



M 2022

**OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS DE
PRODUÇÃO DE BIOMASSA,
ESTABILIZAÇÃO DE EXTRATOS E
FORMULAÇÃO DE PRODUTOS
BASEADOS EM MICROALGAS E
CIANOBACTÉRIAS COM
APLICAÇÕES EM AGRICULTURA**

ANDREIA LOPES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
À FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM
ENGENHARIA QUÍMICA

Mestrado em Engenharia Química

Otimização de processos de produção de biomassa, estabilização de extratos e formulação de produtos baseados em microalgas e cianobactérias com aplicações em agricultura

Dissertação de Mestrado

de

Andreia Lopes

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizado em



Orientador na FEUP: **Prof. Olga Nunes**

Coordenador na Fykia Biotech: **Prof. Vitor Vasconcelos**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Doutora Olga Nunes que, enquanto minha orientadora na FEUP, acompanhou o meu trabalho ao longo destes meses e esteve sempre disponível para ajudar e aconselhar. Para além de supervisora desta dissertação, a professora é um membro integrado do LEPABE – Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, financeiramente suportado pelo LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/00511/2020 e UIDP/00511/2020 (LEPABE), fundado por fundos nacionais pela FCT/MCTES (PIDDAC).

Agradeço igualmente ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos pela oportunidade e confiança depositada em mim para realizar este trabalho na Fykia Biotech e ser meu coordenador na empresa, assim como por me disponibilizar todos os recursos necessários à realização da tese.

É para mim importante agradecer também à Ana Silva, igualmente estagiária na empresa, por me ter integrado na equipa e me ter ajudado a dar os primeiros passos na realização desta tese. Obrigada da mesma forma aos restantes membros da equipa pela disponibilidade e amizade.

Um agradecimento especial à Joana Azevedo, técnica superior no CIIMAR, por me ter auxiliado e guiado numa das etapas mais importantes e atribuladas da tese, tendo sido essencial para a realização da mesma, assim como ao Professor Luís Belchior e Rui Santos por me terem possibilitado o uso do ICP-MS apenas disponível na FCUP. Um grande obrigada aos membros do BBE, o laboratório de *Blue Biotechnology and Ecotoxicology* do CIIMAR, onde desenvolvi o trabalho experimental, pelo auxílio e companheirismo.

Como não podia deixar de ser, quero agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional, por garantirem que nada me faltava e que tinha tudo o que precisava para concluir esta tese com sucesso. É igualmente importante o agradecimento à minha prima Ana, por todas as vezes em que me acalmou quando os obstáculos apareceram, por sempre me aconselhar e ajudar no que podia, e ser como uma irmã para mim.

Por fim, agradeço ao meu namorado, Rafael, por acreditar em mim, estar presente e me encorajar a seguir as minhas convicções e objetivos. Um grande obrigada a todos os amigos que a faculdade me trouxe, por me terem acompanhado e comigo criado memórias durante estes 5 anos e por muitos mais que aí virão.

Resumo

A agricultura recorre diariamente a fertilizantes químicos para aumentar a produtividade agrícola e acelerar o crescimento dos seus produtos. Contudo, o seu uso em excesso provoca a poluição eminente de águas subterrâneas e superficiais e compromete a segurança dos alimentos obtidos. Aliado a este problema está o agravar das alterações climáticas e o aumento exponencial da população mundial, os quais têm levado cada vez mais à escassez de alimentos. Posto isto, é urgente desenvolver alternativas aos fertilizantes tradicionais que permitam otimizar o crescimento das plantas sem comprometer nem o ambiente nem a saúde. Assim, surgem os bioestimulantes e biofertilizantes, neste caso produzidos através de extratos de microalgas, como potencial solução para este problema.

Nesta dissertação foram estudadas três estirpes de microalgas, FB001, FB012 e FB013, de modo a avaliar o seu potencial para aplicação na agricultura. Foram realizados três métodos de extração de compostos bioativos das microalgas: extração a alta pressão, extração assistida de enzimas e sonicação. Estes foram avaliados e identificado o método mais eficiente a nível da extração dos compostos alvo, mais viável economicamente e apropriado a *scale-up*. Realizaram-se ensaios de atividade em três plantas, o tomate, melão e cenoura, efetuaram-se análises químicas para conhecimento da composição dos extratos e procedeu-se à produção de três formulações (F1, F2 e F3) com base nos resultados obtidos.

As três estirpes demonstraram potencial para aplicação na agricultura. A estirpe FB013 demonstrou o maior potencial na germinação das plantas, assim como no desenvolvimento das raízes do tomate aliada à estirpe FB012, apresentando estas, consequentemente, níveis superiores de atividade bioestimulante. No que diz respeito à composição dos extratos, as três estirpes apresentam na sua composição valores semelhantes de azoto e carbono, assim como outros nutrientes, como o potássio, fósforo e cálcio, essenciais para o crescimento das plantas. Em adição, foram detetadas duas hormonas de crescimento do grupo das auxinas, o IAA e IPA, na estirpe FB013 e o IAA apenas nas estirpes FB001 e FB012. No que diz respeito aos métodos, a extração a alta pressão demonstrou ser mais eficiente, registando extratos com mais atividade nos ensaios realizados nas plantas, assim como um custo mais baixo, de $6,60\text{€} \cdot \text{kg}^{-1}$ de biomassa, quando comparado com o custo da extração assistida de enzimas de cerca de $371\text{€} \cdot \text{kg}^{-1}$ de biomassa. A sonicação, além de apresentar alguns extratos sem atividade, não é viável para *scale-up*. As três formulações continham apenas a estirpe FB012 no caso da F1, apenas a estirpe FB013 na F2 e uma mistura das duas estirpes na F3. As duas últimas apresentaram maior atividade nos ensaios realizados no tomate e apresentam os valores de NPK seguintes: 6,6-0,1-0,3 e 5,6-0,1-0,3, respetivamente. Concluiu-se que, os bioestimulantes produzidos apresentam uma performance superior quando comparados ao uso isolado de água e de um bioestimulante comercial, o *Spiragro*, relativamente à promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas.

Palavras-Chave:

microalgas; extração de compostos bioativos; bioestimulante; biofertilizante

Abstract

Agriculture uses chemical fertilizers in daily basis in order to increase the crops productivity and accelerate plants' growth. However, the use in excess of fertilizers results in the eminent pollution of subterranean and superficial waters and compromises the security of the food obtained. In addition to this problem are the aggravation of the climate changes and the exponential growth of world population. Therefore, it is urgent to develop alternatives to the traditional fertilizers that allow the optimization and growth of plants without compromising the environment and health. So, arise the biostimulators and biofertilizers, in this case produced by microalgae extracts, as a potential solution for this problem.

In this thesis three species of microalgae, FB001, FB012 and FB013, were studied to evaluate their potential for application in agriculture. Three methods for the extraction of bioactive compounds from the microalgae were used: high pressure extraction, enzyme-assisted extraction and sonication. These were evaluated and the most efficient method when it comes to the extraction of the target compounds, economical viability and scale-up was determined. Activity assays were made in three plants, tomato, watermelon and carrot, chemical analysis were conducted for the knowledge of the extracts composition and three formulations were produced (F1, F2 and F3) based on the results obtained.

The three microalgae species showed potential for application in agriculture. FB013 demonstrated the higher potential in the seeds' germination, as well as in the development of roots in the tomato allied to the FB012 specie, presenting these two species higher biostimulant activity. Concerning the extracts' composition, the three species contain similar values of nitrogen and carbon, as well as other nutrients, such as potassium, phosphorus and calcium, essential to plant's growth. In addition two growth hormones from the auxins group were detected, IAA and IPA, in the specie FB013 and IAA only in the species FB001 and FB012. Concerning the methods, the high-pressure extraction showed to be more efficient, registering extracts with higher activity in the tests in plants, as well as a lower operation cost of about $6,60 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ of biomass, when compared to the enzyme-assisted extraction with a cost of $371 \text{ €} \cdot \text{kg}^{-1}$ of biomass. Sonication, besides presenting some extracts without activity, it is not also possible to scale-up. The three formulations contained only the specie FB012 in the case of F1, only the specie FB013 in F2, and a mixture of both species in F3. The last two presented higher activity in the assays realized in the tomato and presented the following NPK values: 6.6-0.1-0.3 and 5.6-0.1-0.3, respectively. It can be concluded that the biostimulants produced presented a better performance than the use of water only and, also, the use of a commercially available biostimulant, *Spiragro*, when it comes to the promotion of plants' growth and development.

Keywords:

microalgae; bioactive compounds extraction; biostimulant; biofertilizer

Declaração

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte.

Andreia Sofia Oliveira Lopes

4 de julho de 2022

Índice

Índice.....	i
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Notação e Glossário.....	vi
1 Introdução.....	7
1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto	7
1.2 Apresentação da Empresa	8
1.3 Contributos da autora para o Trabalho	8
1.4 Organização da Dissertação	9
1.5 Objetivos.....	9
2 Estado da Arte	10
2.1 Papel dos fertilizantes na agricultura e o seu impacto	10
2.2 Bioestimulantes e biofertilizantes.....	10
2.3 Microalgas e cianobactérias	11
2.4 Produção de biomassa através de microalgas e cianobactérias	12
2.5 Métodos de extração de compostos bioativos de microalgas.....	12
2.5.1 Extração com solventes.....	12
2.5.2 Extração com ultrassons.....	13
2.5.3 Extração a alta pressão	14
2.5.4 Extração assistida por enzimas	14
2.5.5 Extração de fluídos supercríticos com CO ₂	14
2.6 Composição dos extratos de microalgas	15
2.7 Formulação de bioestimulantes e biofertilizantes	16
3 Materiais e Métodos	19
3.1 Seleção das estirpes e meio de cultivo	19
3.2 Cultivo das microalgas.....	19

3.3	Colheita das microalgas	20
3.4	Extração	21
3.4.1	Alta pressão	21
3.4.2	Extração assistida de enzimas	21
3.4.3	Extração com ultrassons	22
3.5	Ensaio de atividade	22
3.6	Caracterização dos extratos	24
3.6.1	Quantificação de azoto e carbono	24
3.6.2	Quantificação de metais	25
3.6.3	Quantificação de hormonas de crescimento	26
3.7	Análise de custo dos métodos	27
3.8	Formulação do Bioestimulante/Biofertilizante	28
4	Resultados e Discussão	30
4.1	Disrupção celular	30
4.1.1	Extração a alta pressão	30
4.1.2	Extração assistida de enzimas	30
4.1.3	Sonicação	31
4.2	Ensaio de atividade	31
4.2.1	Germinação	31
4.2.2	Comprimento das raízes	34
4.2.3	Índice de Germinação	38
4.3	Caracterização dos extratos	42
4.3.1	Quantificação de azoto e carbono	42
4.3.2	Quantificação de metais	43
4.3.3	Quantificação de hormonas de crescimento	44
4.4	Análise de custos dos métodos	46
4.5	Formulação do bioestimulante/biofertilizante	47
5	Conclusões	51
6	Avaliação do trabalho realizado	52
6.1	Objetivos Realizados	52

6.2	Recomendações de Trabalhos Futuros	52
6.3	Apreciação Final	53
7	Referências	54
	Anexo A - Meio de cultivo.....	57
	Apêndice A - Evolução do crescimento das sementes	59
	A.1. <i>Lycopersicon esculentum</i>	59
	A.2. <i>Cucumis melo</i>	60
	A.3. <i>Daucus carota</i>.....	61
	Apêndice B – Comprimento das raízes	62
	Apêndice C – Índices de germinação	65
	Apêndice D – ICP-MS.....	66
	Apêndice E – LC-MS.....	67
	E.1. Diluições dos padrões	67
	E.2. Cromatogramas do LC-MS/MS	68
	E.3. Curva de calibração dos padrões	70
	E.4. Cálculo dos LODs e LOQs.....	71

Lista de Figuras

Figura 1. Sala de cultivo para crescimento de culturas de microalgas.	Error! Bookmark not defined.
Figura 2. Culturas de 4 L das estirpes FB012 e FB013.	20
Figura 3. Cultivo das sementes de melão, tomate e cenoura para testagem dos extratos das microalgas.....	23
Figura 4. Exemplo de medição das raízes do melão.	24
Figura 5. Evolução da germinação de tomate quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).	32
Figura 6. Evolução da germinação de melão quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).	33
Figura 7. Evolução da germinação de cenoura quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).	33
Figura 8. Comprimento das raízes de tomate ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).	34
Figura 9. Comprimento das raízes de melão ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).	35
Figura 10. Comprimento das raízes de cenoura ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).	36
Figura 11. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de tomate dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).	38
Figura 12. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de melão dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).	39
Figura 13. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de cenoura dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).	39
Figura 14. Espectros de LC-MS dos padrões IAA e IPA.	44
Figura 15. Cromatogramas MRM obtidos para a estirpe FB013, com a deteção de IPA e IAA.	45
Figura 16. Evolução da germinação de tomate após aplicação das 3 formulações (F1, F2, F3)	47
Figura 17. Comprimento das raízes de tomate ao fim de 7 dias após aplicação das formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013 (P)).	48
Figura 18. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) para as três formulações (F1, F2, F3) e os dois extratos utilizados nas formulações (FB012 (P), FB013 (P)).	49

Lista de Tabelas

<i>Tabela 1. Formulação de um bioestimulante baseado em extratos de microalgas (Michalak et al., 2016).</i>	<i>17</i>
<i>Tabela 2. Volumes usados na testagem dos extratos no melão, tomate e cenoura.</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 3. Condições experimentais do EA para análise elementar de N e C em amostras sólidas.</i>	<i>25</i>
<i>Tabela 4. Extratos de microalgas analisados por LC-MS/MS.</i>	<i>26</i>
<i>Tabela 5. Auxinas alvo, os seus parâmetros de operação MS e método LODs.</i>	<i>27</i>
<i>Tabela 6. Formulação do bioestimulante.</i>	<i>28</i>
<i>Tabela 7. Parâmetros da extração a alta pressão.</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 8. Comprimento das raízes de tomate, melão e cenoura, quando aplicada apenas água (C-), um bioestimulante comercial (C+) e os extratos obtidos pelos três métodos de extração.</i>	<i>37</i>
<i>Tabela 9. Resultados do GI relativo ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) obtido para o tomate, melão e cenoura.</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 10. Resultados da composição elementar do azoto, carbono e CN.</i>	<i>42</i>
<i>Tabela 11. Resultados da quantificação dos nutrientes nos extratos de alta pressão (P) e hidrólise enzimática (E) por ICP-MS.</i>	<i>43</i>
<i>Tabela 12. Quantificação de IAA e IPA.</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 13. Parâmetros, valor e custo do consumo energético para a extração a alta pressão.</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 14. Parâmetros para o cálculo do consumo energético da hidrólise enzimática.</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 15. Comprimento das raízes obtido para as formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013 (P))... </i>	<i>48</i>
<i>Tabela 16. Valores de GI obtidos para as formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013(P)).</i>	<i>49</i>
<i>Tabela 17. Composição estimada de cada formulação produzida.</i>	<i>49</i>

Notação e Glossário

$C -$	controlo negativo	
$C +$	controlo positivo	
CN	razão carbono/azoto molar	%
CV	coeficiente de variação	%
GI	índice de germinação	%
G_t	número de sementes germinadas no ensaio de tratamento	
G_c	número de sementes germinadas no ensaio de controlo	
N	número de ciclos de homogeneização	
P	potência	kW
P_{ENZ}	preço das enzimas	€ · mL ⁻¹
P_H	pressão de homogeneização	Pa
t	tempo	h
V_{ENZ}	volume de enzimas	mL · kg ⁻¹ _{biomassa}
V_L	volume do tanque	L
R_t	comprimento médio das raízes das plantas no ensaio de tratamento	cm
R_c	comprimento médio das raízes das plantas no ensaio de controlo	cm
X	concentração de biomassa	g · L ⁻¹

Lista de Siglas

ANOVA	Analysis of Variance
EA	Elemental Analyzer
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ES	Extração com Solventes
ESI	Eletrospray Ionization
HPH	High Pressure Homogenization
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	Indole-3-acetic acid
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IPA	Indole-3-propionic acid
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MRM	Multiple Reaction Monitoring

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Apresentação do Projeto

O setor agrícola tem recorrido ao uso constante de pesticidas e fertilizantes químicos para a otimização do crescimento dos seus produtos. Segundo Yang et al. (2019), o uso excessivo de fertilizantes sofreu um aumento brusco de cerca de 7 000 vezes entre 1978 e 2016. No mesmo espaço de tempo, a aplicação dos mesmos por hectare superou o limite de segurança (0,23 t/ha definido para a aplicação dos fertilizantes nos países desenvolvidos, o qual corresponde ao valor máximo que pode ser aplicado sem comprometer a segurança dos alimentos e o ambiente). Este uso prolongado e em excesso levou à diminuição do nível de produtividade do solo agrícola, prejudicando o rendimento das plantas e o seu valor. Em adição ocorre a poluição eminente de águas subterrâneas e superficiais, como lagos e rios (Foley et al., 2011).

Mais recentemente, com o agravar das alterações climáticas e o aumento exponencial da população mundial, tem-se registado escassez de alimentos face à procura. Tendo em conta que se prevê, como referido por Ronga et al. (2019), que a população atinja um número de 9,8 biliões em 2050, a necessidade de uma solução inovadora urge. O desenvolvimento e aplicação de bioestimulantes e biofertilizantes, obtidos através de produtos orgânicos, pode permitir melhorar a produtividade agrícola sem causar impactos negativos no ambiente, contribuindo assim para a criação de fontes de alimentação mais sustentáveis com vista a solucionar a escassez alimentar. De acordo com Ronga et al. (2019), estes produtos têm influência na respiração celular das plantas, no processo de fotossíntese, síntese de ácidos nucleicos e captura de iões, assim como conseguem melhorar a disponibilidade de nutrientes no solo, aumentar o teor em antioxidantes da planta e de clorofilas nas folhas, e melhorar o seu metabolismo. Os bioestimulantes são, portanto, eficientes alternativas aos fertilizantes sintéticos tradicionais, melhorando o crescimento das plantas, a recolha de nutrientes e o seu consequente uso eficiente por parte das mesmas e, em adição, melhoram a sua tolerância ao stress abiótico (Ronga et al., 2019).

Para o desenvolvimento de tais produtos, as microalgas e cianobactérias têm sido investigadas como potenciais componentes de formulações com aplicação no setor agrícola, devido aos seus elevados níveis de macro e micronutrientes que podem atuar tanto como estimulantes como fertilizantes.

O objetivo deste projeto assenta, assim, na criação de potenciais bioestimulantes e biofertilizantes, a partir de biomassa de microalgas, sendo que as estirpes utilizadas foram selecionadas com base em testes prévios realizados na empresa Fykia Biotech, tendo demonstrado uma maior rapidez no crescimento após cultivo, aliado ao facto de terem obtido resultados mais favoráveis quando testadas no crescimento das sementes de plantas. Estas estirpes não foram ainda devidamente investigadas e, como tal, existe ainda bastante potencial a ser analisado.

O trabalho experimental focou-se na otimização dos processos de extração dos compostos bioativos das mesmas, como as hormonas de crescimento e nutrientes, testagem da sua eficácia em sementes de

plantas, caracterização dos extratos obtidos e posterior formulação do produto final, cuja qualidade e eficiência deve ser novamente avaliada. Para tal, foram selecionados como métodos de extração utilizados para a disrupção celular das células das microalgas e consequente libertação de compostos bioativos, a extração a alta pressão e a extração assistida por enzimas, assim como o método atualmente empregue pela empresa, a extração com ultrassons (sonicação). Estes três métodos foram comparados no que diz respeito à eficiência da disrupção celular através da observação ao microscópio dos extratos obtidos, assim como através da testagem dos respetivos extratos no crescimento das sementes de algumas plantas. Os melhores extratos foram caracterizados quanto à quantidade de azoto (N), fósforo (P) e potássio (K), assim como outros metais e carbono (C), e foi analisada a presença de hormonas de crescimento. Os extratos que demonstraram os melhores resultados foram utilizados para a formulação do produto final, o bioestimulante.

Para a formulação do bioestimulante é importante ter em conta que o produto deve ser capaz de se manter estável durante o armazenamento e aplicação, deve ser economicamente viável, sem perda de atividade e, em adição, fácil de misturar, manusear e aplicar. Como tal, a formulação baseou-se nestes requisitos e no facto das formulações comerciais para este fim possuírem tanto os ingredientes ativos, dominados por compostos inorgânicos, e aditivos, responsáveis pela eficiência da absorção dos complexos de ingredientes ativos aplicados nos órgãos das plantas (Kim et al., 2015).

1.2 Apresentação da Empresa

A Fykia Biotech é uma *spin-off* do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) criada em janeiro de 2021, focada no desenvolvimento de aplicações de microalgas e cianobactérias, nomeadamente nas áreas da nutracêutica, cosmética e agricultura. Pretende, através do uso de novas tecnologias e microalgas exclusivas, resolver problemas existentes nestas três áreas de atuação. O âmbito da dissertação incide na terceira, cujo objetivo é a produção de bioestimulantes e biofertilizantes sustentáveis a partir de microalgas.

Na Fykia, desenvolvem-se soluções inovadoras, baseadas em microalgas exclusivas e tecnologias proprietárias para enfrentar os problemas modernos em saúde, cuidados com a pele e agricultura. Está sediada na área metropolitana do Porto, Portugal, um movimentado centro de tecnologia de algas.

1.3 Contributos da autora para o Trabalho

A autora realizou o cultivo das microalgas, a recolha da biomassa das estirpes em causa, submetendo as amostras a centrifugação e liofilização para obtenção de biomassa seca. As microalgas haviam sido previamente isoladas. Realizou igualmente os ensaios dos diferentes métodos de extração e, com os extratos provenientes destes, procedeu à sua testagem em sementes de diferentes espécies de frutas e legumes para averiguação da sua atividade e eficiência de extração de compostos bioativos. Inserida nesta testagem está a contagem diária das sementes durante 7 dias de germinação, seguida da medição das raízes de cada amostra. Procedeu também à caracterização química dos extratos das diferentes estirpes, recorrendo, para

tal, a três métodos de química analítica, o Analisador Elementar (EA), o ICP-MS e o LC-MS/MS, e à formulação do produto. Todos os dados obtidos foram compilados em Excel e foram tratados pela autora, assim como foi realizada uma análise estatística recorrendo a um software apropriado, o *GraphPad Prism8*.

1.4 Organização da Dissertação

A dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos, sendo que no primeiro, na Introdução, realiza-se um enquadramento do projeto e são enunciados os seus objetivos.

No capítulo 2 apresentar-se-á o Estado de Arte relativo aos dados que fundamentam este trabalho, nomeadamente de artigos e experiências previamente realizadas que serviram de suporte à presente dissertação, abordando o papel dos fertilizantes, os conceitos de bioestimulante e biofertilizante, as características das microalgas e os diversos métodos de extração de compostos bioativos das mesmas.

De seguida, no capítulo 3 serão apresentados os métodos utilizados no decorrer do projeto, desde as etapas iniciais de cultivo, métodos de extração e testagem dos extratos, até às técnicas utilizadas para a caracterização química dos mesmos e posterior formulação do produto.

Em continuação, serão expostos no capítulo 4 os resultados relativos à eficiência dos métodos de extração na disrupção celular das microalgas em estudo, assim como a sua aplicação nas sementes de frutos e legumes, resultados obtidos na caracterização dos extratos e na estabilização do produto desenvolvido. A par apresentar-se-á a discussão dos mesmos.

No capítulo 5 serão apresentadas as conclusões e contemplar-se-ão as principais ilações retiradas dos resultados. Por fim, no capítulo 6, avaliar-se-á o trabalho efetuado.

1.5 Objetivos

Os objetivos deste trabalho assentam, numa primeira etapa, na otimização da extração de compostos bioativos de algumas estirpes de microalgas com potencial para aplicação como bioestimulantes e biofertilizantes, testando para isso diferentes métodos e avaliando a sua viabilidade económica e possibilidade de utilização a larga escala. Numa segunda fase, o foco é a testagem destes extratos nas plantas e a sua caracterização, tanto para aferição da estirpe mais promissora e com melhores características para esta aplicação, assim como para comparação dos métodos testados. Por último pretende-se obter extratos estáveis e prontos a ser utilizados como bioestimulantes, como tal, será realizada uma formulação e criação de um primeiro produto.

2 Estado da Arte

A aplicação recorrente de químicos sintéticos, como os pesticidas e fertilizantes, no solo tem gerado consequências nefastas, tanto para o solo e águas subterrâneas, como para os alimentos produzidos cuja segurança alimentar é posta em causa. O seu uso recorrente deve-se ao crescimento da população mundial que, dia após dia, leva à escassez de alimentos (Foley et al., 2011).

Desta forma, as microalgas surgem como uma matéria-prima promissora no âmbito do desenvolvimento de novos produtos que permitam otimizar o cultivo sem comprometer o ambiente e a segurança dos consumidores.

2.1 Bioestimulantes e biofertilizantes

Os bioestimulantes são definidos por Ronga et al. (2019) como produtos que são administrados em pequenas doses nas sementes, planta ou solo, e regulam e otimizam os processos fisiológicos das plantas. De acordo com Jardin (2015), é considerado um bioestimulante qualquer substância ou microrganismo aplicado a plantas que promova a sua eficiência nutricional, a sua tolerância ao stress abiótico e qualidade. Estes diferem dos biofertilizantes pelo facto de não conterem nutrientes com o intuito de serem transferidos para a planta (Jardin, 2015) e, segundo vários investigadores, apresentam-se como uma alternativa promissora aos fertilizantes (González-Pérez et al., 2022). Estes podem incluir uma vasta variedade de compostos, nomeadamente microrganismos, como rizobactérias, microminerais, reguladores do crescimento das plantas, e extratos de algas (González-Pérez et al., 2022).

Por outro lado, Ronga et al. (2019) afirma que os biofertilizantes, por sua vez, contêm microrganismos vivos ou substâncias naturais com nutrientes, os quais têm como função melhorar as propriedades químicas e biológicas do solo, estimulando o crescimento das plantas e restaurando a fertilidade do solo.

2.2 Papel dos fertilizantes na agricultura e o seu impacto

Os fertilizantes têm sido essenciais no processo de intensificação da agricultura, permitindo uma produção mais rápida e em maior quantidade (Foley et al., 2011). Contudo, os fertilizantes não orgânicos comumente usados na agricultura contêm, maioritariamente, fosfato, nitrato, amónia e sais de potássio, e constituem uma fonte de radionuclídeos e metais pesados, tais como: cobre, chumbo, níquel, mercúrio, cádmio e arsénio (Savcı et al., 2012). Savcı et al. (2012) explica que estes se acumulam no solo e, consequentemente, nas plantas que absorvem os fertilizantes através do solo, entrando assim na cadeia alimentar.

O impacto dos fertilizantes usados na agricultura não para nos solos, provocando a contaminação por excesso de nutrientes no solo, alcançando a água e o ar, nomeadamente lagos, rios e oceanos, poluindo-os e constituindo já a maior fonte de poluição por metais pesados (Foley et al., 2011). Savcı et al. (2012) afirma que os fertilizantes nitrogenados são apenas usados em 50% pelo solo, entre 2 a 20% é perdido para

evaporação, 15 a 25% reage com compostos orgânicos e os restantes 2 a 10% produzem impactos tanto na água superficial como na subterrânea. Ocorre o aumento da concentração de nutrientes e toxinas, provenientes dos fertilizantes nitrogenados, nestas águas por lixiviação para aquíferos, induzindo custos adicionais para a purificação da água e reduzindo o valor dos produtos provenientes da pesca devido à contaminação dos peixes (Tilman et al., 2002). Particularmente, Savcı et al. (2012) constata que os fertilizantes com níveis elevados de sódio e potássio provocam um impacto ainda mais negativo no solo. O nitrato proveniente destes quando combinado com os catiões básicos do sódio e potássio é absorvido pelo solo e quando estas bases são removidas e substituídas pelos iões de hidrogénio, o pH diminui, acidificando o solo e causando o aumento da irrigação ácida. Tilman et al. (2002) conclui que este tipo de práticas acaba por reduzir a capacidade dos ecossistemas de providenciar os seus produtos, obtendo-se o resultado contrário ao pretendido pelos fertilizantes.

Quando aplicados de forma inadequada e extensiva, os fertilizantes provocam a poluição do ar com a emissão de óxidos de nitrogénio (NO, N₂O, NO₂) (Savcı et al., 2012). Sanders (2012) explica que os fertilizantes com base em nitrato estimulam a conversão rápida do azoto em óxido de azoto por parte dos microrganismos presentes no solo, levando a que nos últimos 50 anos tenha havido um aumento brusco destes óxidos na atmosfera. De facto, este aumento coincidiu com a altura em que os fertilizantes sintéticos conduziram a um elevado aumento de produção alimentar. A seguir ao dióxido de carbono e metano, o N₂O é o gás com efeito de estufa mais potente, aprisionando o calor e contribuindo para o aquecimento global (Sanders, 2012).

2.3 Microalgas e cianobactérias

Ronga et al. (2019) define as microalgas como sendo seres eucarióticos unicelulares fotossintéticos microscópicos que crescem em meios aquáticos e, até, húmidos. Elucida que podem ser classificadas com base em diversos parâmetros, como a sua pigmentação, ciclo de vida, estrutura celular, morfologia e tamanho. Relativamente ao último parâmetro, as algas são classificadas em unicelulares, coloniais, filamentosas e multicelulares. As microalgas são capazes de produzir biomassa que pode posteriormente ser aplicada em diversos setores, como o alimentar, biodiesel, farmacêutico e agricultura (Ronda et al., 2019). Os elevados níveis de macro e micronutrientes, fazem com que as microalgas permitam um crescimento ótimo das plantas e mostrem potencial para desempenhar a função tanto de bioestimulantes como biofertilizantes, segundo Michalak et al. (2016). Em adição, compostos como os hidratos de carbono, minerais, hormonas de crescimento, betaínas e esteróis, apresentam potencial para a proteção das plantas, sendo sintetizados como consequência do permanente estado de stress abiótico e biótico, o qual provoca o desenvolvimento de mecanismos de defesa que protejam as microalgas da seca, salinidade, diferenças na intensidade da luz incidente, congelação e colonização por fungos ou bactérias. Estes compostos não são facilmente sintetizados quimicamente, como tal, a sua extração das algas surge como a melhor solução para os obter (Michalak et al., 2016).

As cianobactérias, por sua vez, e de acordo com Mutale-Joan et al. (2022), são os produtores originais da atmosfera rica em oxigênio do planeta. De acordo com este autor, foram inicialmente classificadas como algas azuis-verdes segundo códigos botânicos, contudo na década de 1960 foram atribuídas ao grupo das bactérias devido às suas características procarióticas. São bactérias foto-autotróficas oxigênicas, com possibilidade de excepcionalmente serem capazes de realizar fotossíntese anoxigênica facultativa. Tanto as microalgas, como as cianobactérias, têm comprovado ser fontes de biorrecursos para a produção de produtos alimentares.

2.4 Produção de biomassa através de microalgas e cianobactérias

As microalgas são facilmente cultivadas em comparação com as macroalgas, assim como mais convenientes a nível técnico e económico, segundo Baweja et al. (2019). Existem várias possibilidades para o seu cultivo e crescimento. Estas podem ser cultivadas tanto em tanques/lagoas abertos ao ar, como em fotobiorreatores, isto é, sistemas fechados. Ronga et al. (2019) explica que a primeira opção tem sido a mais utilizada em processos industriais. Consiste em sistemas abertos com uma profundidade entre 10 e 50 cm, permitindo assim boa iluminação, com pás incorporadas para a mistura e circulação do meio. Como é aberto ao ar, ocorre evaporação que regula a temperatura do meio de cultura. A segunda opção, segundo os mesmos autores, tem vindo a ser mais recorrente, pois tipicamente possuem maior produtividade volumétrica, devido a uma melhor captura de luz e um uso ótimo da área cultivada. Em comparação, os tanques abertos são construídos com materiais mais acessíveis e requerem menor energia para a mistura da cultura, mas por outro lado também se encontram mais sujeitos a contaminações, apresentam menor eficiência de energia radiante, menor transferência de massa e ausência de controlo de temperatura (Ronga et al., 2019).

2.5 Métodos de extração de compostos bioativos de microalgas

Os métodos de extração de compostos bioativos baseiam-se em técnicas de ruptura celular essenciais para a libertação dos produtos intracelulares presentes na matriz das microalgas. Diversos estudos têm sido realizados acerca da ruptura das paredes celulares, contudo, continuam a persistir algumas incógnitas e conflitos entre autores. Yap et al. (2015) declara que enquanto alguns afirmam que a ruptura celular está diretamente relacionada com a integridade da parede celular, outros focam-se na importância da membrana celular, cujos métodos por vezes afetam apenas estas e não desintegram a camada referente à parede celular. Esta etapa é de extrema importância para a formulação de produtos a partir de microalgas, por ser responsável pela libertação dos compostos bioativos que passam a estar disponíveis e podem exercer as suas funções na aplicação em questão, neste caso, nas plantas (Yap et al., 2015).

2.5.1 Extração com solventes

A extração com solventes (ES), segundo Gil-Chávez et al. (2013), é dos métodos mais recorrentes para obtenção de compostos de diferentes materiais como sedimentos, solo, polímeros, bactérias, fungos,

algas, microalgas, mas sobretudo plantas. O processo consiste na seleção do solvente mais adequado para a extração do composto específico pretendido que está presente no material. Tanto podem ser alvo compostos polares e não polares orgânicos, tais como alcaloides, pesticidas organoclorados, fenóis, compostos aromáticos, ácidos gordos, óleos, entre outros. A extração baseia-se na distribuição de um ou mais solutos entre dois líquidos imiscíveis, isto é, duas fases, sendo geralmente uma aquosa e outra orgânica/oleosa e é sempre acompanhada por uma energia de *Gibbs* negativa (Grima et al., 2012). Geralmente as amostras são posteriormente centrifugadas e filtradas para remoção de resíduos sólidos, e o extrato com o composto de interesse é aproveitado. Os solventes utilizados, mais frequentemente, são o hexano, éter, clorofórmio, acetonitrilo, benzeno e etanol. É necessário ter atenção à toxicidade de certos solventes em relação não só ao ser humano, mas também ao ambiente e, como tal, manuseá-lo com cuidado, o que pode envolver processos de extração mais trabalhosos, salvaguarda Gil-Chávez et al. (2013). No caso das microalgas, geralmente este processo é usado para extração de lípidos, em que as moléculas lipídicas são dispersas num solvente orgânico (Grima et al., 2012). Devido à presença da parede celular nas microalgas, é necessário conhecer as suas características e composição, pois a parede celular pode impedir o contacto direto entre o solvente e a membrana celular, impedindo assim a extração (Grima et al., 2012). Assim sendo, pode ser essencial um pré-tratamento.

Este método de extração apresenta como vantagens o seu baixo custo e facilidade de operação. Todavia, o facto de recorrer diversas vezes a solventes tóxicos em grandes quantidades, exige que seja feita uma etapa extra de evaporação para remoção do solvente e recuperação do produto. Mais recentemente, este processo tem sido combinado com sonicação (extração com ultrassons), extração com micro-ondas, entre outros, melhorando assim o seu rendimento (Gil-Chávez et al., 2013).

Para o caso da produção de produtos com aplicação na agricultura, este método não é aconselhado, devido à potencial toxicidade do solvente que, apesar de passar por uma etapa de remoção, pode não ser removido na sua totalidade e ter efeitos prejudiciais no crescimento das plantas.

2.5.2 Extração com ultrassons

A extração recorrendo a ultrassons, também denominada de sonicação, é apresentada por Sierra et al. (2017) como uma alternativa à tradicional extração com solventes, devido à obtenção de uma maior recuperação dos compostos pretendidos evitando o gasto de quantidades elevadas de solvente. O processo baseia-se no fenómeno da cavitação, em que, sendo a intensidade dos ultrassons suficiente, o ciclo de expansão cria cavidades ou microbolhas no líquido. Estas irão absorver a energia das ondas de som, crescer durante a expansão e recomprimir durante o ciclo de compressão. Estas bolhas podem iniciar um novo ciclo de rarefação ou colapsar levando a ondas de choque com condições extremas de pressão e temperatura. É este conjunto de eventos que eventualmente leva à implosão das bolhas de cavitação que, ao atingir a superfície da matriz sólida, provoca a desintegração das células, libertando-se, assim, o material intracelular. Segundo Sierra et al. (2017), este método tem demonstrado ser eficiente na recuperação de proteínas, açúcares e complexos de polissacarídeos-proteínas. A otimização da extração de antioxidantes,

tais como compostos fenólicos, assim como carotenoides, ainda se encontra em desenvolvimento, devido às variantes que afetam a extração destes compostos e a visível degradação dos mesmos quando submetidos a este processo, conclui Sierra et al. (2017).

2.5.3 Extração a alta pressão

High pressure homogenization (HPH), de acordo com Bernaerts et al. (2019), consiste num processo de extração a alta pressão que tem mostrado ser promissor na disrupção de células, sobretudo devido à sua escalabilidade, aplicação em pastas de algas concentradas e eficiência na disrupção de paredes celulares rígidas. Até ao momento tem sido utilizado sobretudo nas áreas alimentares e farmacêuticas já em larga escala. Neste aparelho as suspensões de células circulam e são forçadas por uma bomba de fluxo positivo a passar num orifício com uma estrutura de válvulas de pressão. A velocidade do fluxo aumenta rapidamente e a pressão diminui até à pressão atmosférica durante um pequeno período de espaço, enquanto a suspensão sai da unidade. Os mecanismos de disrupção celular do HPH têm sido associados a tensões de cisalhamento, forças inertes, impacto, turbulência e cavitação (Bernaerts et al., 2019).

Para um processo de disrupção celular ser viável a larga escala é necessário que permita conteúdos elevados de biomassa, incluindo altas viscosidades, seja energeticamente eficiente, exija pouco tempo de residência e cause uma degradação mínima dos produtos pretendidos, segundo Yap et al. (2015). Em adição, afirma que a eficiência deste processo é independente da concentração da alimentação, o que significa que existe uma redução dos requerimentos a nível energético à medida que se aumenta a concentração, devido ao facto do equipamento poder operar a uma capacidade superior sem aumentar o consumo energético ou comprometer a eficiência da disrupção celular. Desta forma, o HPH apresenta-se como a solução ideal para disrupção celular das paredes das microalgas a larga escala e grandes quantidades. Deve apenas ser considerado que, a partir de um certo ponto, uma solução demasiado viscosa não é aconselhável, pelo facto de poder levar ao entupimento do equipamento e uma remoção e consequente limpeza mais difícil e demorada (Yap et al., 2015).

2.5.4 Extração assistida por enzimas

A disrupção celular através do uso de enzimas para extração de compostos bioativos é descrita por Sierra et al. (2017) como promissora, tendo em conta que permite uma disrupção seletiva com vista a extração dos produtos alvo para o meio enquanto evita a degradação destes bioprodutos. A seleção das enzimas a utilizar baseia-se na biomassa em específico, considerando a constituição e estrutura da sua parede celular. As enzimas mais comumente usadas são a celulase, xilanase, protease, amilase e pectinase (Sierra et al., 2017), tanto sozinhas como combinadas, com o propósito de aumentar a eficiência da sua ação.

2.5.5 Extração com fluídos supercríticos com CO₂

A extração com fluídos supercríticos tem demonstrado permitir a obtenção de extratos concentrados com compostos bioativos de interesse, sem recorrer ao uso de solventes e sendo seguro para aplicação em

plantas. De acordo com Michalak et al. (2016), este método é promissor para a produção de bioestimulantes, nomeadamente pelo facto de apresentar alta eficiência, biodegradabilidade total e fitotoxicidade nula. Gil-Chavéz et al. (2013) acrescenta que a extração se foca na elevada seletividade, tempos curtos de extração e prevenção de poluição. Baseia-se nas propriedades dos fluídos, tais como a densidade, difusividade, constante dielétrica e viscosidade, e com o conhecimento das mesmas procede a alterações de pressão e temperatura para transformar estes fluídos em supercríticos. Neste estado, os fluidos encontram-se entre gás e líquido, visto que a densidade é semelhante ao do líquido, porém a viscosidade é equivalente à de um gás. O resultado final consiste num fluído com melhores propriedades de transporte do que as de líquidos, pois são apenas dependentes da sua densidade, a qual consegue ser ajustada por alterações de pressão e temperatura (Gil-Chavéz et al., 2013).

Existem diversos solventes que podem ser utilizados neste método: etileno, metano, nitrogénio, xenon e fluorocarbono. Porém, o dióxido de carbono (CO_2) tem provado não provocar alterações nos compostos bioativos e, em adição, preservar as suas propriedades funcionais e curativas. Assim, tornou-se uma solução alternativa atrativa aos comuns solventes orgânicos, devido ao facto de não ter tóxico, não explosivo, barato e possuir a capacidade de solubilizar substâncias lipofílicas e ser removido facilmente do produto final. O CO_2 é apenas pouco eficaz no que toca à extração de compostos altamente polares (Gil-Chávez et al., 2013).

Relativamente à avaliação da eficiência dos processos, os métodos geralmente empregues consistem na contagem das células, dimensionamento das partículas ou medição dos metabolitos libertados. O primeiro é o mais comum e considerado dos métodos mais fidedignos, contudo é demorado e não permite avaliar a integridade das membranas celulares. O segundo, por sua vez, apenas se aplica quando ocorre agregação ou fragmentação das células. Por fim, o terceiro deve ser realizado com cuidado pois pode subestimar o grau de disrupção das células. Conclui-se, assim, que deve ser usada uma combinação destes métodos quantitativos para uma caracterização assertiva e completa (Yap et al., 2015).

2.6 Composição dos extratos de microalgas

Palmer et al. (2021) define os compostos bioativos como substâncias que influenciam atividades fisiológicas ou celulares dos seres vivos. As microalgas têm demonstrado conter uma larga variedade destes compostos de alta qualidade, alguns até ainda desconhecidos, tornando-os uma alternativa sustentável e *vegan* face aos compostos comumente extraídos de animais e petroquímicos. De modo geral, Palmer et al. (2021) enuncia os compostos presentes nas microalgas, nomeadamente os lípidos (ácidos gordos polinsaturados, esteróis, tocoferóis e tocotrienóis), pigmentos (carotenoides, clorofilas e flavonoides), alcaloides e polissacarídeos.

González-Pérez et al. (2022), por sua vez, aborda os compostos igualmente disponíveis na biomassa de microalgas, contudo foca-se nos que possuem propriedades benéficas e promotoras do crescimento das plantas, com vista a aplicação na agricultura. Assim, destaca os nutrientes azoto (N), fósforo (P), potássio

(K) e cálcio (Ca), substâncias promotoras do crescimento das plantas, tais como as fito-hormonas, aminoácidos, vitaminas e polissacarídeos. As fito-hormonas derivam do metabolismo secundário das microalgas e são capazes de controlar a divisão celular, o alongamento do caule, a ativação dos complexos de defesa durante a patogénese, iniciar a germinação das sementes e da formação das raízes, entre outros. Neste grupo inserem-se as auxinas, citoquininas, ácido giberélico, etileno e ácido abscísico (González-Pérez et al., 2022).

2.7 Formulação de bioestimulantes e biofertilizantes

O desenvolvimento de uma formulação, segundo Kim et al. (2015), deve ter em consideração certos conceitos como a termodinâmica, mecânica dos fluídos, química das superfícies, suspensões e soluções. A formulação deve ser estável, homogénea e deve ser capaz de eficientemente utilizar as substâncias ativas nela presentes para o fim desejado. Como tal, o bioestimulante, em adição às substâncias ativas, neste caso proveniente de extratos de algas, deve conter adjuvantes, os quais correspondem a substâncias capazes de introduzir modificações físicas e/ou químicas de forma a melhorar a retenção dos ingredientes ativos nas formulações. Dentro deste grupo inserem-se os emulsificantes, conservantes, antimicrobianos, surfactantes, estabilizadores, anticongelantes, solventes, entre outros (Kim et al., 2015).

Os surfactantes, de acordo com Kim et al. (2015), são os principais aditivos desenvolvidos na indústria da agricultura. Estas moléculas possuem tanto propriedades hidrofílicas como hidrofóbicas que permitem a ligação entre diferentes fases, nomeadamente as fases aquosa e oleosa. Como resultado, obtém-se formulações estáveis. Os antimicrobianos e conservantes são igualmente essenciais no sentido de preservar a atividade da formulação e prevenir a deterioração da mesma. Os solventes, por sua vez, constituem a maior percentagem da formulação. Geralmente o solvente usado é a água, sobretudo considerando o fim pretendido (Kim et al., 2015).

Após a adição destes componentes, o bioestimulante formulado deve obedecer a certos requisitos: o extrato deve estar completamente dissolvido na água, visto que a aplicação do mesmo é geralmente feita recorrendo a um sistema de gotas microscópicas; a entrega das substâncias ativas nas plantas incluindo a sua translocação até às partes relevantes da planta deve ser eficiente; quando aplicado em spray deve ser retido pelas plantas, como tal é necessário reduzir a tensão superficial do produto final; e, por fim, deve ser estável durante o armazenamento e aplicação, assim como economicamente viável a nível de produção (Kim et al., 2015).

Um exemplo de uma formulação baseada em extratos de microalgas é apresentado por Michalak et al. (2016), o qual desenvolveu uma formulação usando extratos de duas microalgas, *Spirulina plantensis* e *Ascophyllum nodosum*, e uma macroalga. Nesta formulação incluiu emulsificantes (Atlas 4915 e Atlas G-5000), conservante e antimicrobiano (sorbato de potássio), estabilizador (polietilenoglicol), solvente (água) e ainda nutrientes. A formulação completa apresentada por Michalak et al. (2016) acompanhada da percentagem de cada ingrediente apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação de um bioestimulante baseado em extratos de microalgas (Michalak et al., 2016).

Substância ativa	Fração mássica (%)
Extrato supercrítico de algas	10,000
Emulsificante anfotérico (Atlox 4915)	2,500
Emulsificante não iónico (Atlas G-5000)	2,500
Sorbato de potássio	0,010
Polietilenoglicol	2,50
B(III)	0,020
Cu(II)	0,050
Fe(II)	0,100
Mn(II)	0,050
Mo(VI)	$1,000 \times 10^{-3}$
Zn(II)	0,050
Água desmineralizada	Encher até 100%

Segundo Jiaying et al. (2022), o desenvolvimento de um biofertilizante deve igualmente ter em conta os três elementos essenciais ao crescimento das plantas, os quais por norma vêm quantificados nos rótulos dos fertilizantes. Estes são os macronutrientes N, P e K, tipicamente apresentados pela sigla NPK. Verifica-se que a utilização crescente destes nutrientes na agricultura tem contribuído para um aumento do rendimento de produção ao longo das últimas décadas. Mais precisamente o azoto atua na estrutura orgânica, nas características fisiológicas e na síntese de biomassa, sendo de extrema importância que esteja presente em concentrações suficientes para que ocorra a fotossíntese. Por outro lado, os efeitos do fósforo podem ser observados na área das folhas das plantas, cuja deficiência causa uma redução da sua área, assim como influência a fotossíntese, o metabolismo do carbono e limita em parte o surgimento de novos rebentos, comprometendo assim o rendimento. O potássio, por sua vez, regula o movimento estomático (entrada e saída de iões potássio das células-guarda), consequentemente a pressão osmótica e o balanço de cargas, a ativação de enzimas, o potencial de membrana e o transporte de proteínas através da membrana celular (Jiaying et al., 2022). Desta forma, estes 3 elementos são cruciais para o crescimento das plantas e devem estar presentes neste tipo de formulações. Como mencionado anteriormente, estes elementos têm sido detetados em microalgas (González-Pérez et al., 2022), como tal, a formulação apresentada por Michalak et al. (2016) engloba estes nutrientes nos extratos obtidos por extração supercrítica.

Outro ponto importante relativo a bioestimulantes, depreende-se precisamente no seu modo de aplicação. Segundo González-Pérez et al. (2022), a aplicação das microalgas na agricultura pode ser feita

de duas formas: aplicando diretamente a biomassa, ou obtendo o seu extrato aquoso e aplicando o mesmo. Estudos prévios revelam que a aplicação dos extratos brutos é mais eficiente na estimulação do crescimento, pelo facto de conterem substâncias bioativas que atuam em sinergia (Rouphael and Colla, 2018). Tanto as microalgas intocadas, como os debrís celulares, os metabolitos específicos, sozinhos ou em combinação com os ingredientes ativos, demonstraram grande potencial para uso como bioestimulantes e biofertilizantes (González-Pérez et al., 2022).

3 Materiais e Métodos

O objetivo do presente trabalho consiste na obtenção de produtos com aplicação na agricultura baseados em microalgas e cianobactérias. Como tal, o primeiro passo consiste no cultivo das microalgas no meio de cultivo mais apropriado tendo em conta a estirpe e os objetivos pretendidos. Para isso, foram primeiramente definidas as estirpes a ser exploradas.

3.1 Seleção das estirpes e meio de cultivo

A seleção das estirpes baseou-se em estudos prévios realizados na empresa, Fykia Biotech, os quais demonstraram uma maior eficiência das estirpes FB001, FB012 e FB013, no crescimento das plantas, assim como uma maior rapidez no seu crescimento após cultivo.

3.2 Cultivo das microalgas

Inicialmente, procedeu-se à preparação dos matrizes de 2 L, formando a rolha de algodão a ser usada para os fechar, coberta por folha de alumínio e com o respetivo adesivo de identificação do frasco. De seguida colocou-se 1 L de água desionizada nos matrizes. Estes foram colocados na autoclave durante 20 minutos, salvaguardando que a mesma está devidamente fechada e que existe água a cobrir a resistência no fundo. Para os retirar foi necessário esperar que a temperatura descesse até aos 80/90°C e a pressão fosse entre 0 e 0,5 bar.

O meio selecionado foi o Z8, de acordo com Kotai (1972), cuja constituição detalhada se encontra no Anexo A. Os constituintes deste meio, a solução A, B e Fe-EDTA foram adicionados recorrendo a seringas, nas quantidades de 10 mL por cada litro de água desionizada, e os micronutrientes na quantidade de 1 mL por litro de água, na câmara de fluxo, tendo para tal sido utilizados filtros de 0,2 µm acoplados às seringas, com o intuito de filtrar as soluções previamente à sua adição. Estas soluções foram definidas por Kotai (1972) com o intuito da criação de um meio de cultivo semelhante à água doce. Mais especificamente, o Fe-EDTA proporciona o ferro (Fe), um nutriente essencial ao crescimento das microalgas, sendo um componente de várias enzimas e catalisador da formação dos precursores das clorofilas. A solução A e B são constituídas por compostos inorgânicos que disponibilizam outros nutrientes como o sódio, magnésio, cálcio, e potássio, fosfato e sódio, respetivamente, igualmente importantes para o desenvolvimento das algas. Posteriormente, os matrizes foram agitados para homogeneizar a solução.

O crescimento das algas em estudo decorreu na designada sala de cultivo, representada na Figura 1, a uma temperatura de 22 ± 2 °C e um fotoperíodo de 16 horas. A evolução do mesmo foi acompanhada através da observação em frascos de 40 mL, desde o dia 0, correspondente à inoculação. Não foram realizados ensaios de densidade ótica pois as microalgas são bastante filamentosas e, como tal, não seriam obtidos resultados fidedignos. Foi então observada a densidade da cultura com o passar do tempo e estas foram sujeitas a recolha ou *scale up* quando a cultura se apresentou bastante densa e desenvolvida.

Numa segunda etapa, após crescimento das microalgas na cultura de 2 L foi realizado o *scale-up* do meio de cultivo, transferindo as microalgas para um novo meio de cultivo de 4 L para que possam continuar o seu crescimento e ter novos nutrientes e condições para apropriadas a tal, tal como representado na Figura 2.



Figura 1. Sala de cultivo para crescimento de culturas de microalgas.



Figura 2. Culturas de 4 L das estirpes FB012 e FB013.

3.3 Colheita das microalgas

Após crescimento das microalgas, nomeadamente da estirpe FB001, num volume de 2 L de meio, estas foram transferidas para tubos de 50 mL para uso da centrífuga, de modo a separar o meio das microalgas ao fazer com que estas sedimentem no fundo. A centrifugação decorreu a uma velocidade de 5000 g, a uma temperatura de 4 °C, aceleração nível 9 e desaceleração nível 7, durante 5 minutos. Posteriormente o meio foi descartado e as microalgas sedimentadas em cada tubo foram colhidas e concentradas num só. Relativamente às culturas de 4 L das estirpes FB012 e FB013, a sua recolha, devido à maior dimensão das microalgas e ao facto de serem filamentosas, foi realizada recorrendo a peneiras de 20 µm. No final, os tubos contendo a biomassa são colocados no congelador a -20 °C até ser possível realizar a liofilização.

A liofilização é um processo em que a água é congelada e removida da amostra, primeiramente por sublimação (secagem primária) e depois por dessorção (secagem secundária). Consiste num processo frequentemente utilizado em certos produtos farmacêuticos e biológicos que são termolábeis ou instáveis em meios aquosos, durante longos períodos de armazenamento (Nireesha et al., 2013). No caso deste processo, realizado no *Telstar LyoQuest*, a cerca de -56 °C de temperatura do condensador e a cerca de 0,13 mbar, ligado no modo semiautomático, é necessário para retirar toda a água e meio de cultivo ainda presente na biomassa e secá-la para que possa ser armazenada e posteriormente utilizada. Após submissão das microalgas a este processo obtém-se então biomassa liofilizada, seca.

3.4 Extração

Como primeiro passo, foram testados os processos de extração a alta pressão, assistido de enzimas e ultrassons. A disrupção celular obtida por estes métodos foi analisada ao microscópio *Leica DMLB*, com a câmara ICC50 HD.

3.4.1 Alta pressão

A extração a alta pressão foi conduzida no *CF Cell Disruptor* da *Constant Systems LTD*. Para a utilização deste aparelho é requerido um volume mínimo de 10 mL de suspensão, com as células ainda íntegras, a ser submetida a alta pressão.

A biomassa de cada estirpe estudada já se encontrava liofilizada, seca, como tal foi necessário voltar a suspender a mesma em água destilada. Foi medido um volume de 12,5 mL de água destilada, ao qual foi adicionada cerca de 50 mg biomassa. Esta solução não deve ser demasiado líquida, nem demasiado espessa, de forma à disrupção celular ser eficiente e não causar o entupimento do aparelho.

Inicialmente foi ligado o equipamento de controlo de temperatura e definida a mesma para 4 °C. A temperatura foi ajustada durante cerca de 10 minutos. O equipamento principal foi ligado e selecionada a pressão. Como não foi encontrado um valor de pressão associado às estirpes em estudo para a disrupção celular, foram testadas diferentes pressões, nomeadamente 15, 30 e 40 kpsi para cada uma das estirpes. Estes extratos foram posteriormente sujeitos a centrifugação para descarte dos restos celulares e aproveitamento do sobrenadante, nas seguintes condições: velocidade de 5000 g, temperatura de 4 °C, aceleração nível 9 e desaceleração nível 7, durante 10 minutos.

3.4.2 Extração assistida de enzimas

O processo de extração de compostos bioativos através do uso de enzimas é seletivo, e, como tal, a enzima ou mistura de enzimas selecionada deve ter em consideração a constituição da parede celular das microalgas. Como tal, considerando que a parede celular das microalgas em estudo é constituída maioritariamente por celulose e alguma sílica, depreende-se automaticamente que a enzima celulase é essencial (Wang et al., 2017). Tendo em conta que em diversos estudos a mistura de enzimas tem vindo a mostrar melhores resultados na disrupção celular das microalgas, optou-se por selecionar o complexo de enzimas celulolíticas, *Viscozyme L*. Este contém β -glucanase, enzima igualmente essencial na disrupção das paredes celulares ricas em celulose, visto que ataca a celulose amorfa presente nas paredes celulares e quebra as cadeias celulósicas, segundo Demuez et al. (2015). A celulose amorfa são regiões de baixo nível de ordem e, como tal, mais facilmente penetradas por reagentes. Possui igualmente arabanase, celulase, hemicelulase e xilanase, as quais degradam polissacarídeos, sendo estas duas últimas responsáveis pela degradação da hemicelulose, constituinte da parede celular.

De acordo com as informações do fornecedor, *Sigma-Aldrich*, e prévias utilizações desta mistura enzimática, nomeadamente por Mahdy et al. (2014), as condições ótimas para atuação da *Viscozyme L* correspondem a uma temperatura de 50 °C e um pH de 5,5. Como tal, a solução que contém os extratos foi

ajustada relativamente ao seu pH recorrendo a NaOH 2M (aumentar pH) ou HCl 5M (diminuir pH), conforme o pH inicial registado. Posteriormente, foi realizada a incubação da solução enzimática com a biomassa. A concentração de enzimas definida por Mahdy et al. (2014) é de cerca de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$. Desta forma, para uma massa de bioproducto de 50 mg pesada para cada estirpe e suspensa em 2 mL de água destilada, é necessário um volume de $0,015 \text{ mL} / 15 \mu\text{L}$ de solução enzimática. Contudo, foram testadas concentrações mais elevadas de $0,4$ e $0,8 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$. O tempo de incubação foi igualmente testado, tendo os extratos sido submetidos a reações de 5 h e 12 h, seguindo o procedimento abordado por Mahdy et al. (2014), para as três estirpes em estudo.

No final das 5 h e 12 h de incubação no banho, realizado no *Thermo Scientific Precision Water Bath GP 28*, foi necessário realizar a desativação das enzimas. Para tal, recorreu-se ao aumento da temperatura até aos 75°C , mantendo-a constante durante 15 minutos. Foram realizados alguns testes preliminares para averiguar a quantidade de solução em que as enzimas devem ser dissolvidas, assim como a dosagem de enzimas necessária para a disrupção celular eficiente. Desta forma, usou-se a concentração de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$ e um tempo de reação de 5h.

3.4.3 Extração com ultrassons

A extração também denominada de sonicação, foi realizada no sonicador da *Bandelin Sonopuls* utilizando uma sonda MS 72. Foi aplicada uma amplitude de 80% durante 20 minutos com um pulso de 30 segundos ligado e um pulso de 5 segundos desligado. Este processo foi repetido duas vezes.

3.5 Ensaio de atividade

De forma a aferir a atividade dos extratos, a sua influência no crescimento de plantas foi avaliada. Assim, foram selecionados da categoria dos frutos, o melão, *Cucumis melo*, e o tomate, *Lycopersicon esculentum*. Na categoria dos legumes foi selecionada a cenoura, *Daucus carota*. Para cada um dos ensaios, foram preparadas placas de Petri estéreis com papel de filtro *Whatman*. A água foi adicionada às placas recorrendo a uma pipeta de $100\text{-}1000 \mu\text{L}$, os extratos, por sua vez usando uma pipeta de $2\text{-}20 \mu\text{L}$ e o biofertilizante presente no mercado através de uma pipeta de $0,2\text{-}2 \mu\text{L}$, e as sementes, já adquiridas esterilizadas, foram colocadas recorrendo a uma pinça ou espátula, dependendo da sua dimensão. Foram então preparadas 3 réplicas de 5 ensaios: um apenas com água (controlo negativo), um com cada extrato de microalgas em estudo e água, e, por fim, outro com um biofertilizante já presente no mercado e água (controlo positivo), *Spiragro*, usando o volume recomendado pelo fabricante. Os volumes de cada um destes componentes necessários para cada placa para a respetiva semente estão presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes usados na testagem dos extratos no melão, tomate e cenoura.

Planta	Volume água destilada (mL)	Volume de extrato de microalgas (µL)	Volume de <i>Spiragro</i> (µL)
Melão	1,50	1,50	0,38
Tomate	5,00	1,50	0,38
Cenoura	2,00	1,50	0,38

Foram preparadas antecipadamente 15 placas de Petri para cada tipo de semente, correspondentes a 3 ensaios (A, B e C) de cada categoria: controlo negativo (apenas água), controlo positivo (adição do biofertilizante comercial), estirpe FB001, estirpe FB012 e estirpe FB013. Em cada uma das placas foi colocado papel de filtro (*Whatman filter paper*), com o propósito de conter a água e os extratos, e criar uma superfície de contacto para absorção dos compostos bioativos e água por parte das sementes, simulando de certa forma o solo. Após a devida identificação das placas de Petri, procedeu-se à colocação das respetivas soluções, previamente submetidas a *vortex* para mistura homogénea, nas placas. Em cada uma foram depositadas 10 sementes e recorreu-se a uma tira de parafilme, já cortada anteriormente, para selar devidamente a placa. Na Figura 3 apresentam-se as placas preparadas para o melão, tomate e cenoura. Estas foram posteriormente colocadas na estufa a cerca de 25°C.



Figura 3. Cultivo das sementes de melão, tomate e cenoura para testagem dos extratos das microalgas.

Durante uma semana foi registado o número de sementes germinadas em cada dia. Para cada método de extração efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) em cada dia, de forma a comparar o efeito dos extratos das estirpes entre si, assim como compará-los com o controlo negativo e positivo. Ao fim de uma semana de germinação realizou-se a medição das raízes, colocando as sementes de cada placa numa folha de alumínio acompanhada de uma régua. Foram tiradas fotografias às sementes dispostas com as raízes alinhadas, como representado na Figura 4, e a sua medição foi realizada recorrendo a um programa denominado *ImageJ*.



Figura 4. Exemplo de medição das raízes do melão.

De forma a realizar uma análise que englobasse a germinação e o comprimento das raízes, foi determinado o índice de germinação (GI) de acordo com Ronga et al. (2019), cuja fórmula de cálculo se apresenta na Equação 1.

$$GI\% = 100 \frac{Gt}{Gc} \frac{Rt}{Rc} \quad (1)$$

Em que *Gt* se refere ao número de sementes germinadas com o tratamento, *Gc* o número de sementes germinadas do ensaio de controlo, *Rt* a média do comprimento das raízes do tratamento e *Rc* a média do comprimento das raízes do controlo. Este cálculo foi realizado considerando tanto o controlo negativo como o controlo positivo como *Gc* e *Rc*. Os resultados obtidos para os ensaios de atividade foram analisados estatisticamente usando o software *GraphPad Prism8*.

3.6 Caracterização dos extratos

As estirpes foram submetidas a análises para quantificação de nutrientes, em especial o N, P e K, entre outros, após extração, e a análise para deteção e quantificação de auxinas, as hormonas de crescimento mais relevantes para o crescimento das sementes e raízes.

3.6.1 Quantificação de azoto e carbono

A quantificação de N, C e a razão molar entre ambos (CN) foi efetuada num Analisador Elementar (EA), modelo *Flash 2000*, *Organic Elemental Analyzer* da marca *Thermo Scientific*. O controlo de qualidade analítico foi assegurado pela leitura do padrão de ureia e de *Chlorella* sp. (lida no início e final da sequência).

Primeiramente, as amostras foram pesadas e encapsuladas em cápsulas de estanho e colocadas numa placa de titulação. Os ensaios foram realizados em duplicado, com um coeficiente de variação igual ou inferior a 10%, para cada amostra de biomassa seca das estirpes FB001, FB012 e FB013. O cálculo da composição elementar foi feito com base na curva de calibração da cafeína. As condições experimentais do EA utilizadas no processamento das análises encontram-se sumariadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições experimentais do EA para análise elementar de N e C em amostras sólidas.

Parâmetro	Condições operacionais
Reator de oxidação	1020 °C
Reator de redução	650 °C
Coluna de cromatografia gasosa	45 °C
<i>Run time</i>	500 s
Fluxo de He	90 ml · min ⁻¹
Fluxo de O ₂	180 ml · min ⁻¹
Fluxo dos gases de CO ₂ e N ₂	200 ml · min ⁻¹

3.6.2 Quantificação de metais

As análises para quantificação dos metais, mais especificamente o P, K, Ca, Mg, Zn, Na e Fe, foram realizadas recorrendo ao Espectrómetro de massa com plasma indutivo acoplado (ICP-MS) da *Analytik Jena GmbH*. Este método surgiu como alternativa a outros métodos mais antigos, tais como a absorção e emissão atômica, apresentando diversas vantagens face aos mesmos. Possui a capacidade de medir múltiplos elementos em simultâneo numa só análise, a preparação das amostras é simples, o tempo de análise é curto, os limites de deteção são significativamente mais baixos do que noutros métodos, possui alta resolução e controlo de interferências e requer pouco volume de amostra para análise (Wilschefski e Baxter, 2019). O N foi quantificado recorrendo a um método diferente, pois o ICP-MS não consegue detetar determinados elementos, tais como hidrogénio (H) e hélio (He), pela massa estar abaixo do limite do aparelho, árgon (Ar), N e O, pois estão presentes em alta concentração no ar e no plasma, e ferro (F) e néon (Ne), porque não conseguem ser ionizados no plasma de árgon.

O ICP-MS é constituído por 6 compartimentos, incluindo o sistema de introdução de amostras, o plasma acoplado indutivamente (ICP), um sistema de lentes e interface, o analisador de massa e o detetor. Os extratos líquidos das 3 estirpes, foram primeiramente nebulizados no sistema de introdução, formando-se um aerossol. Estes foram transferidos para o plasma de árgon gerado por radiofrequência e mantido por um campo magnético onde alcança uma temperatura na ordem de 10000 K, o que permite a ionização da quase totalidade dos elementos químicos. Os iões aqui formados são conduzidos para um espectrómetro de massa (Quadrupolo), através de um sistema de lentes e interface, que separa os diferentes iões na sua razão massa/carga, para posteriormente serem detetados por um multiplicador de eletrões (Wilschefski e Baxter, 2019).

Para este método foi também utilizado um branco, neste caso água, visto ser o solvente presente nos extratos das microalgas, para efeitos de referência, assim como foi analisado um extrato de uma

biomassa mais comum, *Aphanizomenon ovalisporum* (cianobactéria), para efeitos de comparação. Tendo em conta que as quantidades de nutrientes eram desconhecidas, todas as amostras foram diluídas em 3 fatores de diluição diferentes: 1:10; 1:50; e 1:100.

3.6.3 Quantificação de hormonas de crescimento

Com o objetivo de detetar a presença das hormonas de crescimento mais relevantes para o crescimento das plantas, as auxinas, os extratos foram submetidos a Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS). Esta técnica química combina a capacidade de separação da cromatografia líquida (HPLC) com a análise de massa do MS/MS, tornando-a uma técnica abrangente e que possibilita a deteção e identificação de compostos em misturas complexas (Tilvi et al., 2014). Assim, os extratos foram submetidos a esta técnica para deteção e quantificação das hormonas pretendidas.

As amostras, cujos dados se encontram na Tabela 4, obtidas por extração a alta pressão, foram diretamente colocadas nos frascos, sendo necessário um volume mínimo de 20 µL para análise.

Tabela 4. Extratos de microalgas analisados por LC-MS/MS.

Código da Estirpe	Peso seco (mg)	Concentração do extrato (mg · mL ⁻¹)
FB001	42,40	4,24
FB012	56,40	4,51
FB013	67,20	4,48

O sistema LC-MS/MS utilizado foi o Cromatógrafo de Fase Líquida *Alliance e2695* sistema HPLC, acoplado com detetor de espectrometria quadruplo triplo (*Micromass® Quattro micro™ API*), com interface de eletrospray (ESI). O programa usado para aquisição de dados e processamento foi o *MassLynx* versão 4.1. O espectrómetro de massa operou no modo positivo e a quantificação foi realizada em *multiple reaction monitoring* (MRM). A voltagem capilar foi mantida a 3,5 kV, o extrator a 3 V e a lente a 0,2 V. A temperatura da fonte foi mantida a 120 °C e a de desolação a 350 °C. O fluxo de azoto usado foi de 500 L · h⁻¹ como gás auxiliar e de revestimento, e o árgon foi usado como gás de colisão a 0,5 bar.

A separação foi executada numa coluna *C₁₈ Hypersil Gold column* (100 × 4.6 mm I.D., 5 µm, *ThermoScientific, Waltham, MA, USA*), mantida a 45 °C, com um caudal de 0,35 mL · min⁻¹. O volume injetado foi de 10 µL no modo de ciclo parcial. Foi usado um gradiente de eluição com uma fase móvel A, Metanol, e B, água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente iniciou-se aos 10% para A durante 3 minutos, aumentando para 40% de A em 1 minuto, aumentando para 60% de A aos 7 minutos (durante 2 minutos), aumentando para 80% de A por 2 minutos e retomando às condições iniciais aos 20 minutos (durante 10 minutos). A água, o metanol e o ácido fórmico de grau LC-MS (≥99%) foram adquiridos através da *VWR Chemicals* (Portugal).

O sistema foi calibrado com padrões das seguintes moléculas derivadas das auxinas: ácido indolacético (IAA) e ácido indol-3-propiónico (IPA). O intervalo de concentrações em ambas as curvas de calibração foi de 5 a 500 ppb. De modo a encontrar os parâmetros de detecção, foram injetadas soluções padrão de IAA e IPA, em *Full scan* (30-2000m/z) e em MRM, de modo a encontrar as transições correspondentes à maior intensidade de sinal. Foram calculados assim os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), recorrendo ao método dos mínimos quadrados e, utilizando para tal, o declive da reta e desvio padrão residual da curva de calibração respetiva (Uhrovčík, 2014; RELACRE, 2000; Miller, 1993). Os tempos de retenção (t_R), transições, cone, energia de colisão, LOD e LOQ obtidos para cada padrão apresentam-se na Tabela 5 (Kučniar et al., 2021).

Tabela 5. Auxinas alvo, os seus parâmetros de operação MS e método LODs.

Auxina	Tempo de retenção (min)	Transição razão massa-carga ($m \cdot z^{-1}$)	Cone (V)	Energia de colisão (V)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
IAA	12,65	176,10 > 130,0 (quantificador)	20	30	14,88	49,59
		176,10 > 103,0 (qualificador)	20	10		
IPA	13,53	190,05 > 130,10	20	10	8,07	26,90
		(quantificador e qualificador)	20	10		

3.7 Análise de custo dos métodos

Os métodos utilizados para a disrupção celular das microalgas estão associados a certos custos, nomeadamente energéticos e, no caso da extração assistida de enzimas, acrescidos do custo das enzimas. Como tal, de forma a completar a avaliação da eficiência e a viabilidade dos métodos para aplicação a larga escala, foram calculados os custos da extração a alta pressão, segundo Zhang et al. (2012), e da extração assistida de enzimas, de acordo com Safi et al. (2017). As fórmulas usadas para estimar o consumo energético das extrações em $\text{kWh} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$ apresentam-se nas equações 2 e 3, respetivamente. Sabendo o consumo energético e o preço atual de kWh, cerca de 0,23 €, calcularam-se os custos de cada método.

$$E_{HPH} = \frac{P \cdot N}{X \cdot 1000 \times 3600} \quad (2)$$

P – pressão de homogeneização (Pa)

N – número de ciclos

X – concentração da biomassa ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

$$E_{ENZ} = \frac{\int_0^t P \, dt}{X \cdot V_L} \quad (3)$$

P – potência (kW)

t – tempo de tratamento (h)

V_L – volume do tanque (L)

No caso da extração assistida de enzimas, existe ainda o custo adicional das enzimas. Este custo foi determinado pela seguinte equação 4.

$$C_{ENZ} = P_{ENZ} \cdot V_{ENZ} \quad (4)$$

P_{ENZ} – preço por mL da solução enzimática ($\text{€} \cdot \text{mL}^{-1}$)

V_{ENZ} – volume de enzimas necessário para 1kg de biomassa ($\text{mL} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$)

3.8 Formulação do Bioestimulante/Biofertilizante

A formulação do bioestimulante/biofertilizante foi realizada tendo em consideração as funções necessárias para a estabilidade e conservação do produto explicitadas por Kim et al. (2015) e a formulação desenvolvida por Michalak et al. (2016). Desta forma, os seguintes ingredientes e respetivas frações mássicas, presentes na Tabela 6, foram definidos.

Tabela 6. Formulação do bioestimulante.

Ingrediente	Função	Fração mássica (%)
Extrato das microalgas	Composto ativo	12,00
Ácido cítrico	Conservante, antimicrobiano	0,50
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	Estabilizador, conservante	3,60
Monolaurato de sorbitano (Span 20)	Emulsificante não iónico, surfactante	5,00
Água desmineralizada	Solvente	78,90

Como mencionado na tabela anterior o ácido cítrico, adquirido da *Sigma Aldrich* foi adicionado à formulação com o propósito de atuar como conservante. É largamente usado na indústria alimentar, solúvel em água e possui propriedades antimicrobianas provenientes da sua acidez (Søltoft-Jensen e Hansen, 2005). Estas propriedades manifestam-se através da diminuição do pH, assim como tem sido demonstrado que o seu efeito quelante também provoca a inibição das bactérias (Doores et al., 1993). No caso específico da aplicação do ácido cítrico na agricultura, Mallhi et al. (2019) comprovou que a aplicação do ácido cítrico na planta *Ricinus communis* permitiu diminuir a toxicidade do chumbo (Pb) nela presente, ao melhorar o processo de fotossíntese e, conseqüentemente, o crescimento da planta.

Por outro lado, o EDTA, também adquirido da *Sigma Aldrich*, é um quelante usado como agente estabilizante em produtos cosméticos e aditivo alimentar, assim como tem sido aplicado na agricultura em pequenas quantidades através de fertilizantes (Bloem et al., 2019). Segundo Bloem et al. (2019), a aplicação

do EDTA no solo altera a composição mineral das plantas após absorção, aumentando as concentrações de P, S, Fe e Mn, e diminuindo a de cádmio (Cd) nas sementes das plantas. Em adição, a sua presença não demonstrou ter qualquer efeito negativo no solo.

Como emulsificante não iónico O/A (emulsão de óleo em água) e surfactante foi selecionado o *Span 20*, o qual, segundo a empresa *Croda International Plc* de onde proveio, apresenta baixa toxicidade, flexibilidade na combinação com outros ingredientes, estável tanto em soluções alcalinas como ácidas e eletrolíticas, e ótimo desempenho nas formulações de agroquímicos (Croda International Plc, 2022).

Os extratos, já em meio aquoso, foram primeiramente ajustados relativamente à fração mássica de água, o solvente, definida. De seguida foram adicionados os restantes ingredientes, após pesagem de cada um, em agitação constante para homogeneização e criação da emulsão. Foram criadas 3 formulações diferentes, todas utilizando os extratos obtidos por alta pressão: uma recorrendo ao extrato de microalgas da estirpe FB012 (F1); outra com o extrato da estirpe FB013 (F2); e uma última combinando estes dois extratos (F3).

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo compara-se a eficiência dos diferentes métodos de extração utilizados e a atividade dos extratos resultantes.

4.1 Disrupção celular

A eficiência da disrupção celular das estirpes através da extração a alta pressão e assistida de enzimas, cujo propósito consistia na libertação dos compostos bioativos presentes no meio intracelular das microalgas, foi avaliada.

4.1.1 Extração a alta pressão

A biomassa das três estirpes em estudo foi submetida à disrupção celular a alta pressão. Na Tabela 7 encontram-se os valores de pressão e número de ciclos que mostraram maior eficiência na disrupção de cada microalga.

Tabela 7. Parâmetros da extração a alta pressão.

Estirpe	Pressão (kpsi)	Nº de ciclos
FB001	15	2
FB012	30/40	2/1
FB013	30/40	2/1

A estirpe FB001 corresponde a uma microalga de menores dimensões e menos robusta quando comparada às restantes. Como tal, a pressão necessária para a disrupção da sua parede celular é menor. Foram realizados dois ciclos com o objetivo de abranger a totalidade da microalga e obter uma maior disrupção. As estirpes FB012 e FB013 são microalgas semelhantes em termos de estrutura, de maiores dimensões e filamentosas, requerendo por isso pressões superiores. Observou-se, através da observação de amostras ao microscópio, que a disrupção foi eficiente para pressões de 30 kpsi com dois ciclos e para um ciclo único de 40 kpsi, visualizando-se as células lisadas e material intracelular a ser libertado e a circular no meio. Do ponto de vista económico, é mais viável realizar um ciclo a 40 kpsi.

4.1.2 Extração assistida de enzimas

Relativamente à extração assistida de enzimas, foram testadas três concentrações de solução enzimática, começando na concentração selecionada por Mahdy et al. (2014) para hidrólise de outra estirpe de microalga. Foram assim testadas as concentrações 0,3, 0,4 e 0,8 mL · g⁻¹_{peso seco} equivalente a, respetivamente, 15, 20 e 40 µL de volume. De igual forma a reação de hidrólise foi efetuada durante 5h e depois prolongada para 12h com o intuito de confirmar se as 5h seriam realmente suficientes ou se faria diferença aumentar o tempo de reação. Verificou-se que o prolongamento do tempo de reação de 5 para

12h não surtiu efeitos significativos, como seria de esperar segundo estudos prévios (Mahdy et al., 2014). Por outro lado, obteve-se uma maior disrupção celular para a concentração de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$.

Observando a disrupção obtida em comparação com a extração a alta pressão, constata-se que este método não foi tão eficiente quanto o anterior, evidenciando-se múltiplas células e agregados que não sofreram disrupção. Em adição, a extração a alta pressão apresenta-se como um método mais facilmente escalável e rápido, pelo que para *scale-up* este seria o mais indicado.

4.1.3 Sonicação

No caso da sonicação, verificou-se que a disrupção celular foi eficiente, sobretudo para as estirpes FB001 e FB013. Comparando com os métodos anteriores, constata-se que provocou melhor disrupção comparativamente ao método de extração por enzimas e uma disrupção semelhante à da extração a alta pressão. Todavia, é um processo dificilmente escalável.

De forma a comprovar a eficiência da libertação dos compostos bioativos pretendidos com benefícios, neste caso, para o desenvolvimento das plantas, estes extratos foram aplicados em sementes de frutos e legumes de forma a verificar a existência de atividade dos mesmos, assim como foram sujeitos a análises químicas para deteção e quantificação de alguns dos compostos de interesse.

4.2 Ensaio de atividade

Os testes realizados nas plantas poderão ser avaliados segundo 3 parâmetros: germinação, comprimento das raízes e índice de germinação.

4.2.1 Germinação

O crescimento das sementes foi acompanhado diariamente, procedendo-se à contagem das sementes germinadas. Nas Figuras 5, 6 e 7 apresentam-se os gráficos da evolução da germinação das sementes de tomate, melão e cenoura, respetivamente, ao longo de 7 dias.

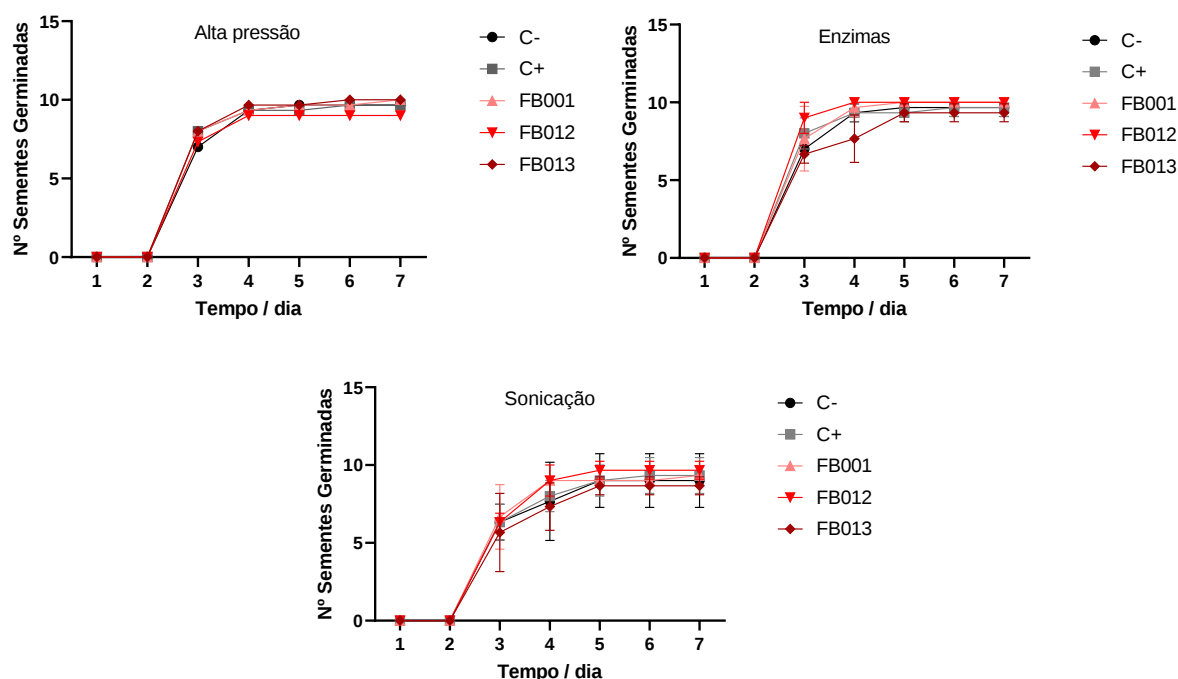


Figura 5. Evolução da germinação de tomate quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).

A comparação das diferentes estirpes dentro de cada método de extração, em relação ao controlo negativo, evidenciou que, no caso da extração a alta pressão, apenas a estirpe FB013 apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) no dia 3 de germinação, tendo provocado uma germinação do tomate mais rápida em comparação. Por outro lado, na extração assistida de enzimas e sonicação não se registaram diferenças significativas entre os ensaios das estirpes e os controlos.

A comparação dos diferentes métodos de extração dentro de cada estirpe revelou que para a estirpe FB001, os métodos de hidrólise enzimática e sonicação apresentaram diferenças significativas ($p < 0,0001$) para os dias 6 e 7, sendo o primeiro método o que provocou maior número de sementes germinadas. Por sua vez, para as estirpes FB012 e FB013, não se verificaram diferenças significativas entre os métodos.

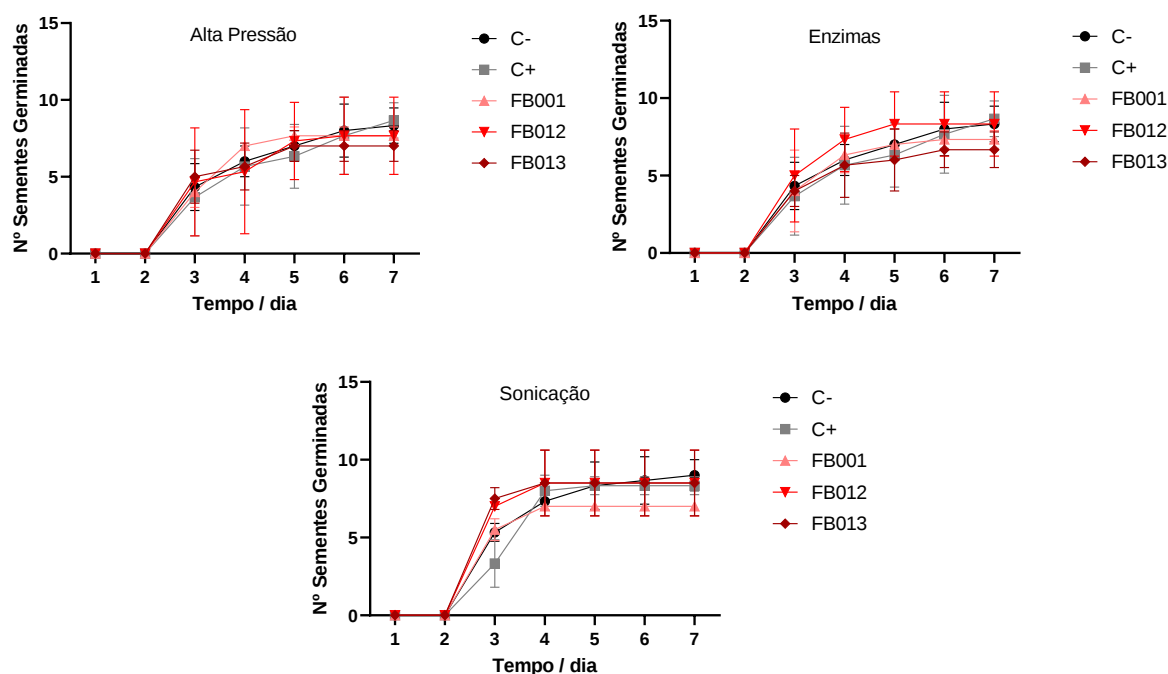


Figura 6. Evolução da germinação de melão quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).

Dentro de cada método não se averiguaram diferenças significativas entre os ensaios, incluindo os dois controles e as estirpes, de acordo com a análise estatística. Relativamente à análise dos métodos para cada estirpe, para as três em causa não se registam diferenças entre as extrações nos 7 dias de germinação.

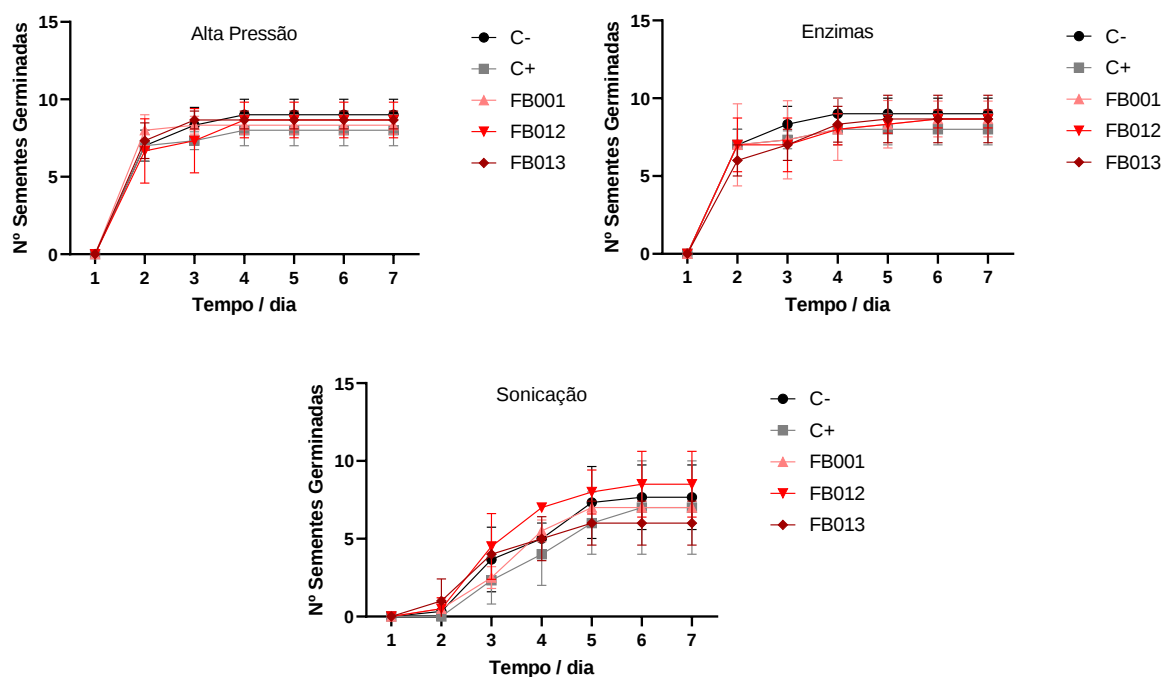


Figura 7. Evolução da germinação de cenoura quando aplicados os extratos de FB001, FB012 e FB013, um bioestimulante (C+) e apenas água (C-).

No caso da comparação dos métodos de extração para cada estirpe na germinação da cenoura, verifica-se que para a estirpe FB001 o método de alta pressão diferiu significativamente ($p=0,0054$) da sonicação, nos dias 2 e 3 de germinação, sendo que o primeiro apresentou maior número de sementes germinadas. No caso da estirpe FB012, em ambos os dias 2 e 3 houve diferenças significativas entre os extratos obtidos por alta pressão e sonicação ($p=0,0475$), assim como obtidos por hidrólise enzimática e sonicação ($p=0,0248$). Como tal, constata-se que tanto os extratos de alta pressão como os de hidrólise enzimática provocaram uma germinação mais rápida do que os de sonicação. Por fim, para o caso da FB013, no dia 3 observaram-se diferenças significativas ($p=0,0092$) entre os extratos provenientes da alta pressão e sonicação, tendo os primeiros originado maior número de sementes germinadas.

Relativamente a este parâmetro da germinação, é possível concluir que os extratos obtidos por alta pressão e hidrólise enzimática demonstram ser mais eficientes na germinação das plantas em comparação com a sonicação. Mais especificamente para as estirpes FB001 e FB013, destaca-se o método de alta pressão e para a FB012 ambos os métodos mencionados se distinguem positivamente da sonicação. Contudo, apenas ao nível do tomate, a espécie que germinou melhor, se verificou uma melhoria da germinação quando aplicado o extrato da estirpe FB013, obtido por alta pressão. Não foram, desta forma detetadas diferenças suficientes entre a aplicação dos extratos e a aplicação isolada de água (controlo negativo) nem do bioestimulante (controlo positivo), que permitam comprovar a melhoria de germinação das sementes aquando da aplicação dos extratos das microalgas.

4.2.2 Comprimento das raízes

Os comprimentos das raízes obtidas para cada ensaio foram analisados e a distribuição dos comprimentos das raízes de tomate apresenta-se na Figura 8.

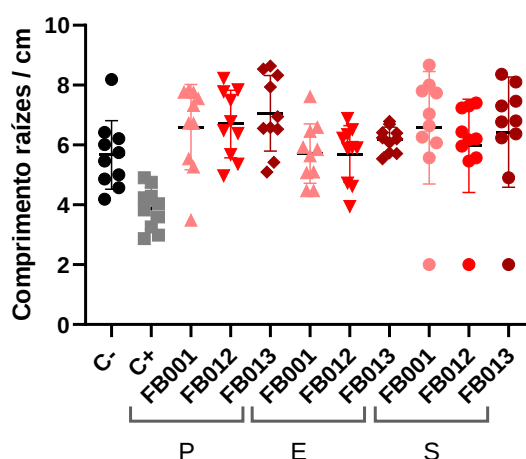


Figura 8. Comprimento das raízes de tomate ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).

No caso do tomate, quando comparado o efeito dos extratos de cada uma das estirpes com o controlo negativo, isto é, com o ensaio realizado apenas com água, observou-se apenas diferença significativa ($p=0,0491$) do extrato de FB013 obtido por alta pressão. Curiosamente, quando comparado com o controlo positivo, correspondente ao uso de um bioestimulante presente no mercado, as médias são significativamente diferentes ($p<0,0001$), para os extratos obtidos pelos 3 métodos. Tal significa que os extratos apresentam melhor desempenho que o bioestimulante já em comercialização, contudo não se destacam em relação ao ensaio de apenas água.

Os resultados obtidos para os comprimentos das raízes de melão encontram-se na Figura 9.

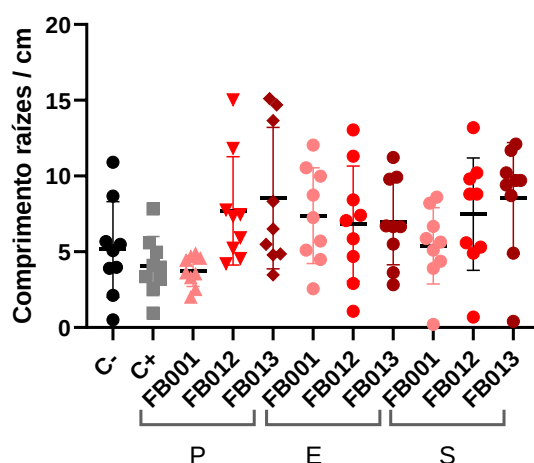


Figura 9. Comprimento das raízes de melão ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).

Relativamente aos dados obtidos para as sementes de melão, o comprimento médio das raízes em contacto com os extratos da estirpe FB013 obtidos por alta pressão e sonicação foram significativamente superiores ($p<0,0001$) aos do controlo negativo. Pelo contrário, os comprimentos médios das raízes de cenoura foram iguais aos dos controlos negativo, contendo apenas água, e positivo, contendo o bioestimulante em comercialização (Figura 10).

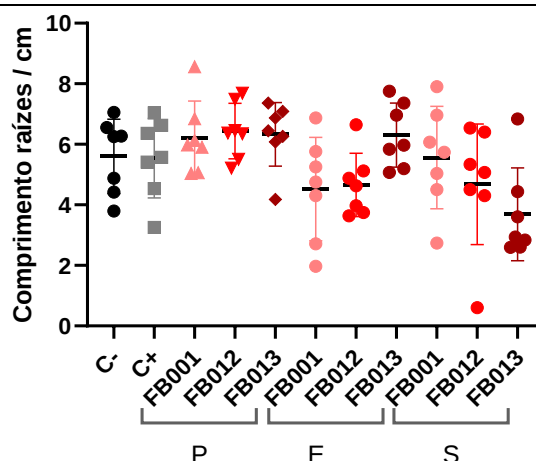


Figura 10. Comprimento das raízes de cenoura ao fim de 7 dias após aplicação dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S), comparativamente aos controlos negativo (C-) e positivo (C+).

Na Tabela 8 encontram-se reunidas as médias e o respetivo desvio-padrão do comprimento das raízes de tomate, melão e cenoura, medidas após aplicação dos extratos das microalgas resultantes das extrações a alta pressão, assistida de enzimas e sonicação, assim como após aplicação somente de água (C-) e de um bioestimulante comercial (C+).

Tabela 8. Comprimento das raízes de tomate, melão e cenoura, quando aplicada apenas água (C-), um bioestimulante comercial (C+) e os extratos obtidos pelos três métodos de extração.

Ensaio		Comprimento das raízes (cm)		
		Alta pressão	Enzimas	Sonicação
T O M A T E	C-	5,67 ± 1,15 a		
	C+	3,88 ± 0,70 b		
	FB001	6,60 ± 1,42 a	5,72 ± 0,99 a	6,58 ± 1,88 a
	FB012	6,70 ± 1,13 a	5,70 ± 0,95 a	5,97 ± 1,56 a
	FB013	7,06 ± 1,26 c	6,18 ± 0,42 a	6,43 ± 1,85 a
M E L Ã O	C-	5,15 ± 3,15 a		
	C+	4,06 ± 1,95 ab		
	FB001	3,73 ± 1,01 abc	7,38 ± 3,16 ad	5,393 ± 2,51 abce
	FB012	7,70 ± 3,58 a	6,86 ± 3,80 abd	7,48 ± 3,71 ade
	FB013	8,55 ± 4,66 d	6,99 ± 2,86 ad	8,53 ± 3,68 d
C E N O U R A	C-	5,60 ± 1,23 a		
	C+	5,54 ± 1,31 a		
	FB001	6,22 ± 1,21 ab	4,52 ± 1,71 abcd	5,56 ± 1,69 abcde
	FB012	6,44 ± 0,92 abc	4,66 ± 1,05 abcd	4,68 ± 1,99 abcde
	FB013	6,33 ± 1,05 abcd	6,31 ± 1,06 abcde	3,69 ± 1,53 a

Médias acompanhadas por diferentes letras (a,b,c,d,e) são diferentes a $p < 0,05$, de acordo com a análise de variância; $\pm$, desvio padrão

Os dados apresentados para as três plantas levam-nos a concluir que a espécie cujas raízes mais se desenvolveram foi o melão, e a estirpe que se destacou apresentando algum resultado diferente do controle negativo, constituído apenas por água, foi a FB013.

4.2.3 Índice de Germinação

O índice de germinação (GI) correlaciona o número de sementes germinadas e o comprimento das raízes obtidos para cada extrato comparativamente a um controlo. É importante referir que os valores de GI acima de 100% revelam atividade dos extratos. Os resultados de GI das sementes de tomate encontram-se esquematizados na Figura 11.

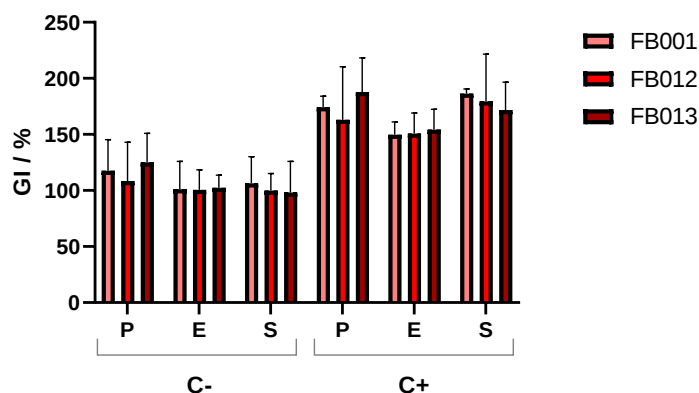


Figura 11. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de tomate dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).

Observando o gráfico acima, constata-se que, à exceção das amostras de FB012 e FB013 extraídas por sonicação, as restantes amostras apresentaram valores de GI superiores a 100% relativamente ao controlo negativo (constituído apenas por água). Tal significa que estes extratos apresentam atividade bioestimulante e um desempenho superior ao do controlo negativo. No caso do GI obtido relativamente ao controlo positivo (constituído por um bioestimulante em comercialização), verifica-se que todos os extratos apresentam atividade e provocaram uma maior germinação do que o controlo positivo.

De acordo com a análise estatística, ANOVA com 2 fatores, as médias de GI não apresentam diferenças estatisticamente significativas. De facto, os valores deste parâmetro são próximos dentro de cada método e cada estirpe, como tal, não é possível aferir com certeza qual o melhor método e estirpe. Todavia, os extratos resultantes da alta pressão destacam-se com valores mais elevados, nomeadamente no que diz respeito ao controlo negativo, assim como a estirpe FB013 apresenta os GI superiores.

Na Figura 12 apresentam-se os dados relativos ao GI para as sementes de melão.

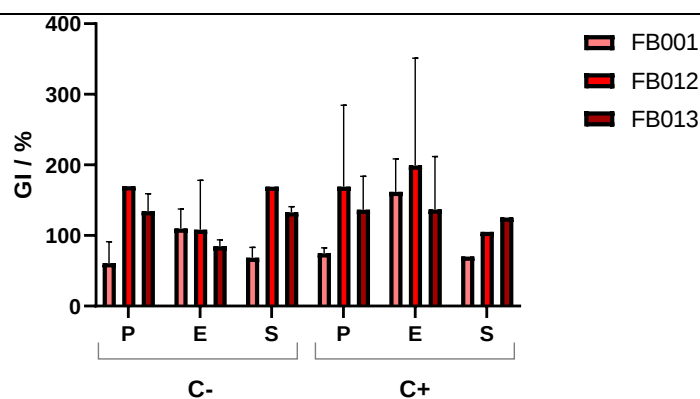


Figura 12. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de melão dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).

De acordo com os valores de GI registados, para os extratos de FB001 obtidos por alta pressão e sonicação, e os extratos de FB013 obtidos por reação enzimática inibiram a germinação do melão. Isto significa que apresentaram um desempenho inferior ao ensaio realizado apenas com água (C-) ou com um bioestimulante comercial (C+). Devido à elevada variabilidade entre réplicas, os valores médios de GI obtidos para as sementes de melão foram todas iguais de acordo com os critérios estatísticos. Porém neste caso a estirpe com os valores de GI mais elevados foi a FB012, embora com desvios-padrão bastante elevados.

Os dados de GI das sementes de cenoura estão representados na Figura 13.

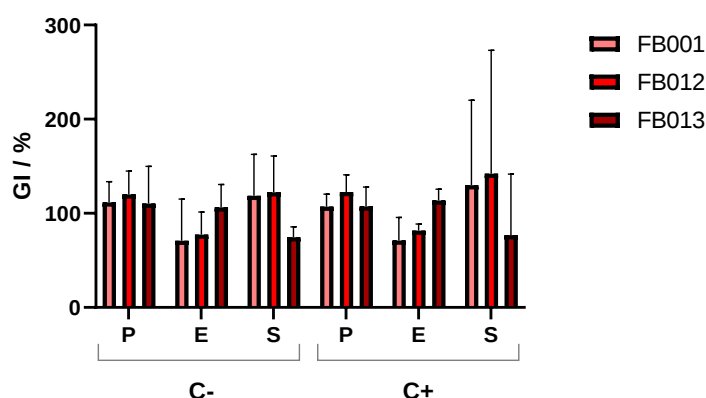


Figura 13. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) de cenoura dos extratos de alta pressão (P), assistidos de enzimas (E) e sonicação (S).

No caso da cenoura, os extratos de FB001 e FB012 obtidos por hidrólise enzimática, assim como o extrato de FB013 obtido por sonicação, registam valores inferiores a 100% para o GI relativo ao controlo negativo e positivo. Tal indica que estes apresentaram um desempenho inferior ao ensaio realizado apenas com água (controlo negativo) e com um bioestimulante comercial (controlo positivo). Novamente, não se encontraram diferenças significativas entre estirpes ou métodos, mas observando os valores de GI, verifica-se que estes foram mais elevados para a estirpe FB012.

Na tabela 9 apresentam-se reunidos os valores de GI obtidos para as 3 plantas.

Tabela 9. Resultados do GI relativo ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) obtido para o tomate, melão e cenoura.

T O M A T E	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	117,70 ± 27,66 a	108,40 ± 34,67 a	125,17 ± 25,87 a
	E	101,15 ± 24,84 a	100,57 ± 18,01 a	102,38 ± 11,34 a
	S	106,44 ± 23,69 a	99,91 ± 15,29 a	98,22 ± 27,66 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	174,34 ± 9,73 a	163,07 ± 43,25 a	187,89 ± 30,42 a
	E	149,77 ± 11,33 a	150,72 ± 18,27 a	154,36 ± 17,97 a
M E L Ã O	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	60,97 ± 30,21a	169,79 ± 0,00 a	134,55 ± 24,60 a
	E	109,70 ± 27,91 a	108,16 ± 69,87 a	84,86 ± 9,136 a
	S	68,37 ± 14,89 a	169,23 ± 0,00 a	132,91 ± 8,08 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	74,85 ± 7,74 a	169,29 ± 115,27 a	136,35 ± 47,35 a
	E	161,91 ± 46,71 a	199,15 ± 151,98 a	136,88 ± 75,04 a
C E N O U R A	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	111,69 ± 21,83 a	120,21 ± 24,54 a	110,44 ± 39,54 a
	E	70,99 ± 44,17 a	77,42 ± 23,95 a	106,38 ± 24,35 a
	S	118,58 ± 43,93 a	122,38 ± 38,50 a	74,74 ± 10,88 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	107,06 ± 13,41 a	122,55 ± 18,27 a	107,32 ± 20,59 a
	E	71,13 ± 24,53 a	81,73 ± 6,82 a	113,61 ± 11,90 a
C E N O U R A	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	111,69 ± 21,83 a	120,21 ± 24,54 a	110,44 ± 39,54 a
	E	70,99 ± 44,17 a	77,42 ± 23,95 a	106,38 ± 24,35 a
	S	118,58 ± 43,93 a	122,38 ± 38,50 a	74,74 ± 10,88 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	107,06 ± 13,41 a	122,55 ± 18,27 a	107,32 ± 20,59 a
	E	71,13 ± 24,53 a	81,73 ± 6,82 a	113,61 ± 11,90 a
C E N O U R A	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	111,69 ± 21,83 a	120,21 ± 24,54 a	110,44 ± 39,54 a
	E	70,99 ± 44,17 a	77,42 ± 23,95 a	106,38 ± 24,35 a
	S	118,58 ± 43,93 a	122,38 ± 38,50 a	74,74 ± 10,88 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	107,06 ± 13,41 a	122,55 ± 18,27 a	107,32 ± 20,59 a
	E	71,13 ± 24,53 a	81,73 ± 6,82 a	113,61 ± 11,90 a
C E N O U R A	GI (%) C-	FB001	FB012	FB013
	P	111,69 ± 21,83 a	120,21 ± 24,54 a	110,44 ± 39,54 a
	E	70,99 ± 44,17 a	77,42 ± 23,95 a	106,38 ± 24,35 a
	S	118,58 ± 43,93 a	122,38 ± 38,50 a	74,74 ± 10,88 a
	GI (%) C+	FB001	FB012	FB013
	P	107,06 ± 13,41 a	122,55 ± 18,27 a	107,32 ± 20,59 a
	E	71,13 ± 24,53 a	81,73 ± 6,82 a	113,61 ± 11,90 a

Médias acompanhadas por diferentes letras (a) são diferentes a p<0,05, de acordo com a análise de variância; ± , desvio padrão

Conclui-se que mais do que um extrato obtido por sonicação não apresentou atividade relativamente ao controlo negativo, sem qualquer adição de extratos. Em adição, no parâmetro de germinação observou-se, nomeadamente para o tomate e cenoura, que o método de sonicação apresentou diferenças significativas negativas em comparação com os extratos obtidos pelos dois outros métodos, evidenciando a menor eficiência geral deste método em comparação com os restantes. Observa-se que a extração por alta pressão deu origem a mais extratos com atividade relativamente aos outros métodos. Dentro das estirpes, a FB001 foi a que demonstrou ter mais extratos sem atividade em comparação com a FB012 e FB013.

Os parâmetros de germinação e comprimento das raízes foram analisados com o objetivo de perceber as diferentes influências que as estirpes e os métodos de extração analisados poderiam ter em cada um destes aspetos, nomeadamente averiguar se os extratos que potenciam a germinação seriam os mesmos a provocar um desenvolvimento mais rápido das raízes. Constata-se que a nível dos métodos de extração, as altas pressões se destacaram face à sonicação no que diz respeito à germinação, mas não provocaram efeitos diferenciados no crescimento das raízes. Conclui-se, portanto, que a escolha do método de extração não tem grande efeito neste parâmetro, possivelmente pelo facto dos métodos permitirem a extração de hormonas de crescimento, responsáveis, entre outros, pelo desenvolvimento das raízes, em concentrações semelhantes.

Por outro lado, relativamente às estirpes em estudo, em ambos os parâmetros os extratos da estirpe FB013 se destacaram em relação ao controlo negativo, composto por água apenas. Observa-se, por isso, uma correlação da influência de diferentes estirpes na germinação e desenvolvimento das raízes. O último parâmetro apresentado, o GI, pretende avaliar o efeito combinado dos parâmetros anteriores, evidenciando se existe realmente atividade dos extratos face ao uso isolado de água (controlo negativo) e de um bioestimulante comercial (controlo positivo). Esta atividade é expressa por valores de GI iguais ou superiores a 100%. Em concordância com o parâmetro de germinação, os extratos resultantes da sonicação apresentaram uma performance inferior, não apresentando sequer atividade em alguns casos, e os extratos provenientes da alta pressão e hidrólise enzimática não apresentam diferenças significativas. Da mesma forma, a estirpe que apresentou melhores resultados face ao controlo negativo nos parâmetros de germinação e comprimento das raízes foi a mesma, a FB013, assim como também foi uma das estirpes que registou valores mais elevados de GI, sobretudo para o tomate, aliada à estirpe FB012 que apresentou atividade dominante no melão e cenoura.

4.3 Caracterização dos extratos

4.3.1 Quantificação de azoto e carbono

Os resultados da composição elementar do N, C e CN molar, encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados da composição elementar do azoto, carbono e CN.

Amostra	%N média	%C média	CN molar média
FB001	6,80 ± 0,20	43,60 ± 0,70	8,10 ± 0,20
FB012	4,40 ± 0,20	36,50 ± 0,20	10,40 ± 0,40
FB013	6,30 ± 0,10	46,40 ± 0,10	9,20 ± 0,10

Observando os valores obtidos para a composição elementar de N nas três estirpes, verifica-se que a FB001 e FB013 apresentam os valores superiores e semelhantes, algo que pode ser justificado pelo facto de pertencerem ao mesmo género de microalgas. Tal significa que estas estirpes poderão contribuir mais significativamente para o desenvolvimento das características fisiológicas das plantas, tais como o alongamento do caule, a germinação das sementes, entre outras, e ocorrência da fotossíntese, visto ser este o foco de atuação de N. Contudo, a percentagem de N na FB012 é também elevada e próxima.

Da mesma forma, são as estirpes FB001 e FB013 que possuem maior conteúdo em C. Nas plantas, é essencial haver um equilíbrio entre a absorção de C, o seu armazenamento e o crescimento. Este elemento é retirado pelas plantas do ar na forma de CO₂ e é utilizado como fonte de energia, assistindo na produção de variados compostos biológicos, tal como os hidratos de carbono e as proteínas (Smith e Stitt, 2007). Assim, é possível inferir que as estirpes contendo maior percentagem de C, possuem igualmente um conteúdo mais elevado em hidratos de carbono, proteínas e aminoácidos, sendo estes também incluídos nos ingredientes ativos de bioestimulantes e, quando aplicados em spray nas plantas demonstram contribuir para o seu crescimento (Smith e Stitt, 2007).

No que diz respeito à razão CN molar, a estirpe FB012 destaca-se, contudo, os valores das três em causa são próximos. Este parâmetro indica a quantidade de C relativamente à de N presente, sendo que existe sempre mais C que N na biomassa e matéria orgânica. Quando esta razão se encontra entre 1 e 15 no solo, ocorre rápida mineralização e libertação de N. Este processo de mineralização consiste na metabolização do carbono orgânico, por parte dos micróbios, e na conversão do N orgânico em iões de nitrato e amónia, de forma que as plantas consigam absorver e utilizar o N nas suas funções. Quanto mais baixo for o valor, mais rápido o N é disponibilizado. Por outro lado, uma razão superior a 35 resulta na imobilização de N por parte dos microrganismos, convertendo-o novamente de composto inorgânico a orgânico (Brust, 2019). Neste caso, todos os valores estão entre 1 e 15, algo favorável visto que assim o N é disponibilizado mais rapidamente e, consequentemente, irá produzir mais depressa o seu efeito no crescimento das plantas.

4.3.2 Quantificação de metais

A quantificação de metais e nutrientes das três estirpes em estudo, assim como de uma amostra de uma biomassa mais comum de uma cianobactéria, a *Aphanizomenon ovalisporum*, foi realizada por ICP-MS. Tendo em conta que se pretende obter um método alternativo à sonicação e escalável, ao contrário deste, e que os extratos dos métodos alternativos apresentaram atividade semelhante ou superior, esta análise foi apenas realizada aos dois métodos de interesse: extração por alta pressão; e extração assistida de enzimas. Os resultados da concentração final, já com o branco eliminado, isto é, já com as concentrações de nutrientes presentes na água em que os extratos se encontram dispersos eliminadas, apresentam-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados da quantificação dos nutrientes nos extratos de alta pressão (P) e hidrólise enzimática (E) por ICP-MS.

Concentração ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{peso seco}}$)		P	K	Ca	Mg	Zn	Na	Fe
FB001	P	0,56 ± 0,00 a	1,62 ± 0,21 a	54 ± 32 a	0,19 ± 0,00 a	0,74 ± 0,00 a	0,20 ± 0,00 a	14,0 ± 0,6 a
	E	2,99 ± 0,26 a	0,75 ± 0,00 a	4271 ± 296 b	1,31 ± 0,00 a	9,33 ± 0,00 a	9984 ± 589 b	177 ± 3 ab
FB012	P	2,22 ± 0,00 a	2,99 ± 0,16 a	188 ± 6 ad	0,22 ± 0,00 a	2,44 ± 0,00 a	0,15 ± 0,00 a	46,4 ± 0,5 a
	E	3,74 ± 0,33 a	1,39 ± 0,11 a	478 ± 54 d	0,98 ± 0,00 a	9,64 ± 0,00 a	7506 ± 443 c	487 ± 79 b
FB013	P	1,77 ± 0,00 a	2,98 ± 0,00 a	55 ± 2 a	0,29 ± 0,00 a	2,36 ± 0,00 a	0,13 ± 0,00 a	1,03 ± 0,13 a
	E	1,32 ± 0,00 a	1,51 ± 0,00 a	138 ± 5 a	0,28 ± 0,00 a	3,45 ± 0,00 a	18723 ± 76 d	10,6 ± 0,5 a
<i>A. ovalisporum</i>	P	0,16 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	14 ± 0 a	0,05 ± 0,00 a	0,19 ± 0,00 a	0,02 ± 0,00 a	2,52 ± 0,00 a

Médias acompanhadas por diferentes letras (a,b,c,d) são diferentes a $p < 0,05$, de acordo com a análise de variância realizada para cada metal/coluna; $\pm$, desvio padrão

Observando os resultados obtidos para cada nutriente analisado, verifica-se que somente no caso do Ca, Na e Fe, se revelaram diferenças significativas entre as amostras. Nos restantes, P, K, Mg e Zn, a análise estatística realizada com recurso a ANOVA, conclui que as médias apresentadas não apresentam diferenças estatisticamente diferentes.

Tendo em consideração as ilações dos resultados enunciadas acima, constata-se que as médias significativamente diferentes e superiores às restantes, são todas de extratos provenientes do método de extração assistido de enzimas, relativamente aos nutrientes Ca, Na e Fe. Mais especificamente no que diz

respeito aos dois primeiros, verifica-se que os extratos enzimáticos apresentaram valores bastante superiores aos obtidos por alta pressão, contudo não se verificou uma atividade superior destes extratos comparativamente aos outros quando aplicados nas plantas. Consta-se que estes extratos, possivelmente devido ao método de extração utilizado recorrendo ao uso de uma mistura de enzimas, apresentam valores anormais de Ca, Na e Fe, os quais não correspondem aos que seriam de esperar de biomassa de microalgas. Assim, os valores destes nutrientes presentes nos extratos enzimáticos não são considerados para efeitos de comparação.

Tendo em conta que os elementos mais importantes e devidamente identificados em fertilizantes são o N, P e K, constata-se que os dois métodos seriam adequados para a produção de extratos com esta aplicação. No que diz respeito às estirpes, todas apresentam potencial para esta aplicação, visto que apresentam valores semelhantes estatisticamente. Contudo, apesar de semelhantes, os valores obtidos para as estirpes FB012 e FB013 apresentam valores ligeiramente superiores aos de FB001, dentro do método de extração a alta pressão, podendo assim justificar os seus melhores resultados nos ensaios de atividade. Relativamente aos resultados da biomassa mais comum, verifica-se que a composição de nutrientes da mesma, em comparação com os outros extratos obtidos por alta pressão é inferior em todos os nutrientes à exceção do Fe. Como tal, conclui-se que as estirpes em estudo apresentam maior potencial para a aplicação desejada em comparação a outras biomassas e cianobactérias mais comuns.

4.3.3 Quantificação de hormonas de crescimento

A técnica de LC-MS/MS foi utilizada para detetar e quantificar auxinas nos extratos das microalgas. Os cromatogramas MRM dos dois padrões de auxinas, IAA e IPA, analisados, apresentam-se na Figura 14.

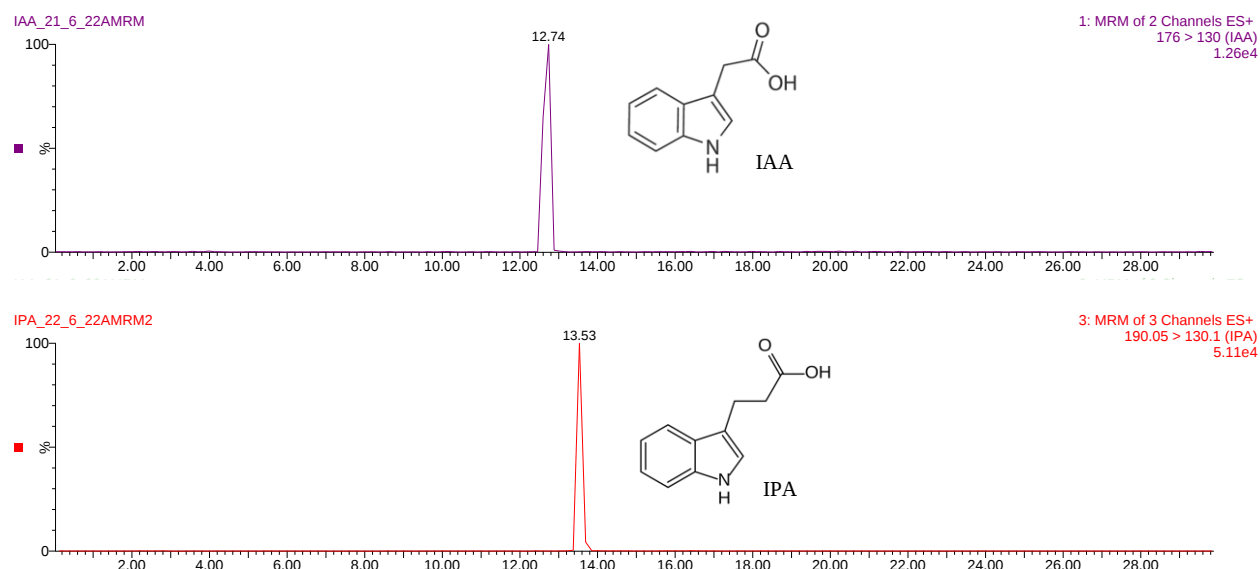


Figura 14. Cromatogramas de LC-MS dos padrões IAA e IPA.

No caso dos extratos de alta pressão o composto IAA foi detetado nas três estirpes, enquanto o IPA foi apenas detetado na estirpe FB013, cujos cromatogramas *TIC* (*ion extracted chromatogram*) se apresentam na Figura 15.

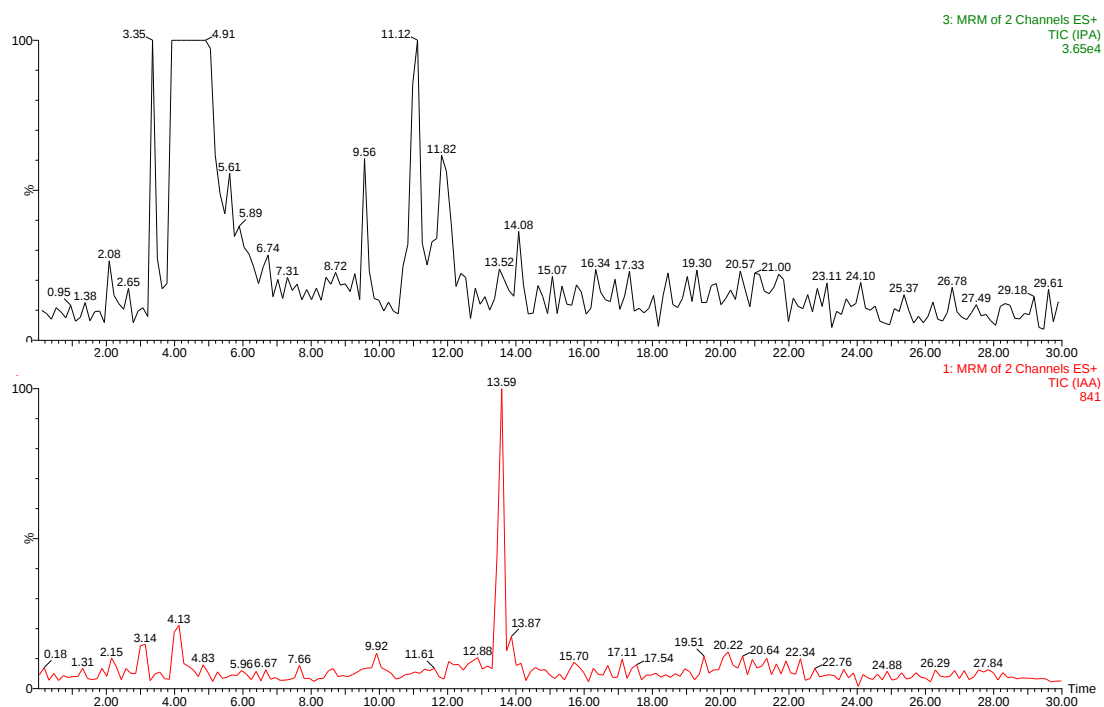


Figura 15. Cromatogramas MRM obtidos para a estirpe FB013, com a detecção de IPA e IAA.

Através da reta de calibração de cada padrão e a área de pico obtido para cada amostra, foi possível quantificar estes compostos em cada amostra. Os resultados da quantificação das auxinas encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Quantificação de IAA e IPA.

Composto	FB001 P ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$)	FB012 P ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$)	FB013 P ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$)
IAA	0,91	1,24	1,80
IPA	-	-	1,78

No caso dos extratos obtidos por hidrólise enzimática, não foi possível detetar as hormonas de crescimento, devido às interferências registadas, provavelmente devidas a matriz complexa da amostra. Desta forma, para melhorar a detecção nestes extratos seria necessário purificar as amostras utilizando uma coluna de extração de fase sólida (SPE), como sugerido por Dobrev et al. (2017).

Num estudo similar de Hashtroudi et al. (2012) em que se pretendeu quantificar as auxinas presentes em três estirpes de cianobactérias, *Anabaena vaginicola* de água e solo, e a *Nostoc calcicola*, a molécula IPA não foi sequer detetada e a de IAA apresentou, respetivamente, as seguintes concentrações: 0,009, 0,002 e 0,005 $\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$. Por outro lado, no estudo realizado por Duong et al. (2021), foram registadas as concentrações de 5,51 e 0,93 $\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$ para o IAA encontrado nas estirpes *P. raciborskii* e *Chrorella sorokiniana*, respetivamente, e as concentrações de 0,29 e 2,66 $\mu\text{g} \cdot \text{g}_{\text{peso seco}}^{-1}$ para o IPA. Verifica-se assim que os resultados obtidos para as estirpes FB001, FB012 e FB013 estão dentro do esperado e previamente encontrado noutras estirpes de microalgas e cianobactérias, confirmando a sua potencialidade como promotoras do crescimento das plantas.

4.4 Análise de custos dos métodos

A determinação do consumo energético das extrações a alta pressão foi determinada através da equação 2, e a assistida de enzimas foi realizada recorrendo à equação 3. Para o primeiro método foram utilizados diferentes parâmetros de acordo com as estirpes, nomeadamente no que diz respeito à pressão imposta. Na tabela 13 apresentam-se os valores dos parâmetros usados na equação 2 e o respetivo valor final de energia e custo obtido para um preço de $0,23 \text{ €} \cdot \text{kWh}^{-1}$.

Tabela 13. Parâmetros, valor e custo do consumo energético para a extração a alta pressão.

Parâmetros	$P \text{ (Pa)}$	N	$X \text{ (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$	Energia ($\text{kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Custo ($\text{€} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$)
FB001	$1,03 \times 10^8$	2	4,24	14,30	3,29
FB012	$2,07 \times 10^8$	2	4,51	28,75	6,61
FB013	$2,76 \times 10^8$	1	4,48	19,17	4,41

Por outro lado, para o cálculo do consumo da extração com enzimas, foram necessários os parâmetros representados na Tabela 14, e obteve-se o valor de energia e custo representado na mesma tabela.

Tabela 14. Parâmetros para o cálculo do consumo energético da hidrólise enzimática.

$P \text{ (kw)}$	$t \text{ (h)}$	$V_L \text{ (L)}$	$X \text{ (g} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$	Energia ($\text{kWh} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Custo ($\text{€} \cdot \text{kg}_{\text{biomassa}}^{-1}$)
0,5	5	10	4,50	55,56	12,78

A este valor acresce ainda o custo das enzimas, calculado através da equação 4. Considerando que o preço por mL de solução enzimática é de 1,19 €, e que o volume necessário de enzimas para 50 mg de biomassa é de 0,015 mL, correspondente a um volume de 300 mL para 1 kg de biomassa, obtém-se um custo de 358 € · kg⁻¹ de biomassa. Assim, este método apresenta um custo total de 371 € · kg⁻¹ de biomassa. Comparando os preços dos dois métodos verifica-se que a extração assistida de enzimas, a ser usada a larga escala, apresenta custos bastante superiores, não sendo viável a nível económico.

4.5 Formulação do bioestimulante/biofertilizante

A formulação do bioestimulante/biofertilizante foi realizada em triplicado, utilizando as percentagens mássicas de cada ingrediente como apresentado na secção 3.8 do capítulo dos Métodos, variando apenas a estirpe presente nos extratos. Considerando o desempenho dos métodos nos ensaios de atividade, análises químicas e avaliação de custos, concluiu-se que o melhor método a ser aplicado a larga escala para a produção de extratos de microalgas a serem aplicados em bioestimulantes e biofertilizantes foi a extração a alta pressão. Assim, utilizou-se os extratos obtidos da mesma e formularam-se 3 produtos: um com os extratos de FB012 (F1), um com os de FB013 (F2) e um com ambos os extratos, FB012 e FB013 (F3). Nesta última, mantiveram-se os 12% de massa de extratos de microalgas, mas utilizando 6% de cada estirpe. Foram selecionadas estas estirpes tendo igualmente por base os ensaios realizados previamente, os quais permitiram aferir que as estirpes com melhores qualidades e potencial seriam a FB012 e FB013.

As formulações realizadas foram testadas nas sementes de tomate, visto ter sido a planta que demonstrou resultados mais evidentes na comparação dos métodos e estirpes, com o propósito de averiguar se a atividade se manteria ou piorava quando misturados os extratos com outros compostos. Na Figura 16 apresenta-se o gráfico da germinação do tomate ao longo de uma semana.

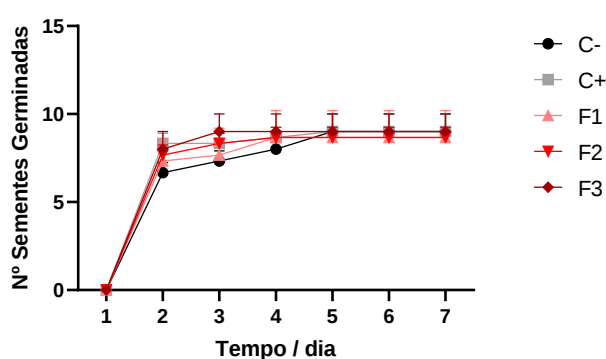


Figura 16. Evolução da germinação de tomate após aplicação das 3 formulações (F1, F2, F3)

Foi realizada a ANOVA para análise das variâncias, cujo resultado inferiu que não existem diferenças significativas entre as estirpes e controlos. Na Figura 17 e Tabela 15 apresentam-se os resultados obtidos para o crescimento das raízes, apresentando também os valores que se obtiveram para os extratos isolados de FB012 e FB013 resultantes da extração a alta pressão (FB012 (P), FB013 (P)).

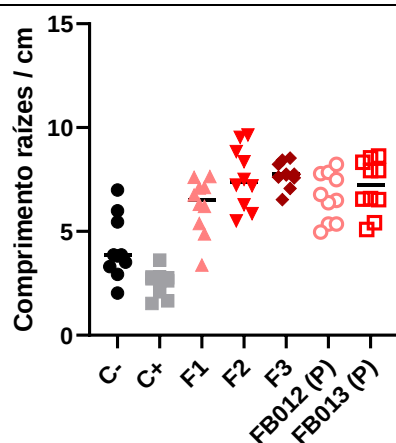


Figura 17. Comprimento das raízes de tomate ao fim de 7 dias após aplicação das formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013 (P)).

Tabela 15. Comprimento das raízes obtido para as formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013 (P)).

Planta	Ensaio	Comprimento das raízes (cm)
Tomate	C-	5,67 ± 1,15 a
	C+	3,88 ± 0,70 b
	F1	6,24 ± 1,91 ac
	F2	7,60 ± 2,05 cd
	F3	7,72 ± 1,79 d
	FB012 (P)	6,70 ± 1,13 acd
	FB013 (P)	7,06 ± 1,26 cd

Médias acompanhadas por diferentes letras (a,b,c,d) são diferentes a $p < 0,05$, de acordo com a análise de variância; $\pm$, desvio padrão.

De acordo com a análise estatística, as formulações F2 e F3 e o extrato de FB013 obtido por alta pressão são significativamente diferentes dos controlos negativo (apenas água) e positivo (adição de bioestimulante comercial). A formulação F1 e extrato FB012 (P) são também diferentes do controlo positivo. As formulações F2 e F3 são semelhantes e equivalentes aos extratos FB012 (P) e FB013 (P), o que significa que a adição dos ingredientes da formulação aos extratos não alterou a sua atividade. Na Figura 18 e Tabela 16 estão representados os GI obtidos.

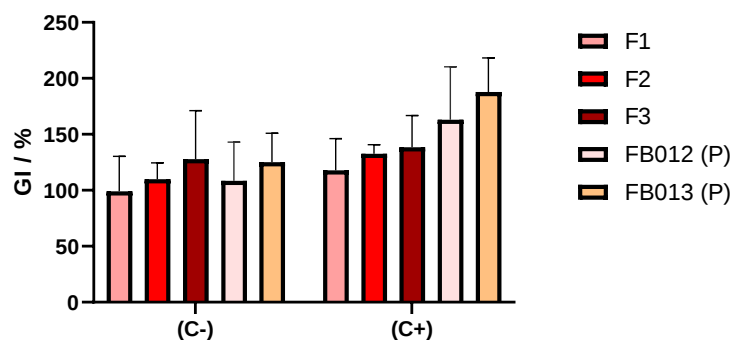


Figura 18. GI obtido relativamente ao controlo negativo (C-) e positivo (C+) para as três formulações (F1, F2, F3) e os dois extratos utilizados nas formulações (FB012 (P), FB013 (P)).

Tabela 16. Valores de GI obtidos para as formulações (F1, F2, F3) e extratos (FB012 (P), FB013 (P)).

Tomate		F1	F2	F3	FB012 (P)	FB013 (P)
GI (%)	C-	98,98 ± 31,42 a	109,97 ± 14,53 a	127,79 ± 43,44 a	108,40 ± 34,67 a	125,17 ± 25,87 a
	C+	117 ± 28,43 a	132,59 ± 8,05 a	138,51 ± 28,31 a	163,07 ± 47,25 a	187,89 ± 30,42 a

Médias acompanhadas por diferentes letras (a) são diferentes a $p < 0,05$, de acordo com a análise de variância; $\pm$, desvio padrão.

Verificou-se que as médias de GI são semelhantes independentemente da estirpe. Estes resultados permitem aferir que a formulação em comparação com os extratos brutos apresenta igualmente atividade e não demonstra alterações face ao desempenho dos extratos. É de salientar que as formulações F2 e F3 apresentaram valores de GI superiores a 100%, demonstrando atividade face aos controlos negativo e positivo. Infere-se, desta forma, que estas formulações permitem uma maior produtividade em comparação com o uso somente de água (controlo negativo) e adição de um bioestimulante já comercializado (controlo positivo).

A composição de cada formulação apresenta-se na Tabela 17.

Tabela 17. Composição estimada de cada formulação produzida.

%	N	P	K	C	Ca	Mg	Zn	Na	Fe	IAA	IPA
F1	4,40	0,22	0,30	36,50	18,80	0,02	0,24	0,02	4,64	$0,91 \times 10^{-4}$	-
F2	6,30	0,06	0,30	46,40	5,50	0,02	0,07	0,01	0,10	$1,80 \times 10^{-4}$	$1,77 \times 10^{-4}$
F3	5,60	0,14	0,30	41,45	12,15	0,02	0,16	0,02	2,37	$1,52 \times 10^{-4}$	$8,84 \times 10^{-5}$

O pH medido das formulações, igual a 4, é equivalente ao do pH apresentado pelo bioestimulante da microalga *Chlorella* já em comercialização, *Spiragro*, igual a 3,8. Prevê-se que este produto, por ser um biofertilizante líquido, tenha uma validade de 3 meses, enquanto um fertilizante sólido teria uma validade superior de 6 meses, segundo Quesada-Salas et al. (2021). Contudo, os produtos líquidos são melhor assimilados e disponibilizam mais eficientemente os nutrientes presentes no produto. Os valores de NPK obtidos para as formulações, apresentadas na Figura 19, são então os seguintes: F1: 4,4-0,2-0,3; F2: 6,3-0,1-0,3; F3: 5,6-0,1-0,3.

No caso do *Spiragro*, no seu rótulo lê-se o seu NPK como sendo 1,4-0,3-4,0. Em comparação, verifica-se que as formulações realizadas só com a estirpe FB013 (F2) e com a mistura das duas estirpes (F3) apresentam maior percentagem de N, o ingrediente principal para o crescimento. Esta composição permite justificar o melhor desempenho das formulações F2 e F3 comparativamente à F1 nos vários parâmetros analisados previamente. Conclui-se que estas duas formulações apresentam atividade e potencial para aplicação como biofertilizantes, sobretudo quando comparadas ao biofertilizante *Spiragro*, apresentando maior conteúdo em N e melhores resultados nos ensaios de atividade. Comparando as duas, F2 e F3, constata-se que em termos de composição a F2 é mais atrativa, pelo valor superior de N e hormonas de crescimento, sendo que a F3 apresenta melhores resultados no comprimento das raízes e consecutivamente no valor de GI, visto ter em adição o extrato da estirpe FB012, o qual demonstrou ser eficiente no desenvolvimento das raízes. Conclui-se que ambas as formulações apresentam potencial para aplicação na agricultura.

5 Conclusões

O propósito deste trabalho consistia na avaliação do potencial de três estirpes, FB001, FB012 e FB013, e três métodos de extração, a alta pressão, assistida de enzimas e sonicação, no que diz respeito ao potencial dos seus extratos para aplicação na agricultura.

A análise da germinação das sementes permitiu concluir que os extratos obtidos por alta pressão e hidrólise enzimática demonstraram ser mais eficientes do que a sonicação, assim como a estirpe FB013 apresentou melhores resultados face ao controlo negativo, composto por apenas água. Quanto ao comprimento das raízes, constatou-se da mesma forma que a estirpe mais eficiente do que o controlo negativo foi a FB013. No caso do GI, verificou-se que mais do que um extrato obtido por sonicação não apresentou atividade relativamente ao controlo negativo, evidenciando assim a menor eficiência deste método. Por outro lado, a extração por alta pressão deu origem a mais extratos com atividade, levando a concluir que este seria o método mais eficiente. Dentro das estirpes, a FB012 e FB013 apresentaram atividade superior destacando-se como as que possuem maior potencial para a aplicação desejada.

Relativamente às análises químicas efetuadas, no que diz respeito à composição em azoto e carbono, concluiu-se que as estirpes apresentam percentagem semelhantes destes elementos e numa quantidade significativa, apresentando potencial de desenvolvimento das características fisiológicas das plantas, assim como se pode concluir que, tendo em conta a elevada percentagem de carbono presente nas três estirpes, quase 50%, estas contêm hidratos de carbono, proteínas e aminoácidos numa quantidade significativa. A quantificação dos metais, por sua vez, permitiu concluir que ambos os métodos de alta pressão e hidrólise enzimática permitiram extrair eficientemente os principais nutrientes e que as três estirpes estudadas apresentam concentrações semelhantes dos mesmos, destacando-se ligeiramente as FB012 e FB013.

No que diz respeito aos custos, o método de alta pressão apresenta um custo máximo de 6,61 € · kg⁻¹, derivado de consumos energéticos, enquanto a hidrólise enzimática representa um custo de 371 € · kg⁻¹, resultante do custo elevado das enzimas, tornando-se assim um método não viável a nível económico sobretudo quando aplicado a larga escala. Tendo em conta as conclusões retiradas de todos os parâmetros, conclui-se que o método mais eficiente e económico, apropriado a *scale-up*, é o da extração a alta pressão e, a estirpe que apresenta o melhor desempenho com base nos mesmos critérios é a FB013, seguida da FB012. Produziram-se assim duas formulações com os extratos destas duas estirpes obtidos por alta pressão, as quais mostraram ser eficientes, a F2 (com FB013) e F3 (com FB012 e FB013), possuindo os NPK de 6,3-0,1-0,3 e 5,6-0,1-0,3, respetivamente. Quando comparadas ao uso isolado de água e de um bioestimulante comercial, *Spiragro*, apresentam um desempenho superior e maior potencial para aplicação como bioestimulantes e biofertilizantes, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento das plantas.

6 Avaliação do trabalho realizado

6.1 Objetivos Realizados

Os objetivos deste trabalho consistiam na testagem de métodos de extração alternativos e escaláveis para a extração de compostos bioativos de microalgas, avaliação do potencial de três estirpes de microalgas para aplicação na agricultura, e formulação de um bioestimulante/biofertilizante através dos melhores extratos. Assim, foram testados três métodos, um deles tradicionalmente usado para esta aplicação, a extração com ultrassons, e dois novos, a extração a alta pressão e assistida de enzimas. Foram produzidos extratos de três estirpes de microalgas, avaliada a sua atividade quando aplicados em plantas, a sua composição em termos de nutrientes e hormonas de crescimento, analisados os seus custos e viabilidade económica, e possibilidade de *scale up*. No que diz respeito às estirpes estas foram avaliadas com base nos mesmos parâmetros e comparadas entre si. Por fim, foi realizada uma formulação de um bioestimulante/biofertilizante usando os extratos do método mais eficiente e viável, não só a nível económico, mas também no que diz respeito ao *scale-up*, e dentro destes utilizando as estirpes que demonstraram ter maior potencial para aplicação na agricultura. Desta forma, os objetivos propostos foram alcançados.

6.2 Recomendações de Trabalhos Futuros

Nesta dissertação foi demonstrado o potencial de duas estirpes de microalgas no desenvolvimento de produtos com aplicação na agricultura, como bioestimulantes e biofertilizantes. Foram produzidos extratos destas microalgas através de três métodos de extração: a alta pressão, assistida de enzimas e por sonicação. A libertação de compostos bioativos após estes procedimentos foi verificada e constatou-se que a extração a alta pressão foi o método mais eficiente. Contudo, um outro processo de extração tem vindo a ganhar importância e tem demonstrado elevado potencial na libertação destes compostos alvo. Trata-se da extração supercrítica com CO₂. Desta forma, em trabalhos futuros, seria interessante realizar este método, embora mais complexo e demorado devido à necessidade de otimização de diversos parâmetros de funcionamento, é igualmente um método apropriado ao *scale-up* e à produção de extratos em larga escala, à semelhança do extrator a alta pressão.

Foram também testados os extratos obtidos e as formulações em sementes de plantas, nomeadamente o tomate, melão e cenoura, com o propósito de averiguar a sua atividade na germinação e crescimento das raízes das plantas. Como próximo passo poderiam ser realizados testes de *performance* dos produtos em condições de stress abiótico e na presença de fungos, assim como poderiam ser realizados testes numa maior variedade de plantas, como os cereais. Em adição, seria importante verificar a atividade do produto num nível mais avançado do crescimento das plantas, nomeadamente a nível do crescimento das folhas, algo que necessitaria de um maior período de tempo.

6.3 Apreciação Final

A dissertação apresentada cumpriu os objetivos definidos, apresentou resultados e evidências devidamente justificadas, comprovando o potencial das microalgas para aplicação na agricultura, na forma de bioestimulantes e biofertilizantes. Foram igualmente avaliados três métodos de extração de compostos bioativos das microalgas, tendo-se aferido qual o mais eficiente e que poderá ser utilizado para a produção destes extratos a larga escala, com o intuito da comercialização do bioestimulante/biofertilizante produzido na empresa Fykia Biotech.

Foi dado mais um passo no que diz respeito à sustentabilidade e à produção de alimentos de forma segura e sem qualquer consequência negativa para o ambiente.

7 Referências

- Aktar, W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, **2**(1), 1–12.
- Baweja, P., Kumar, S., Kumar, G. (2019). Organic Fertilizer from Algae: A Novel Approach Towards Sustainable Agriculture.
- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2019). Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. *Algal Research*, **42**.
- Bloem, E., Haneklaus, S., Haensch, R., & Schnug, E. (2017). EDTA application on agricultural soils affects microelement uptake of plants. *Science of The Total Environment*, **577**, 166–173.
- Brust, G. E. (2019). Management Strategies for Organic Vegetable Fertility. *Safety and Practice for Organic Food*, 193–212.
- Croda International Plc, “Span™ 20”, Croda, 2022. Retrieved from (https://www.crodacropcare.com/en-gb/product-finder/product/259-span_1_20)
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros M. (2015). Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. *Biotechnol Bioeng. Oct*, **112**(10), 1955-66.
- Dobrev PI., Hoyerová K., Petrášek J. (2017). Analytical Determination of Auxins and Cytokinins. *Methods Mol Biol*, **1569**, 31-39.
- Duong, T. T., Nguyen, T. T. L., Dinh, T. H. V., Hoang, T. Q., Vu, T. N., Doan, T. O., Bui, H. M. (2021). Auxin production of the filamentous cyanobacterial *Planktothricoides* strain isolated from a polluted river in Vietnam. *Chemosphere*, **284**.
- Foley, J. A., Ramankutty, N., Brauman, K. A., Cassidy, E. S., Gerber, J. S., Johnston, M., Zaks, D. P. M. (2021). Solutions for a cultivated planet. *Nature*, **478**, 337–342.
- González-Pérez, B.K., Rivas-Castillo, A.M., Valdez-Calderón, A. (2022). Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol*, **38**, 4.
- Hashtroudi, M. S., Ghassempour, A., Riahi, H., Shariatmadari, Z., & Khanjir, M. (2012). Endogenous auxins in plant growth-promoting Cyanobacteria—*Anabaena vaginicola* and *Nostoc calcicole*. *Journal of Applied Phycology*, **25**(2), 379–386.
- Joana Gil-Chávez, G., Villa, J. A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**(1), 5–23.

- Jiaying, M., Tingting, C., Jie, L., Weimeng, F., Baohua, F., Guangyan, L., Hubo, L., Juncai, L., Zhihai, W., Longxing, T., Guanfu, F. (2022). Functions of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in Energy Status and Their Influences on Rice Growth and Development. *Rice Science*, **29**, Issue 2, 166-178.
- Kim, S. K., & Chojnacka, K. (2015). *Marine Algae Extracts*.
- Kuźniar A, Włodarczyk K, Sadok I, Staniszevska M, Woźniak M, Furtak K, Grządziel J, Gałązka A, Skórzyńska-Polit E, Wolińska A. (2021). A Comprehensive Analysis Using Colorimetry, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Bioassays for the Assessment of Indole Related Compounds Produced by Endophytes of Selected Wheat Cultivars. *Molecules*, **26**(5), 1394.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C. (2014). Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Conversion and Management*, **85**, 551-557.
- Mallhi, Z. I., Rizwan, M., Mansha, A., Ali, Q., Asim, S., Ali, S., Ahmad, P. (2019). Citric Acid Enhances Plant Growth, Photosynthesis, and Phytoextraction of Lead by Alleviating the Oxidative Stress in Castor Beans. *Plants*, **8**(11), 525.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Dmytryk, A., Wilk, R., Gramza, M., & Rój, E. (2016). Evaluation of Supercritical Extracts of Algae as Biostimulants of Plant Growth in Field Trials. *Frontiers in Plant Science*, **7**.
- Miller, J. C., & Miller, J. N. (1993). *Statistics for Analytical Chemistry* (3rd ed.). Ellis Horwood, Chichester.
- Mutale-Joan, C., Sbabou, L. & Hicham, E.A. (2022). Microalgae and Cyanobacteria: How Exploiting These Microbial Resources Can Address the Underlying Challenges Related to Food Sources and Sustainable Agriculture: A Review. *J Plant Growth Regulation*.
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N. N. B. M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freeze drying – a review. *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences*, **3**(4), 87-98.
- Palmer, J., Muñoz, D., Edwards, C. (2021). Biological activities of natural products from microalgae, **11**, 287-324.
- Quesada-Salas, Delfau-Bonnet, G., Willig, G., Pr  at, N., Allais, F., & Ioannou, I. (2021). Optimization and Comparison of Three Cell Disruption Processes on Lipid Extraction from Microalgae. *Processes*, **9**(2), 369.
- RELACRE. (2000). Guia RELACRE 13: Valida  o de métodos internos de ensaio em análise química. Lisboa, *Relacre*.
- Ronga D, Biazzi E, Parati K, Carminati D, Carminati E, Tava A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*. **9**(4), 192.

- Rouphael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, **9**.
- Safi, C., Cabas Rodriguez, L., Mulder, W. J., Engelen-Smit, N., Spekking, W., Broek, L. A. M., Olivieri, G., Sijtsma, L. (2017). Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresource Technology*, **239**, 204-210.
- Sanders, R. (2012). Fertilizer use responsible for increase in nitrous oxide in atmosphere, *Berkeley News*
- Savcı, S. (2012). An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*. **3**.
- Sierra, L. S., Dixon, C. K., Wilken, L. R. (2017). Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Research*, **25**, 149-159.
- Smith, A. M., & Stitt, M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment*, **30**(9).
- Søltoft-Jensen, J., & Hansen, F. (2005). New Chemical and Biochemical Hurdles. *Emerging Technologies for Food Processing*, **15**, 387–416.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, **418**(6898), 671–677.
- Tilvi, S., Majik, M. S., & Singh, K. S. (2014). Mass Spectrometry for Determination of Bioactive Compounds. *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds*, **13**, 193–218.
- Uhrovčík, J. (2014). Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects. *Talanta*, **119**, 178–180.
- Wang, H., Zhou, W., Shao, H., Liu, T. (2017). A comparative analysis of biomass and lipid content in five *Tribonema* sp. strains at autotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultivation. *Algal Research*, **24**, Part A, 284-289.
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *The Clinical biochemist. Reviews*, **40**(3), 115–133.
- Yang, J., & Lin, Y. (2019). Spatiotemporal evolution and driving factors of fertilizer reduction control in Zhejiang Province. *Science of The Total Environment*, **660**, 650–659.
- Yap, B. H. J., Dumsday, G. J., Scales, P. J., & Martin, G. J. O. (2015). Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresource Technology*, **184**, 280–285.
- Zhang, Y., Zhang, P., Ma, B., Wu, H., Zhang, S., & Xu, X. (2012). Sewage sludge disintegration by high-pressure homogenization: A sludge disintegration model. *Journal of Environmental Sciences*, **24**(5), 814–820.

Anexo A - Meio de cultivo



LABORATÓRIO DE ECOTOSSICOLOGIA
GENÔMICA E EVOLUÇÃO

Z8 Medium (Kotai, 1972)

PROTOCOL

- Sterilize all glass material and/or use sterile plastic material
- Use ultrapure water
- Prepare the solutions in volumetric flasks
- Autoclave separately the A,B, Fe-EDTA and micronutrients solutions
- Prepare medium in the flow chamber under aseptic conditions
- The solutions should be at room temperature when added to prevent precipitation
- In the end stock solutions should be stored in the refrigerator

Add the solutions to water according to the following concentrations:

Solution A	10 ml/l
Solution B	10 ml/l
Fe-EDTA Solution	10 ml/l
Micronutrients Solution	1 ml/l

Composition of stock solutions:

Solution A

Reagent	Name	g/l	g/2L
NaNO ₃	Sodium nitrate	46.7	93.4
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Calcium nitrate tetrahydrate	5.9	11.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Magnesium sulfate heptahydrate	2.5	5.0

Solution B

Reagent	Name	g/l	g/2l
K ₂ HPO ₄	Potassium phosphate dibasic	3.1	6.2
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate	2.1	4.2

Fe-EDTA Solution

Solution	ml/l	ml/2L
FeCl ₃ *	10	20 ml
EDTA-Na**	9.5	19 ml

Micronutrients Solution

Solution	ml/l	ml/500ml
1 a 12	10	5 ml
13 e 14	100	50 ml

11/02/2020

1/2



Composition of basic solutions

* FeCl₃ Solution

Reagent	Name	100ml	250ml
FeCl ₃ .6H ₂ O	Ferric chloride	2.8 g	7 g
HCl (0.1 N)	Hydrochloric acid	100ml	250ml

** EDTA-Na Solution

Reagent	Name	100 ml	250 ml
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	3.9 g	9.75 g
NaOH (0.1 N)	Sodium hydroxide solution	100 ml	250 ml

Solutions 1-14

	Reagent	g/l	g/ 100ml
1	Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O Sodium tungstate	0.33	0.033
2	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .2H ₂ O Ammonium heptamolybdate	0.88	0.088
3	KBr Potassium bromide	1.2	0.12
4	KI Potassium iodide	0.83	0.083
5	ZnSO ₄ .7H ₂ O Zinc sulfate	2.87	0.287
6	Cd(NO ₃).4H ₂ O Cadmium nitrate	1.55	0.155
7	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O Cobalt (II) nitrate	1.46	0.146

	Reagent	g/l	g/ 100ml
8	CuSO ₄ .5H ₂ O Cupric sulfate	1.25	0.125
9	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ .6H ₂ O Ammonium nickel sulfate	1.98	0.198
10	Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O Chromium (III) nitrate	0.41	0.041
11	V ₂ O ₅ Vanadium (V) oxide	0.089	0.0089
12	AlK(SO ₄) ₂ .12 H ₂ O Potassium aluminium sulfate	9.48	0.948
13	H ₃ BO ₃ Boric acid	3.1	0.31
14	MnSO ₄ .4H ₂ O Manganese sulfate	2.23	0.223

11/02/2020

2/2

Apêndice A - Evolução do crescimento das sementes

A.1. *Lycopersicon esculentum*

Tabela A 1. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios de alta pressão.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	7	7	8	9	7	6	10	8	9	8	5	8	8	8
4	10	9	9	9	10	9	9	10	9	10	10	7	9	10	10
5	10	10	9	9	10	9	9	10	10	10	10	7	9	10	10
6	10	10	9	9	10	10	9	10	10	10	10	7	10	10	10
7	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	7	10	10	10

Tabela A 2. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios assistidos de enzimas.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	7	7	8	9	7	7	10	6	8	10	9	6	7	7
4	10	9	9	9	10	9	9	10	10	10	10	10	6	9	8
5	10	10	9	9	10	9	10	10	10	10	10	10	9	9	10
6	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10
7	10	10	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	10

Tabela A 3. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios da sonicação.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	7	5	7	5	7	7	6	5	9	7	6	6	8	6	3
4	8	5	10	8	7	9	9	9	9	10	9	8	9	7	6
5	10	7	10	9	8	10	9	9	9	10	10	9	9	9	8
6	10	7	10	10	8	10	9	9	9	10	10	9	9	9	8
7	10	7	10	10	8	10	9	9	10	10	10	9	9	9	8

A.2. *Cucumis melo*

Tabela A 4. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios de alta pressão.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	3	4	6	4	1	5	3	4	5	1	8	6	6	3
4	7	6	5	8	6	3	7	7	7	6	1	9	7	6	4
5	8	7	6	8	7	4	8	8	7	7	5	10	7	8	6
6	9	9	6	8	10	5	8	8	7	8	5	10	7	8	6
7	9	9	7	8	10	8	8	8	7	8	5	10	7	8	6

Tabela A 5. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios assistidos de enzimas.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	3	4	6	4	1	5	6	1	5	2	8	4	3	5
4	7	6	5	8	6	3	7	7	5	8	5	9	5	4	8
5	8	7	6	8	7	4	8	7	6	10	6	9	6	4	8
6	9	9	6	8	10	5	8	7	7	10	6	9	6	6	8
7	9	9	7	8	10	8	8	7	7	10	6	9	6	6	8

Tabela A 6. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios assistidos de enzimas.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
2	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
3	5	5	6	5	3	2	5	6	-	7	7	-	8	7	-
4	8	7	7	9	8	7	7	7	-	7	10	-	10	7	-
5	10	8	7	9	8	8	7	7	-	7	10	-	10	7	-
6	10	9	7	9	8	8	7	7	-	7	10	-	10	7	-
7	10	9	8	9	8	8	7	7	-	7	10	-	10	7	-

A.3. *Daucus carota*

Tabela A 7. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios de alta pressão.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8	7	6	7	8	6	9	8	7	9	6	5	8	6	8
3	9	7	9	7	8	7	9	8	8	9	8	5	9	8	9
4	10	8	9	8	9	7	9	8	8	10	8	8	9	8	9
5	10	8	9	8	9	7	9	8	8	10	8	8	9	8	9
6	10	8	9	8	9	7	9	8	8	10	8	8	9	8	9
7	10	8	9	8	9	7	9	8	8	10	8	8	9	8	9

Tabela A 8. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios assistidos de enzimas

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	8	7	6	7	8	6	5	10	6	5	8	8	6	5	7
3	9	7	9	7	8	7	5	10	7	5	8	8	8	6	7
4	10	8	9	8	9	7	6	10	8	7	8	9	9	7	9
5	10	8	9	8	9	7	7	10	8	8	8	9	9	7	10
6	10	8	9	8	9	7	8	10	8	8	9	9	9	7	10
7	10	8	9	8	9	7	8	10	8	8	9	9	9	7	10

Tabela A 9. Evolução do número de sementes germinadas para os ensaios da sonicação.

Dias	C-			C+			FB001			FB012			FB013		
1	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
2	0	0	1	0	0	0	0	1	-	0	1	-	0	2	-
3	3	2	6	1	4	2	2	3	-	3	6	-	4	4	-
4	5	4	6	2	6	4	6	5	-	7	7	-	4	6	-
5	6	6	10	4	8	6	7	7	-	9	7	-	5	7	-
6	6	7	10	4	10	7	7	7	-	10	7	-	5	7	-
7	6	7	10	4	10	7	7	7	-	10	7	-	5	7	-

Apêndice B – Comprimento das raízes

Tabela B 1. Comprimento das raízes de *Lycopersicon esculentum*.

Ensaio		Medida (cm)									
C-	A	7.056	6.229	5.086	8.454	6.661	8.276	5.291	5.277	6.354	7.84
	B	5.085	7.707	3.256	7.665	2.523	1.848	2.861	6.312	5.216	5.883
	C	5.899	5.331	6.669	10.532	7.473	7.118	6.434	7.04	0.981	-
C+	A	1.162	3.769	6.379	5.388	1.845	2.283	5.234	3.863	4.968	-
	B	5.780	3.000	2.437	6.350	2.821	3.706	2.488	3.979	2.833	5.04
	C	1.666	4.713	5.442	2.969	4.294	3.806	4.397	2.949	5.193	4.826
FB001 (P)	A	5.174	9.013	6.862	4.604	3.514	8.675	5.931	7.253	7.748	1.938
	B	4.558	6.403	8.520	8.040	9.394	6.672	9.015	7.938	8.465	1.804
	C	6.889	4.756	7.26	7.533	2.889	8.145	7.006	8.087	7.058	6.71
FB012 (P)	A	6.146	6.589	8.154	9.774	8.431	7.553	4.245	3.764	8.28	5.904
	B	4.449	10.713	8.689	9.003	9.272	3.804	7.986	6.142	6.063	4.122
	C	5.488	6.034	6.702	5.900	4.784	8.106	6.930	-	-	-
FB013 (P)	A	6.218	8.151	6.941	7.973	4.940	6.633	10.912	5.611	7.544	9.8
	B	11.357	11.035	3.786	4.197	5.700	6.286	9.558	3.933	10.633	8.444
	C	6.227	6.437	4.562	7.743	9.019	6.667	4.523	6.72	7.734	2.586
FB001 (E)	A	4.659	8.115	3.753	7.406	7.783	6.272	2.561	0.978	5.624	-
	B	5.367	6.326	7.370	7.132	7.824	7.511	7.049	6.748	0.328	-
	C	7.503	2.482	4.088	5.215	7.220	5.576	5.671	5.436	5.386	7.078
FB012 (E)	A	8.431	7.827	3.821	0.394	6.638	4.819	7.686	4.957	6.451	7.616
	B	5.798	5.769	5.284	6.305	7.621	5.408	5.280	4.786	7.056	5.285
	C	3.484	4.040	5.081	6.160	5.749	6.595	4.671	3.624	8.292	-
FB013 (E)	A	7.928	4.922	6.078	7.100	6.501	7.490	6.933	7.554	6.592	-
	B	7.213	6.182	6.615	5.627	5.212	5.992	6.488	5.632	6.342	-
	C	4.094	7.515	7.405	6.450	5.505	5.227	3.709	7.187	5.304	5.608
FB001 (S)	A	9.200	4.600	6.000	8.900	5.000	7.400	10.600	8.300	2.900	-
	B	9.900	9.200	6.700	6.900	7.200	7.800	6.300	6.000	8.200	-
	C	6.900	4.400	8.400	7.600	6.600	8.000	8.700	5.600	5.600	-
FB012 (S)	A	7.800	8.000	7.800	7.200	6.300	7.900	8.400	8.400	7.900	-
	B	4.800	5.000	3.400	5.200	6.200	6.200	6.600	5.100	4.800	10.000
	C	6.000	8.700	6.700	4.000	6.800	7.800	7.200	3.200	5.800	-
FB013 (S)	A	6.200	7.700	7.200	6.300	8.100	9.700	7.400	8.300	1.900	-
	B	8.200	6.200	7.300	7.600	6.600	6.700	9.500	6.000	8.800	-
	C	4.300	6.400	7.900	5.200	5.700	7.900	8.700	7.600	-	-

Tabela B 2. Comprimento das raízes de Cucumis melo.

Ensaio		Medida (cm)									
C-	A	0.374	-	0.438	0.255	-	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	1.455	0.974	1.094	0.91	0.122	0.903	1.167	0.165	-	-
C+	A	0.148	4.269	0.613	0.619	2.602	3.91	-	-	-	-
	B	4.123	0.205	2.528	0.38	3.599	2.488	4.406	3.757	2.275	6.107
	C	0.758	0.38	0.808	0.608	0.376	0.178	0.263	-	-	-
FB001 (P)	A	2.808	2.251	12.073	0.347	0.598	3.75	4.112	2.718	18.758	-
	B	2.792	3.344	13.049	11.162	4.931	3.541	3.226	-	-	-
	C	2.267	3.047	2.95	5.71	1.799	2.26	2.557	1.678	6.212	-
FB012 (P)	A	4.538	0.948	3.67	5.755	14.445	4.173	1.443	-	-	-
	B	1.399	0.465	8.836	0.584	2.187	-	-	-	-	-
	C	2.448	0.978	1.944	0.746	1.864	1.534	-	-	-	-
FB013 (P)	A	3.843	4.343	4.892	8.445	3.963	3.603	1.84	0.203	-	-
	B	0.739	4.324	2.89	1.373	1.998	3.021	4.24	3.78	-	-
	C	0.148	2.727	3.011	3.531	4.043	2.547	2.82	0.195	-	-
FB001 (E)	A	5.65	7.462	0.425	4.226	2.626	5.4	0.149	0.071	-	-
	B	6.859	5.033	4.91	1.635	7.744	4.688	4.151	4.691	5.423	0.042
	C	8.103	3.265	2.803	0.056	6.923	2.818	1.904	0.144	-	-
FB012 (E)	A	6.604	2.028	4.379	5.245	8.331	7.893	1.985	0.083	-	-
	B	2.462	1.859	1.626	7.122	6.643	3.028	8.049	3.751	-	-
	C	2.182	7.026	5.897	1.509	4.973	3.727	1.586	5.325	-	-
FB013 (E)	A	4.595	9.642	7.092	5.547	6.399	9.313	4.455	8.448	-	-
	B	8.182	6.412	6.822	6.89	4.379	7.445	-	-	-	-
	C	4.032	6.681	1.666	3.217	4.432	1.872	6.017	6.495	5.29	7.451
FB001 (S)	A	6.900	9.400	18.200	13.800	8.700	5.800	3.900	0.200	-	-
	B	5.00	4.100	5.800	6.000	2.200	7.100	5.700	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FB012 (S)	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	5.600	8.800	4.900	8.800	5.300	9.800	0.700	15.200	10.200	
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FB013 (S)	A	10.100	9.000	16.000	11.600	9.800	7.600	8.600	10.800	14.300	0.400
	B	4.900	9.400	8.700	9.700	9.700	11.700	10.200	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela B 3. Comprimento das raízes de Daucus carota.

Ensaio		Medida (cm)									
C-	A	4.219	5.882	3.369	7.262	5.514	5.937	6.323	-	-	-
	B	9.623	5.897	3.01	0.924	6.385	2.328	5.776	3.103	-	-
	C	7.325	7.021	5.004	5.072	7.771	6.383	6.653	7.239	7.022	-
C+	A	3.601	4.046	9.272	8.358	6.833	7.59	4.766	5.004	-	-
	B	7.391	5.337	4.996	6.906	4.784	1.027	-	-	-	-
	C	5.723	6.845	5.627	5.837	-	-	-	-	-	-
FB001 (P)	A	7.787	4.216	2.168	5.065	5.5	8.446	3.963	5.644	-	-
	B	9.48	5.478	3.962	4.704	5.734	7.273	5.812	3.913	-	-
	C	8.409	8.018	7.866	5.342	3.961	4.827	6.933	6.102	-	-
FB012 (P)	A	5.408	5.868	6.369	5.125	5.222	4.403	3.942	5.539	-	-
	B	7.106	4.731	4.89	10.236	5.447	8.618	-	-	-	-
	C	3.117	8.511	7.778	7.1	8.695	10.048	7.022	-	-	-
FB013 (P)	A	6.947	7.564	8.079	7.021	7.976	6.284	2.757	-	-	-
	B	5.906	2.032	3.714	5.195	5.018	5.854	2.157	8.33	-	-
	C	6.571	2.953	7.826	6.121	1.241	9.124	2.669	6.742	6.006	-
FB001 (E)	A	5.65	7.462	0.425	4.226	2.626	5.4	0.149	0.071	-	-
	B	6.859	5.033	4.91	1.635	7.744	4.688	4.151	4.691	5.423	0.042
	C	8.103	3.265	2.803	0.056	6.923	2.818	1.904	0.144	-	-
FB012 (E)	A	6.604	2.028	4.379	5.245	8.331	7.893	1.985	0.083	-	-
	B	2.462	1.859	1.626	7.122	6.643	3.028	8.049	3.751	-	-
	C	2.182	7.026	5.897	1.509	4.973	3.727	1.586	5.325	-	-
FB013 (E)	A	4.595	9.642	7.092	5.547	6.399	9.313	4.455	8.448	-	-
	B	8.182	6.412	6.822	6.89	4.379	7.445	-	-	-	-
	C	4.032	6.681	1.666	3.217	4.432	1.872	6.017	6.495	5.29	7.451
FB001 (S)	A	5.900	7.100	7.100	6.000	5.400	7.100	4.800	-	-	-
	B	5.800	3.200	8.300	6.100	1.400	6.900	6.200	3.400	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FB012 (S)	A	7.200	6.300	6.500	7.500	4.200	5.600	0.300	3.700	6.000	5.300
	B	6.400	7.600	2.700	6.100	5.100	4.800	1.200	1.600	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FB013 (S)	A	2.200	3.400	6.700	5.100	6.700	6.800	7.600	-	-	-
	B	3.300	3.700	6.900	1.700	3.300	0.500	0.100	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Apêndice C – Índices de germinação

Tabela C 1. GI obtidos para as três plantas.

Ensaio	<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>Cucumis melo</i>		<i>Daucus carota</i>	
	GI (C-) %	GI (C+) %	GI (C-) %	GI (C+) %	GI (C-) %	GI (C+) %
FB001 P	91,26	91,26	41,51	66,07	87,51	87,31
	146,43	146,43	95,77	77,79	125,13	101,52
	115,41	115,41	45,64	80,70	86,50	122,36
FB012 P	103,48	103,48	78,76	125,34	95,16	105,81
	145,26	145,26	60,41	82,46	147,67	119,80
	76,45	76,45	169,71	300,06	100,42	142,04
FB013 P	112,32	112,32	151,94	188,07	155,69	121,19
	154,95	154,95	117,15	95,15	82,50	83,67
	108,25	108,25	55,35	125,82	93,14	117,11
FB001 E	78,75	78,75	103,46	164,66	47,28	52,58
	127,88	127,88	140,20	113,88	121,95	98,94
	96,83	96,83	85,44	207,18	43,73	61,86
FB012 E	88,15	88,15	167,20	266,10	66,44	73,88
	121,17	121,17	31,02	25,19	104,89	85,10
	92,20	92,20	126,26	306,16	60,94	86,20
FB013 E	91,84	91,84	74,32	118,27	113,49	126,19
	114,37	114,37	89,75	72,90	126,38	102,53
	100,92	100,92	90,51	219,48	79,26	112,12
FB001 S	86,05	86,05	57,84	-	123,44	193,75
	132,43	132,43	78,90	70,12	149,64	65,97
	100,83	100,83	-	-	-	-
FB012 S	105,94	105,94	-	-	149,60	234,82
	111,26	111,26	169,23	105,27	112,55	49,62
	82,53	82,53	-	-	-	-
FB013 S	85,91	85,91	138,62	-	67,04	122,77
	129,90	129,90	127,19	125,59	82,43	31,15
	78,85	143,20	-	-	-	-

Apêndice D – ICP-MS

As concentrações dos metais analisados por ICP-MS foram dadas em ppm, como representado na Tabela D1.

Tabela D 1. Concentrações dos metais presentes nas amostras obtidas diretamente do ICP-MS.

ppm	Na		Mg		P		K		Ca		Fe		Zn	
FB001 P	0.68	0.68	1	1	6	6	5	6	108	262	49	46	8	8
FB001 E	5128 6	5574 8	7	7	1 5	17	4	4	217 69	240 16	940	960	50	50
FB012 P	0.68	0.68	1	1	1 0	10	13	14	829	870	211	208	11	11
FB012 E	5128 6	5574 8	7	7	2 5	28. 33	10.4	9.33	391 0	459 5	404 8	434 1	68. 75	68. 75
FB013 P	0.68	0.68	0.000 01	0.000 01	3	3	0.00 09	0.00 09	303	284	6	5	4	4
FB013 E	1979 02	1990 35	3	3	1 4	14	16	16	142 9	150 0	109	116	37	36
B. Comum	0.68	0.68	2	2	7	7	1	1	620	620	108	108	8	8

A concentração final de cada metal por mg de biomassa foi obtida sabendo a concentração de cada amostra, apresentada na Tabela D2 e utilizando a relação expressa pela equação D1.

Tabela D 2. Concentração de biomassa nas amostras.

Amostra	Concentração ($mg_{biomassa} \cdot mL^{-1}$)
FB001 P	4,24
FB001 E	5,36
FB012 P	4,51
FB012 E	14,80
FB013 P	4,48
FB013 E	10,60
<i>A. ovalisporum</i>	4,28

$$C (\mu g \cdot mg_{biomassa}^{-1}) = \frac{C (ppm)}{C (mg_{biomassa} \cdot mL^{-1})} \quad (D1)$$

Apêndice E – LC-MS

E.1. Diluições dos padrões

Descrição da preparação dos padrões através de diluições para obtenção da concentração $1,00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ definida para análise no LC-MS:

- IAA

Concentração solução inicial = $0,48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

1º diluição: 50 μL da solução inicial diluídos em 5000 μL de metanol grau LC-MS – Concentração final = $4,80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2º diluição: 208 μL da diluição anterior em 792 μL de metanol com 0,1% de ácido fórmico LC-MS ($\geq 99\%$) – Concentração final = $1,00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

- IPA

Concentração solução inicial = $0,77 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

1º diluição: 50 μL da solução inicial diluídos em 5000 μL de metanol grau LC-MS – Concentração final = $7,70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

2º diluição: 130 μL da diluição anterior em 879 μL de metanol com 0,1% de ácido fórmico LC-MS ($\geq 99\%$) – Concentração final = $1,00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

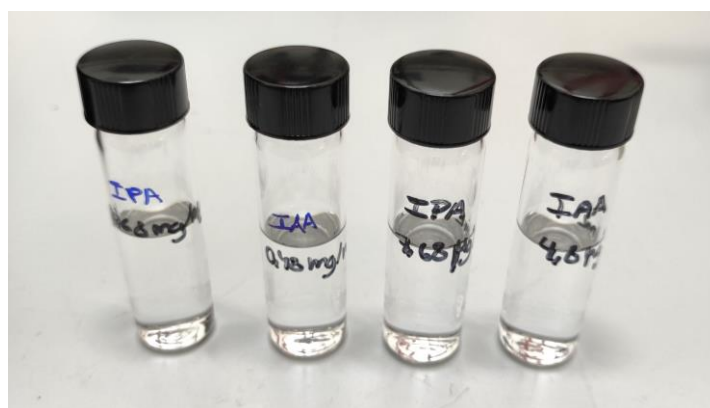


Figura E 1. Diluições dos padrões IAA e IPA efetuadas com o intuito de se obter a concentração definida para análise no LC-MS/MS.

E.2. Cromatogramas do LC-MS/MS

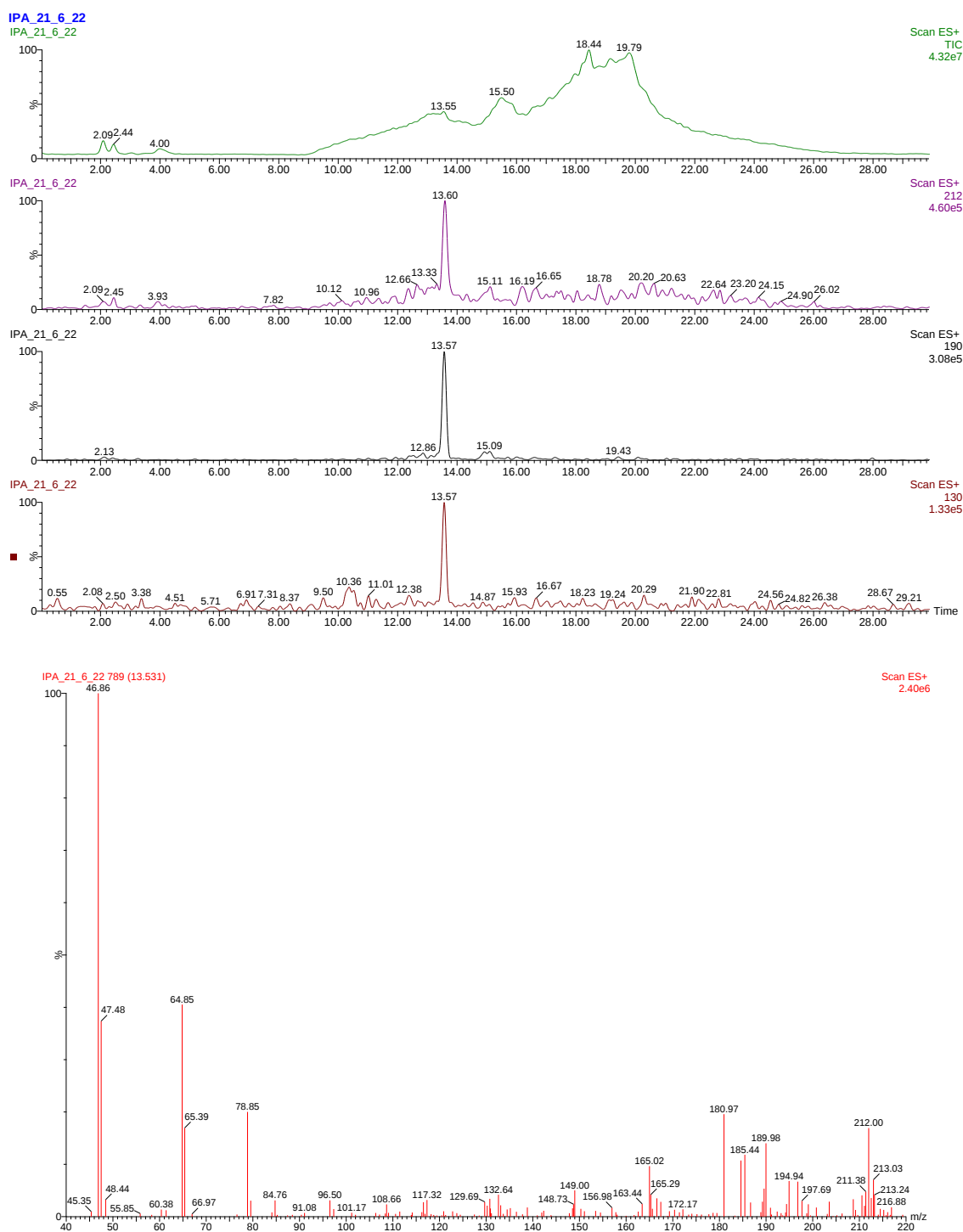


Figura E 2. Cromatograma XIC e espectro, respectivamente, do full scan do IPA.

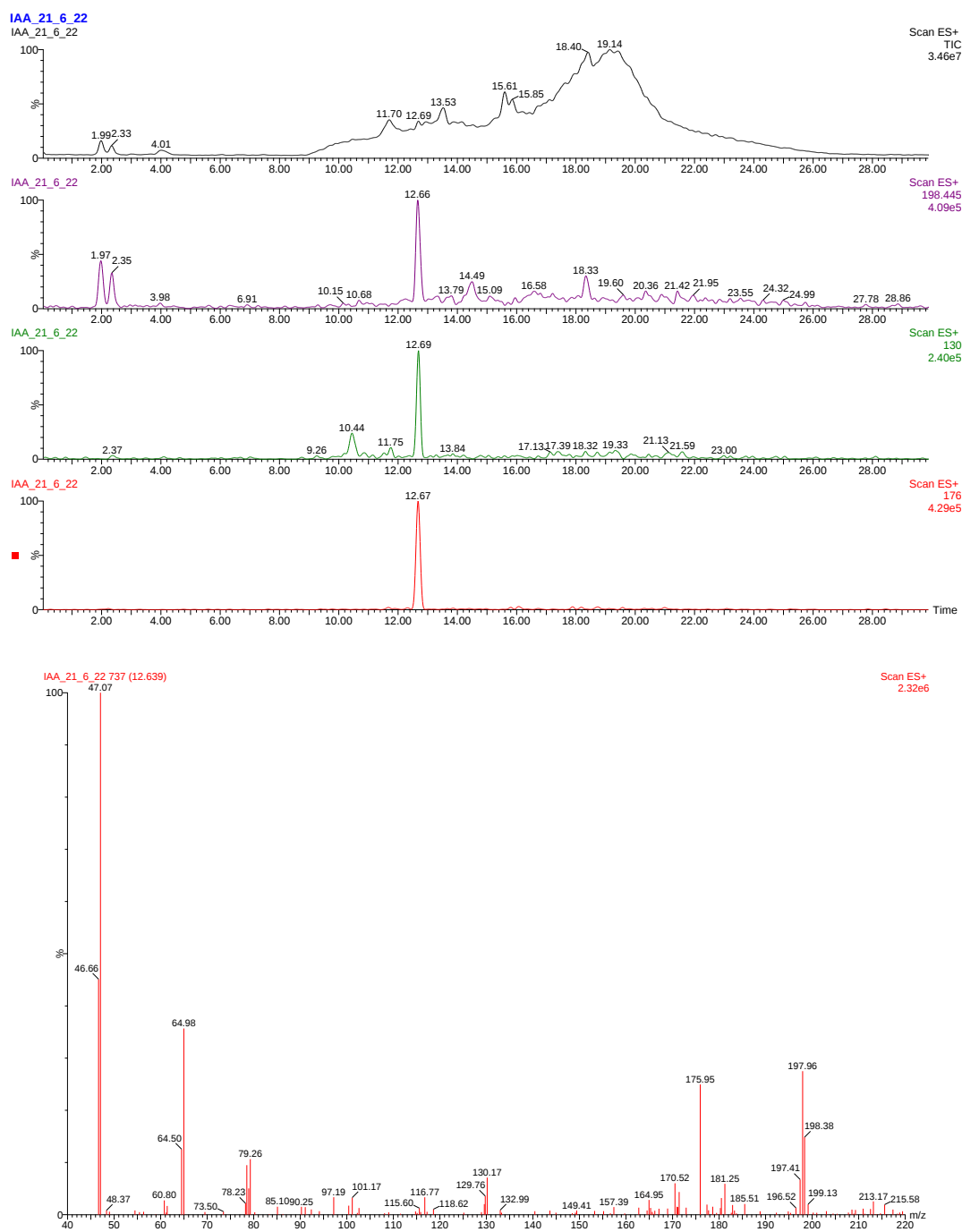


Figura E 3. Cromatograma XIC e espectro, respectivamente, do full scan do IAA.

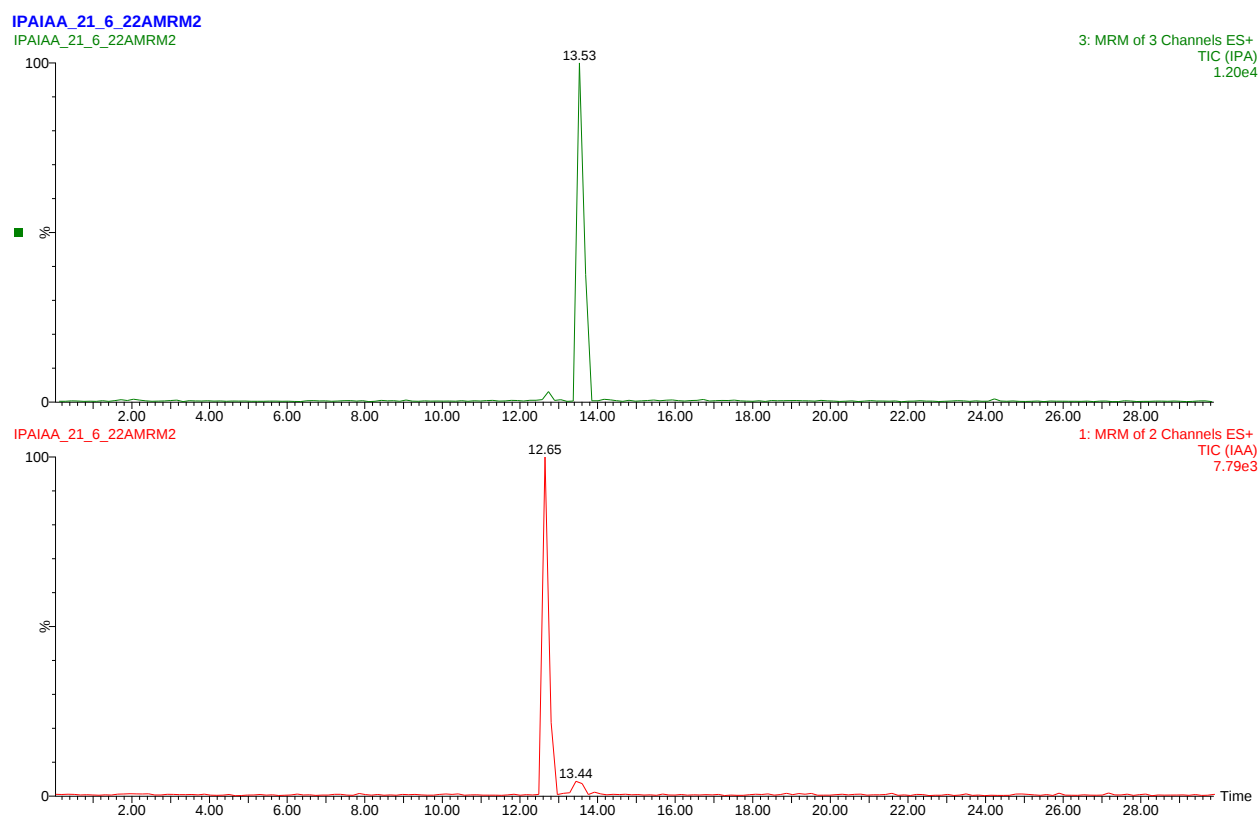


Figura E 4. Cromatograma da solução de IPA e IAA.

E.3. Curva de calibração dos padrões

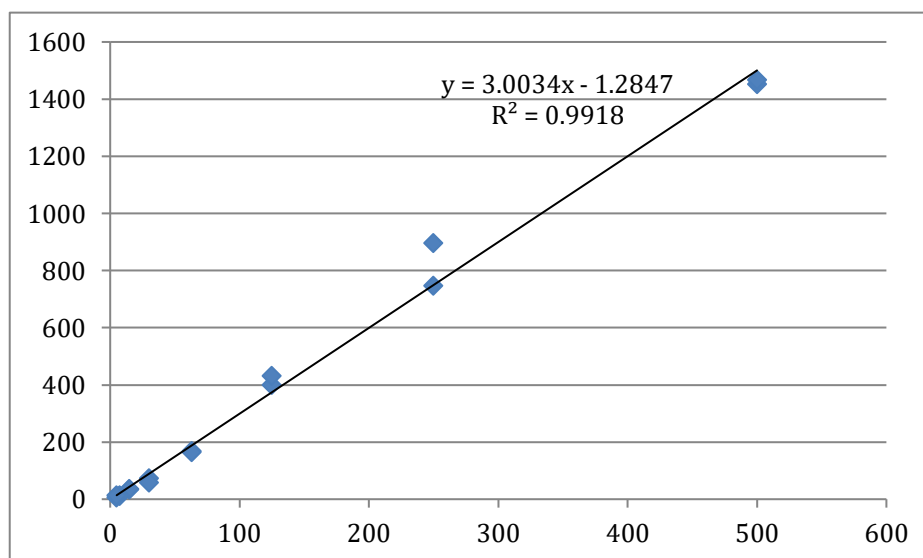


Figura E 5. Reta de calibração do IAA.

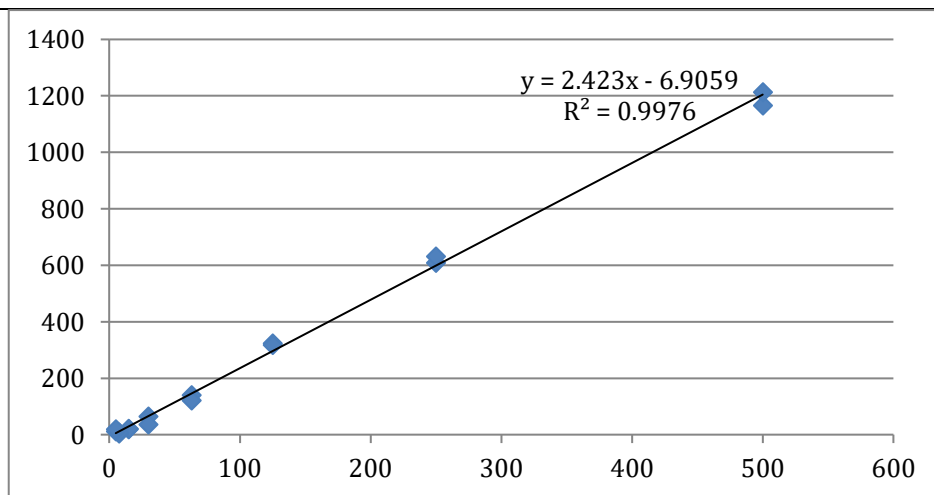


Figura E 6. Reta de calibração do IPA.

E.4. Cálculo dos LODs e LOQs

Foi realizada uma regressão linear a cada curva de calibração e a análise de variância ANOVA, de modo a retirar o valor do declive (coeficiente variável X) e erro-padrão da interseção.

O LOD e LOQ foram, assim, calculados pelas equações E1 e E2, respetivamente.

$$LOD = 3 \cdot \frac{\text{Coef. Variável X}}{\text{Erro Interceção}} \quad (E1)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{\text{Coef. Variável X}}{\text{Erro Interceção}} \quad (E2)$$