

1.5.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração enzimática é um mecanismo de extração que está a ter uma grande adoção, por parte das indústrias, uma vez que permite obter produtos de maior qualidade e apesar de as enzimas utilizadas acarretarem custos significativos, é possível reutilizá-las, tornando-se por isso um método de extração rentável. As principais ações das enzimas são a hidrólise e oxidação, de compostos como proteínas e ácidos gordos, onde as suas ligações químicas são quebradas, possibilitando a sua remoção de estruturas quimicamente estáveis.^[36]

1.6. Objetivo

O objetivo central deste trabalho de investigação foi a produção de SCP, utilizando a *Chlorella protothecoides*, a partir de substratos feitos à base de resíduos da indústria agroalimentar, tendo sido escolhidos o repiso de tomate, as borras de café, o repiso de uva e a borra de uva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ESCOLHA DA MICROALGA

A microalga utilizada para este trabalho de investigação, foi a *Chorella protothecoides*, estirpe esta pertencente ao banco de microalgas da ESTBarreiro/IPS. Os meios de crescimento utilizados foram o MCV, no caso do crescimento autotrófico e o MSC, para o crescimento mixotrófico. Ambos os meios foram utilizados como meios de referência para analisar o crescimento mixotrófico em substratos produzidos a partir de tomate, café e uva, descritos no ponto 2.2.

De forma a garantir inóculos saudáveis, realizaram-se repicagens mensais.

2.2 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CRESCIMENTO

A produção de SCP, utilizando a *Chlorella protothecoides*, foi realizada a partir de substratos feitos à base de resíduos da indústria agroalimentar, tendo sido escolhidos o repiso de tomate, as borras de café, o repiso de uva e a borra de uva.

2.2.1 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO

O meio autotrófico foi utilizado como meio de referência de forma a comparar o crescimento da *Chlorella* entre crescimento autotrófico e mixotrófico. Deste modo, escolheu-se o meio inorgânico MCV.

Para fazer o meio MCV, foi necessário fazer três soluções, A, B e C, tabelas 4, 5 e 6 respetivamente.

Tabela 4: Solução A, para fazer o meio MCV

Composto/Fórmula Química	Nomenclatura	Concentração
KNO ₃	Nitrato de potássio	1,25 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio heptahidratado	1 g/L
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio dihidratado	0,11 g/L
EDTA.Na.Fe.3H ₂ O	Ácido etildiamino tetra-acético de ferro trihidratado	0,1 mg/L

,

Tabela 5: Solução B, para fazer o meio MCV

Composto/Fórmula Química	Nomenclatura	Concentração
KH_2PO_4	Dihidrogenofosfato de potássio	1,25 g/L
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio	0,5 g/L

Tabela 6: Solução C, para fazer o meio MCV

Composto/Fórmula Química	Nomenclatura	Concentração
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de zinco heptahidratado	222 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre pentahidratado	79 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetra hidratado	1,80 g/L
H_3BO_3	Ácido bórico	2,85 g/L

A divisão deste meio em três soluções foi para manter a estabilidade dos compostos durante o processo de esterilização. Os compostos da solução B, foram então isolados para evitar que se precipitassem.

A solução C, tabela 6, foi uma solução de elementos traço tendo sido adicionado 1 mL desta solução à solução A.

No final o meio MCV teve um volume total de 1 L, sendo o volume das soluções A e B de 500 mL cada. A solução C foi feita com um volume total de 10 mL.

2.2.2 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO

2.2.2.1 MEIO MSC

Para este crescimento, escolheu-se o meio MSC, tabela 7, também com a finalidade de usar como substrato de comparação para o crescimento de *Chlorella* nos substratos à base dos resíduos agroindustriais em estudo.

Tabela 7: Composição do meio MSC.

Composto/Fórmula Química	Concentração
Açúcares redutores	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Água do mar	80 mL (3g NaCl/L)

No final da preparação deste meio, acertou-se o pH a 7,2 com solução de NaOH diluída.

2.2.2.2 MEIO BORRAS DE CAFÉ

A borra de café, foi um dos três resíduos escolhidos para fazer o estudo do crescimento de *Chlorella*. Deste modo, desenvolveram-se duas fórmulas, tabela 8, para estudar a afinidade da microalga com a borra de café.

Nota: A borra de café utilizada neste trabalho de investigação, foi cedida pela cafetaria da ESTBarreiro/IPS.

Tabela 8: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de borras de café

Composto	Substrato Café Quantidade
Borra de Café	200 g
Água Destilada	650 mL

A preparação deste substrato foi realizada com recurso a um processo hidrotérmico, utilizando-se a autoclave a condições de 121°C durante 15 minutos, de forma não só a esterilizar o resíduo, mas também para extrair os compostos de interesse para o crescimento da *C. protothecoides*. Posteriormente ao processo hidrotérmico, procedeu-se a uma filtração a vácuo de forma a retirar dos substratos as partículas dos resíduos, que pudessem vir a interferir com a determinação dos parâmetros cinéticos para o crescimento da microalga.

2.2.2.3 MEIO REPISO DE TOMATE

O repiso de tomate, figura 9, foi outro dos três resíduos escolhidos para fazer este estudo do crescimento de *Chlorella*, utilizando-se o mesmo método de produção e fórmula do meio anterior, tabela 9.

Nota: O repiso de tomate utilizado neste trabalho de investigação, foi cedido pela empresa transformadora de tomate FIT-Fomento da Indústria do Tomate, SA, em Águas de Moura.

Tabela 9: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de repiso de tomate

Composto	Substrato Tomate Quantidade
Repiso de Tomate	200 g
Água Destilada	650 mL

2.2.2.4 MEIO REPISO DE UVA

A utilização do resíduo de uva, neste trabalho de investigação, surgiu a partir de uma proposta da AVIPE- Associação de Viticultores do Concelho de Palmela. No caso da uva, resultam dois tipos de resíduo, tal como referido no ponto 1.4.3.

Assim, desenvolveram-se fórmulas, tabela 10, para o substrato com este resíduo semelhantes aos resíduos descritos anteriormente, utilizando-se também a mesma metodologia de produção.

Tabela 10: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de repiso de uva

Composto	Substrato Uva Quantidade
Repiso de Uva	200 g
Água Destilada	650 mL

2.2.2.5 MEIO BORRA DE UVA

Para o resíduo de borra de uva, seguiu-se o mesmo protocolo dos resíduos anteriores para a formulação do substrato, tabela 11.

Tabela 11: Fórmula desenvolvida para o substrato à base de borra de uva

Composto	Substrato Uva 1 Quantidade
Repiso de Uva	200 g
Água Destilada	650 mL

2.3 INÓCULO DE *CHLORELLA PROTOTHECOIDES*

2.3.1 CRESCIMENTO AUTOTRÓFICO

Os ensaios realizados em crescimento autotrófico, foram desenvolvidos com base em inóculos preparados em meio MCV, com a composição descrita no ponto 2.2.1. O inóculo autotrófico foi desenvolvido em balões de Erlenmeyer de 50 mL, previamente esterilizados a 121°C, durante 15 minutos. Este inóculo foi repicado mensalmente e manuseado no interior de uma

câmara de fluxo laminar (BioBase-SSC-1500), de forma a garantir as condições de esterilidade na manipulação do inóculo.

2.3.2 CRESCIMENTO MIXOTRÓFICO

Os inóculos para os crescimentos de *Chlorella* nos diferentes substratos à base de resíduos agroindustriais, foram desenvolvidos tendo como base o substrato MSC, com a composição descrita no ponto 2.2.2.1.

À semelhança do inóculo autotrófico, o inóculo mixotrófico foi preparado e manuseado nas mesmas condições de esterilidade, sendo igualmente repicado no mesmo período de tempo.

2.4 ENSAIOS DE CRESCIMENTO DE *CHLORELLA PROTOTHECOIDES*

Durante este trabalho de investigação realizaram-se quatro ensaios de crescimento de microalgas.

2.4.1 ENSAIO 1

No primeiro ensaio, realizaram-se o crescimento autotrófico com meio MCV e o crescimento mixotrófico com o substrato de repiso de tomate e o substrato de borra de café, como descrito nos pontos 2.2.2.2 e 2.2.2.3, respetivamente. Nesta primeira abordagem, não houve acerto de pH e efetuaram-se diluições em todos os substratos, tendo-se adicionado aos substratos de repiso de tomate e borra de café meio MCV, tal como descrito na tabela 12.

Tabela 12: Composição dos ensaios para cada substrato no ensaio 1.

Composto	Meio MCV		Substrato Repiso de Tomate		Substrato Borrás de Café	
	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)
Inóculo	10	0	10	0	10	0
Meio MCV	25	12,5	25	12,5	25	12,5
Meio de Repiso de Tomate	0	0	25	12,5	0	0
Meio de Borrás de Café	0	0	0	0	17	8,5
Água Destilada	65	37,5	40	25	48	29
Volume final	100	50	100	50	100	50

Os ensaios para cada meio, foram realizados em duplicado em balões erlenmeyer de 250 mL, previamente esterilizados a 121°C, durante 15 minutos e colocados em agitação numa incubadora orbital (Nohita-636 Plus) a 150 rpm, com uma temperatura de 28°C.

Uma vez que se pretendia medir a taxa de crescimento da *Chlorella* através da medida da absorvância, das culturas, com recurso a um Espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu-UV-1800) foi necessário preparar ensaios sem inóculo, que serviram como controlo branco, respeitando a mesma razão de diluição entre substrato/água destilada.

O tempo de realização deste ensaio teve a duração de cinco dias, retirando-se diariamente uma amostra de 5 mL de cada ensaio, realizando-se a medição de pH, com um potenciómetro (Mettler Toledo- PSM 11R-090), peso seco, com recurso a uma centrífuga (Centurion- Pro Research: K1015), densidade ótica (absorvância), concentração de açúcares, recorrendo a um colorímetro (BioChrom-HK-AJ-090-170-DH) e azotos totais.

2.4.2 ENSAIO 2

O segundo ensaio realizou-se apenas com culturas de crescimento mixotrófico, utilizando agora como crescimento de referência o meio MSC, composto de acordo com o descrito no ponto 2.2.2.1. O ensaio teve a duração de cinco dias e os substratos foram utilizados com diluições descritas na tabela 13.

Tabela 13: Composição dos meios de crescimento no ensaio 2

Composto	Meio MSC		Substrato Repiso de Tomate		Substrato Borrás de Café	
	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)
Inóculo	10	0	10	0	10	0
Meio MSC	15	7,5	0	0	0	0
Meio de Repiso de Tomate	0	0	50	25	0	0
Meio de Borrás de Café	0	0	0	0	34	17
Água Destilada	75	42,5	40	25	56	33
Volume final	100	50	100	50	100	50

2.4.3 ENSAIO 3

O terceiro ensaio também se realizou-se apenas com culturas de crescimento mixotrófico, sem diluição de substratos, utilizando os mesmos que no ensaio 2. No entanto, neste ensaio, houve um acerto de pH para 7,1, e não se efetuaram diluições, sendo a composição dos meios de acordo com a tabela 14.

Tabela 14: Composição dos meios de crescimento no ensaio 3

Composto	Meio MSC		Substrato Repiso de Tomate		Substrato Borrás de Café	
	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)	Ensaio de crescimento (mL)	Branco (mL)
Inóculo	10	0	10	0	10	0
Meio MSC	90	45	0	0	0	0
Meio de Repiso de Tomate	0	0	90	45	0	0
Meio de Borrás de Café	0	0	0	0	90	45
Água Destilada	0	5	0	5	0	5
Volume final	100	50	100	50	100	50

2.4.4 ENSAIO 4

O último ensaio efetuado neste trabalho de investigação, figura 8, foi realizado com substratos de resíduos de tomate, café e uva, descritos nos pontos 2.2.2.2 a 2.2.2.5, tabela 15. As culturas de crescimento com substrato de repiso de tomate e borras de café foram realizadas sem diluição do substrato, mas as culturas com substrato de repiso de uva e borras de uva, fizeram-se ensaios com diluição de substrato e sem diluição de substrato, tabela 16 e 17.

Tabela 15: Composição dos meios de crescimentos de resíduo de tomate e café no ensaio 4

Composto	Substrato Repiso de Tomate		Substrato Borrás de Café	
	Ensaio de crescimento	Branco	Ensaio de crescimento	Branco
Inóculo	10	0	10	0
Meio de Repiso de Tomate 1	90	45	0	0
Meio de Borrás de Café 1	0	0	90	45
Água Destilada	0	5	0	5
Volume final	100	50	100	50

Tabela 16: Composição dos meios de crescimento do resíduo de uva sem diluição no ensaio 4.

Composto	Substrato Repiso de Uva		Substrato Borrás de Uva	
	Ensaio de crescimento	Branco	Ensaio de crescimento	Branco
Inóculo	10	0	10	0
Meio MSC	0	0	0	0
Meio de Repiso de Uva 1	90	45	0	0
Meio de Borrás de Uva 1	0	0	90	45
Água Destilada	0	5	0	5
Volume final	100	50	100	50

Tabela 17: Composição dos meios de crescimento do resíduo de uva com diluição no ensaio 4.

Composto	Substrato Repiso de Uva (C/diluição)		Substrato Borrás de Uva (C/diluição)	
	Ensaio de crescimento	Branco	Ensaio de crescimento	Branco
Inóculo	10	0	10	0
Meio MCS	0	0	0	0
Meio de Repiso de Uva (diluído)	25	12,5	0	0
Meio de Borrás de Uva (diluído)	0	0	25	12,5
Água Destilada	65	37,5	65	37,5
Volume final	100	50	100	50



Figura 8: Crescimento de *C. protothecoides* nos meios produzidos a partir de resíduos do ensaio 4.

2.5 METODOLOGIAS ANALÍTICAS

2.5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS

Segundo o método analítico do livro Standard Methods os sólidos totais (ST) são a matéria que permanece como resíduo seco após evaporação da água a 105 °C.^[37]

Após evaporação da água, as amostras dos resíduos de tomate, café e uva são submetidas a incineração a 550 °C, onde a parte orgânica dos sólidos é oxidada, isto é, transforma-se em dióxido de carbono e água denominando-se por sólidos voláteis (SV) e a parte inorgânica permanece sob a forma de cinzas, denominando-se por sólidos fixos (SF).

Utilizando cápsulas de porcelana, previamente taradas a 120°C, foram colocados 5g de amostra de cada resíduo em triplicado e colocados em estufa a 105°C, com medições de massa a cada duas horas até atingir peso constante.

As cápsulas com os resíduos em estudo neste trabalho foram colocadas numa mufla a 550°C durante uma hora, pesando-se, após arrefecimento num exsiccador, o peso das cápsulas, determinando-se deste modo os SV e os SF dos resíduos em estudo, conforme descrito nas equações I e II.

Equação I: Determinação dos sólidos voláteis

$$SV = \frac{(A - B)}{massa_{amostra}}$$

Equação II: Determinação dos sólidos fixos

$$SF = \frac{(B - C)}{massa_{amostra}}$$

A - peso da amostra mais o peso da cápsula após a estufa (g);

B – peso da amostra mais o peso da cápsula após a mufla (g).

C – peso da cápsula (g).

2.5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do uso do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), utilizado para a determinação de açúcares redutores.^[38]

Para este método foi utilizado 0,5 mL de amostra, diluída de forma aos valores de medição fiquem dentro da gama de valores da reta de calibração, tendo-se a este volume de amostra adicionando 0,5 mL de reagente de DNS, tendo-se homogeneizado com vortex. De seguida, a mistura foi colocada, em banho maria a 100°C, durante cinco minutos e findado este tempo colocou-se a mistura, durante dez minutos, a arrefecer até à temperatura ambiente. Após o arrefecimento, adicionou-se 5mL de água destilada, homogeneizando-se novamente a mistura em vortex para fazer a leitura da densidade ótica a 550 nm, utilizando o colorímetro (Bio-Chrom-HK-AJ-090A170-DH).

A reta de calibração deste método, calculada no anexo I, foi determinada através do uso de soluções padrão de açúcares redutores com concentrações de 0,075 a 1,5 g/L, permitindo assim o cálculo dos valores de concentração para as amostras deste trabalho de investigação.

2.5.3 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO

Este método analítico foi um dos métodos utilizados neste estudo para determinar o crescimento da *Chlorella*, utilizando-se 2mL da amostra diária retirada das culturas de crescimento. Neste procedimento, centrifugou-se o volume referido anteriormente, neste ponto, em tubos eppendorf 2mL, previamente tarados a 105°C durante uma hora, por uma microcentrífuga (Centurion-Pro Research K1015) a 10000 rpm durante dez minutos. Após o ciclo de centrifugação, separou-se o sobrenadante, que foi usado como amostra para a determinação da concentração de açúcares redutores no ponto 2.5.2 e colocaram-se os tubos eppendorf com o precipitado novamente em estufa a 105°C durante uma hora. Terminado esse período, colocaram-se os tubos num exsiccador para arrefecerem à temperatura ambiente, para então serem pesados e determinar a biomassa de *Chlorella* dos ensaios realizados.^[39]

2.5.4 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA

A determinação da densidade ótica, foi o outro método analítico utilizado para a determinação do crescimento de *Chlorella*. Neste método, utilizou-se 1 mL do volume de amostra diária, retirado de todas as culturas de crescimento em estudo, colocando-se a amostra em células de plástico, a mais adequada para fazer leituras de densidade ótica na gama, de comprimentos de onda, visível. Utilizou-se água destilada como branco, para as medições neste trabalho

de investigação, e sempre que os valores de densidade ótica fossem superiores a 1, fez diluição das amostras também com água destilada. [40]

2.6 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

2.6.1 TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO

A partir dos valores do peso seco, descrito no ponto, 2.5.3, foi possível calcular a taxa específica de crescimento (μ) da *Chlorella*, através da correlação, equação II, do logaritmo natural da concentração de biomassa seca em função do tempo. Uma vez que os últimos dias dos ensaios realizados houve um decréscimo da biomassa produzida de microalga, foi necessário ter em atenção a escolha dos valores do crescimento em fase exponencial.

Equação III: Determinação da taxa específica de crescimento

$$\ln X = \mu t + \ln X_i$$

Onde:

$\ln X$ – logaritmo natural da concentração de biomassa de microalga;

μ - taxa específica de crescimento (h^{-1});

t – tempo (h).

$\ln X_i$ – logaritmo natural da concentração de biomassa de microalga no início da fase do crescimento exponencial;

2.6.2 TAXA MÉDIA DE CONSUMO DE SUBSTRATO

De forma a estudar a afinidade da *Chlorella* com os substratos produzidos à base de resíduos calculou-se a taxa média de consumo de substrato (r_s), representada na equação III.

Equação IV: Determinação da taxa média de consumo de substrato

$$r_s = \frac{m_i - m_f}{V \times t}$$

Onde:

r_s – taxa média de consumo de substrato ($\text{g}/(\text{L.h})$);

m_i – massa inicial de substrato (g);

m_f – massa final de substrato (g);

V – volume da cultura (L);

t – duração do ensaio (h).

Uma vez que este trabalho de investigação se baseou no crescimento mixotrófico de *Chlorella*, considerou-se para este parâmetro a massa de açúcares redutores calculada a partir da concentração de açúcares redutores, obtida por análise química, ponto 2.5.2.

2.6.3 PRODUTIVIDADE

De forma a avaliar o crescimento de microalga, calculou-se a produtividade, pela equação IV, dos vários ensaios de crescimento.

Equação V: Determinação da produtividade de biomassa de *Chlorella protothecoides*

$$P_X = \frac{m_f - m_i}{V \times t}$$

Onde:

P_X – produtividade de biomassa (g/(L.h));

m_f – biomassa final (g);

m_i – biomassa inicial (g);

V – volume médio da cultura (L);

t – duração do ensaio (h).

2.6.4 RENDIMENTO

A partir da produtividade de biomassa de microalga e da taxa de consumo de substrato, calculou-se o rendimento da produção de *Chlorella*, equação V.

Equação VI: Determinação do rendimento de produção de *Chlorella protothecoides*

$$Y_{P/S} = \frac{P_x}{r_s}$$

Onde:

$Y_{P/S}$ –rendimento de biomassa de microalga em relação ao substrato (g biomassa /g açúcares redutores);

P_x – produtividade de biomassa (g/(L.h));

r_s – taxa média de consumo de substrato (g/(L.h));

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DA INDÚSTRIA AGROALIMENTAR

Neste estudo, pretendeu-se determinar a composição orgânica (sólidos voláteis) e inorgânica (sólidos fixos) dos resíduos mencionados anteriormente, bem como a sua composição em água (% humidade), estando os valores médios apresentados na tabela 18.

Tabela 18: Composição em sólidos voláteis, fixos e humidade, nos resíduos de tomate, café e uva.

% na amostra (base húmida)	Sólidos Voláteis	Desvio Padrão	Sólidos Fixos	Desvio Padrão	Humidade	Desvio Padrão
Repiso de Tomate	18,31	0,76	0,97	0,03	80,72	0,78
Borras de Café	28,70	5,82	0,51	0,01	70,79	5,82
Repiso de Uva	29,99	0,73	4,11	0,10	65,90	0,72
Borras de Uva	12,31	0,07	5,33	0,21	82,36	0,15

Observando os valores da tabela 18, representados graficamente na figura 9, foi possível constatar que o repiso de uva e as borras de café foram os resíduos que apresentaram a maior composição de sólidos voláteis (matéria orgânica), com uma composição de 29,99% e 28,70%, respetivamente por grama de resíduo húmido, e as borras de uva o resíduo com a menor composição. No que diz respeito aos sólidos fixos (matéria inorgânica), verificou-se que as borras de uva são o resíduo que apresenta uma maior composição, com 5,33% por grama de resíduo húmido e as borras de café a menor.

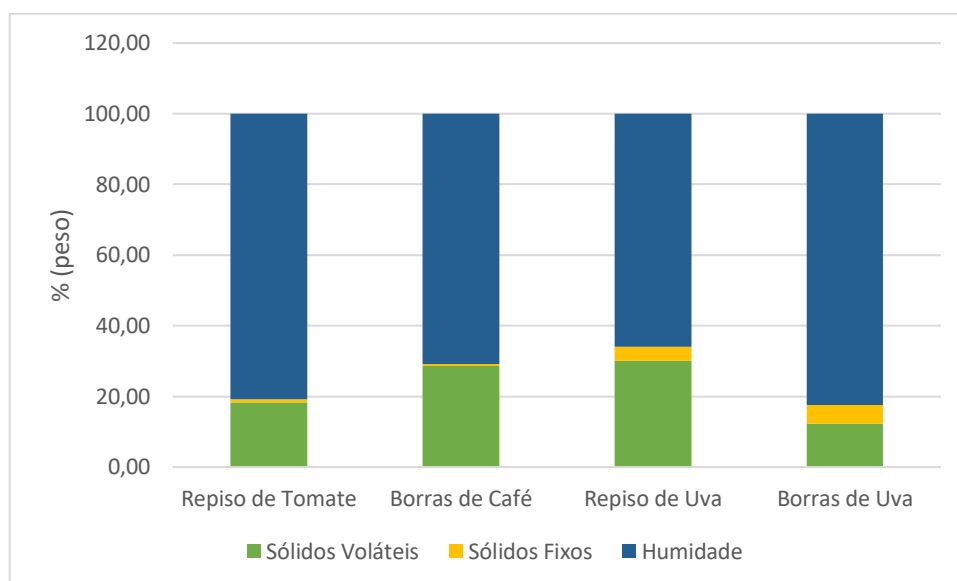


Figura 9: Representação gráfica da quantificação de sólidos voláteis e sólidos fixos, nos resíduos em estudo

O principal objetivo da utilização dos resíduos da indústria agroalimentar foi, como já referido anteriormente, o uso de uma fonte alternativa de carbono para a formulação de substratos para culturas de crescimento mixotrófico de microalga, neste caso, a *Chlorella protothecoides*. De forma a avaliar o potencial dos resíduos em estudo, como fonte alternativa de carbono determinou-se a concentração de açúcares redutores nos substratos produzidos, descritos no ponto 2.2, utilizando o método analítico do uso de DNS, descrito no ponto 2.5.2.

A partir resultados obtido, tabela 19 e figura 10, concluiu-se que o repiso de uva é o resíduo que apresenta uma maior concentração de açúcares redutores, na ordem dos 53 g/L, e por outro lado os resíduos de borra de café e borra de uva, são os resíduos que apresentaram a concentração mais baixa neste estudo, na ordem dos 1,4 g/L.

Tabela 19: Concentração de açúcares redutores nos substratos nos quatro resíduos em estudo

	Tomate (g/L)	Café (g/L)	Repiso Uva (g/L)	Borra Uva (g/L)
Média	6,54	1,49	53,77	1,47
Desvio Padrão	0,28	0,10	1,55	0,09

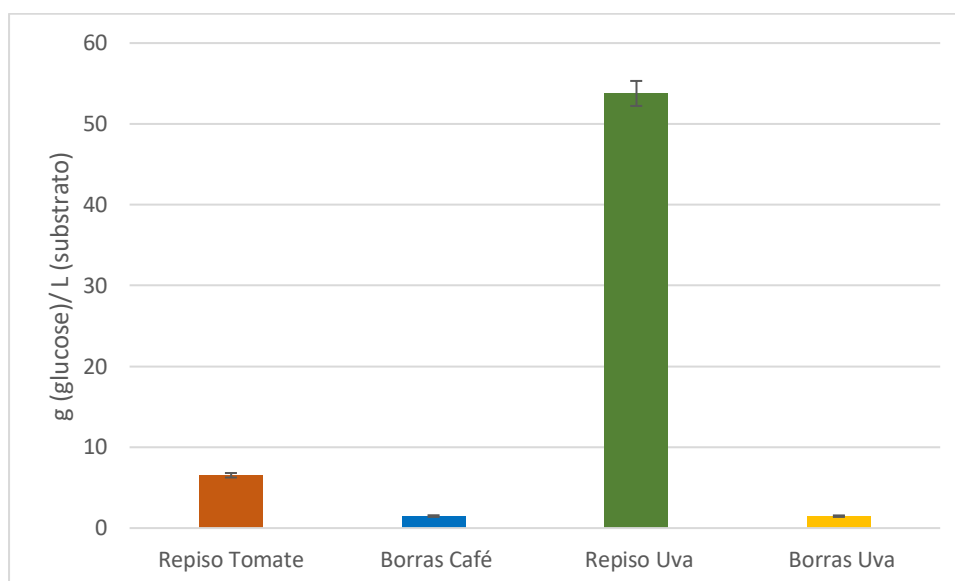


Figura 10: Representação gráfica da concentração de açúcares redutores nos diferentes substratos produzidos a partir dos resíduos de tomate, café e uva (g (açúcares redutores)/L)

3.2 ESTUDO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS, NO CRESCIMENTO DE *CHLORELLA PROTOTHECOIDES*

3.2.1 TAXA ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DA *C. PROTOTHECOIDES*

Um dos passos mais importantes para o estudo do crescimento da *Chlorella protothecoides*, foi a determinação da taxa específica de crescimento (μ).

3.2.1.1 ENSAIO 1

No primeiro ensaio deste estudo, optou-se por fazer a comparação das culturas em crescimento nos substratos de resíduos, com o meio de referência inorgânico (MCV), devido ao facto de não se ter informações sobre os parâmetros cinéticos relativos ao crescimento nestes quatro tipos de resíduos. Para além disso, também por não se saber a afinidade destes substratos com a microalga, utilizou-se também o meio MCV na formulação dos substratos de resíduos agroalimentares, conforme consta na tabela 12 no ponto 2.4.1, atuando como um suplemento de nutrientes.

A partir das curvas de crescimento, figura 11 e tabela 20, verificou-se que houve uma maior produção de biomassa para o meio com repiso de tomate, 1,85 g/L, de seguida o meio com borras de café, 1,03 g/L e por fim o meio MCV, com 0,28 g/L.

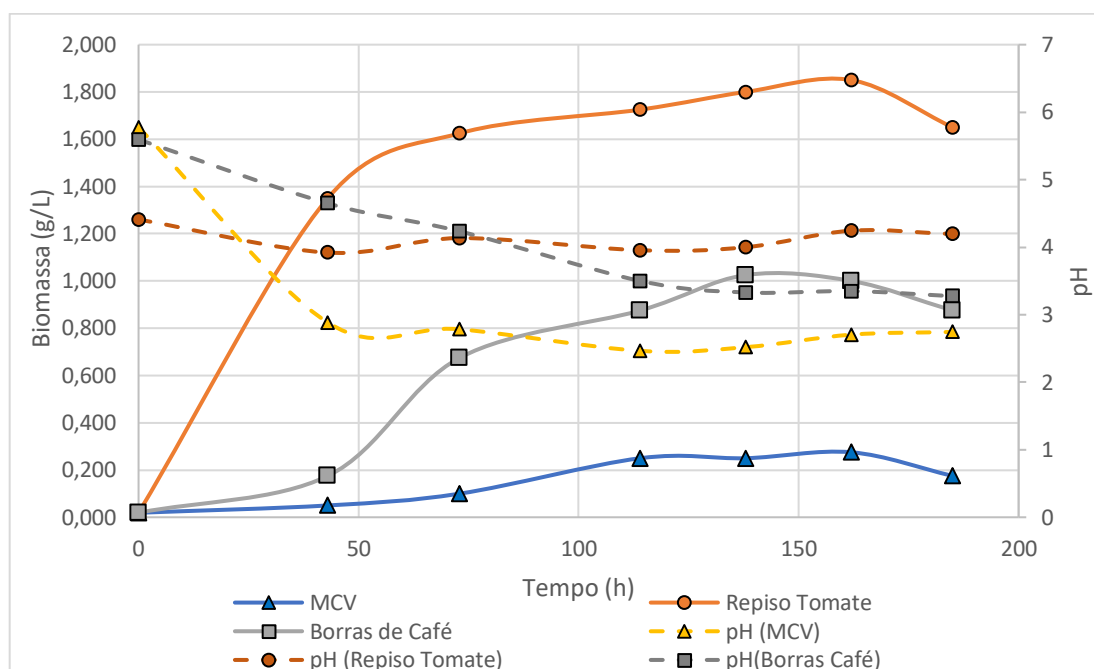


Figura 11: Curva de crescimento e variação de pH da *C. protothecoides*, nos meios de cultura MCV, repiso de tomate e borras de café, ao longo do ensaio 1.

Tabela 20: Biomassa de *C. protothecoides* produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 1.

Tempo (horas)	MCV (g/L)	Desvio Padrão	Repiso Tomate (g/L)	Desvio Padrão	Borrás Café (g/L)	Desvio Padrão
0	0,02	0	0,02	0	0,02	0
43	0,05	0	1,35	7,9E-17	0,18	7,1E-05
73	0,10	1,4E-04	1,63	7,1E-05	0,68	7,1E-05
114	0,25	0	1,73	7,1E-05	0,88	7,1E-05
138	0,25	2,8E-04	1,80	1,4E-04	1,03	7,1E-05
162	0,28	2,1E-04	1,85	4,2E-04	1,00	2,8E-04
185	0,18	7,1E-05	1,65	0	0,88	3,5E-04

Fez-se também a medição do pH nos diferentes meios de cultura e verificou-se que os crescimentos com repiso de tomate, foram os meios que apresentaram uma menor flutuação de valores ao longo do tempo, na ordem de pH 4. No crescimento com borras de café e meio MCV, houve uma redução do pH, ao longo do tempo, registando-se uma estabilização na ordem dos 3 e 2, respetivamente.

De forma a determinar a taxa específica de crescimento dos diferentes meios de crescimento, escolheu-se a fase exponencial de cada curva, representadas na figura 12, a partir do logaritmo natural das concentrações de biomassa, representadas na figura 13, conforme consta na tabela 20.

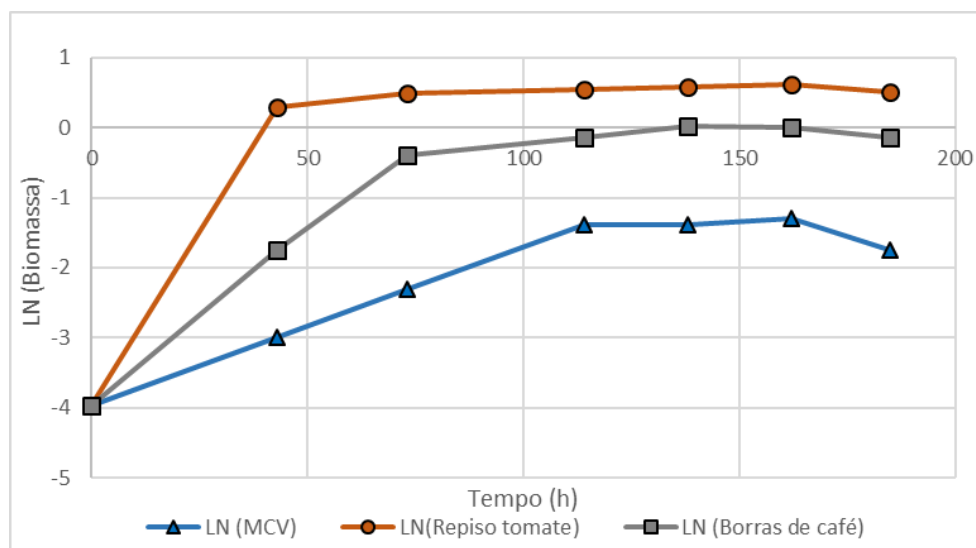


Figura 12: Representação logarítmica do crescimento de biomassa das culturas de *C. protothecoides*, no ensaio 1.

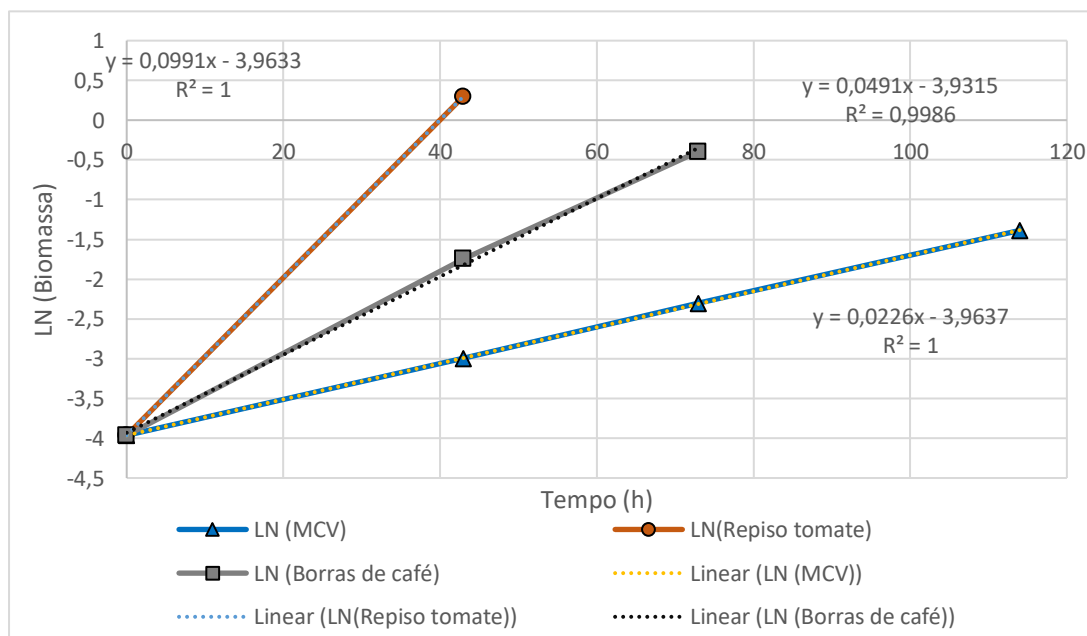


Figura 13: Crescimento exponencial de *C. protothecoides*, no ensaio 1.

O meio de crescimento com o substrato de repiso de tomate foi a cultura que apresentou a taxa específica de crescimento maior neste ensaio, sendo o seu valor de $0,0991 \text{ h}^{-1}$.

Tabela 21: Taxa específica de crescimento (μ) e tempo de duplicação (td), nas diferentes culturas de crescimento do ensaio 1.

	MCV	Repiso Tomate	Borras Café
μ (h^{-1})	0,0225	0,0991	0,0497
td (h)	30,8	10,4	13,9
R^2	0,9999	1	0,9996

De notar que o repiso de tomate já tinha passado a fase exponencial ao fim das 43 h iniciais e estava em fase de desaceleração para atingir a fase estacionária, pelo que não foi possível medir mais que 2 pontos na fase exponencial de crescimento para este resíduo, verificou-se também a nível ótico que a coloração da biomassa microalgal, no crescimento com repiso de tomate, apresentou uma cor amarela/laranja, nas primeiras 48h, verificando-se após esse período uma viragem para uma coloração verde, o que indica que a cultura já tinha consumido toda a fonte de carbono e tinha entrado em modo crescimento autotrófico.

3.2.1.2 ENSAIO 2

O segundo ensaio realizado neste estudo, foi também com os substratos de repiso de tomate e borra de café, mas com a diferença da redução da concentração de meio autotrófico MCV, utilizando-se neste o meio de crescimento heterotrófico MSC, como meio de referência, tal como referenciado no ponto 2.4.2.

Através da representação gráfica da figura 14 (tabela 23), verificou-se, que à semelhança do ensaio 1, o meio com substrato de repiso de tomate foi a cultura de crescimento que apresentou a maior concentração de biomassa, face às outras culturas de crescimento, tendo-se atingido para este meio, uma concentração máxima de 3,45 g/L, para as borras de café, 1,45 g/L e para o meio MSC 2,35 g/L.

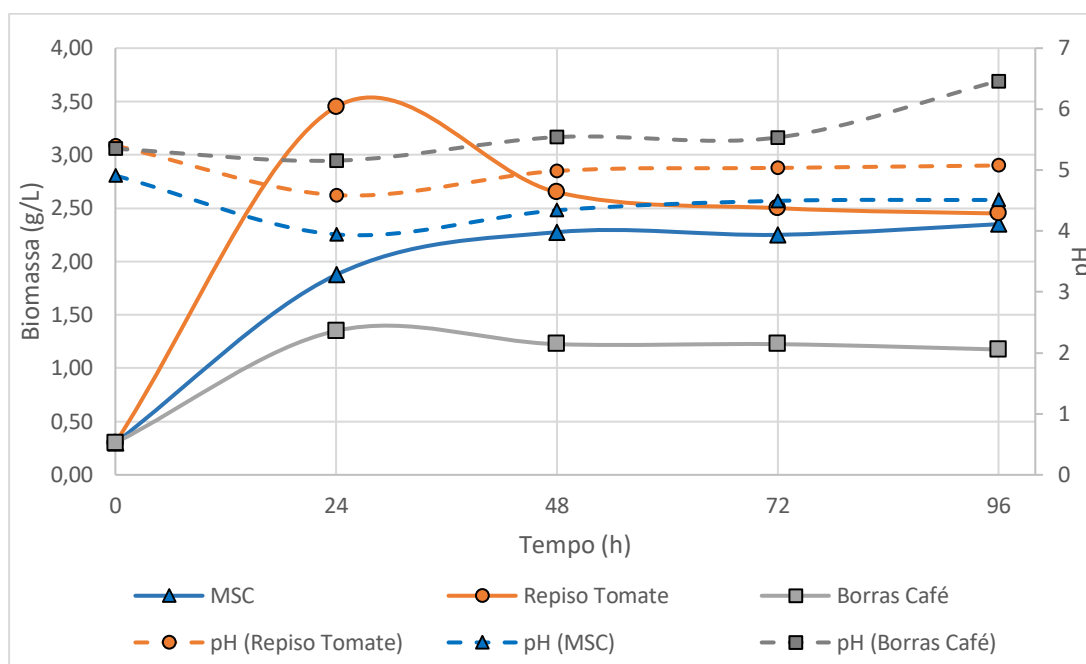


Figura 14: Curva de crescimento e variação de pH da *C. protothecoides*, nos meios de cultura MSC, repiso de tomate e borras de café, ao longo do ensaio 2.

Tabela 22: Biomassa de *C. protothecoides* produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 2

Tempo (horas)	MSV (g/L)	Desvio Padrão	Repiso Tomate (g/L)	Desvio Padrão	Borrás Café (g/L)	Desvio Padrão
0	0,30	7,1E-04	0,30	1,4E-04	0,30	3,5E-04
24	1,87	2,1E-04	3,45	1,4E-03	1,35	2,8E-04
48	2,28	3,5E-04	2,65	2,8E-04	1,23	2,1E-04
72	2,25	2,8E-04	2,50	2,8E-04	1,22	7,1E-05
96	2,35	1,4E-04	2,45	0	1,18	2,1E-04

Uma vez que neste ensaio, a fase exponencial para os meios com repiso de tomate e borras de café se verificou entre o primeiro e o segundo ponto, obteve-se um coeficiente do cálculo da taxa específica de crescimento, representada na tabela 23, de um, estando as representações gráficas do logaritmo natural da concentração de biomassa e do logaritmo natural das concentrações de biomassa na fase exponencial, apresentadas no anexo II.

Tabela 23: Taxa específica de crescimento, dos meios de crescimento MSC, repiso de tomate e borras de café, do ensaio 2.

	MSC	Repiso Tomate	Borras Café
μ (h ⁻¹)	0,042	0,102	0,063
td (h)	16,4	6,8	11,1
R ²	0,8944	1	1

Neste ensaio também se verificou que a cultura de crescimento com o substrato com repiso de tomate apresentou a maior taxa de crescimento, deste ensaio.

3.2.1.3 ENSAIO 3

O terceiro ensaio fez-se sem diluição dos substratos nas culturas de crescimento, tal como referenciado na tabela 14, no ponto 2.4.4. Esta alteração fez-se para verificar se os três substratos utilizados na sua concentração total, potenciarium um maior crescimento das microalgas, obtendo-se os crescimentos representados na figura 15 e tabela 24.

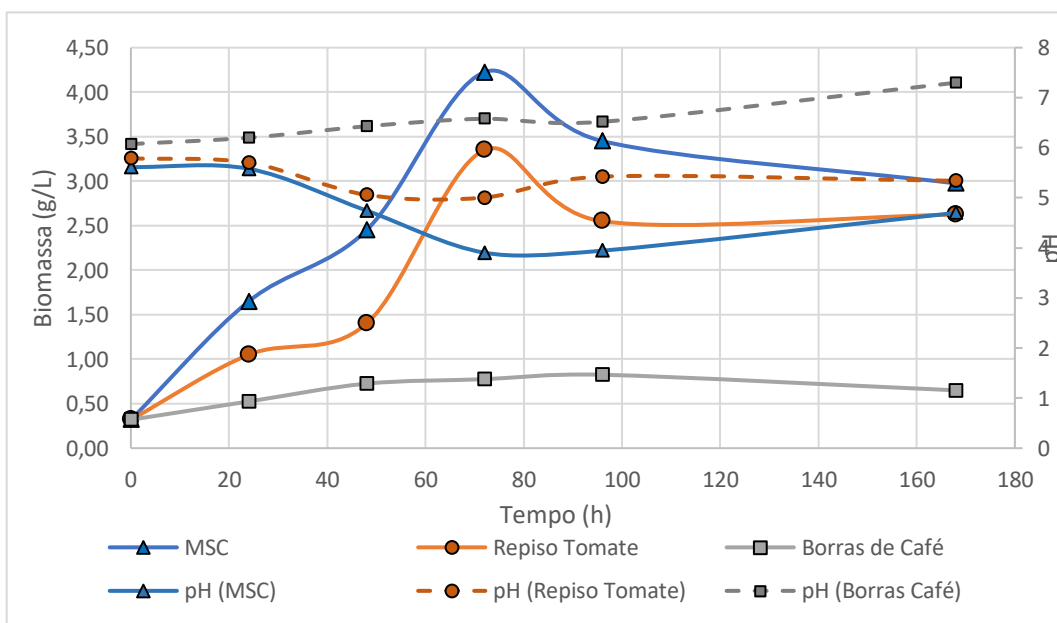


Figura 15: Curvas de crescimento e variação de pH das culturas de crescimento de *C. protothecoides*, com os substratos de repiso de tomate, borras de café e MSC, no ensaio 3

Tabela 24: Biomassa de *C. protothecoides* produzida nos diferentes resíduos e respetivo desvio padrão, no ensaio 3.

Tempo (horas)	MSV (g/L)	Desvio Padrão	Repiso Tomate (g/L)	Desvio Padrão	Borras Café (g/L)	Desvio Padrão
0	0,32	7,1E-05	0,32	9,9E-04	0,32	7,1E-05
24	1,65	1,4E-04	1,05	1,4E-04	0,52	7,1E-05
48	2,45	9,9E-04	1,40	1,4E-04	0,73	2,1E-04
72	4,23	1,1E-03	3,35	7,1E-04	0,77	3,5E-04
96	3,45	1,4E-04	2,55	5,7E-04	0,82	2,1E-04
168	2,97	7,1E-05	2,62	7,8E-04	0,65	8,5E-04

Verificou-se através das representações gráficas no anexo 3 da taxa de crescimento das culturas realizadas neste ensaio, também representadas na tabela 25 que todos as culturas de crescimento, deste ensaio, sofreram um efeito inibitório por se ter verificado uma diminuição deste parâmetro cinético das culturas de crescimento face aos resultados obtidos no ensaio 2.

Tabela 25: Taxa específica de crescimento, dos meios de crescimento MSC, repiso de tomate e borras de café, do ensaio 3.

	MSC	Repiso Tomate	Borras Café
μ (h⁻¹)	0,0339	0,0306	0,0170
td (h)	20,4	22,7	40,7
R²	0,89288	0,95211	0,98542

Apesar da diminuição da taxa específica de crescimento, o meio de crescimento com substrato MSC, foi o meio que a apresentou a maior taxa, com um valor de 0,0339 h⁻¹ e com uma concentração de biomassa máxima de 4,23 g/L, o meio com repiso de tomate apresentou uma concentração máxima de 3,35 g/L e o meio com borras de café com 0,83 g/L.

3.2.1.5 ENSAIO 4

No último ensaio utilizaram-se apenas os substratos sem diluição no caso dos meios de crescimento com repiso de tomate e borras de café, e utilizaram-se os substratos com e sem diluição para os resíduos de repiso de uva e borra de uva.

Os meios de crescimento com os substratos de repiso de tomate apresentaram uma curva de crescimento semelhante aos meios ensaios anteriores para estes resíduos, com uma concentração máxima de biomassa de 4,23 g/L e os meios de borras de café apresentaram uma ligeira subida, face ao ensaio anterior com o mesmo resíduo, apresentando uma concentração máxima de biomassa de 1,55 g/L conforme representado na figura 16 e tabela 26.

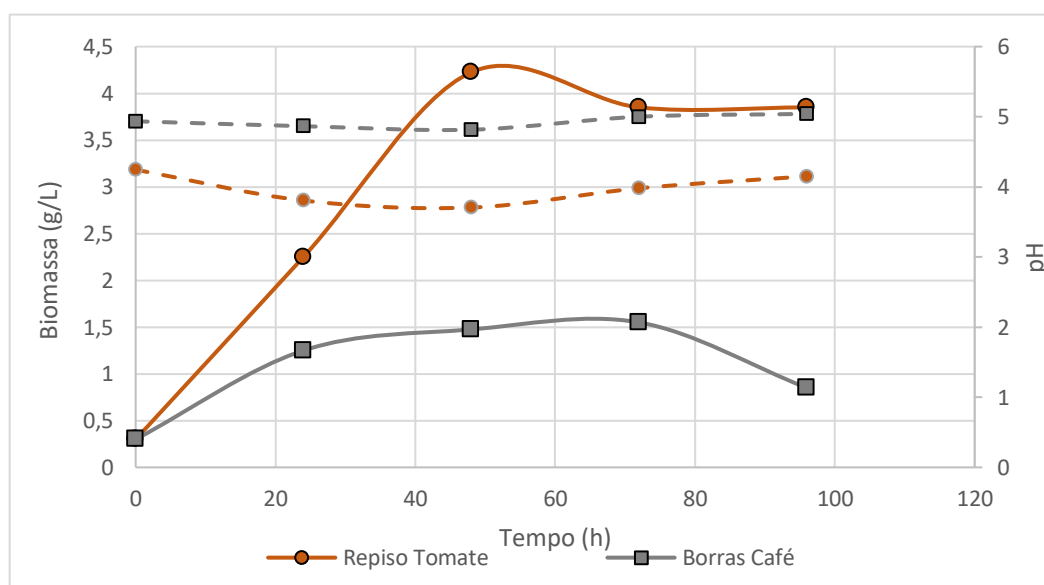


Figura 16: Representação gráfica das curvas de crescimento e da variação do pH, dos meios com repiso de tomate e borras de uvacafé, no ensaio 4.

Nos meios de repiso de uva e borras de uva registaram-se concentrações de biomassa mais elevadas nos meios sem diluição, conforme representado nas figuras 17(tabela 27) e 18 (tabela 28).

Tabela 26: Biomassa de *C. protothecoides* produzida nos resíduos de repiso de tomate e borras de café e respetivo desvio padrão, no ensaio 4

Tempo (horas)	Repiso Tomate (g/L)	Desvio Padrão	Borras Café (g/L)	Desvio Padrão
0	0,30	2,8E-04	0,30	1,4E-04
24	2,25	2,8E-04	1,25	1,4E-04
48	4,22	2,1E-04	1,48	2,1E-04
72	3,85	2,8E-04	1,55	7,1E-04
96	3,85	2,8E-04	0,85	7,1E-04

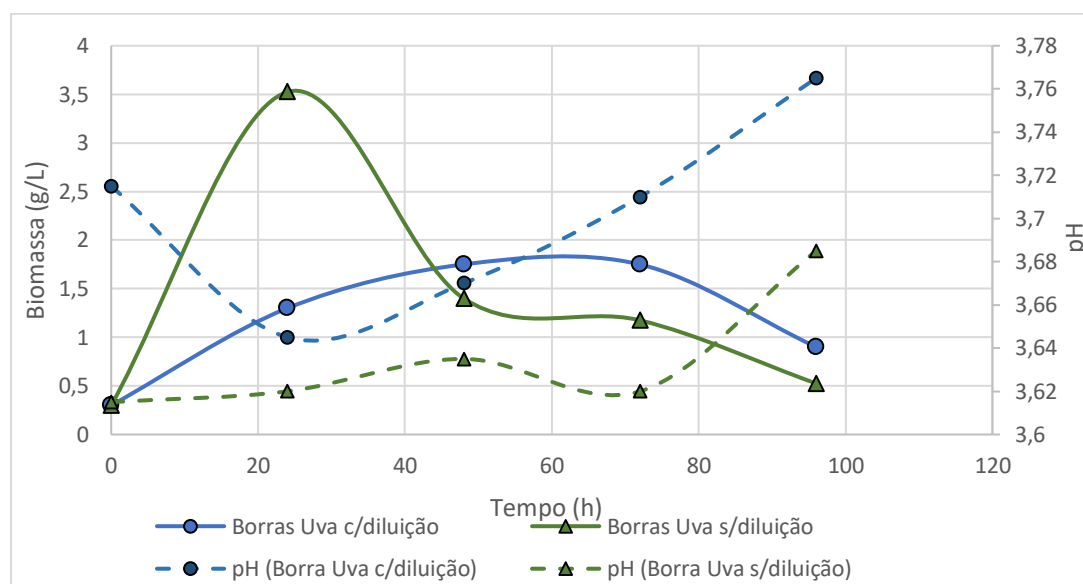


Figura 17: Curvas de crescimento nos meios de borras de uva, com e sem diluição, no ensaio 4.

Tabela 27: Biomassa de *C. protothecoides* produzida no resíduo de borra de uva, diluído e não diluído, e respetivo desvio padrão, no ensaio 4

Tempo (horas)	Borra Uva Diluído (g/L)	Desvio Padrão	Borra Uva Concentrado (g/L)	Desvio Padrão
0	0,30	0	0,30	0
24	1,30	2,8E-04	3,53	7,7E-03
48	1,75	2,8E-04	1,40	7,1E-04
72	1,75	1,1E-03	1,17	7,8E-04
96	0,90	7,1E-04	0,52	7,1E-05

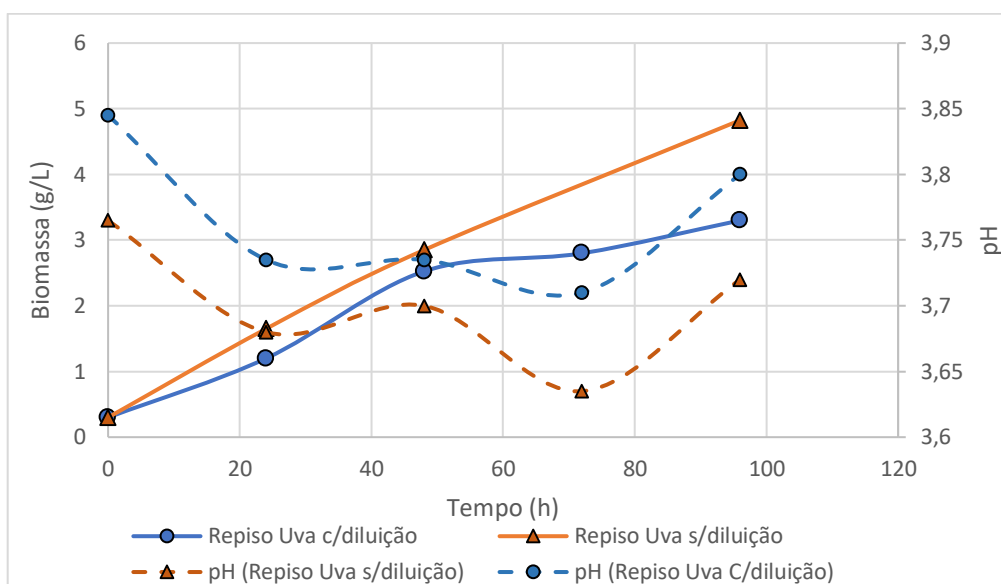


Figura 18: Curvas de crescimento nos meios de repiso de uva, com e sem diluição, no ensaio 4.

Tabela 28: Biomassa de *C. protothecoides* produzida no resíduo de repiso de uva, diluído e não diluído, e respetivo desvio padrão, no ensaio 4

Tempo (horas)	Repiso Uva Diluído (g/L)	Desvio Padrão	Repiso Uva Concentrado (g/L)	Desvio Padrão
0	0,30	2,1E-04	0,30	2,5E-03
24	1,20	1,1E-03	1,65	1,4E-04
48	2,53	3,5E-04	2,85	1,1E-03
72	2,80	2,8E-04	0,73	9,2E-04
96	3,30	9,9E-04	4,82	1,5E-03

À semelhança dos ensaios anteriores, fez-se o cálculo da taxa de crescimento da *C. protothecoides*, nos quatro resíduos em estudo, estando os seus valores descritos na tabela 29 e as representações gráficas do logaritmo natural das concentrações de biomassa, desenvolvidas no anexo IV.

Segundo a literatura, a *C. protothecoides*, apresentou uma taxa específica de crescimento ligeiramente a cima da taxa obtida para açúcares redutores pura, tendo o meio com resíduos de borras de uva, apresentado uma taxa de $0,096 \text{ h}^{-1}$ e um rendimento biomassa/açúcares redutores de 0,43.⁵¹

Tabela 29: Taxa de crescimento dos meios com repiso de tomate, borras de café e repiso e borras de uva (com e sem diluição), no ensaio 4.

	Repiso Tomate	Borras Café	Borras Uva c/diluição	Borras Uva s/diluição	Repiso Uva c/diluição	Repiso Uva s/diluição
μ (h⁻¹)	0,055	0,033	0,037	0,103	0,044	0,047
td (h)	12,6	11,2	18,7	6,7	15,8	14,7
R²	0,9163	0,8270	0,8722	1	0,9706	0,9189

3.2.2 TAXA MÉDIA DE CONSUMO DE SUBSTRATO

Uma vez que o objetivo deste trabalho era a utilização de resíduos da indústria agroalimentar, como fonte alternativa de carbono, considerou-se a concentração de açúcares redutores das amostragens diárias de cada ensaio, através do método analítico do uso do DNS, como referido no ponto 2.5.2, para determinar a taxa média de consumo de substrato.

Tendo em conta as concentrações de açúcares redutores dos substratos dos resíduos de tomate, café e uva, mencionadas na tabela 19, no ponto 3.1, recalculou-se essas concentrações tendo em conta as diluições utilizadas em cada um dos ensaios. Deste modo obteve-se a tabela 30, com as diferentes concentrações obtidas

Tabela 30: Concentração de açúcares redutores nos substratos em cada ensaio, tendo em conta as diluições efetuadas.

Ensaio	Repiso de Tomate (g/L)	Borras de Café (g/L)	Repiso de Uva (g/L)	Borras de Uva (g/L)
1	1,64	0,37	-----	-----
2	3,27	0,76	-----	-----
3	5,89	1,34	-----	-----
			C/diluição	C/diluição
			13,44	0,38
4	5,89	1,34	S/diluição	S/diluição
			49,39	1,32

Através da representação gráfica da figura 15, verificou-se que a açúcares redutores existente nos meios de cultura foi toda consumida nas primeiras 70h do ensaio, para o ensaio 1 (A) e

nas primeiras 24h para o ensaio 2 (B). No ensaio 3 (C) também o consumo de açúcares redutores se deu nas primeiras 24h para o meio com borras de café e para o meio com repiso de tomate verificou-se um período de latência nas primeiras 24h, dando-se o consumo de açúcares redutores no período entre as 24h e as 48h do ensaio. No ensaio 4 (D), o consumo de açúcares redutores, nos dois meios, deu-se nas primeiras 40h até estabilizar a concentração.

Verificou-se que em todos os ensaios houve uma estabilização do consumo de açúcares redutores quando esta atingiu uma concentração na ordem dos 1 g/L, à exceção do ensaio 4 (D), onde o meio com borras de café apresentou uma estabilização da concentração de açúcares redutores na ordem dos 3 g/L.

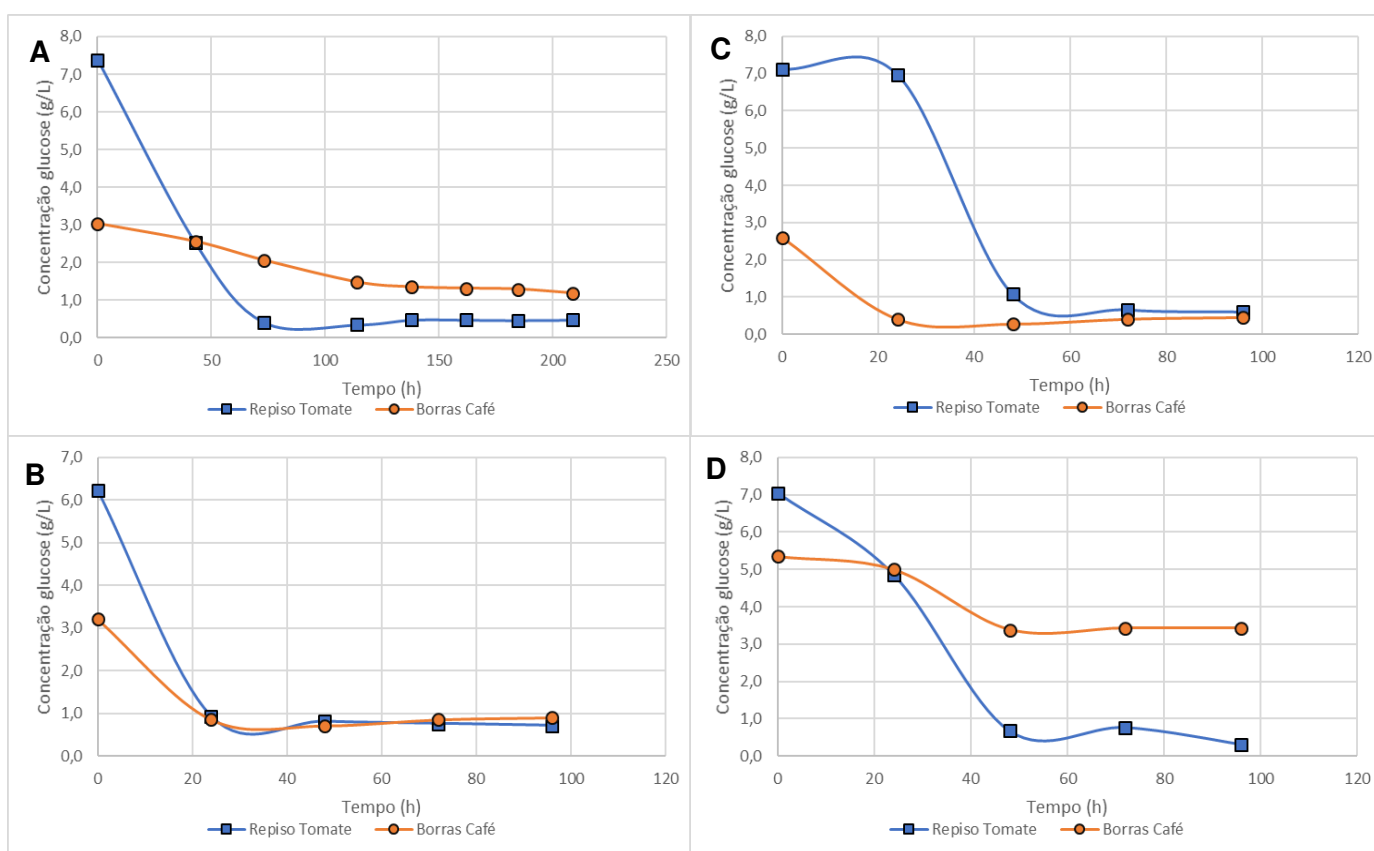


Figura 19: Representação gráfica do consumo de açúcares redutores nos meios de crescimento com repiso de tomate e borras de café, no ensaio 1 (A), no ensaio 2 (B), no ensaio 3 (C) e no ensaio 4 (D).

Pela equação IV para a determinação da taxa média de consumo de substrato, referida no ponto 2.6.2, determinou-se este parâmetro cinético, tabela 31, para as culturas de crescimento realizadas neste trabalho de investigação.

Tabela 31: Taxa média de consumo de substrato nos quatro ensaios realizados neste trabalho de investigação.

Ensaio	Repiso de Tomate (g/(L*h))	Borras de Café (g/(L*h))	Repiso de Uva (g/(L*h))	Borras de Uva (g/(L*h))
1	0,04	0,01	-----	-----
2	0,06	0,02	-----	-----
3	0,07	0,02	-----	-----
4	0,07	0,03	C/diluição 0,13 S/diluição 0,34	C/diluição 0,06 S/diluição 0,07

No que diz respeito aos ensaios de crescimento com substratos de repiso(A) e borra de uva(B), realizados no ensaio 4, figura 20, deste estudo, foi evidente que a cultura de *C. protothecoides* apresentou mais afinidade para consumir a açúcares redutores presente no meio com repiso de uva diluído, face ao mesmo resíduo sem diluição.

Verificou-se que a concentração de açúcares redutores, nos meios de crescimento com repiso de uva (com e sem diluição), apresentaram uma estabilização da concentração na ordem dos 30 g/L, enquanto os meios com borra de uva apresentaram um consumo praticamente total de açúcares redutores.

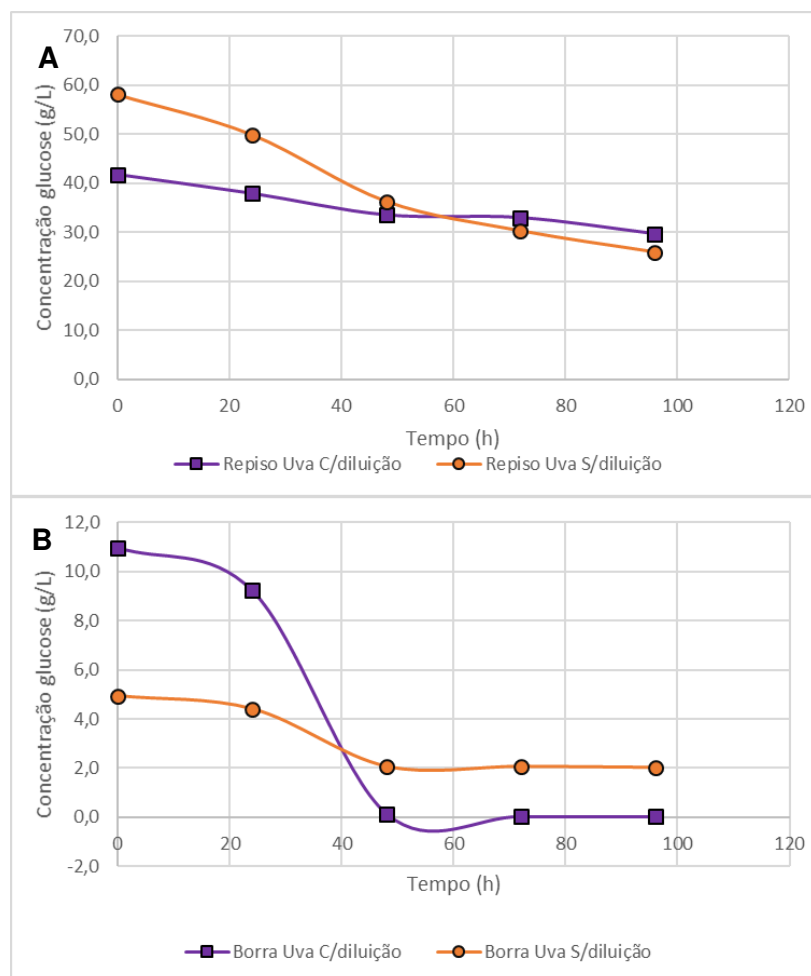


Figura 20: Representação gráfica do consumo de glucose nos meios de crescimento com repiso de uva (A) e borra de uva (B), no ensaio 4.

3.2.3 PRODUTIVIDADE

Para se conseguir avaliar o crescimento da *C. protothecoides* neste estudo, calculou-se a produtividade máxima, a partir da equação V no ponto 2.6.3. Para cada crescimento, selecionou-se o ponto onde se atingiu a concentração máxima de biomassa para a variável da biomassa final e considerou-se o tempo onde se atingiu essa concentração. Deste modo, obtiveram-se as produtividades dos ensaios realizados neste estudo de acordo com a tabela 32.

Tabela 32: Produtividade máxima das culturas de crescimento de *C. protothecoides*, realizados neste estudo.

Ensaio	Repiso de Tomate (g/(L*h))	Borras de Café (g/(L*h))	Repiso de Uva (g/(L*h))	Borras de Uva (g/(L*h))
1	0,01	0,006	-----	-----
2	0,13	0,04	-----	-----
3	0,04	0,01	-----	-----
			C/diluição 0,03	C/diluição 0,03
4	0,08	0,08	S/diluição 0,05	S/diluição 0,13

A maior produtividade foi obtida quando a microalga cresceu em meio com substrato de repiso de tomate diluído e quando cresceu em meio com substrato de borras de uva sem diluição, atingindo um valor de 0,13 g de biomassa de microalga por litro de cultura em cada hora.

Nestes ensaios não se verificou a maior taxa de consumo de açúcares redutores ao contrário do que seria de esperar, podendo significar que há outros nutrientes em jogo que não foram alvo de estudo como por exemplo a concentração em azoto orgânico.

3.2.4 RENDIMENTO

A partir da equação VI do ponto 2.6.4, calculou-se o rendimento de cada cultura de crescimento, tabela 33, de forma a verificar a quantidade de açúcares redutores consumida, de cada resíduo, que conseguiria produzir de biomassa microalgal. De entre os rendimentos obtidos, o rendimento da cultura com borras de café, no ensaio 4, destacou-se de todas as outras culturas, mesmo até das restantes culturas com borras de café, realizadas neste estudo. A

razão mais plausível para esta ocorrência pode dever-se ao facto de haver interferências nas medidas de peso seco, uma vez que estamos a trabalhar com resíduos agroindustriais e no caso especial das borras de café, estas apresentam uma granulometria muito fina, pelo que há uma elevada probabilidade de algumas partículas terem passado através dos poros dos papeis de filtro durante o processo de produção dos substratos à base deste resíduo. Desta forma as partículas contribuíram para um aumento da massa pesada em cada eppendorf, na obtenção do peso seco da biomassa.

Tabela 33: Rendimento das culturas de crescimento de *C. protothecoides* nos diferentes resíduos (g biomassa / g açúcares redutores)

Ensaio	Repiso de Tomate (g biomassa/ g açúcares reduto- res)	Borras de Café (g biomassa/ g açúcares reduto- res)	Repiso de Uva (g biomassa/ g açúcares reduto- res)	Borras de Uva (g biomassa/ g açúcares reduto- res)
1	0,25	0,60	-----	-----
2	2,17	2,00	-----	-----
3	0,57	0,50	-----	-----
4	1,14	2,67	C/diluição 0,09 S/diluição 0,38	C/diluição 0,50 S/diluição 1,86

Analisando os rendimentos biomassa/açúcares redutores obtidos no ensaio 4, ensaio este onde já não se utilizou meio MCV, como suplemento aos substratos com resíduos, apesar das concentrações de açúcares redutores obtidas em cada substrato, o meio de crescimento com borras de café foi o meio que apresentou um maior rendimento (biomassa/açúcares redutores), atingindo um valor máximo de 2,67 g biomassa/g açúcares redutores, seguindo-se as borras de uva com 1,86 g biomassa/g açúcares redutores, o repiso de tomate, com 1,14 g biomassa/g açúcares redutores e por último o meio com repiso de uva com uma concentração máxima de 0,38 g biomassa/g açúcares redutores. Uma vez que se registaram valores de rendimento superiores a um, a explicação para o ocorrido prende-se com o facto de se ter trabalho com resíduos da agroindústria, que interferiram com as medições realizadas. No entanto, considerando os valores de rendimento aceitáveis, ou seja, a baixo de 1, os quatro resíduos apresentaram rendimentos a cima de valores apresentados na literatura e noutros ensaios experimentais ^{[5],[16]}.

4. CONCLUSÕES FINAIS

Este trabalho de investigação teve como objetivo o estudo da possibilidade da utilização de determinados resíduos da agroindústria, numa altura em que se enfrentam grandes desafios para o tratamento das grandes quantidades de resíduos produzidas anualmente.

Primeiramente, foram testados os resíduos de café e tomate com o suplemento de meio autotrófico, o meio MCV, com o intuito de o retirar gradualmente ao longo deste estudo, ficando apenas os substratos com os resíduos nas culturas de crescimento. O estudo culminou assim com a utilização de dois resíduos originados da transformação da uva, na produção vinícola. Deste modo, pretendeu-se usar estes resíduos como fonte de carbono orgânico alternativa, de forma a promover um crescimento heterotrófico, sem a necessidade de recorrer ao uso de compostos como a glucose e o glicerol.

Comparando as diferentes concentrações de açúcares redutores em cada resíduo verificou-se que o repiso de uva é o resíduo que apresentou a maior concentração, com um valor de 50 g/L, aproximadamente. Logo a seguir, o repiso de tomate apresentou a segunda concentração mais alta deste estudo, registando-se uma concentração máxima de aproximadamente 6 g/L, seguindo-se as borras de uva e as borras de café com uma concentração na ordem dos 1,30 g/L.

Durante a realização dos ensaios foi evidente que houve um grande pico no crescimento da microalga nos meios com substrato de repiso de tomate da hora zero para as vinte e quatro horas, permitindo-se concluir que os inóculos de *C. protothecoides* não precisaram de uma fase de latência para se adaptar a este resíduo.

Por outro lado, apesar de as culturas onde foram utilizados os substratos com borras de café, terem apresentado um rendimento acima de todos os meios com resíduos utilizados neste estudo, foi evidente a presença de partículas de granulometria muito baixa, que se identificaram durante o processo da centrifugação das amostras diárias, para a determinação posterior do peso seco, apesar de se terem realizado vários processos de filtração, de forma a evitar a presença de partículas de borras de café, que interferissem na determinação dos parâmetros cinéticos para se avaliar o crescimento da *C. protothecoides*. De forma a conseguir identificar todas as interferências, é necessário determinar a composição total dos substratos com resíduos, para se identificarem todos os compostos que possam estar a inibir o crescimento da microalga, para além das partículas de resíduos em suspensão.

Um dos objetivos programados neste trabalho era a determinação dos azotos totais nos quatro resíduos utilizados, mas devido a uma avaria no digestor da ESTSetúbal/IPS, não foi possível realizar este procedimento analítico, pelo que um dos próximos passos a desenvolver neste trabalho de investigação será a realização desta análise de forma a determinar uma correlação entre a concentração de azotos e a produtividade de microalga.

Para além deste método analítico a realizar, também se pretende realizar o estudo da utilização de enzimas, como a celulase, na digestão dos resíduos agroindustriais, durante o processo de produção dos substratos de resíduos, com o objetivo de aumentar a disponibilização de compostos importantes para o crescimento de *C. protothecoides*. Também se pretende realizar um estudo em semi-contínuo, com o substrato de repiso de tomate uma vez que a *C. protothecoides* apresentou uma boa finidade com este resíduo.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] LOWREY, Joshua, BROOKS, Mariane S, (2014), Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges—a critical review, *Journal of Applied Phycology*
- [2] KOYANDE, Apurav Krishna, CHEW, Kit Wayne, RAMBABU, K, TAO, Yang, CHU, Dinh-Toi, SOW, Pau-Loke (2019), Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans, *Food Science and Human Wellness*.
- [3] Disponível em: <https://iwa-network.org/microalgae-sustainable-alternative-wastewater-treatment/> (visitado a 27/07/2019)
- [4] FAO, (2009), How to feed the world in 2050, Insights from an expert meeting at FAO, Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- [5] O'GRADY, John, MORGAN, John A., (2010), Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol, Purdue University, EUA
- [6] VALENTE, Joana, M. L. D, (2015), Tese de mestrado-Subprodutos Alimentares: Novas Alternativas e Possíveis Aplicações Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, Portugal
- [7] MADEIRA, Marta S., CARDOSO, Carlos, LOPES, Paula A., COELHO, Diogo, AFONSO, Cláudia, BANDARRA, Narcisa M., PRATES, José A.M. *et al* (2017), Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: a review, *Livestock Science*
- [8] RICHMON, Amos (2004), *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science
- [9] XU, Han, MIAO, Xiaoling, WU, Qingyu, (2006), High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *Journal of Biotechnology*
- [10] RIBEIRO, José E. S, MARTINI, Mina, ALTOMONTE, Iolanda, SALARI, Federica, NARDONI, Simona, SORCE, Carlo, SILVA, Flávio H., ANDREUCCI, Andrea, (2017), Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll a carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate , *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*
- [11] BARATA, Ana F. L., (2016), Tese de mestrado- Microalgas: produção económica e ambientalmente sustentável, Universidade de Lisboa, Portugal
- [12] CAPORGO, Martín P., HABERKORN, Iris, BOCKER, Lukas, MATHY, Alexander, (2019), Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions, *Bioresource Technology*

- [13] BOHUTSKYI, Pavlo, LIU, K, KESSLER, BA, KULA, T, HONG, Y, BOUWE, EJ, BETENBAUGH, MJ, ALLNUTT, F.C., (2014), Mineral and non-carbon nutrient utilization and recovery during sequential phototrophic-heterotrophic growth of lipid-rich algae, Johns Hopkins University, EUA
- [14] ANUPAMA, RAVINDRA, P., (2000), Value added food: Single cell protein, Biotechnology Advances
- [15] SMETANA, Sergiy, SANDMANN, M, ROHN, S, PLEISSNER, D, HEINZ, V, (2017), Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: Life Cycle Assessment, Instituto de Tecnologia Alimentar da Alemanha
- [16] CHEN, Feng, (1996), High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth, Elsevier
- [17] SEMIÃO, Filipe J. C., (2013), Tese de mestrado- Produção de *single cell oil* para biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado, Universidade Nova, Portugal.
- [18] KRZEMINSKA, Izabela, NAWROCK, AGNIESZKA, PIASCKA, Agata, JAGIELSKI, Pawel, TYS, Jerzy, (2015), Cultivation of *Chlorella protothecoides* in photobioreactors: The combined impact of photoperiod and CO₂ concentration, Engineering in Life Sciences
- [19] WANG, Yanming, RISCHER, Heiko, ERIKSEN, Niels T., WIEBE Marilyn G., (2013), Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids, Bioresource Technology.
- [20] ENZING, Christien, PLOEG Matthias, BARBOSA Maria, SIJTSMA Lolke, VIGANI Mauro, PARISI Claudia, RODRIGUEZ, Emilio, (2014), Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe (Comissão Europeia)
- [21] Guimarães L., (2012), Tese de mestrado- Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas, Universidade de Braga, Portugal
- [22] BRENNAN, Liam, OWENDE, Philip, (2009), Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Renewable and Sustainable Energy Reviews
- [23] CARDOSO, Aderlânio da Silva, VIEIRA, Gláucia Eliza Vieira, MARQUES, Anelise Kappes, (2010), O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis, Brazilian Journal of Biosciences
- [24] Disponível em:
<https://www.pordata.pt/Europa/Produ%C3%A7%C3%A3o+de+res%C3%ADuos+total+e+por+tipo+de+res%C3%ADuo-1380-220763> (visitado a 22/11/2019)
- [25] CETKOVIC, Gordana, SAVATOVIC, Sladjana, CANADANOVIC-BRUNET, Jasna, DJILAS, Sonja, VULIC, Jelena, MANDIC, Anamarija, CETOJEVIC-SIMIN, (2012), Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste, Food Chemistry
- [26] SILVA, Y. P. A., BORBA, B. C., REIS, M. G., M. Calíari, FERREIRA, T.A.P.C (2016), Tomato industrial waste as potential source of nutrients, XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: a árvores que sustenta a vida.

- [27] FERREIRA, Anabela Dias, (2011), Tese de mestrado- Influência da borra de café no crescimento e nas propriedades químicas e biológicas de plantas de alface (*Lactuca sativa* L.)
- [28] CALDEIRA, Diana C. A., (2015), Tese de mestrado- Valorização da Borra de Café: Otimização da Produção de Biodiesel por Catálise Enzimática, Instituto Politécnico de Bragança
- [29] OLIVEIRA, Carina do Rosário, (2011), Tese de mestrado- Avaliação da Qualidade de Compostos de Borrás de Café na Produção de Plantas Aromáticas, Universidade de Lisboa
- [30] UQUICHE, Edgar, JEREZ, Marcia, ORTIZ, Jaime,(2007), Effect of pretreatment with micro-waves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol), Innovative Food Science & Emerging Technologies
- [31] VEGGI, Priscilla Carvalho, (2006), Tese de mestrado-Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos, Universidade Estadual de Campinas
- [32] SANTOS, Renata Dinnies, FERRARI, Roseli Aparecida, (2005), Extração aquosa enzimática de óleo de soja, Food Science and Technology
- [33] PIGHINELLI, Montenegro Turtelli, *et al*, (2008), Otimização da prensagem a frio de grãos de amendoim em prensa contínua tipo *expeller*
- [34] MARQUES, Thalita Moreira, ESPINHEIRA, Marcelo José Costa Lima, SOUZA, Flávio Mendes, (2018), Revisão bibliográfica sobre os diferentes métodos de extração de óleo essencial, Faculdade Independente do Noroeste, Brasil
- [35] ZHANG, Qing-Wen, LIN, L.G, YE, W.C,(2018), Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, Chin Med
- [36] ANTUNES, Rafael Souza, LOPES, Flavio, BRITO, Andressa de Oliveira, GARCIA, Luane Ferreira, (2017), Enzimas vegetais: extração e aplicações biotecnológicas, Infarma-Ciências Farmacêuticas
- [37] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, (1999), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater
- [38] Miller, G.L., (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar., American Chemical Society.
- [39] SANTOS, Carla, (2018), Protocolo Experimental de Laboratórios V: Análise aos sólidos em águas residuais, Instituto Politécnico de Setúbal
- [40] SANTOS, Carla, (2014), Tese de Doutoramento: New symbiotic approach for sustainable microalgae production: a biorefinery platform, Universidade Nova de Lisboa

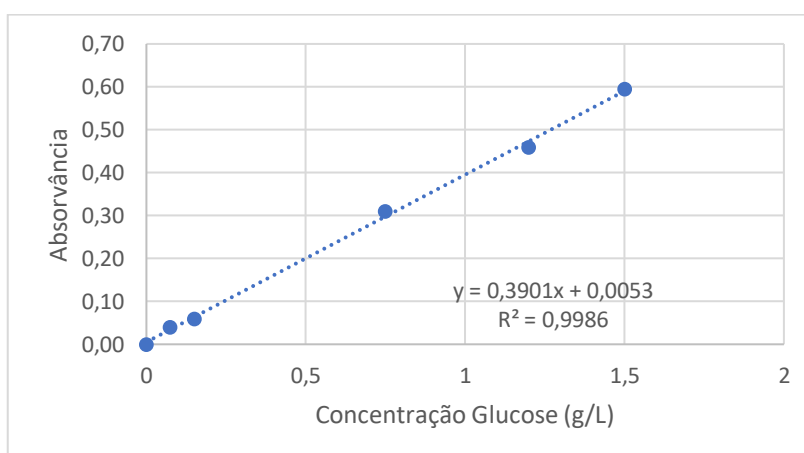
ANEXOS

ANEXO I

Para o método analítico do uso do DNS, foi necessário realizar uma reta de calibração para o cálculo da concentração de açúcares redutores, para este estudo.

Espetro Abs 550 nm		
Amostra	Absorvância	Concentração [Açúcares redutores] (g/L)
Branco	0,00	0
P1	0,60	1,5
P2	0,46	1,2
P3	0,31	0,75
P4	0,06	0,15
P5	0,04	0,075

Figura 21: Valores dos padrões de açúcares redutores para a realização da reta de calibração.



ANEXO II

À semelhança do ensaio 1, também se fez a representação gráfica do logaritmo natural da concentração de biomassa e a escolha das fases exponenciais de cada ensaio, para a determinação da taxa específica de crescimento.

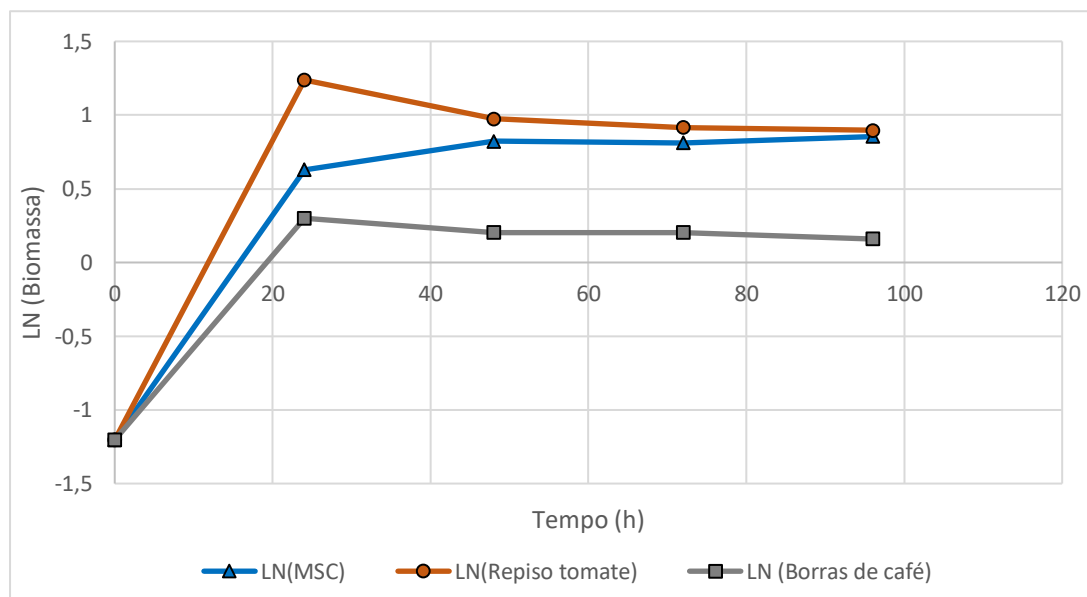


Figura 22: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, no ensaio 2.

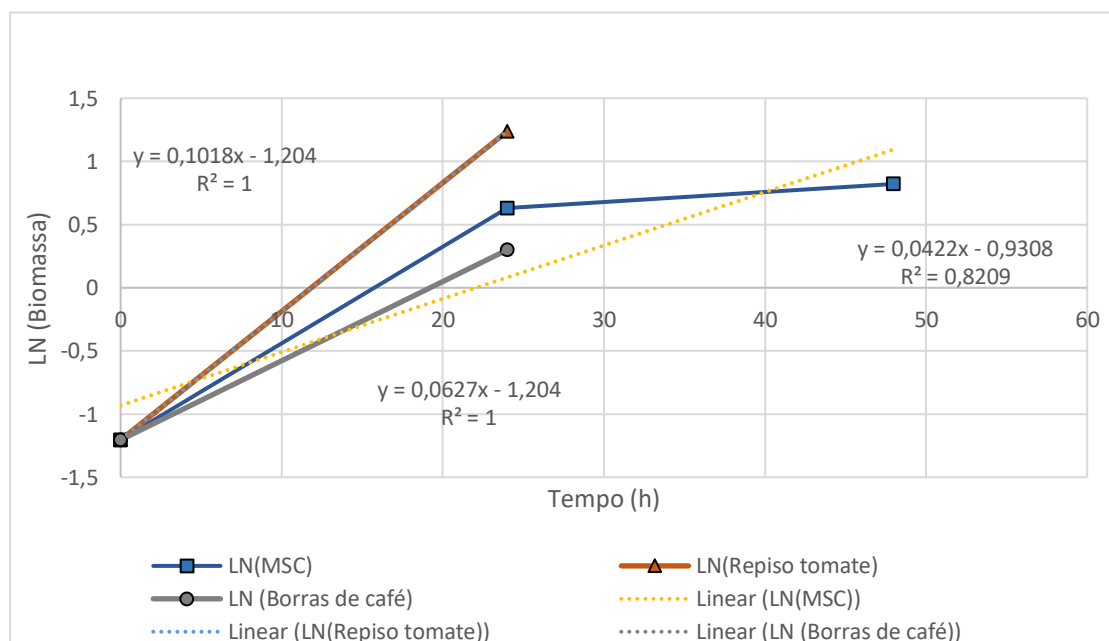


Figura 23: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, no ensaio 2.

ANEXO III

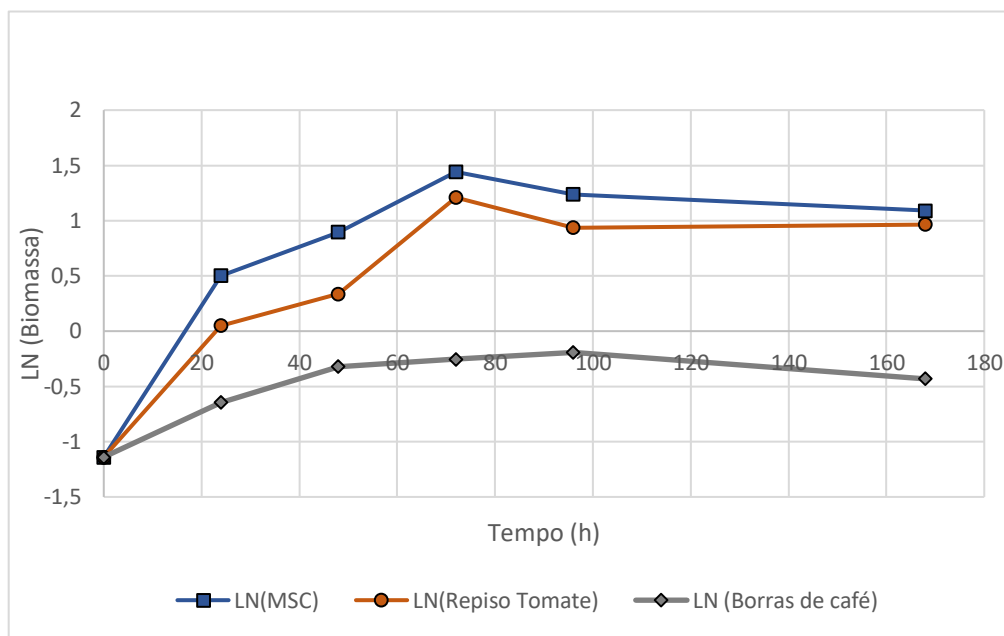


Figura 24: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, no ensaio 3

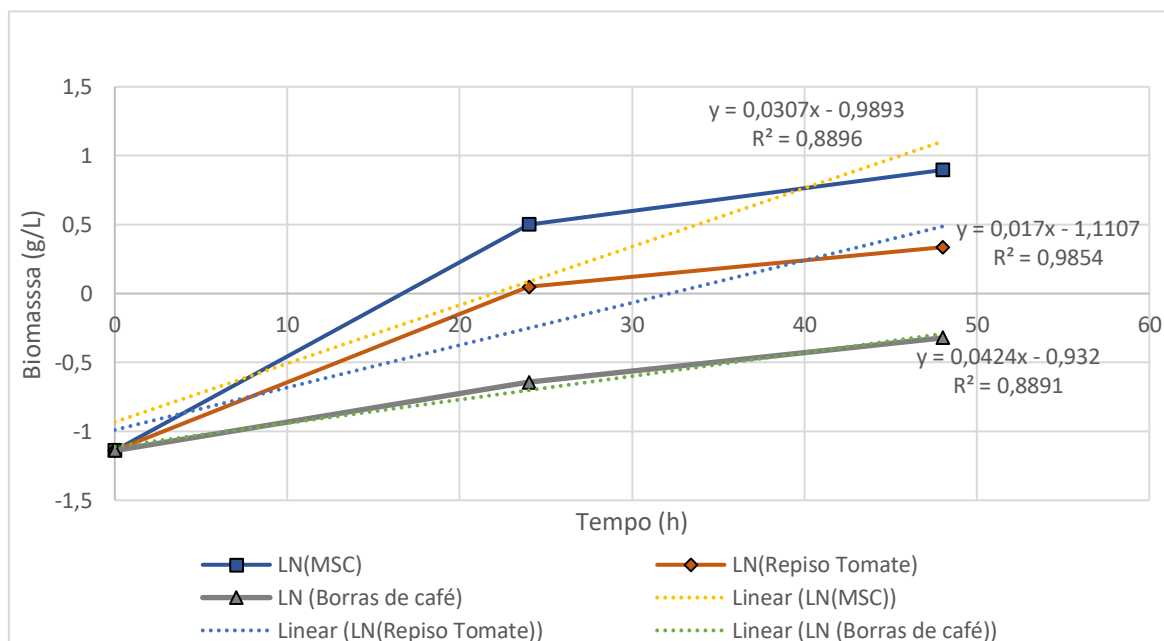


Figura 25: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, no ensaio 2

ANEXO IV

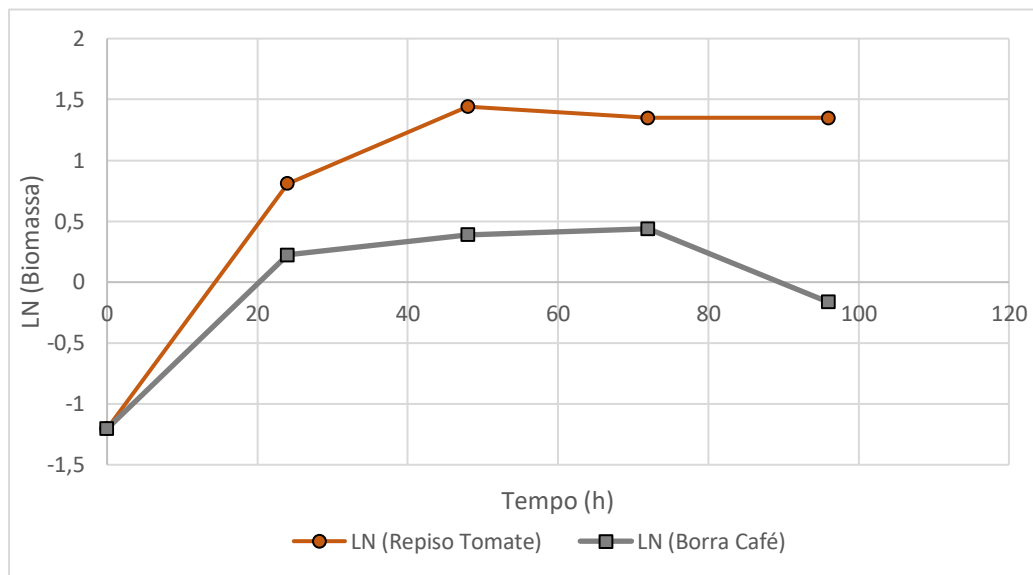


Figura 26: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com repiso de tomate e borra de café, no ensaio 4.

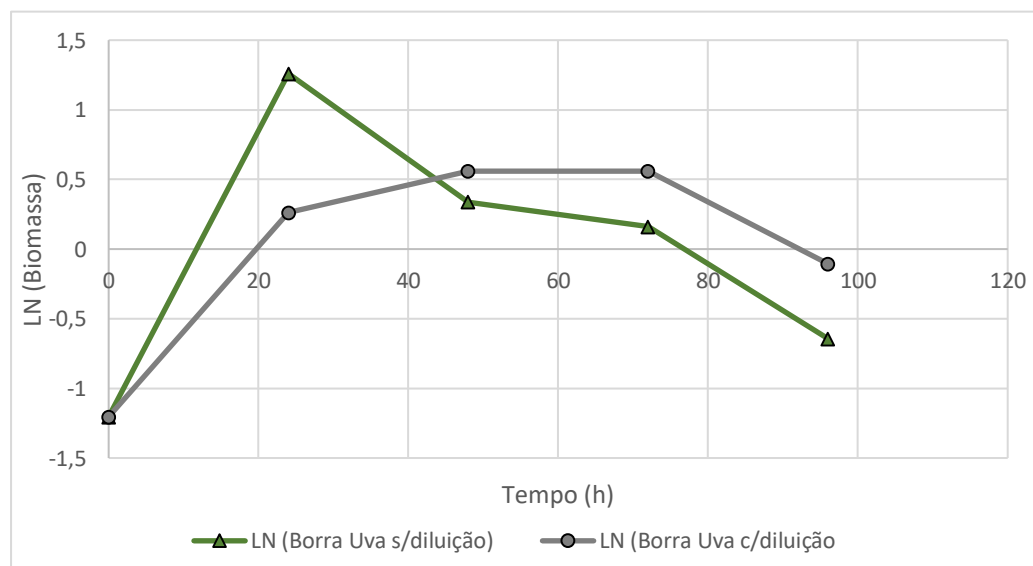


Figura 27: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com borra de uva, no ensaio 4.

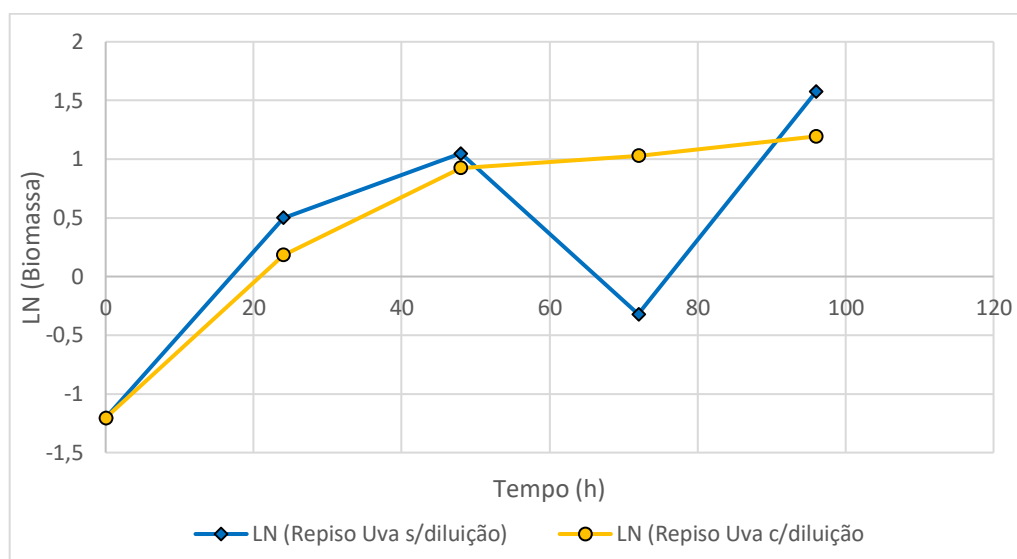


Figura 28: Representação gráfica do logaritmo natural das concentrações de biomassa, dos meios com repiso de uva, no ensaio 4.

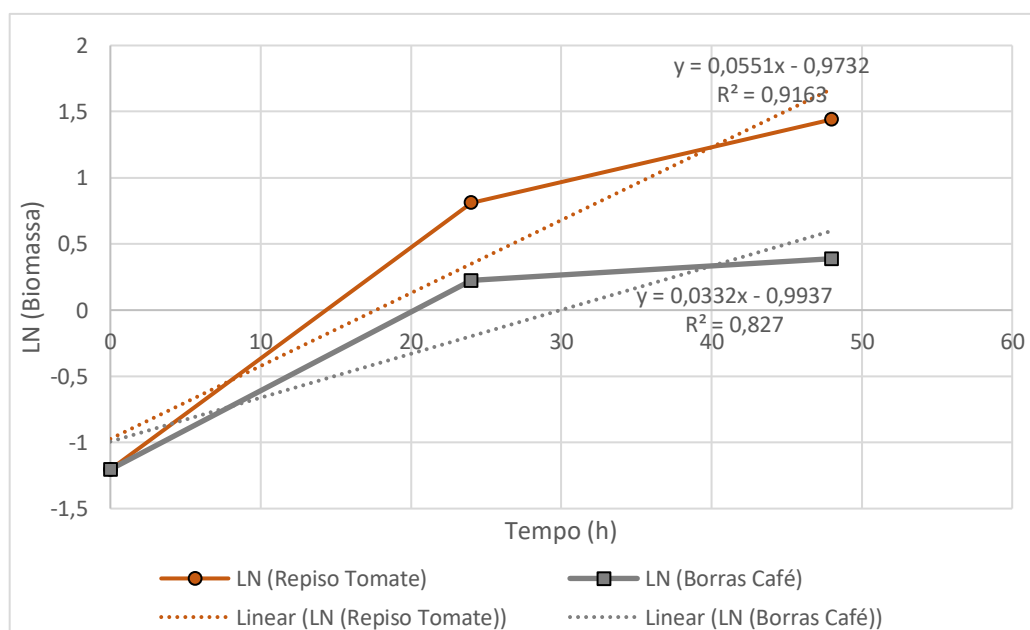


Figura 29: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com repiso de tomate e borras de café, no ensaio 4.

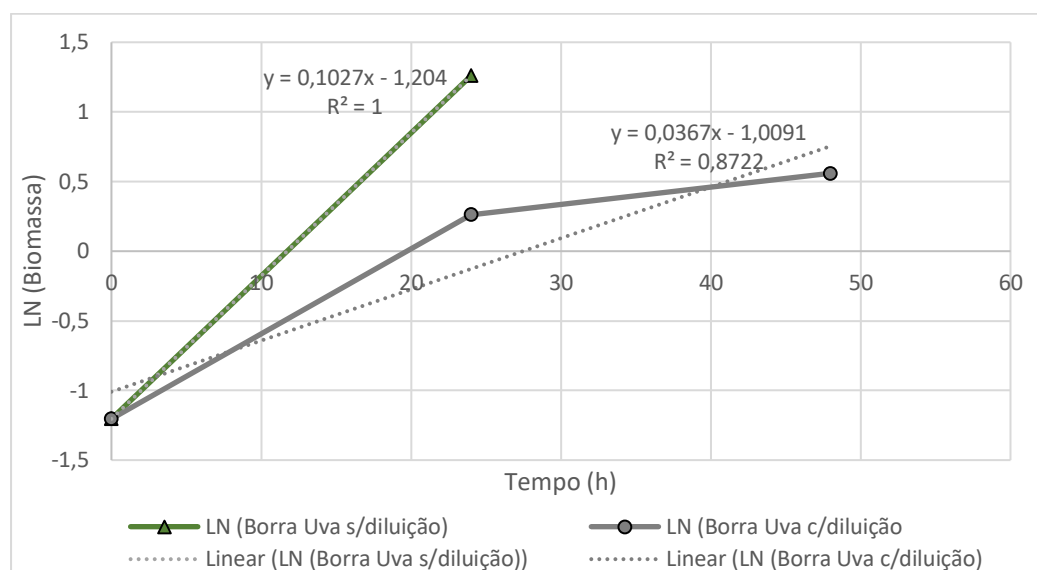


Figura 30: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com borras de uva, no ensaio 4.

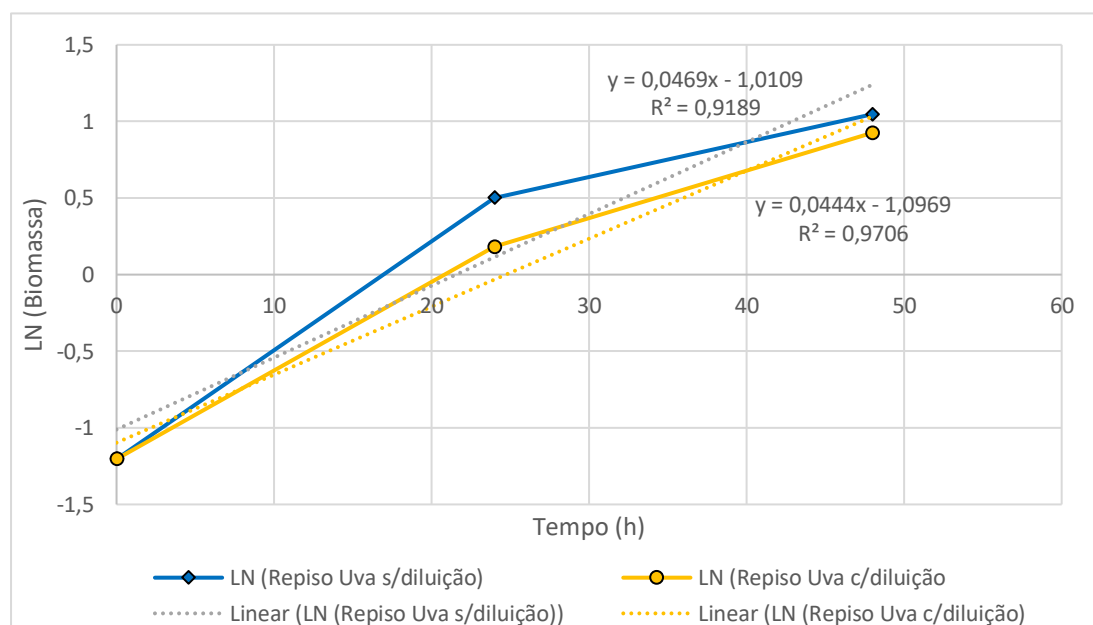


Figura 31: Representação gráfica da fase exponencial do logaritmo natural da concentração de biomassa de *C. protothecoides*, para a determinação da taxa específica de crescimento, dos meios com repiso de uva, no ensaio 4