

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Utilização de efluente cervejeiro no cultivo de microalgas para obtenção de óleo para biodiesel

Tese de Mestrado

de

Janaína Maria Rodrigues dos Santos

Desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Dissertação

realizada no

Departamento de Engenharia Química do ISEP em colaboração com o LEPAE

Orientador na FEUP: **Prof Doutor Adélio Mendes**

Orientador no ISEP: **Prof Doutora Nídia Sá Caetano**



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP

Departamento de Engenharia Química

Julho 2013

Agradecimentos

A Deus pela vida e por seu infinito amor. Por ter me dado forças quando pensei em fraquejar e ter me ensinado que quando estou fraco é que sou forte, pois o seu poder se aperfeiçoa em nossas fraquezas.

Primeiramente agradeço aos meus orientadores, Doutora Nídia Caetano e Doutor Adélio Mendes pelo acolhimento, simpatia, confiança, paciência, incentivo, e toda orientação disponibilizada, que tanto ajudou para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, Adélia Lobato e Carlos Alberto e ao meu irmão Filipe Diego, pelos conselhos, apoio, amor e força incondicional, por todo sacrifício em me proporcionarem dar seguimento aos meus estudos e que sem eles eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus tios, Manoel José, Tia Freira, Rômulo, Francisca, Ricardo, Teodósia e em especial a minha tia Rosário que além de tia sempre será uma segunda mãe.

Aos meus primos Matheus e Rômulo que me proporcionaram momentos de descontração e sempre me apoiaram.

As minhas novas e queridas amigas, Carolina Melo e Raquel Moura pela confiança, amizade, momento de risadas, a presença nos momentos difíceis e alegres, o apoio e principalmente pelas vossas disponibilidades em sempre me ajudar, serei eternamente grata.

Aos engenheiros Tomás Albergaria, Marília Baptista e Magda Marques, Dona Lurdes e colegas do laboratório de tecnologia, Vânia Silva, Adelaide Martins, Dulce Rodriguez, Joana Teixeira, meu muito obrigada pelo apoio, espírito cooperativo e agradável convívio e auxílio durante toda a condução dos experimentos.

Ao meu querido Ivan Villar, que mesmo longe fisicamente sempre se fez presente por meio de suas palavras e carinho.

Aos meus amigos espalhados pelo mundo, Jesus Villar, Wladmir Alves, Vicente Rochela, Iris Chanoína, Francisco Brito e Gilson Barbosa, meu muito obrigada por sempre me motivarem a nunca desistir dos nossos sonhos e que sempre somos capazes de torná-los realidade.

A todas às pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para a concretização desse trabalho. Muito obrigado.

Resumo

Microalgas são microrganismos usualmente fotossintéticos e unicelulares, eucariontes e procariontes, e localizam-se em diversos *habitats*, seja em água marinhas, doces, residuais ou no solo. Embora grande parte das microalgas cresça realizando principalmente a fotossíntese, algumas espécies são heterotróficas e utilizam carbono orgânico extracelular quando uma fonte de luz não está disponível. Assim, a utilização de efluente cervejeiro torna-se uma opção viável como um meio alternativo para o cultivo das microalgas, pois oferecem alguns dos nutrientes necessários para seu crescimento, sendo possível seu cultivo e, consequentemente o tratamento do efluente.

O objetivo deste trabalho foi testar se os açúcares disponíveis a partir de resíduos da indústria cervejeira poderiam ser uma fonte viável de carbono para o crescimento da microalga *Chlamydomonas sp. (CS)*, cultivada em meio com efluente cervejeiro, tendo em vista a produção de óleo a usar como matéria-prima na produção de biodiesel. Foram realizados ensaios com culturas com efluente cervejeiro sem adição de açúcar e ensaios com adição das pentoses: xilose, arabinose e ribose.

Os ensaios foram realizados adicionando ao meio um açúcar na fase inicial da curva de crescimento com a concentração de 0,25 g/L e 0,5 g/L do açúcar respectivamente, sendo a xilose a pentose que originou melhor resultado, em termos de produção de biomassa algal seca, correspondendo a uma concentração de cerca de 0,7 g seco/L, obtida ao fim de 10 dias.

Foram realizados outros ensaios adicionando ao meio os açúcares na concentração de 0,25 g/L, na fase estacionária de crescimento, verificando-se que este procedimento não ofereceu qualquer vantagem, já que as culturas sem adição de açúcar apresentaram melhor resultado.

Em seguida a biomassa das culturas sem e com adição de açúcar (com concentração de 0,25 g/L) na fase estacionária foram colhidas por centrifugação e os lipídeos foram extraídos da biomassa fresca utilizando o método modificado de Bligh e Dyer (1959) para a quantificação dos mesmos. O teor de óleo produzido a partir da cultura sem adição de açúcar foi de 53,5%, resultando numa produtividade lipídica de 3,36 mg/L.d, e o teor de óleo obtido a partir das culturas com adição do açúcar xilose, ribose e arabinose foi de 25,5%, 26,0% e 39,0%, respectivamente, resultando numa produtividade lipídica de 1,58, 2,61 e 2,18 mg/L.d. Após a extração, para transesterificação dos lipídeos extraídos foi utilizado o método modificado de Lepage e Roy (1984) e os ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa. O teor máximo de éster metílico foi obtido na amostra de biodiesel produzido a partir do óleo da cultura com 20% de efluente cervejeiro, sem adição de qualquer pentose, sendo este 22,8%.

Palavras Chave (Tema): arabinose, biodiesel, *Chlamydomonas sp.*, efluente cervejeiro, ribose, xilose.

Abstract

Microalgae are photosynthetic, usually unicellular, eukaryote and prokaryote microorganisms that live in different habitats, either in marine or fresh water, waste or soil.

Although some microalgae grow mainly doing photosynthesis, some species are hexotrophic and use extracellular organic carbon when a light source is not available.

Thus the use of an effluent becomes a viable alternative as a mean for the cultivation of *Chlamydomonas sp. (CS)* microalga, because it offers some of the nutrients required for their growth, so their cultivation becomes possible and therefore the effluent is treated.

The aim of this study was to determine if the available sugars resulting from brewery spent grain, a byproduct of the beer industry, could be a viable source of carbon for the growth of microalgae grown in a culture media containing brewery wastewater, with the objective of oil production to be used as raw material in biodiesel production.

Assays were performed in cultures with no added sugar and trials with addition of pentoses: xylose, arabinose and ribose.

The tests were performed adding to the culture media containing brewery wastewater, from the beginning of the trial, a pentose sugar at the concentration of 0.25 g/L and 0.5 g/L, and xylose was the sugar which originated the best results in terms of algal biomass production, corresponding to a concentration of about 0.7 g/L (on a dry weight basis), obtained after 10 days of culture.

Other experiments were performed by adding to the culture media, containing 20% (v/v) brewery wastewater, sugars at a concentration of 0.25 g/L but only in the stationary phase, verifying that this does not offer any advantage as the cultures without added sugar exhibited better results.

Then microalgae cultivated with and without added sugar in the stationary phase were collected by centrifugation, and lipids were extracted from fresh biomass using the modified method of Bligh and Dyer (1959) in order to quantify them. The oil content obtained for the microalgae from the culture without added sugar was 53.5%, resulting in a lipid productivity of 3.36 mg/L.d, and the oil content obtained from cultures with added sugar xylose, ribose and arabinose was 25.5%, 26.0% and 39.0%, respectively, resulting in a lipid productivity of 1.58, 2.61 and 2.18 mg/L.d.

After extraction, the modified method of Lepage and Roy (1984) was used for the transesterification of lipids and the produced esters were analyzed by gas chromatography.

The maximum ester content was found in the biodiesel sample produced from the oil extracted from the culture produced using the culture media containing 20% (v/v) brewery wastewater without any added sugar, which was 22.8%.

Key-words: arabinose, biodiesel, brewery wastewater, *Chlamydomonas sp.*, ribose, xylose.

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.

Porto, ____ de julho de 2013.

Janaína Maria Rodrigues dos Santos

Índice

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	v
1 Introdução.....	1
1.1 Enquadramento Geral.....	1
1.1.1 Microalgas e o tratamento de efluentes	2
1.1.2 Produção Europeia de Biodiesel	3
1.2 Objetivos da Tese.....	4
1.3 Contributos do Trabalho.....	5
1.4 Organização da Tese	5
2 Contexto e Estado da Arte	7
2.1 Biocombustíveis	7
2.1.1 Biodiesel	7
2.2 Aplicações das microalgas	10
2.3 Produção da biomassa algal	13
2.3.1 Cultivo	13
2.3.2 Colheita	15
2.3.3 Secagem	15
2.3.4 Conteúdo de lipídeos	16
2.3.5 Transesterificação	17
2.4 A indústria cervejeira.....	17
2.4.1 Efluente cervejeiro	19
2.4.2 Drêche Cervejeira.....	20
3 Descrição Técnica.....	21
3.1 Aquisição das microalgas utilizadas no trabalho	21
3.2 A microalga <i>Chlamydomonas sp</i>.....	21
3.3 Condições de inoculação e cultivo.....	22
3.4 Resultados e discussão	25

3.4.1	Colheita, extração e quantificação de lipídeos.....	35
3.4.2	Transesterificação e Análises de ésteres	37
4	Conclusões.....	41
4.1	Objetivos Realizados.....	41
4.2	Trabalho Futuro	42
4.3	Apreciação final	42
	Referências.....	43
Anexo 1	Composição do meio de cultura <i>BBM-3N</i>	53
Anexo 2	Procedimentos	55
Anexo 3	Ensaio de crescimento	57
Anexo 4	Tabelas de resultados: extração e transesterificação.....	71

Índice de Figuras

<i>Figura 2.1- Estados-membros da European Biodiesel Board (EBB, 2013).</i>	9
<i>Figura 2.2- Equação geral do Processo de Transesterificação (Camargos, 2005).</i>	10
<i>Figura 2.3- Fluxograma das aplicações potenciais das microalgas (Adaptado de Costa e Moraes, 2011).</i>	11
<i>Figura 2.4- (a) Sistemas de produção abertos do tipo “raceway pond” (Lourenço, 2006); (b) fotobiorreator tubular com tubos arejados (López et al., 2006).</i>	15
<i>Figura 3.1- Fotografia ao microscópio da microalga Chlamydomonas sp. com ampliação (a) 400x e (b) 1000x.</i>	21
<i>Figura 3.2- (a) Tubos de ensaios inoculados; (b) imagem de ensaios realizados.</i>	22
<i>Figura 3.3- Espectrofotómetro UV/Vis utilizado na avaliação do crescimento das culturas pelo método de densidade ótica.</i>	25
<i>Figura 3.4- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de xilose nas concentrações de 0,25 g/L (Xil 0,25) e 0,5 g/L (Xil 0,5).</i>	25
<i>Figura 3.5- Aspeto das amostras dia 0 (a) sem adição de xilose, (b) com adição de 0,25 g/L de xilose e (c) com adição de 0,5 g/L de xilose; (d) dia 23 da cultura sem adição de xilose; (e) dia 10 da cultura com adição de 0,25 g/L de xilose; (f) dia 10 da cultura com adição de 0,5 g/L de xilose.</i>	26
<i>Figura 3.6- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de ribose nas concentrações de 0,25 g/L (R 0,25) e 0,5 g/L (R 0,5).</i>	27
<i>Figura 3.7- Aspeto das amostras dia 0 (a) sem adição de ribose, (b) com adição de 0,25 g/L de ribose e (c) com adição de 0,5 g/L de ribose; (d) dia 23 da cultura sem adição de ribose; (e) dia 12 da cultura com adição de 0,25 g/L de ribose; (f) dia 12 da cultura com adição de 0,5 g/L de ribose.</i>	28
<i>Figura 3.8- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de arabinose nas concentrações de 0,25 g/L (A 0,25) e 0,5 g/L (A 0,5).</i>	29
<i>Figura 3.9- Aspeto das amostras dia 0 (a) cultura com 20% de efluente cervejeiro, (b) com adição de 0,25 g/L de arabinose e (c) com adição de 0,5 g/L de arabinose; (d) dia 15 da cultura sem adição de arabinose; (e) dia 10 da cultura com adição de 0,25 g/L de arabinose; (f) dia 10 da cultura com adição de 0,5 g/L de arabinose.</i>	30
<i>Figura 3.10 - Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição dos respetivos açúcares na fase estacionária: arabinose (A(FE)1.1), xilose (Xil(FE)1.1) e arabinose (R(FE)1.1) na concentração de 0,25 g/L.</i>	31
<i>Figura 3.11- Curvas de crescimento da biomassa algal em meio BBM-3N com efluente cervejeiro em diferentes concentrações (v/v): 5%, 10%, 20%, 30% e 40%.</i>	32

<i>Figura 3.12- Aspeto das culturas com diferentes concentrações de efluente real (a) dia 0 da cultura e (b) dia 23 da cultura.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 3.13- (a) Biomassa com adição de metanol, clorofórmio e água; (b) após a segunda fase de adição dos solventes de extração e ultrassons; (c) biomassa depois de centrifugar.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3.14- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da Chlamydomonas sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de arabinose.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.15- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da Chlamydomonas sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro sem adição de açúcar.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.16- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da Chlamydomonas sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de ribose.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 3.17- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da Chlamydomonas sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de xilose.</i>	<i>40</i>
<i>Figura A3.1- Curva de calibração de Absorvância medida a $\lambda=682,5$ nm vs concentração de biomassa seca para a Chlamydomonas sp.</i>	<i>57</i>
<i>Figura A3.2- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 5% de efluente.</i>	<i>69</i>
<i>Figura A3.3- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 10% de efluente.</i>	<i>69</i>
<i>Figura A3.4- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 20% de efluente.</i>	<i>70</i>
<i>Figura A3.5- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 30% de efluente.</i>	<i>70</i>
<i>Figura A3.6- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 40% de efluente</i>	<i>70</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1.1- Estimativa de produção de biodiesel como carburante em 2011, em milhões de litros (adaptado de Eurobserv'er, 2012).</i>	4
<i>Tabela 2.1- Teor de lipídeos e produtividade de diferentes espécies de microalgas (adaptado: Mata et al., 2010).</i>	12
<i>Tabela 2.2- Fontes de produção de biodiesel (Mata et al., 2010).</i>	13
<i>Tabela 2.3- Conteúdo em óleo de alguns géneros e espécies de microalgas (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009).</i>	16
<i>Tabela 2.4- Composição de alguns efluentes cervejeiros reportados na literatura.</i>	20
<i>Tabela 3.1- Valores médios dos parâmetros analisados no efluente cervejeiro real utilizado.</i>	24
<i>Tabela 3.2- Condições dos ensaios de cultivo de Chlamydomonas sp. com diferentes percentagens de efluente real sem ou com adição dos açúcares: xilose, arabinose e ribose.</i>	24
<i>Tabela 3.3- Taxa de crescimento da microalga Chlamydomonas sp. em diferentes condições de cultivo.</i>	34
<i>Tabela 3.4- Teor médio de óleo na microalga Chlamydomonas sp.</i>	35
<i>Tabela 3.5- Produtividade lipídica das culturas da microalga Chlamydomonas sp avaliada no dia da colheita.</i>	36
<i>Tabela 3.6- Estimativa da produtividade lipídica das culturas da microalga Chlamydomonas sp. avaliada no ponto de maior concentração das culturas.</i>	37
<i>Tabela 3.7- Teor de ésteres totais no óleo da microalga Chlamydomonas sp.</i>	38
<i>Tabela A1.1- Composição do meio de cultura Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified (BBM-3N).</i>	53
<i>Tabela A1.2- Composição do meio de cultura Bold Basal Medium (BBM).</i>	54
<i>Tabela A3.3- Valores de Absorvância medida a $\lambda=682,5$ nm, obtidos para as diferentes concentrações padrão.</i>	57
<i>Tabela A3.4- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,25 g/L.</i>	58
<i>Tabela A3.5- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,50 g/L.</i>	59
<i>Tabela A3.6- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,25 g/L.</i>	60
<i>Tabela A3.7- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,50 g/L.</i>	61

<i>Tabela A3.8- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,25 g/L.</i>	<i>62</i>
<i>Tabela A3.9- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,50 g/L.</i>	<i>63</i>
<i>Tabela A3.10- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com efluente cervejeiro nas porcentagens de 5%, 10% e 20%.</i>	<i>64</i>
<i>Tabela A3.11- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com efluente cervejeiro nas porcentagens de 30% e 40%.</i>	<i>65</i>
<i>Tabela A3.12- - Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,25 g/L na fase estacionária</i>	<i>66</i>
<i>Tabela A3.13- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,25 g/L na fase estacionária.</i>	<i>67</i>
<i>Tabela A3.14- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,25g/L na fase estacionária.</i>	<i>68</i>
<i>Tabela A4.15- Teores de óleo da microalga Chlamydomonas sp.</i>	<i>71</i>
<i>Tabela A4.16- Ésteres identificados no óleo de Chlamydomonas sp. e sua quantificação.</i>	<i>72</i>

Notação e Glossário

% (v/v)	Porcentagem em volume	(% (v/v))
A	Arabinose	
A (FE)1.1	Ensaio com adição de Arabinose na fase estacionária	
A 0,25	Ensaio com adição de Arabinose na concentração de 0,25 g/L	
A 0,5	Ensaio com Arabinose na concentração de 0,5 g/L	
Abs (682,5 nm)	Absorvância no comprimento de onda 685,2 nm	
BBM-3N	<i>Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified</i>	
C ₁₀₀ O ₄₈ H ₁₈₃ N ₁₁ P ₁	Fórmula molecular aproximada de biomassa de microalgas	
CBO	Carência Bioquímica de Oxigénio	(mgO ₂ /L)
CBO ₅	Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de 5 dias	(mgO ₂ /L)
CH ₄	Metano	
CO	Monóxido de carbono	
CO ₂	Dióxido de carbono	
Conc.	Concentração de microalgas (em massa seca)	(g/L)
CQO	Carência Química de Oxigénio	(mgO ₂ /L)
Cs	<i>Chlamydomonas sp.</i>	
CsAra	Amostra cultivada em meio com 20% de efluente com arabinose	
CsAq	Amostra cultivada em meio com 20% de efluente sem açúcar	
CsRib	Amostra cultivada em meio com 20% de efluente com ribose	
CsXil	Amostra cultivada em meio com 20% de efluente com xilose	
dX/dt	Variação da concentração de biomassa em ordem ao tempo	(mg/d)
EBB	<i>European Biodiesel Board</i>	
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais	
FE	Fase estacionária	
GEE	Gases de Efeito Estufa	
GF	<i>Glass Fiber</i>	
N ₂ O	Óxido nitroso	
PET	Poliéster	
PNPB	Programa Nacional de Produção de Biodiesel	
R	Ribose	
R(FE)1.1	Ensaio com Ribose na fase estacionária	
R0,25	Ensaio com Ribose na concentração de 0,25 g/L	
R0,5	Ensaio com Ribose na concentração de 0,5 g/L	
SST	Sólidos Suspensos Totais	(mg/L)
T	Tempo do ensaio	(d)
UE	União Europeia	
UV/Vis	Ultravioleta/Visível	
Xil	Xilose	
X	Concentração de biomassa	(mg/L)
Xil (FE)1.1	Ensaio com Xilose na fase estacionária	
X ₀	Concentração de biomassa no tempo de ensaio t ₀	(mg/L)
Xil 0,25	Ensaio com Xilose na concentração de 0,25 g/L	
Xil 0,5	Ensaio com Xilose na concentração de 0,5 g/L	
X _t	Concentração de biomassa seca no tempo de ensaio t	(mg/L)

Letras gregas

Σ	Desvio padrão	(g/L)
μ	Taxa específica de crescimento	(d ⁻¹)
λ	Comprimento de onda	(nm)

1 Introdução

1.1 Enquadramento Geral

O biodiesel é uma alternativa tecnicamente viável para o uso conjunto, ou até mesmo à substituição total, do diesel; assim as crescentes preocupações com as questões ambientais e a alta do petróleo tornaram o biodiesel uma alternativa viável para a substituição do mesmo (Gerpen, 2005).

O petróleo e seus derivados, base da economia moderna, têm como cenário o possível esgotamento de reservas, elevados investimentos para prospeção em novas áreas, concentração de parcela significativa da produção mundial em áreas de conflito e são responsáveis por libertação significativa de gases de efeito estufa (GEE). Essa fonte energética tem apresentado significativos aumentos de preços nos últimos anos, em função principalmente dos aspetos mencionados a que acresce o aumento progressivo da demanda energética pela sociedade contemporânea (Sebrae, 2007).

As tendencias actuais têm evidenciado o biodiesel como uma das fontes energéticas mais importantes, despertando a curiosidade de um contingente enorme de pessoas que se preocupam não só com os assuntos energéticos, mas também com os temas económicos, sociais e ambientais (Parente, 2003).

O que tem sido denominado de biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, sucedâneo ao óleo diesel mineral, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol (Parente, 2003).

Como vantagens do biodiesel Song et al. (2008) citam as propriedades químicas e físicas similares às do petrodiesel, a característica de ser renovável, podendo ser obtido a partir de óleos vegetais, gordura animal e lipídeos de origem microbiana, podendo originar menores emissões atmosféricas, principalmente em áreas urbanas. Tais emissões incluem materiais particulados, monóxido de carbono, hidrocarbonetos, óxidos sulfónicos e nitrogenados, e outros gases tóxicos.

Atualmente as reservas comerciais de biodiesel incluem matérias-primas como os óleos de soja, colza, palma, milho, gordura animal e óleo de fritura. Segundo Chisti (2007), apesar do bom desenvolvimento da tecnologia de produção em grande escala de biodiesel a partir de oleaginosas, a produção não é satisfatória para suprir a demanda global.

Por essa razão, o biodiesel microalgal tem emergido como a melhor promessa, devido a vários fatores, dentre eles, o cultivo sem necessidade de grandes áreas de solo agrícola, como no

caso da plantação de soja, colza e girassol. O biodiesel proveniente de microalgas também pode ser visto como um agente para a minimização das concentrações atmosféricas de dióxido de carbono (caso de fotobiorreatores) ou o aproveitamento de efluentes industriais em cultivos heterotróficos (Sheehan et al., 1998; Chisti, 2007).

1.1.1 Microalgas e o tratamento de efluentes

São um conjunto heterogêneo de microrganismos essencialmente fotossintéticos e unicelulares, procariontes, (cianobactérias) e eucariontes, que se localizam em habitats diversos como águas marinhas, doces, salgadas, residuais ou no solo, em diversas temperaturas, pH e disponibilidade de nutrientes. São consideradas responsáveis pela produção de 50% do oxigénio e da fixação de 50% do carbono no planeta, trabalham convertendo luz solar e dióxido de carbono em biomoléculas. Embora a maioria das microalgas cresça exclusivamente realizando a fotossíntese, algumas espécies são heterotróficas e utilizam carbono orgânico extracelular quando uma fonte de luz não está disponível. As espécies mais estudadas para aplicações biotecnológicas correspondem às algas verdes e as diatomáceas (Hu et al., 2008). Desde a antiguidade as microalgas têm sido usadas como alimento humano, porém agora foram objeto de atenção para investigação de seu potencial biotecnológico. O atrativo das microalgas posteriormente canalizado em relação a outras aplicações tais como a aquacultura (cultivo de espécies aquáticas vegetais e animais em meios naturais e artificiais), o tratamento de águas residuais, a obtenção de substâncias químicas finas, a produção de fármacos e os processos de bioconversão energética (Arredondo e Vázquez-Duhalt, 1991; Huntley e Redalje, 2007).

Para crescer, as microalgas deverão ter à disposição os elementos químicos (macro e micronutrientes) que constituem as suas células. Os elementos essenciais incluem o carbono, o azoto e o fósforo. As necessidades nutricionais mínimas podem ser estimadas utilizando a fórmula molecular aproximada de biomassa de microalgas, $C_{100}O_{48}H_{183}N_{11}P_1$ (Chisti, 2007). Assim sendo, poderão crescer e multiplicar-se não só em meios sintéticos, como por exemplo o *Bold Basal Medium* (BBM), mas em qualquer meio onde estes nutrientes estejam disponíveis.

Dentre os meios de cultura alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se: esgoto doméstico esterilizado (ou não), efluentes de biodigestores, lodo digerido, despejos industriais purificados, vinhaça de cana-de-açúcar, águas residuais da produção de azeite e resíduos da suinicultura (Bertoldi et al, 2008).

O fenómeno de crescimento das microalgas em efluente já foi amplamente estudado por vários autores, quer em efluente municipal (Griffiths, 2009), resultante da atividade agropecuária (Rodrigues e Filho, 2004), de indústria de lacticínios (Woertz et al., 2009), de destilaria (Travieso et al., 2008), entre outros, tendo a conclusão comum sido que, enquanto

crecem, as microalgas causam a diminuição de alguns contaminantes, ou seja, o seu crescimento provoca o tratamento dos efluentes.

Segundo Raposo et al. (2010), as microalgas podem crescer em efluente cervejeiro uma vez que este meio possui alguns dos nutrientes necessários ao seu crescimento, tendo também como consequência o tratamento do mesmo.

1.1.2 Produção Europeia de Biodiesel

Na União Europeia (UE), os sectores do transporte e da energia são responsáveis pela emissão de aproximadamente 20% e 60% dos gases de efeito de estufa (GEE), respetivamente. O sector agrícola é a terceira maior fonte antropogénica e representa cerca de 9% das emissões de GEE, onde os gases emitidos mais relevantes correspondem ao óxido nitroso (N_2O) e ao metano (CH_4) (Oliveira, 2009).

Os governos da UE não só veem o aumento do consumo de biocombustíveis como algo prioritário, mas também como sendo benéfico para a diminuição dos GEE e ao mesmo tempo positivo para o aumento da segurança da energia fornecida, desenvolvimento tecnológico e económico (criação de emprego e desenvolvimento regional).

O biodiesel mantém-se como o biocombustível mais utilizado no transporte a nível europeu em 2011; o valor estimado para a produção Europeia de biodiesel foi de 10 075 254 milhões de litros e a sua cota de utilização, em relação aos outros biocombustíveis (bioetanol, biogás, etc.), foi de 77,6% podendo ver-se na Tabela 1.1 a distribuição pelos diversos países (Eurobserv'er, 2012).

Tabela 1.1- Estimativa de produção de biodiesel como combustível em 2011, em milhões de litros (adaptado de Eurobserv'er, 2012).

Posição	País	Biodiesel (10 ⁶ L)
1	Alemanha	2 143 929
2	França	2 034 500
3	Espanha	1 443 131
4	Itália	1 286 711
5	Reino Unido	729 077
6	Polônia	858 986
7	Suécia	229 808
8	Áustria	349 074
9	Bélgica	273 308
10	Holanda	163 371
11	Portugal	306 894
12	República Checa	240 566
13	Chipre	15 899
	Total	10 075 254

1.2 Objetivos da Tese

O objetivo geral desta tese foi estudar o crescimento de microalgas em efluente cervejeiro das quais serão extraídos lípidos como matéria-prima para obtenção de biodiesel. O efluente utilizado foi colhido na estação de tratamento de águas residuais (ETAR) de uma unidade produtora de cerveja e a espécie microalgal usada foi a *Chlamydomonas sp.* Foi também objetivo testar se os açúcares produzidos a partir de resíduos gerados na indústria cervejeira poderiam ser uma fonte viável de carbono para o crescimento das microalgas. Sendo assim foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Estudar a curva de crescimento da microalga *Chlamydomonas sp.* (Cs) em efluente cervejeiro real suplementado com pentoses (originárias das hemiceluloses da drêche cervejeira);

- ✓ Extrair e quantificar os lípidos das microalgas;
- ✓ Transesterificar os lípidos extraídos;
- ✓ Avaliar o perfil lipídico (composição em ácidos gordos) dos óleos extraídos.

1.3 Contributos do Trabalho

Uma vez que a indústria cervejeira produz muito efluente, é de grande importância o estudo da viabilidade da utilização deste efluente cervjeiro em outros processos, numa tentativa de minimizar os custos com o seu tratamento.

Com este trabalho foi possível verificar que uma das possíveis aplicações poderá ser o cultivo de microalgas usando este efluente, uma vez que ele pode servir de meio de cultura.

Por outro lado foi possível verificar que a adição de pentoses provenientes do processo cervejeiro poderá potenciar o crescimento das microalgas levando a uma maior produtividade de biomassa algal mas com um menor teor lipídico.

1.4 Organização da Tese

Esta dissertação está organizada em 5 capítulos:

No capítulo 1 faz-se o enquadramento geral, onde se descreve brevemente sobre a produção europeia de biodiesel bem como a situação nacional.

No capítulo 2 é apresentada a revisão bibliográfica realizada durante esta dissertação. Descreve-se também o uso e produção de biocombustíveis, a utilização de microalgas, bem como o seu cultivo para a produção de biodiesel. Apresenta-se uma breve revisão sobre o tratamento de efluentes, em particular os da indústria cervejeira.

No capítulo 3 é apresentado todo o trabalho experimental realizado, desde a aquisição das microalgas e condições de inoculação e cultivo, colheita e transesterificação dos ácidos gordos. Segue-se a apresentação e discussão dos resultados obtidos.

No capítulo 4 são apresentadas as conclusões obtidas durante a realização deste estudo, sendo também sugeridas algumas alterações para trabalhos futuros.

O capítulo 5 é referente aos anexos onde se encontram detalhados a descrição dos métodos utilizados, procedimentos e resultados experimentais.

2 Contexto e Estado da Arte

2.1 Biocombustíveis

A partir do Protocolo de Kyoto, grande parte da atenção global tem sido direcionada para reduzir emissões de carbono pela utilização de fontes de energia não convencionais e combustíveis renováveis, visando a minimização da liberação de dióxido de carbono (CO_2) bem como a condução da economia com baixos teores de gases produtores de efeito estufa. O sequestro de dióxido de carbono, a redução dos níveis de emissão, a redução do uso de energia bem como o uso de biocombustíveis, podem somente aliviar o problema (Matthews e Caldeira, 2008).

A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios da atualidade. O crescente preço dos combustíveis e o foco internacional sobre o impacto ambiental das emissões gasosas têm conduzido à procura de recursos renováveis e ao desenvolvimento de tecnologias verdes que suportem a indústria e as necessidades do mercado mundial (Mata, 2010).

Atualmente, na União Europeia, o setor dos transportes é responsável por cerca de um quarto das emissões de gases causadores do efeito estufa, o que desperta a procura por formas de reduzir as emissões poluentes deste setor, seja por meio de veículos mais limpos ou por meio da utilização de biocombustíveis, que permitam reduzir a dependência energética dos combustíveis fósseis. Os biocombustíveis constituem recursos não-tóxicos, biodegradáveis e renováveis, e estão associados a vantagens ambientais uma vez que permitem a redução das emissões poluentes, o que no panorama atual representa uma alternativa energética cada vez mais explorada. Contudo, a primeira geração de biocombustíveis está baseada apenas nas culturas alimentares, como canola, milho, soja, açúcar e colza (a 2ª geração baseia-se na utilização de resíduos e materiais lenhocelulósicos e a 3ª geração aponta para a utilização de microalgas). Apesar de não se ter dados científicos relevantes, acredita-se que o cultivo dessas culturas para biocombustíveis pode conduzir a aumentos nos preços dos alimentos e agravamento da desflorestação (Greenwell, 2010).

2.1.1 Biodiesel

O biodiesel consiste em monoalquilésteres de álcoois de cadeia curta, usualmente etanol e metanol, com ácidos gordos de cadeia longa obtida a partir de biomassa renovável e que é tecnicamente capaz de substituir o diesel derivado do petróleo como combustível. Em contraste com o petrodiesel, o biodiesel oferece várias vantagens já que é uma fonte de energia renovável e biodegradável (degrada-se quatro vezes mais rápido que o diesel fóssil) e produz menos emissões indesejáveis (monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos, aromáticos

policíclicos, partículas, óxidos de enxofre e nitrogênio, metais) e menos nocivas durante a sua combustão, devido ao seu estado oxigenado. Possui propriedades lubrificantes que reduzem o desgaste do motor e é um material seguro para seu transporte, armazenamento e manejo devido à sua baixa volatilidade e elevado ponto de inflamação (100 - 170°C) (Hernández, 2009).

Na última década o desenvolvimento de biocombustíveis como, por exemplo, o biodiesel, foi considerado uma das maiores estratégias para minimizar os problemas ambientais e de geração de energia em muitos países. A produção de biodiesel usando lipídeos microbianos pode ser vista como uma excelente alternativa para a redução do custo dos combustíveis obtidos a partir de matérias-primas alimentares (Chisti, 2008).

Segundo Day et al. (2009), as microalgas produtoras de lipídeos são matérias-primas promissoras para a produção de biodiesel, visto que diversas características essenciais de seus óleos são desejáveis e adequadas à substituição do diesel. Neste sentido o biodiesel de microalga apresenta vantagens frente aos outros, podendo representar uma importante tecnologia a ser desenvolvida para a nova matriz energética que as sociedades buscam (Smith et al. 2010).

Embora a produção de lipídeos de microalgas para combustíveis seja promissora, ela ainda é considerada um processo inviável em escala industrial, devido os altos custos das tecnologias de colheita da biomassa e extração dos lipídeos (Chisti 2007; Chisti e Yan 2011).

2.1.1.1 Produção de biodiesel

Segundo Neto e Rossi (2000) no início do século XX iniciaram-se os testes de utilização do biodiesel como combustível alternativo. E na época em que esses autores desenvolveram tal pesquisa, a comercialização do biodiesel encontrava obstáculos tecnológicos tais como problemas de ignição. Os mesmos autores referem que o biodiesel pode ser caracterizado pela ausência de enxofre e aromáticos; por um número de cetano elevado; pelo teor de oxigênio próximo a 11%; pela elevada viscosidade; por um ponto de inflamação superior ao do diesel convencional; direcionado a um mercado específico, especialmente dirigido a atividades agrícolas, e pelas vantagens ambientais no caso do biodiesel proveniente de óleos vegetais e gorduras.

A União Europeia, com uma produção de 8,607 milhões de litros (ML) no ano de 2011, é o líder mundial na indústria do biodiesel e estima-se que continuará assim durante a próxima década.

Atualmente são mais de 20 os estados-membros (Figura 2.1) da European Biodiesel Board (EBB), que por sua vez integram mais de 120 empresas, tendo como objetivo a produção anual de 6,1 milhões de toneladas de biodiesel (EBB, 2013).



Figura 2.1- Estados-membros da European Biodiesel Board (EBB, 2013).

A Alemanha e a França são os estados-membros que apresentaram uma maior produção a nível Europeu. No ano de 2011, produziram, respetivamente, cerca de 28,01 e 15,59% de todo o biodiesel, ocorrendo um aumento de 10,06%, na totalidade de biodiesel produzido, quando comparado com o ano anterior (EBB, 2013).

Em relação ao Brasil, um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel de todo o mundo, com uma produção anual, em 2010, de 2,4 bilhões de litros e uma capacidade instalada, no mesmo ano, de cerca de 5,8 bilhões de litros, foi no ano de 2005 que se deu o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), programa interministerial do Governo Federal, que tem como objetivo “a implementação sustentável, tanto técnica, como economicamente, da produção e uso do Biodiesel, com enfoque na inclusão social e no desenvolvimento rural, via geração de emprego e renda” (Portal do Biodiesel, 2011; ANP, 2012).

Existem diversas metodologias para a produção de biodiesel e, quatro delas foram estudadas exaustivamente: uso direto de óleos ou misturas destes com diesel fóssil, microemulsões, pirólise e transesterificação. A aplicação das três primeiras alternativas em motores diesel é impraticável e insatisfatória, já que ocasiona problemas tais como a obstrução dos injetores, a formação de depósitos de carbono, a combustão incompleta, o desgaste excessivo do motor, o dano do lubrificante e, no caso específico da pirólise, a eliminação dos benefícios ambientais inerentes ao uso dos combustíveis oxigenados (Hernandéz, 2009).

A transesterificação ou alcoólise é a reação química ocorrida entre os óleos (triglicerídeos) e um álcool (comumente metanol, etanol, propanol ou butanol) para produzir glicerol e mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos gordos, os quais são conhecidos como biodiesel (Hernandéz, 2009).

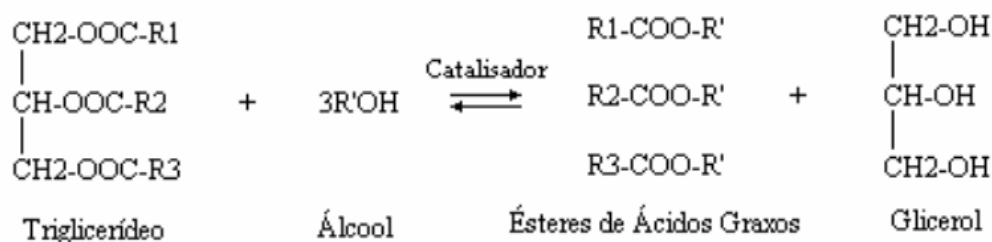


Figura 2.2- Equação geral do Processo de Transesterificação (Camargos, 2005).

A síntese do biodiesel é uma reação química reversível, na qual a tendência é a formação dos monoalquil ésteres como observado na Figura 2.2. Os valores estequiométricos são de 3:1 (álcool: óleo); entretanto, devido ao caráter reversível da reação, torna-se necessária a utilização de razões molares álcool: óleo acima dos valores estequiométricos (Júnior, 2010).

2.2 Aplicações das microalgas

As microalgas podem oferecer diversos compostos importantes, incluindo hidrogênio e hidrocarbonetos, pigmentos e corantes, alimentos e rações, biopolímeros, biofertilizantes, inseticidas, nutracêuticos (alimentos capazes de proporcionar benefícios à saúde) e compostos farmacológicos. Foram identificadas cerca de 40000 espécies, ainda que se estime que existam mais de 100000, das quais com frequência se desconhece a composição bioquímica e metabolismo. As microalgas classificam-se relativamente a vários parâmetros tais como pigmentação, ciclo de vida, morfologia e estrutura celular. As espécies mais estudadas para aplicações biotecnológicas correspondem às algas verdes e às diatomáceas (Arredondo e Vázquez-Duhalt, 1991; Sheehan et al., 1998; Richmond, 2004).

As microalgas são excelentes fixadoras de carbono, possuem taxas de crescimento e capacidade fotossintética superior aos vegetais superiores, sendo capazes de duplicar a sua biomassa em um dia. De acordo com Chisti (2007), algumas espécies podem se duplicar em períodos mais curtos, em torno de 3,5 h. As microalgas são capazes de capturar o CO₂ e produzir biomassa, contribuindo para a minimização do efeito estufa. Para produzir 1,0 kg de biomassa, as algas utilizam cerca de 1,83 kg de CO₂.

Além disso, as microalgas não requerem CO₂ de alta pureza. Sendo assim, os gases de chaminés industriais podem ser usados na alimentação direta das culturas, minimizando custos de separação (Kurano et al., 1995). Adicionalmente, os nutrientes necessários para cultivá-las, principalmente azoto e fósforo, podem ser obtidos a partir de efluentes residuais

orgânicos da indústria agroalimentar (Cantrell et al., 2008; Brennan e Owende, 2010; Kurano e Miyachi, 2005).

O cultivo de microalgas não segue regime de colheitas, podendo ser desenvolvido durante todo o ano, proporcionando maiores produtividades em relação às oleaginosas tradicionais. Algumas microalgas podem ser cultivadas em meio simples, não exigindo solos aráveis, desta forma não competem com as necessidades humanas e industriais. Além disso, não há necessidade de irrigação, herbicidas ou pesticidas (Dismukes et al., 2008; Rodolfi et al., 2009; Brennan e Owende, 2010). Diante das vantagens oferecidas pelas microalgas, esses organismos apresentam inúmeras aplicações, conforme pode ser visto na Figura 2.3.

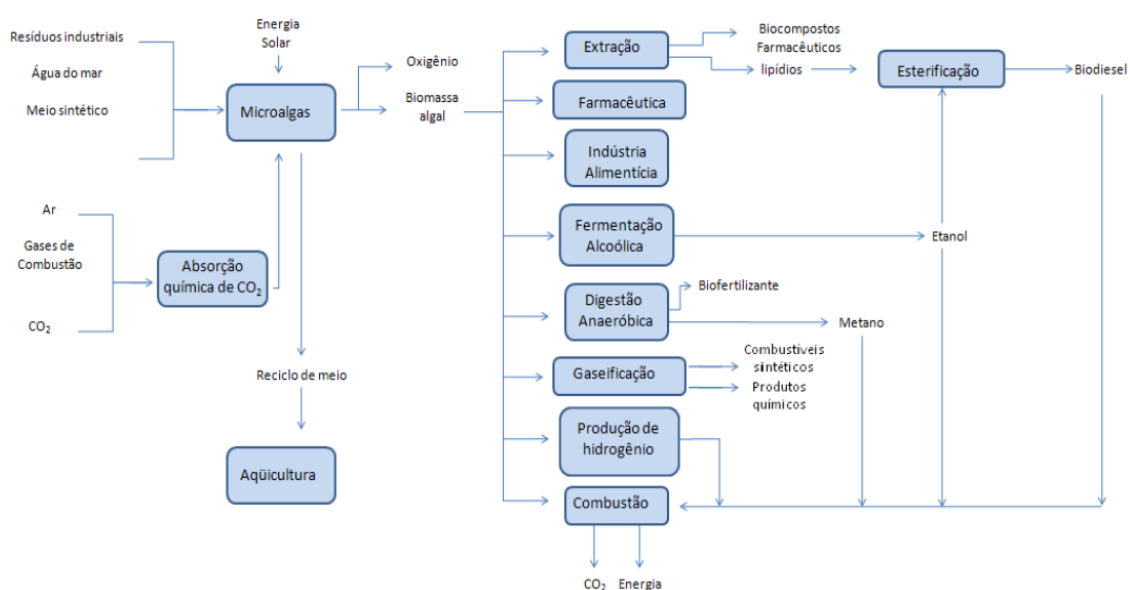


Figura 2.3- Fluxograma das aplicações potenciais das microalgas (Adaptado de Costa e Moraes, 2011).

A composição básica das microalgas resume-se a hidratos de carbono, lipídeos, proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos. A composição percentual de cada composto bioquímico varia com a espécie e o estágio de desenvolvimento (Pérez, 2007). O teor de lipídeos das microalgas em relação ao peso seco pode variar de 1 a 70% e em algumas espécies, sob certas condições, esse teor pode chegar a 90% (Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007; Li et al., 2008; Wang et al., 2008). A Tabela 2.1 mostra o teor de lipídeos e a produtividade de diferentes espécies de microalgas.

Tabela 2.1- Teor de lipídeos e produtividade de diferentes espécies de microalgas (adaptado: Mata et al., 2010).

Éspécie de microalga marinha ou de água doce	Teor de lipídeos (% biomassa seca)	Produtividade de lipídeos (mg/L/dia)	Produtividade de biomassa por área (g/m ² /dia)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24,0-31,0	-	11,5-17,4
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0-75,0	-	3
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8	-
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14,6-16,4/39,8	17,6	-
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0	0,91-0,97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	1214	-
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40	0,57-0,95
<i>Chlorella sp</i>	10,0-48,0	42,1	1,61-16,47/25,0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2	-	72,5/130,0
<i>Chlorella</i>	18,0-57,0	18,7	3,5-13,9
<i>Chlorococcum sp.</i>	19,3	53,7	-
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0-51,1	-	-
<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116	1,6-3,5/20-38,0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23,1	-	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0	-	-
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5-67,0	33,5	-
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27,4	47,3	-
<i>Euglena gracilis</i>	14,0-20,0	-	-
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25	-	10,2-36,4
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0-40,0	-	-
<i>Isochrysis sp.</i>	7,1-33,0	37,8	-
<i>Monodus subterraneus</i>	16	30,4	-
<i>Monallanthus salina</i>	20,0-22,0	-	12
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0-56,0	60,9-76,5	-
<i>Nannochloropsis sp.</i>	22,7-29,7	84,0-142,0	-
<i>Neochloris oleoabundans</i>	12,0-53,0	37,6-90	1,9-5,3
<i>Nitzschia sp.</i>	29,0-65,0	90,0-134,0	-
<i>Oocystis pusilla</i>	16,0-47,0	-	8,8-21,6
<i>Pavlova salina</i>	10,5	-	40,6-45,8
<i>Pavlova lutheri</i>	30,9	49,4	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	35,5	40,2	-
<i>Scenedesmus sp.</i>	9,0-18,8/60,7	34,8	25
<i>Skeletonema sp.</i>	19,6-21,1	40,8-53,9	2,43-13,52
<i>Skeletonema costatum</i>	13,3-31,8	27,3	-

O alto teor de lipídeos oferecido por algumas espécies de microalgas implica altos rendimentos de óleo, o que motiva o desenvolvimento de pesquisa envolvendo a produção de biocombustíveis a partir destes organismos. A Tabela 2.2 apresenta uma comparação da produtividade em óleo entre oleaginosas e microalgas. Pode-se observar que as microalgas utilizam menores áreas de cultivo e oferecem maiores rendimentos e produtividade em óleo.

Tabela 2.2- Fontes de produção de biodiesel (Mata et al., 2010).

Fonte vegetal	Teor de lipídeos (% óleo/biomassa)	Rendimento (L óleo / ha.ano)	Utilização de espaço (m ² /kg biodiesel.ano)	Produtividade biodiesel (kg biodiesel/ha.ano)
Milho (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Cânhamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/colza (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Azeite de dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalgas (médio teor de óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalgas (alto teor de óleo)	70	136900	0,1	121104

2.3 Produção da biomassa algal

A produção de biomassa algal para valorização de bioprodutos requer muita atenção nos seus processos, pois cada etapa é de grande importância. Desde a inoculação, passando pelo seu cultivo, até ao processamento final, onde se obtém o produto em si.

2.3.1 Cultivo

Os cultivos de microalgas são independentes da sazonalidade inerente aos cultivos agrícolas e às condições de fertilidade do solo permitindo, sem uso de herbicidas e pesticidas, o uso de territórios e zonas marginais inadequados para agricultura, pecuária, indústria e turismo (Hernández, 2009).

Diferentes pesquisadores, entre os quais Zhang et al. (1999), realizaram o estudo do cultivo mixotrófico (utilização de fontes orgânicas de carbono associadas a fixação do carbono inorgânico na fotossíntese) da *Spirulina platensis*, e demonstraram, a influência da concentração inicial de glicose na velocidade específica de crescimento em cultivo descontinuo.

Segundo Muliterno et al (2005), estudou-se o cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* adicionando glicose como fonte de carbono uma vez que se considera que a adição de determinados nutrientes pode estimular a biossíntese dos compostos.

Os estudos utilizando açúcares contemplam não só as hexoses, como a glicose, mas também pentoses, como demonstrado no estudo de Brächer et al. (2011), que utilizaram a xilose e a arabinose extraída do bagaço da cana-de-açúcar para cultivar *Spirulina*.

Nessa mesma década de 80, as pesquisas em biotecnologia de microalgas concentravam-se na reciclagem de águas residuais, sua aplicação em programas espaciais de renovação atmosférica e fonte de alimento (Benemann, 1990). Porém, segundo Borowitzka (1992), muitos são os fatores a ter em conta no momento de escolher o tipo de sistema de cultivo, que vão desde a biologia da microalga, custo do terreno, mão-de-obra, energia, disponibilidade de água, nutrientes, clima (no caso de a cultura estar no exterior), até ao tipo de produto desejado, devendo ter-se em conta a eficiência de utilização da luz, a capacidade de controlo da temperatura, o *stress* hidrodinâmico provocado na cultura, à necessidade/capacidade de manter monoculturas e a real possibilidade no aumento de escala.

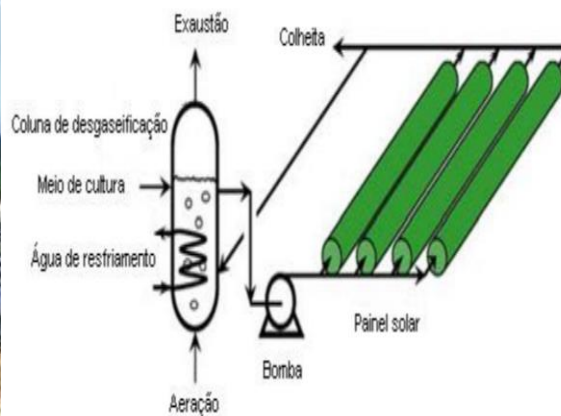
No que diz respeito aos sistemas mais comuns, o que os distingue é essencialmente o facto de serem abertos ou fechados e de operarem em contínuo ou por partidas (*batch*).

Os quatro principais tipos de sistemas abertos são lagoas rasas (*shallow big ponds*), tanques, lagoas circulares (*circular ponds*) e lagoas tipo pista (*raceway ponds*). Os *raceway ponds* têm um canal de recirculação que forma um circuito fechado no qual a circulação e agitação são promovidas por uma roda de pás (Figura 2.4a) (Chisti, 2007).

Para a produção de monoculturas, os mais indicados são os sistemas fechados de cultivo de microalgas, já que em contraste com o sistema aberto, oferecem inúmeras vantagens como mínima perda de CO₂, controle e reprodutibilidade das condições de cultivo, economia de água e nutrientes, contaminação, etc. Existem vários formatos e arranjos possíveis para este tipo de sistemas (Figura 2.4b), tais como, por exemplo, os fotobioreactores tubulares, que podem aparecer em vários arranjos, como por exemplo, horizontal (López et al., 2006), em forma de hélice/serpentina (Scragg et al., 2002), tipo “prato espalmado” (*flat plate*) (Sierra et al., 2008) ou com iluminação artificial (Ugwo et al., 2008), entre outros.



(a)



(b)

Figura 2.4- (a) Sistemas de produção abertos do tipo “raceway pond” (Lourenço, 2006); (b) fotobiorreator tubular com tubos arejados (López et al., 2006).

2.3.2 Colheita

Podendo representar 20-30% dos custos totais, o passo de colheita da biomassa algal é tipicamente um dos mais dispendiosos de todo o processo (Grima et al., 2003).

A colheita de microalgas é um processo difícil e a técnica deve ser escolhida em função das características das microalgas e subsequente produção de biocombustível ou outros produtos (González-Fernández et al., 2012).

Existem diversas maneiras de realizar a colheita da biomassa algal, podendo citar-se algumas como: a centrifugação (Heasman et al., 2000), a autofloculação, a floculação usando compostos químicos ou polímeros para agregar a microalgas (Knuckey et al., 2006), a eletrocoagulação (Poelman et al., 1997), o fracionamento por espuma (Csordas e Wang, 2004), a filtração por membranas (Rossignol et al., 2000), a utilização de ultrassons (Bosma et al., 2003), a flotação (Levin et al., 1962; Koopman e Lincoln, 1983), ou a combinação destes ou outros métodos (Levin et al., 1962; Sim et al., 1988; Guelcher e Kanel, 1999; Oh et al., 2001; Howard et al., 2008; Danquah et al., 2009).

2.3.3 Secagem

Após a colheita, a biomassa segue para a operação de secagem que é comumente usada para manter a qualidade da biomassa. Esta etapa chega a constituir cerca de 30% do custo total de produção (Duarte et al., 2009); para tanto, podem ser utilizadas diversas técnicas como *spray drying*, liofilização (Cordero e Voltolina, 1997), secagem ao sol (Li et al., 2008) e secagem convectiva (Desmorieux e Decaen, 2005).

2.3.4 Conteúdo de lipídeos

Segundo Chisti (2007) as microalgas são uma excelente fonte de lipídeos e o seu conteúdo em óleo pode ultrapassar 80% do seu peso total (peso seco), embora os níveis mais comuns estejam compreendidos entre os 20% e os 50%.

Atualmente conhecem-se as taxas de produção de lipídeos de várias espécies de microalgas.

Na Tabela 2.3 são apresentados os conteúdos em lipídeos de alguns géneros e espécies de microalgas.

Tabela 2.3- Conteúdo em óleo de alguns géneros e espécies de microalgas (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009).

Gênero/Espécie	Conteúdo em óleo (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlamydomonas sp.</i>	25
<i>Chlorella vulgaris</i>	14-40/56
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54/65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Spirulina maxima</i>	4-9
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23

2.3.5 Transesterificação

A produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas tem sido apresentada na literatura utilizando a via convencional, que envolve a extração dos lipídeos da biomassa de microalgas seguida da sua conversão em biodiesel e glicerol utilizando várias técnicas. A mais utilizada é a transesterificação dos triglicerídeos com um álcool de baixo peso molecular, na presença de um catalisador homogéneo em meio alcalino.

Podem ser empregados hidróxidos de metais alcalinos e carbonatos, como precursores da espécie catalítica, e/ou alcóxidos de metais alcalinos (Ma e Hanna, 1999). Porém, deve-se ter em conta os problemas a serem solucionados como a separação do catalisador, a pureza da glicerina e a purificação dos monoésteres obtidos, pois os mesmos podem comprometer a sua qualidade como combustível, bem como reduzir o valor comercial da glicerina produzida, já que este coproduto tem elevado valor acrescentado.

A transesterificação via catálise básica para obtenção de ésteres alquílicos pode apresentar alguns problemas incluindo a formação de emulsões, devido à possibilidade de uma grande quantidade dos ácidos gordos reagirem com o catalisador (básico), o que levaria à necessidade de um pré-tratamento para baixar a acidez, podendo haver um aumento no custo final (Canakci e Van Gerpen, 1999).

Sendo assim, torna-se viável a utilização de catalisadores ácidos (ácidos sulfúrico, sulfónico, clorídrico) que permitem a obtenção de elevados rendimentos em ésteres alquílicos, sem a necessidade de um pré-tratamento. Porém, a catálise ácida vai exigir condições mais rigorosas como razão molar (álcool: óleo) e tempo de reação mais elevados, quando comparadas com a catálise alcalina (Freedman et al., 1984).

2.4 A indústria cervejeira

A produção de cerveja na União Europeia (UE) em 2010, comparativamente a 2008, diminuiu 6% (cerca de 383 milhões de hectolitros), tendo o consumo, no mesmo período, diminuído 8% (para 343 milhões de hectolitros), (APCV, 2011).

Em 2010, Portugal exportou 2.5 milhões de hectolitros de cerveja. Os principais mercados importadores da cerveja portuguesa são africanos, principalmente Angola. Aproximadamente 3% da cerveja vendida em Portugal é importada. Em 2010, esta percentagem corresponde um volume de 180 mil hectolitros.

As empresas cervejeiras portuguesas envolvem cerca de 3.200 postos de trabalho que produzem 8.3 milhões de hectolitros de cerveja, o que representa 478 milhões de euros em valor de mercado (APCV, 2011).

A cerveja é o resultado da fermentação alcoólica de um mosto preparado com o malte da cevada. Agregam-se ainda o lúpulo, a levedura e a água, mas a principal matéria-prima é o malte.

A produção de cerveja consiste nas seguintes etapas: brassagem, moagem do malte, mostura, filtragem do mosto, fervura, fermentação, maturação, filtração, carbonatação e envase, pasteurização (Heineken, 2012).

Brassagem

Nesta etapa ocorre a produção e o processamento do mosto, que é a mistura de malte e água. A brassagem compreende diversas etapas:

- Moagem do malte - procedimento onde o grão do malte é quebrado para que o amido presente em seu interior fique exposto, facilitando seu contato com o líquido.
- Mostura - Nesta etapa adiciona-se água ao malte moído, obtendo-se o mosto, mistura que será submetida a diferentes temperaturas, desencadeando uma série de ativações enzimáticas, e que definirá o quanto de açúcar será produzido para consumo das leveduras durante a fermentação.
- Filtração - É o momento da separação do bagaço do malte do restante líquido. Ela ocorre em duas etapas. Na primeira - filtragem primária - o mosto é “coado” por um filtro para retenção do bagaço (drêche cervejeira). Depois, na filtragem secundária, adiciona-se água ao bagaço para extrair o restante do mosto acumulado nas cascas do malte.
- Fervura e resfriamento - Momento de fundamental importância para a qualidade final da cerveja. A fervura deve ser intensa para eliminar todos os micro-organismos que podem concorrer com a levedura na hora da fermentação, alterando o paladar da cerveja. É no processo de fervura que começa a definição da coloração e sabor da cerveja. Ainda durante a fervura ocorre a adição de lúpulo ao mosto para dar o característico amargor da bebida e diferentes aromas.

Estas etapas têm como objetivo preparar a mistura para a fermentação.

Fermentação

Processo responsável pela transformação dos açúcares presentes no mosto em dióxido de carbono (CO₂) e etanol por meio da ação da levedura. Durante esta reação ocorre o surgimento de diversos subprodutos que podem favorecer ou não as características aromáticas da bebida. Por isso, é necessária a escolha criteriosa do tipo de levedura a ser utilizada assim como o controle das condições de temperatura, pressão e duração do processo.

Maduração

Depois de retiradas as leveduras começa a maturação da cerveja. Neste período, a bebida é deixada em repouso para que suas características de aroma e sabor se consolidem. Nesta etapa ocorre também a carbonatação natural da bebida, resultante da fermentação residual dos açúcares restantes da fermentação. Há ainda a formação de substâncias responsáveis pela estabilização da coloração da bebida. O tempo de maturação, assim como o dos demais processos, varia de acordo com o tipo e a qualidade da cerveja produzida.

Filtração, carbonatação e envase

Na filtração, eliminam-se praticamente todas as leveduras restantes do processo de maturação. Na carbonatação corrige-se, se necessário, o nível de CO₂ da cerveja por meio da adição de gás carbônico.

O envase é o momento em que a cerveja é posta em barris, latas ou garrafas. Este é um dos momentos mais delicados, quando a bebida está mais exposta a possíveis contaminações. Para que isso não ocorra, os vasilhames (latas, garrafas e barris) passam por um rigoroso processo de higienização para garantir a qualidade e preservar as características do produto.

Pasteurização

Após o envase, a cerveja é submetida rapidamente a temperaturas na casa dos 60°C para a eliminação de micro-organismos responsáveis pela sua rápida deterioração. Este processo garante o prolongamento da validade da bebida (Heineken, 2012).

2.4.1 Efluente cervejeiro

Geralmente, os efluentes das indústrias cervejeiras são caracterizados por uma elevada carência química de oxigênio (CQO), carência bioquímica de oxigênio (CBO), sólidos suspensos totais (SST), e grandes variações de caudal (LeClair, 1984).

Segundo Huang e Hung (1987) a indústria cervejeira produz grandes quantidades de água residual com altas concentrações de poluentes orgânicos e baixas concentrações de nutrientes e também é caracterizado por uma larga variação dos parâmetros, sendo que exibem fluxos diários entre 1500 e 2500 m³/dia e CQO normalmente entre 1500 e 3000 mgO₂/L (Rodrigues et al, 2011).

Na Tabela 2.4 é apresentada a composição típica de alguns efluentes cervejeiros reportados na literatura (Driessen e Vereijken, 2003; Tam et al. 2005; Brito et al., 2007; Feng et al, 2008).

Tabela 2.4- Composição de alguns efluentes cervejeiros reportados na literatura.

Parâmetro	Driessen e Vereijken (2003)	Feng et al. (2008)	Brito et al. (2007)	Tam et al. (2005)
CBO ₅ , 20 °C (mg O ₂ /L)	2000-6000	1340	520-2300	600-4000
CQO (mg O ₂ /L)	1200-3600	2250	800-3500	-
SST (mg/L)	200-1000	480	-	200-2600
T (°C)	18-40	-	30-35	-
pH (Escala de Sorensen)	4,5-12,0	6,5	6,5-7,9	4,5-11,0
Azoto total (mg N/L)	25-80	54 ^a	12-31	19,2-69,2 ^c
Fósforo total (mg P/L)	10-50	50 ^b	9-15	2-60

^aAzoto na forma NH₃^bFósforo na forma de PO₄³⁻^cAzoto Kjeldahl

2.4.2 Drêche Cervejeira

A 5ª bebida mais consumida do mundo é a cerveja e a drêche corresponde a 85 % dos subprodutos da sua produção, por isso estima-se que por ano sejam produzidos 3,4 milhões de toneladas de drêche na União Europeia, sendo a maioria utilizada em ração animal (Aliyu et al., 2011).

A drêche é um subproduto do processo de produção da cerveja, retido durante o processo de filtração do mosto, sendo composto por materiais insolúveis, alguns lípidos e proteínas (Mussato et al., 2006; Unicer, 2012).

Segundo Moura (2012), a drêche é um material lenho-celulósico constituído por celulose e hemiceluloses, entre outros.

A celulose é um homopolissacarídeo linear constituído por unidades de glucose, ligadas entre si por ligações β-1,4, que resultam num cristal de celulose. Devido ao espaço reduzido existente entre as ligações, os catalisadores têm bastante dificuldade em aceder, de modo a quebrá-las. As hemiceluloses são constituídas por vários monómeros de D-glucose, D-xilose, L-arabinose, entre outros e também por ácido D-glucurónico e ácido 4-O-metil-glucurónico (Murzin et al., 2012).

Devido ao fato de se conhecer que a drêche possui açúcares pode-se revelar como uma matéria-prima interessante para ser explorada para diversos fins, incluindo a produção de açúcares para bioetanol ou outros fins. Uma vez que as pentoses não são fermentadas pela *Saccharomices cerevisiae*, pretende-se neste trabalho avaliar se elas são utilizadas pela microalga *Chlamydomonas sp.*

3 Descrição Técnica

3.1 Aquisição das microalgas utilizadas no trabalho

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microalgas, localizado no Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto, ISEP. Foram utilizadas microalgas da espécie *Chlamydomonas sp.* (SAG 9.98) e da estirpe *Chlorella vulgaris* (SAG 211.12), adquiridas à Algoteca SAG (Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen - Culture Collection of Algae).

3.2 A microalga *Chlamydomonas sp.*

Em ensaios preliminares, testou-se primeiramente o cultivo das microalgas *Chlamydomonas sp.* e *Chlorella vulgaris*. A última não cresceu tão bem pelo que se optou por levar a cabo os ensaios com a microalga *Chlamydomonas sp.*

O género *Chlamydomonas* (em grego: *chlamys*, uma “capa” ou “manto”, *monas*, solitária, usado como um termo genérico para certos flagelados unicelulares) foi nomeado por C.G. Ehrenberg (1833, 1838) e, provavelmente corresponde ao flagelado *Monas* descrito em 1786 (Harris, 2009).

As características essenciais do género são dois flagelos anteriores de igual comprimento, cujos pontos de emergência do corpo da célula não são completamente separados, uma parede celular e um único cloroplasto ou cromatóforo contendo um ou mais pirenoides (Harris, 2009).

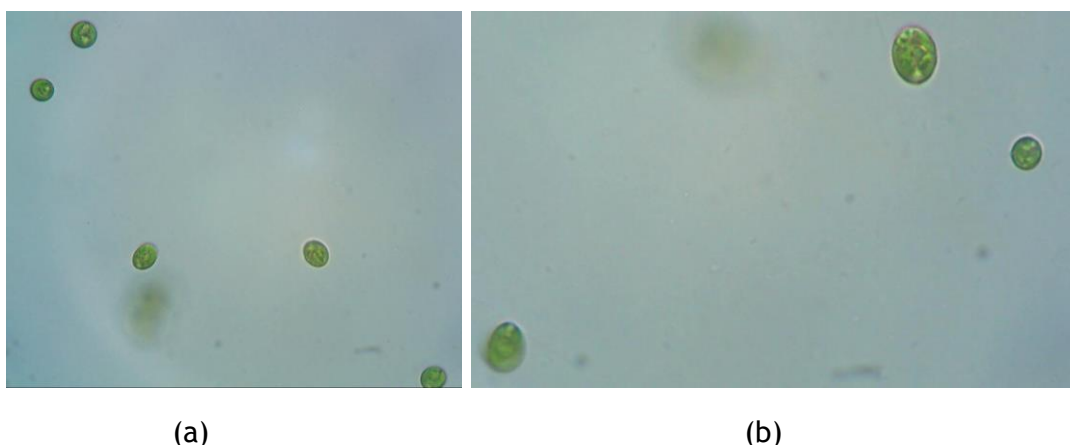


Figura 3.1- Fotografia ao microscópio da microalga *Chlamydomonas sp.* com ampliação (a) 400x e (b) 1000x.

A disponibilidade de carbono na forma de CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-} varia no ambiente, dependendo

do pH e hidratação e é também afectada pela respiração e assimilação fotossintética por organismos vivos. A *Chlamydomonas* possui um sistema complexo que lhe permite utilizar o carbono, e concentrá-lo internamente. A maioria das espécies de *Chlamydomonas* é capaz de assimilar nitrato, nitrito, e amónio como únicas fontes de azoto, bem como qualquer um de uma série de outros compostos (Harris, 2009).

Na literatura encontra-se referido o estudo da utilização de ribose, glicose, galactose, sacarose, lactose, maltose, manose, D-xilose, L-arabinose, etanol, glicerol, manitol, formato, glicerofosfato, propionato, butirato, formaldeído, oxalato, tartarato, piruvato, malato, fumarato, succinato, α -cetoglutarato, o-citrato, o-trans-aconitato, glutamina, glutamato, asparagina, aspartato e glicina no cultivo da microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, tendo-se concluído que estes não se revelam tóxicos na presença de luz, mas revelam-se inibidores do crescimento na ausência de luz (Harris, 2009).

3.3 Condições de inoculação e cultivo

Todos os materiais necessários à execução foram esterilizados de forma a eliminar possíveis contaminações das culturas. O processo de esterilização compreendeu a colocação dos materiais numa panela com água em ebulição durante alguns minutos, seguido de 20 minutos sob radiação UV. A inoculação das microalgas (Figura 3.1a) foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical (CRUMA 870-FL) e o cultivo (Figura 3.1b) foi realizado em sala climatizada, sobre bancadas, mantendo a temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ com aparelho de condicionamento de ar portátil (Orbegozo ADR-67) com iluminação de aproximadamente 3000 lux proveniente de lâmpadas fluorescentes com períodos alternados de 12h/12h com arejamento no mesmo período, posicionado à lateral das bancadas.



(a)



(b)

Figura 3.2- (a) Tubos de ensaios inoculados; (b) imagem de ensaios realizados.

As inoculações num primeiro momento foram realizadas em meio *Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified (BBM-3N)*. Na Tabela A1.1 apresenta-se a descrição da composição do meio de cultura que foi usado como base na formulação dos meios usados neste trabalho. Este meio de cultura difere do meio Bold Basal Medium (BBM) convencional (Tabela A1.2) (Nichols, 1965) pelo fato de ter na sua composição o triplo da quantidade de N da formulação original.

Pois segundo Gouveia (2011), a formulação do meio ideal garante uma quantidade suficiente e estável de nutrientes necessários para atingir a máxima aceleração do crescimento e densidade celular das culturas. As inoculações foram realizadas em tubos de ensaio, cultivados durante aproximadamente uma semana.

Após este período as culturas foram transferidas para fotobiorreatores tipo erlenmayer, de 250 mL, a agitação das culturas foi realizada com a injeção de ar filtrado (passando através de um filtro Chromafil glass fibre (GF) /polyester (PET) 0,20 µm) de uma bomba de ar até ficarem, a olho nu, suficientemente densas. A partir daí passou-se para erlenmeyers de 1 L e em seguida para 5 L, até se obter uma cultura mãe densa a partir da qual se colheu o inóculo para os ensaios subsequentes.

Optou-se por utilizar este meio de cultura até esta fase para que se pudesse atingir uma cultura densa no mais curto espaço de tempo, uma vez que, ao contrário do efluente cervejeiro, o meio *BBM-3N* é bastante conhecido e garante à partida todos os nutrientes necessários ao crescimento de microalgas de água doce. Para estudar o crescimento da microalga *Chlamydomonas sp* em efluente cervejeiro, os ensaios foram levados utilizando como meio de cultura este efluente cervejeiro diluído em meio *BBM-3N*. O efluente utilizado foi colhido em uma estação de tratamento de águas residuais de uma indústria cervejeira. O efluente foi colhido, e em seguida foi filtrado num sistema de ultrafiltração com membranas de 5 µm e passado por um módulo de esterilização por UV, com caudal de cerca de 70 L/h. Para garantir que o efluente estivesse livre de partículas o efluente foi novamente filtrado a vácuo com filtros de fibra de vidro (47 mm x 1,6 µm). Em seguida foram iniciados os ensaios em erlenmeyers de 1 L, os quais foram esterilizados, juntamente com as rolhas e tubos, com água em ebulição e em seguida levado a radiação UV por 20 minutos. Após a esterilização foram preparados os meios de cultura com as características necessárias para efetuar os ensaios. A Tabela 3.2 resume os ensaios e as condições em que os mesmos foram realizados.

O meio de cultura utilizado foi preparado juntando 200 mL de efluente cervejeiro (composição na Tabela 3.1) e 700 mL de água destilada. Para realizar os ensaios adicionou-se 100 mL de cultura mãe de *Chlamydomonas sp*. preparada previamente (totalizando 1 L) e, consoante o ensaio o açúcar correspondente: xilose, ribose ou arabinose. Adicionaram-se os açúcares em dois momentos: início e na fase estacionária, com duas concentrações de 0,25 g_{açúcar}/L_{meio} e 0,5 g_{açúcar}/L_{meio}.

Tabela 3.1- Valores médios dos parâmetros analisados no efluente cervejeiro real utilizado.

Parâmetro	Valor médio
CQO (mg O ₂ /L)	740,8
Nitratos (mg NO ₃ ⁻ /L)	17,3
Fósforo total (mg P/L)	53,9

A avaliação do crescimento microalgal foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-160 A) (Figura 3.3) pelo método da densidade ótica. Para a avaliação do crescimento microalgal primeiramente foi realizada a curva de calibração Absorvância a 682,5 nm vs Concentração de biomassa seca (mg/L) (Anexo 3), uma vez que se verificou ser este o comprimento de onda para o qual se observava o pico de máxima absorvância para a cultura de *Chlamydomonas sp.* Colheu-se cerca de 20 mL de amostra da cultura, filtrou-se uma parte para fazer o branco, e realizar as leituras das amostras em três repetições. Optou-se para fazer o branco com o filtrado já que este meio possuía cor que poderia alterar os resultados. As colheitas foram realizadas regularmente, desde o dia da inoculação (dia 0) até ao final do ensaio.

Tabela 3.2- Condições dos ensaios de cultivo de *Chlamydomonas sp.* com diferentes percentagens de efluente real sem ou com adição dos açúcares: xilose, arabinose e ribose.

Microalga	Meio de cultura	Concentração de açúcar (g/L)	Momento adição de açúcar
Cs	BBM-3N	Sem açúcar	-
Cs	5% (v/v) de efluente	Sem açúcar	-
Cs	10% (v/v) de efluente	Sem açúcar	-
Cs	20% (v/v) de efluente	Sem açúcar	-
Cs	30% (v/v) de efluente	Sem açúcar	-
Cs	40% (v/v) de efluente	Sem açúcar	-
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (A)	Início
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (A)	Na fase estacionária
Cs	20% (v/v) de efluente	0,5 (A)	Início
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (X)	Início
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (X)	Na fase estacionária
Cs	20% (v/v) de efluente	0,5 (X)	Início
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (R)	Início
Cs	20% (v/v) de efluente	0,25 (R)	Na fase estacionária
Cs	20% (v/v) de efluente	0,5 (R)	Início



Figura 3.3- Espectrofotômetro UV/Vis utilizado na avaliação do crescimento das culturas pelo método de densidade ótica.

3.4 Resultados e discussão

Na Figura 3.4 estão representados os valores de concentração da biomassa determinados a partir dos ensaios em meio *BBM-3N* com 20% (v/v) de efluente cervejeiro, ao qual se adicionou a xilose no início, nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L.

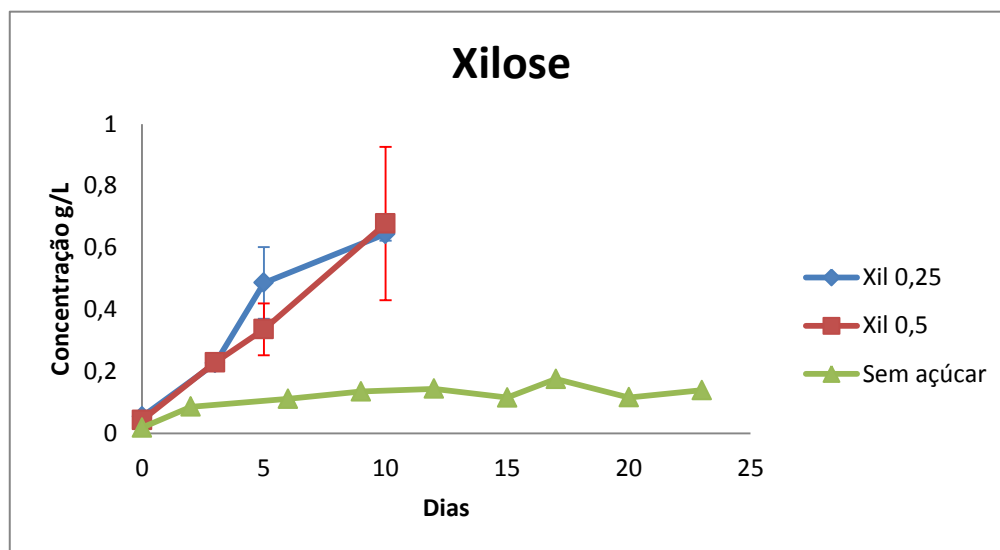


Figura 3.4- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de xilose nas concentrações de 0,25 g/L (Xil 0,25) e 0,5 g/L (Xil 0,5).

Quando se compara o efeito da adição de açúcar (Figura 3.5 - Xil 0,25 e Xil 0,5) com a cultura levada a cabo sem presença de açúcar (Figura 3.5 - sem açúcar), verifica-se que esta última se mantém mais estável, constante e com um tempo de vida muito superior ao das culturas às quais se adicionou açúcar. Neste estudo pretendia-se obter a produção de maior quantidade

de biomassa algal possível, pelo que a presença de xilose foi um fator determinante para acelerar e aumentar o seu crescimento. No entanto observa-se que o tempo de vida da cultura é muito menor pois no dia 10 foi possível observar a degradação da mesma, com aspecto visivelmente turvo e com a biomassa depositada ao fundo do erlenmeyer. Tal pode dever-se ao rápido crescimento das microalgas que, no seu metabolismo consomem o carbono. Como a sua concentração aumenta muito, os nutrientes começam a escassear o que leva ao declínio da cultura. Uma outra possibilidade é a colonização do meio por bactérias. Como tal, a cultura foi descartada, não sendo possível atingir-se uma fase estacionária, apenas uma fase exponencial (Figura 3.4). No entanto, a concentração máxima de microalgas obtida ao 10º dia é substancialmente superior (cerca de 5 vezes) quando o meio de cultura é suplementado com 0,25 g/L de xilose relativamente ao meio de cultura sem adição de pentose.

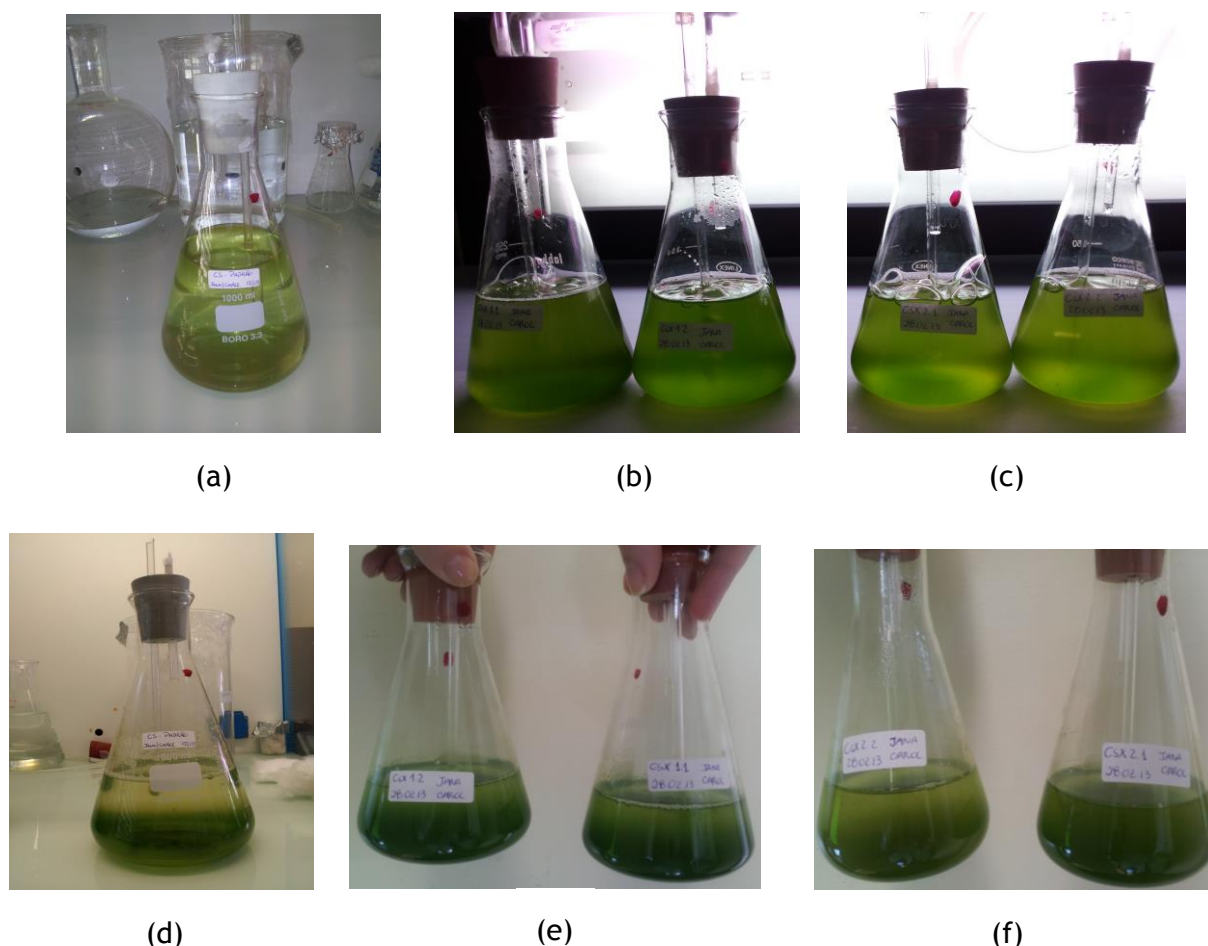


Figura 3.5- Aspeto das amostras dia 0 (a) sem adição de xilose, (b) com adição de 0,25 g/L de xilose e (c) com adição de 0,5 g/L de xilose; (d) dia 23 da cultura sem adição de xilose; (e) dia 10 da cultura com adição de 0,25 g/L de xilose; (f) dia 10 da cultura com adição de 0,5 g/L de xilose.

Os resultados da Figura 3.4 3.5 demonstram que não houve diferença significativa resultante da adição da xilose nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L. Por exemplo, quando se considera o valor mais baixo da biomassa produzida por adição da xilose na concentração de 0,25 g/L com o valor mais alto da biomassa produzida por adição da xilose concentração de 0,5 g/L no 5º dia de cultura, verifica-se que se obtém praticamente o mesmo valor. Sendo assim a menor concentração é mais vantajosa, uma vez que, com uma menor quantidade de xilose adicionada se conseguiriam atingir resultados satisfatórios.

Atendendo ao estudo realizado por Morais et al. (2012), com a microalga *Dunaliella*, esperava-se obter melhor resultado com a concentração de 0,25 g/L, uma vez que este autor conseguiu uma concentração mais elevada de biomassa quando utilizou uma concentração mais baixa das pentoses. No entanto trata-se de microalgas substancialmente distintas pelo que não é razoável fazer a comparação direta.

Na Figura 3.6 estão representados os valores de concentração da biomassa determinados a partir dos ensaios em meio *BBM-3N* com 20% (v/v) de efluente cervejeiro, ao qual se adicionou a ribose no início, nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L.

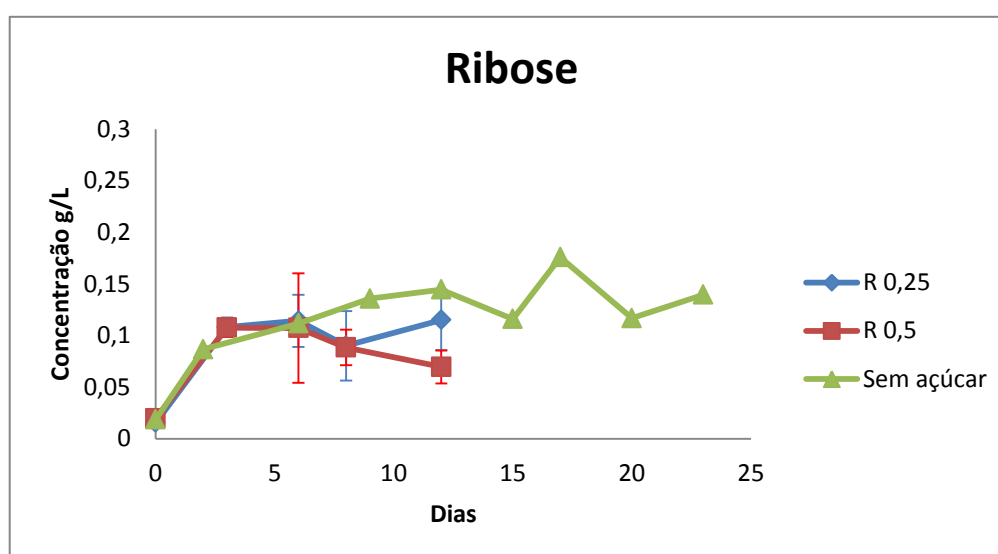
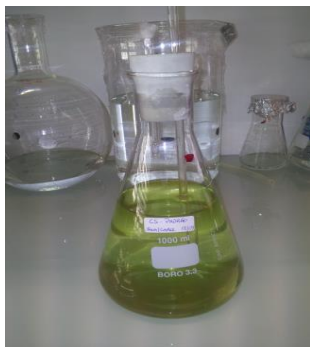


Figura 3.6- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de ribose nas concentrações de 0,25 g/L (R 0,25) e 0,5 g/L (R 0,5).

Por comparação do aspecto visual das culturas na Figura 3.7, e análise dos resultados do gráfico da Figura 3.6, verifica-se que não há diferenças significativas em termos dos efeitos da adição de ribose nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L. Nota-se que ambas as culturas se desenvolvem exponencialmente até ao dia 3, sendo que o crescimento em seguida apresenta pequenas oscilações. A ligeira diferença no aumento da concentração de biomassa da cultura à qual se adicionou 0,25 g/L de ribose poderá ser ilusória e explicada pela

presença de flocos maiores na cultura (autofloculação), o que pode ter levado a um erro significativo quando realizadas as leituras da absorvância.

Ao comparar o crescimento de ambas as culturas às quais se adicionou ribose com a cultura sem adição de açúcar não se identificam diferenças significativas, pois as mesmas apresentam níveis de concentração de biomassa semelhantes (Figura 3.6). Porém, a cultura sem a adição de açúcar possui um tempo de vida maior já que a cultura manteve um tempo de vida de 23 dias quando na presença do açúcar ribose foi aproximadamente de metade (12 dias).



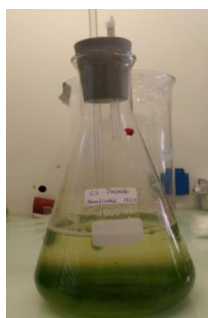
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 3.7- Aspeto das amostras dia 0 (a) sem adição de ribose, (b) com adição de 0,25 g/L de ribose e (c) com adição de 0,5 g/L de ribose; (d) dia 23 da cultura sem adição de ribose; (e) dia 12 da cultura com adição de 0,25 g/L de ribose; (f) dia 12 da cultura com adição de 0,5 g/L de ribose.

A Figura 3.8 apresenta os valores de concentração da biomassa determinados a partir dos ensaios em meio *BBM-3N* com 20% (v/v) de efluente cervejeiro, ao qual se adicionou a arabinose no início, nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L.

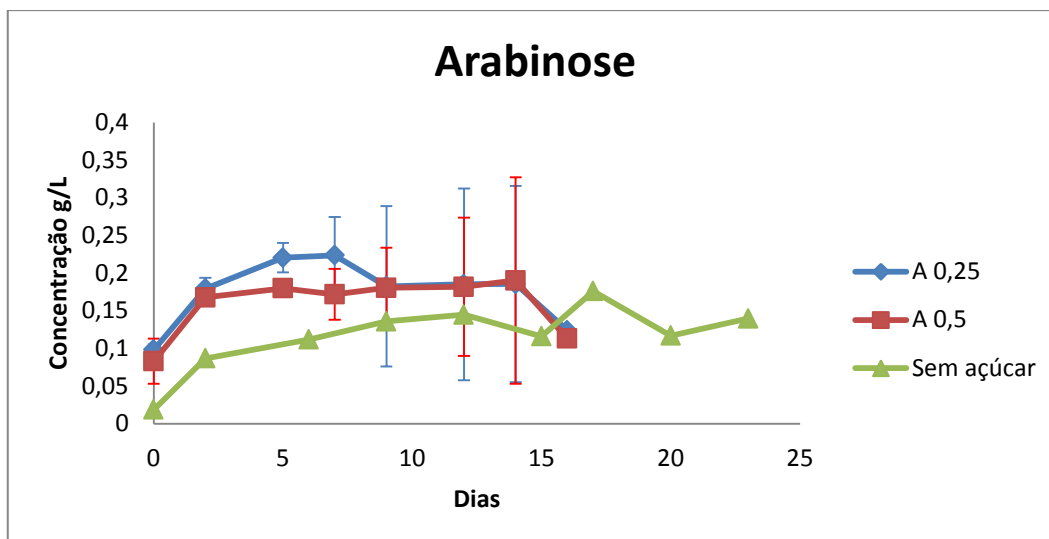


Figura 3.8- Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição de arabinose nas concentrações de 0,25 g/L (A 0,25) e 0,5 g/L (A 0,5).

Tomando apenas os valores médios da concentração de biomassa algal, verifica-se que a cultura sem adição de açúcar e na qual foram adicionados 0,25 g/L de arabinose atingiu valores mais elevados relativamente às culturas sem adição de arabinose. No entanto, comparando as culturas com adição de arabinose nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L, pode-se observar que não há diferenças significativas. Pode chegar-se a esta conclusão levando em consideração o valor mais baixo da concentração de biomassa algal da cultura à qual se acrescentou 0,25 g/L de arabinose e o valor mais alto da concentração de biomassa algal à qual se acrescentou 0,5 g/L de arabinose nos 3º e 5º dias de cultura. No entanto, como a cultura sem adição de açúcar foi feita com um inóculo substancialmente menos concentrado, não é possível garantir que a adição de arabinose potenciou o aumento da densidade da cultura de *Chlamydomonas sp.*

A partir do dia 5 observou-se que as culturas com a presença de arabinose declinaram, ou seja, foi possível observar a olho nu que as culturas ficaram amareladas, depositando-se no fundo dos erlenmeyers e formando flocos grandes (Figura 3.9).

Foi também possível verificar que as culturas com presença de arabinose apresentaram um tempo de vida menor do que a cultura sem adição de açúcar.

Os ensaios da cultura sem açúcar e das culturas às quais foi adicionado um açúcar não decorreram ao mesmo tempo e por isso há diferença nas concentrações iniciais, mas no caso da arabinose e da xilose era idêntico em termos de concentração de biomassa. Assim sendo, não será correto comparar diretamente o comportamento de todas as culturas. Porém, se cada ensaio partisse de um inóculo mais denso poderia ter atingido uma concentração de biomassa algal idêntica, adicionando ou não a arabinose. Esta análise poderá ser realizada se for adicionado, ponto a ponto, o valor correspondente à diferença entre a concentração de

biomassa algal inicial das culturas às quais foi adicionado açúcar e a da cultura à qual não foi adicionado qualquer açúcar. Essa diferença ronda os 0,8 g/L de biomassa algal.

Pode-se observar que adicionar arabinose não apresenta qualquer vantagem, em termos de aumento da concentração de biomassa ou da redução do tempo de cultivo para atingir a mesma concentração.

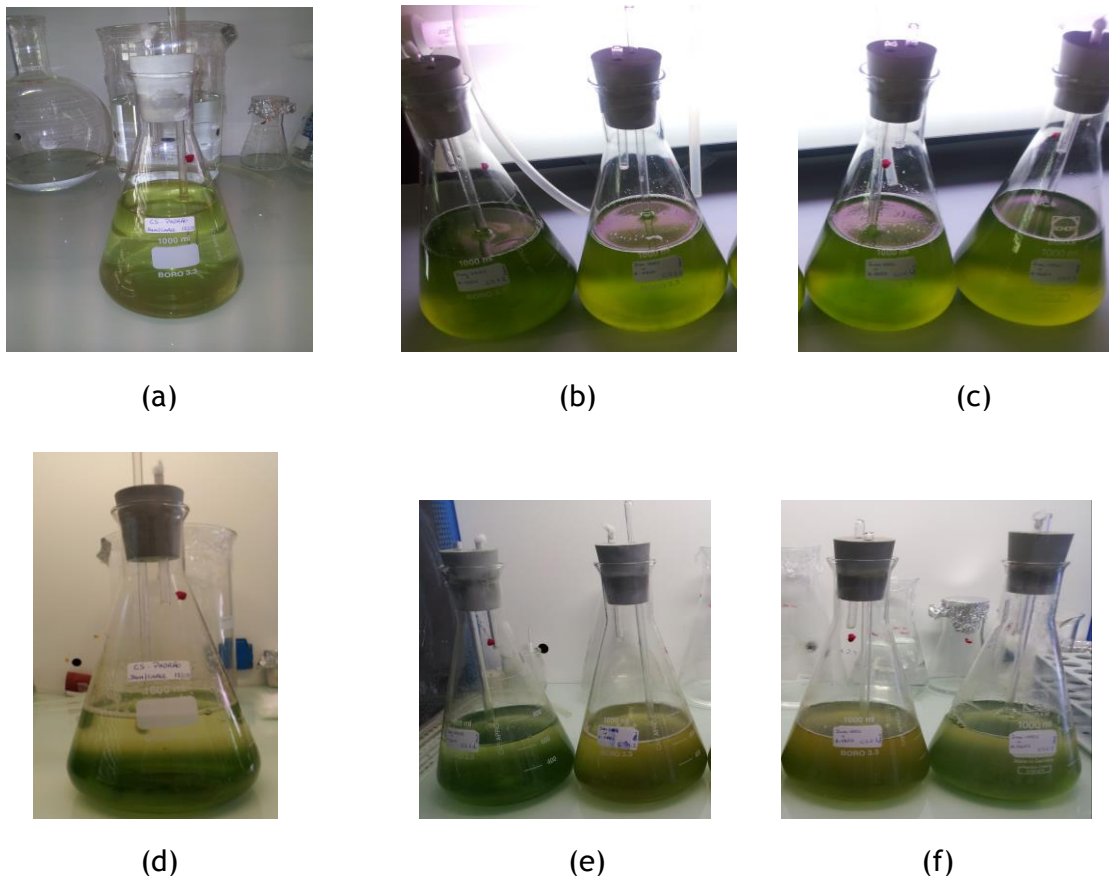


Figura 3.9- Aspeto das amostras dia 0 (a) cultura com 20% de efluente cervejeiro, (b) com adição de 0,25 g/L de arabinose e (c) com adição de 0,5 g/L de arabinose; (d) dia 15 da cultura sem adição de arabinose; (e) dia 10 da cultura com adição de 0,25 g/L de arabinose; (f) dia 10 da cultura com adição de 0,5 g/L de arabinose.

A Figura 3.10 apresenta os valores de concentração da biomassa determinados a partir dos ensaios em que se adicionou apenas na fase estacionária (FE) a xilose, a ribose e a arabinose na concentração de 0,25 g/L.

A partir dos ensaios realizados em que foram adicionados açúcares nas concentrações de 0,25 g/L e 0,5 g/L, optou-se por realizar o ensaio adicionando os mesmos açúcares apenas na fase estacionária, explorando a possibilidade do aumento da concentração de biomassa algal apenas nessa altura. Com base nos resultados previamente obtidos, decidiu-se pela adição dos açúcares na concentração de 0,25 g/L já que esta foi a que, com menor custo associado, teve

como efeito o aumento da concentração de biomassa algal, verificada essencialmente nos ensaios realizados com xilose.

Os açúcares foram adicionados quando se verificou, por análise da absorvância, que o crescimento da cultura estava desacelerando.

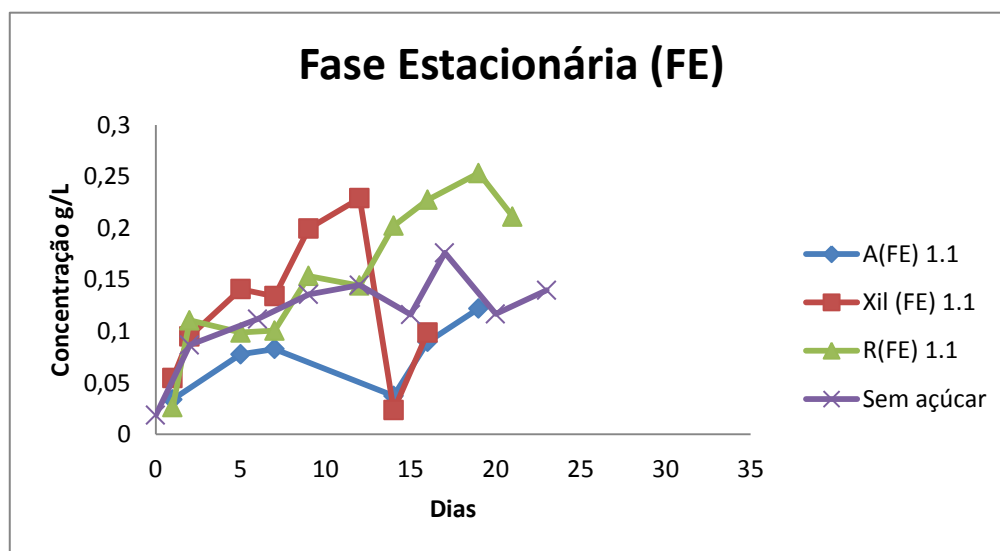


Figura 3.10 - Curva de crescimento de biomassa algal em meio com 20% de efluente cervejeiro e com adição dos respectivos açúcares na fase estacionária: arabinose (A(FE)1.1), xilose (Xil(FE)1.1) e arabinose (R(FE)1.1) na concentração de 0,25 g/L.

A arabinose foi adicionada no 14º dia de cultura. Ao adicionar a arabinose verifica-se que houve um aumento significativo da concentração de biomassa. No entanto, não se considera que este aumento seja explicado pelo crescimento efetivo da biomassa, mas pelo fato de se terem formado flocos muito grandes, o que terá causado interferência na absorvância.

A xilose foi adicionada no 12º dia de cultura. A adição de xilose na cultura revelou-se totalmente ineficaz e até prejudicial, uma vez no dia seguinte a cultura estava visivelmente degradada, com flocos grandes. A adição da xilose originou o *stress* da *Chlamydomonas sp.*, provocando a sua autofloculação.

A ribose foi adicionada no 12º dia de cultura. A adição deste açúcar foi a que melhor resultado promoveu quando comparada com as culturas suplementadas pelos demais açúcares, pois se conseguiu levar a cabo a cultura até ao dia 21. Esta cultura elevou a concentração de biomassa algal, apresentou aspeto bom a olho nu, enquanto as culturas com xilose e arabinose foram descartadas no 16º e no 19º dias, respetivamente, apresentando turbidez, flocos grandes e aparentemente a matéria microalgal degradou-se.

Conclui-se, então, analisando os resultados obtidos que a adição de xilose ou arabinose na fase estacionária não promove o aumento da biomassa algal. Por outro lado, a adição de

ribose permite uma recuperação da cultura, promovendo o aumento da concentração de biomassa algal.

No entanto, quando comparada a concentração de microalgas atingida com a suplementação de xilose desde o início ou a suplementação de ribose no 12º dia, é evidente que a adição inicial de xilose não só promoveu um aumento da concentração de microalgas mais significativo, como permitiu obter essa concentração ao fim de um tempo de cultivo substancialmente mais baixo (cerca de 10 dias).

Para verificar se em um trabalho futuro seria mais interessante a utilização de outra concentração de efluente do que a utilizada neste estudo foram então realizados ensaios com adição de efluente real em diferentes concentrações, sendo elas 5%, 10%, 20%, 30% e 40%. O gráfico da Figura 3.11 apresenta a monitorização do crescimento das culturas nos meios preparados com as diversas concentrações de efluente real.

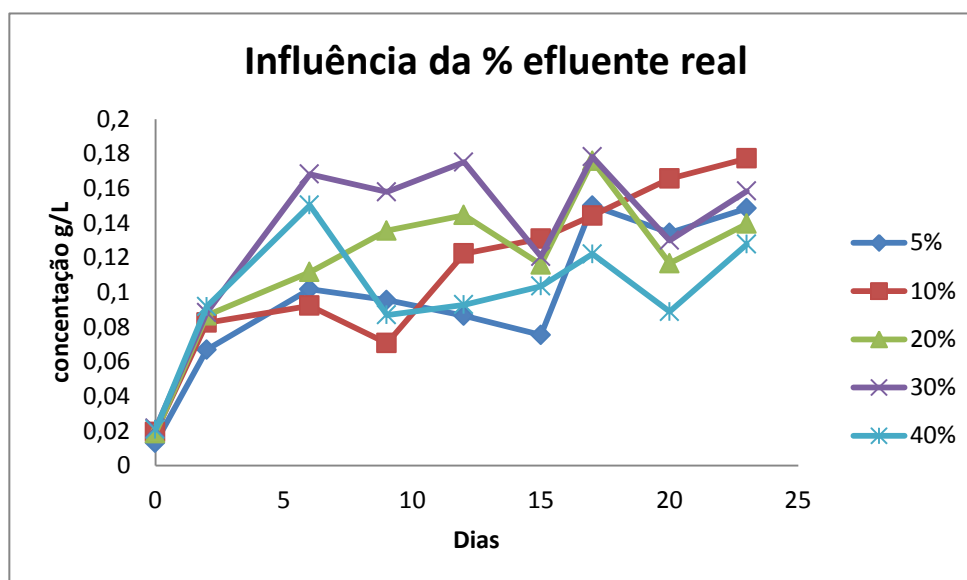


Figura 3.11- Curvas de crescimento da biomassa algal em meio BBM-3N com efluente cervejeiro em diferentes concentrações (v/v): 5%, 10%, 20%, 30% e 40%.

Ao comparar o crescimento das culturas nas diversas concentrações de efluente pode-se observar que a cultura com concentração de 5% de efluente real apresentou um crescimento rápido, porém com uma concentração de biomassa muito menor, vindo a decrescer rapidamente também e mais adiante voltando a apresentar um valor de concentração alto devido à presença de flocos grandes, que dificultavam a medição da densidade ótica. Na concentração de 10%, a cultura cresce, mas não atinge valores muito altos no início; quando a cultura parece que cresce, não apresentou bom aspeto, ou seja, esta cultura apresentou um crescimento anômalo, pois obtivemos inicialmente uma concentração aparentemente estável, mas que em seguida subiu bruscamente, podendo esse aumento ser justificado pela presença de flocos grandes, já que a cultura estava visivelmente degradada (Figura 3.12b), podendo o

meio não estar equilibrado. A cultura com concentração de 20% de efluente apresentou um crescimento regular, mantendo-se estável e a cultura com bom aspeto. Na concentração de 30%, a cultura apresentou um crescimento rápido, uma alta concentração de biomassa, porém não se manteve constante, já na concentração de 40% o crescimento não foi constante, apresentando oscilações; visualmente as culturas apresentam uma cor não muito favorável já que o aspeto do efluente é mais escuro, consequência da presença de muita matéria orgânica, ficando mais suscetíveis a contaminações.



Figura 3.12- Aspeto das culturas com diferentes concentrações de efluente real (a) dia 0 da cultura e (b) dia 23 da cultura.

Sendo o principal objetivo a obtenção da maior concentração de biomassa algal possível, deve dar-se especial atenção à sua fase exponencial.

A taxa de crescimento é representada pelo símbolo μ (Fonseca e Teixeira, 2007). Esta taxa representa a taxa de formação de biomassa por unidade de biomassa existente no biorreator e por unidade de tempo.

Geralmente, o crescimento equilibrado apresenta uma cinética equivalente a uma reação de primeira ordem, idêntica à que é apresentada na equação 1:

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

Em que,

dX/dt - Variação da concentração de biomassa em ordem ao tempo (mg.d^{-1});

X - Concentração de biomassa (mg.L^{-1});

μ - Taxa específica de crescimento (d^{-1});

t - Tempo de ensaio (d).

Na fase de crescimento exponencial, a equação 1 pode ser integrada entre X_0 e X_t , no período de ensaio em que dura a fase de crescimento exponencial. Se se considerar que a fase de crescimento exponencial se inicia no tempo t_0 e termina no tempo t , obtém-se a equação 2:

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu(t - t_0) \quad (2)$$

Em que,

X_t - Concentração de biomassa no tempo de ensaio t (mg.L^{-1});

X_0 - Concentração de biomassa no tempo de ensaio t_0 (mg.L^{-1});

μ - Taxa específica de crescimento (d^{-1});

t - Tempo de ensaio (d).

A equação 2 corresponde à linearização da equação 1 e apresenta como declive a taxa específica de crescimento.

Para os ensaios realizados com diferentes concentrações de efluente real, foi calculada a taxa de crescimento das culturas, cujos resultados se encontram na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Taxa de crescimento da microalga Chlamydomonas sp. em diferentes condições de cultivo.

Concentração de efluente (% v/v)	μ (d^{-1})
5%	0,105
10%	0,728
20%	0,053
30%	0,161
40%	0,301

Atendendo apenas à taxa de crescimento pode-se concluir que a cultura que apresentou a melhor taxa foi a cultura com concentração de 10% de efluente, porém o valor da absorvância pode ter sido deturpada devido a formação de grandes flocos, e a partir do dia 9 de cultivo a cultura começou a apresentar aspeto amarelado. Ou seja, para trabalho futuro seria preferível a utilização da concentração de 40% de efluente, pois a taxa de crescimento com esta concentração apresentou um valor de $\mu = 0,301 \text{ d}^{-1}$. Seria também aconselhável fazer leituras mais frequentes uma vez que se obteria melhor precisão matemática.

Como descrito acima a utilização de uma concentração tão elevada de efluente poderá ter como inconveniente o fato de apresentar maior carga orgânica potenciando o crescimento de outros microrganismos, especialmente se for considerada sua aplicação industrial, onde a esterilização de um efluente poderá ser inviável ou acarretar altos custos.

3.4.1 Colheita, extração e quantificação de lipídeos

Ao fim de cada período de cultivo (variando do 16º ao 21º dia de cultura), deixou-se decantar a biomassa, retirando uma parte do sobrenadante. Em seguida, a biomassa das culturas foi centrifugada (centrífuga SORVALL Superspeed Centrifuge SS-3 Automatic), a 3000 rpm durante 15 minutos, e a biomassa recolhida foi congelada para preservar as suas características, até ao momento em que fossem realizadas as extrações.

Para a extração o método utilizado foi o que melhor se adequa para pequenas quantidades, o método de Bligh e Dyer (1959) modificado (Anexo 2), utilizando metanol, clorofórmio e água (2:1:0,8, em uma primeira fase e na segunda fase as proporções de 2:2:1,8). No final obtiveram-se 3 fases contendo, a fase inferior óleo e clorofórmio (a qual devemos recuperar), a fase do meio contendo biomassa extraída e a fase superior, água e metanol, que podem ser observadas na Figura 3.13.

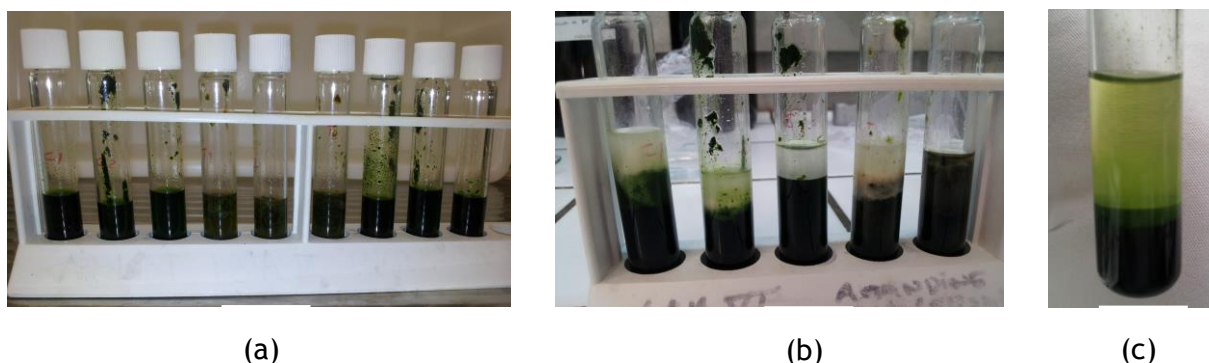


Figura 3.13- (a) Biomassa com adição de metanol, clorofórmio e água; (b) após a segunda fase de adição dos solventes de extração e ultrassons; (c) biomassa depois de centrifugar.

Na Tabela 3.4 apresenta-se o teor médio de óleo nas microalgas produzidas neste estudo.

Tabela 3.4- Teor médio de óleo na microalga *Chlamydomonas* sp.

Amostra	Teor de lipídeos
CsAq	53,5%
CsXil	25,5%
CsRib	26%
CsAra	39%

Verificou-se que a amostra CsAq cultivada em meio com 20% de efluente cervejeiro sem adição de açúcar apresentou um teor de óleo superior às amostras cultivadas com adição de açúcar. Porém a cultura com adição do açúcar arabinose (CsAra) apresentou um valor ligeiramente superior em relação às microalgas dos ensaios em que foram usados os açúcares xilose (CsXil) e ribose (CsRib).

Para se determinar o melhor resultado obtido deve-se ter em conta não apenas o teor de óleo, mas também o tempo e a concentração da cultura de onde este é extraído, devendo então calcular-se a produtividade lipídica. Esta é obtida multiplicando a concentração da cultura (mg/L) pela razão de óleo ($\text{mg}_{\text{óleo}}/\text{mg}_{\text{microalgas}}$) e dividindo pelo número de dias de cultura.

Na Tabela 3.5 estão representados os valores de produtividades lipídicas das culturas em estudo, tendo em atenção o dia de colheita, a concentração de microalgas nesse dia e a razão de óleo produzido.

Tabela 3.5- Produtividade lipídica das culturas da microalga Chlamydomonas sp avaliada no dia da colheita.

Amostra	Concentração de microalgas no dia da colheita (mg/L)	Razão de óleo ($\text{mg}_{\text{óleo}}/\text{mg}_{\text{microalgas}}$)	Dia de colheita	Produtividade lipídica ($\text{mg}_{\text{óleo}}/\text{L.d}$)
CsAq	140	0,535	23	3,26
CsXil	99	0,255	16	1,58
CsRib	211	0,260	21	2,61
CsAra	112	0,290	20	2,18

Comparando os valores de produtividade lipídica obtida verifica-se que a adição de açúcar não oferece vantagem.

Comparando apenas os valores de produtividade lipídica das culturas as quais foram adicionados os açúcares verifica-se que o melhor resultado foi obtido com a cultura a qual se adicionou a ribose, contrariando a conclusão a que se chegaria analisando apenas o teor de óleo.

Por outro lado, a biomassa algal, produzida sendo em maior quantidade poderá ser utilizada como matéria-prima para outros tipos de energia por exemplo para bioetanol ou biogás, ou para aproveitamento de outros compostos por exemplo para pigmentos.

Para se tirar maior partido da biomassa cultivada a colheita para a extração deveria ser feita no ponto máximo de concentração das culturas. Assim sendo, fez-se uma estimativa da produtividade lipídica das culturas tendo em atenção o dia de concentração máxima da biomassa, estando estes resultados descritos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6- Estimativa da produtividade lipídica das culturas da microalga Chlamydomonas sp. avaliada no ponto de maior concentração das culturas.

Amostras	Concentração máxima de microalgas (mg/L)	Dia de maior concentração de biomassa	Razão de óleo ($\text{mg}_{\text{óleo}}/\text{mg}_{\text{microalgas}}$)	Produtividade lipídica ($\text{mg}_{\text{óleo}}/\text{L.d}$)
CsAq	176	17	0,535	5,54
CsXil	229	12	0,255	4,87
CsRib	253	19	0,260	3,46
CsAra	122	19	0,290	1,86

Por análise dos resultados obtidos verifica-se mais uma vez que a cultura sem adição de açúcar (CsAq) apresenta maior produtividade lipídica. Nas culturas com adição de açúcar o melhor resultado foi obtido nas culturas com adição de xilose.

3.4.2 Transesterificação e Análises de ésteres

Para a transesterificação dos lípidos extraídos utilizou-se o método de Lepage e Roy (1984) utilizado por Abou-Shanab et al. (2011) ligeiramente modificado (Anexo 2), que consiste na redissolução dos lípidos extraídos através da mistura de clorofórmio/metanol (2:1), seguida da adição de metanol e ácido sulfúrico 95-97%, reagente e catalisador de transesterificação, respetivamente de acordo com a quantidade adequada à massa de óleo disponível.

Os ésteres foram então analisados por cromatografia gasosa (GC Dani, GC 1000 DPC, com FID e coluna para FAME's/FAEE's AT-WAX), usando um padrão interno de metil-heptadecanoato com uma concentração de 10,256 mg/mL. A preparação das amostras foi feita segundo a norma EN ISO 14103 (2003). Fez-se a injeção de 0,2 μL de amostra diluída, a 250 °C, tendo-se usado o hélio como gás de arraste a um caudal de 1 mL/min.

Por comparação com os tempos de retenção dos padrões adequados, cuja injeção foi feita previamente (ver Anexo 4) foi possível identificar os picos correspondentes a diferentes ésteres.

Na Tabela 3.7 são apresentados os teores dos ésteres identificados.

Tabela 3.7- Teor de ésteres totais no óleo da microalga *Chlamydomonas* sp.

Amostra	Teor de ésteres (%)
CsAq	22,8
CsXil	19,1
CsRib	22,5
CsAra	7,7

Os ésteres identificados são considerados existentes na composição média do biodiesel, sendo que o palmitato (C16:0) é o mais significativo no biodiesel obtido a partir da biomassa cultivada sem adição de açúcar e com presença do açúcar xilose, ribose e arabinose (29,1%, 27,8%, 18,3% e 16,9%, respetivamente).

De acordo com os requisitos para a qualidade do biodiesel (EN 14214:2003) é necessário que este apresente um teor de linolenato inferior a 12% (m/m) o que se verifica nas amostras em que este éster está presente.

Sendo assim a adição dos açúcares não oferece vantagem quanto à produção de biodiesel já que a amostra sem a presença de açúcar apresentou um resultado ligeiramente maior do que com a adição dos açúcares.

Apresentam-se de seguida os cromatogramas relativos à análise dos ésteres do biodiesel produzido através do óleo extraído das culturas com adição de açúcar xilose (Figura 3.17), arabinose (Figura 3.14) e ribose (Figura 3.16) e na Figura 3.15 o cromatograma relativo à análise dos ésteres no biodiesel produzido através do óleo extraído da cultura sem adição de açúcar.

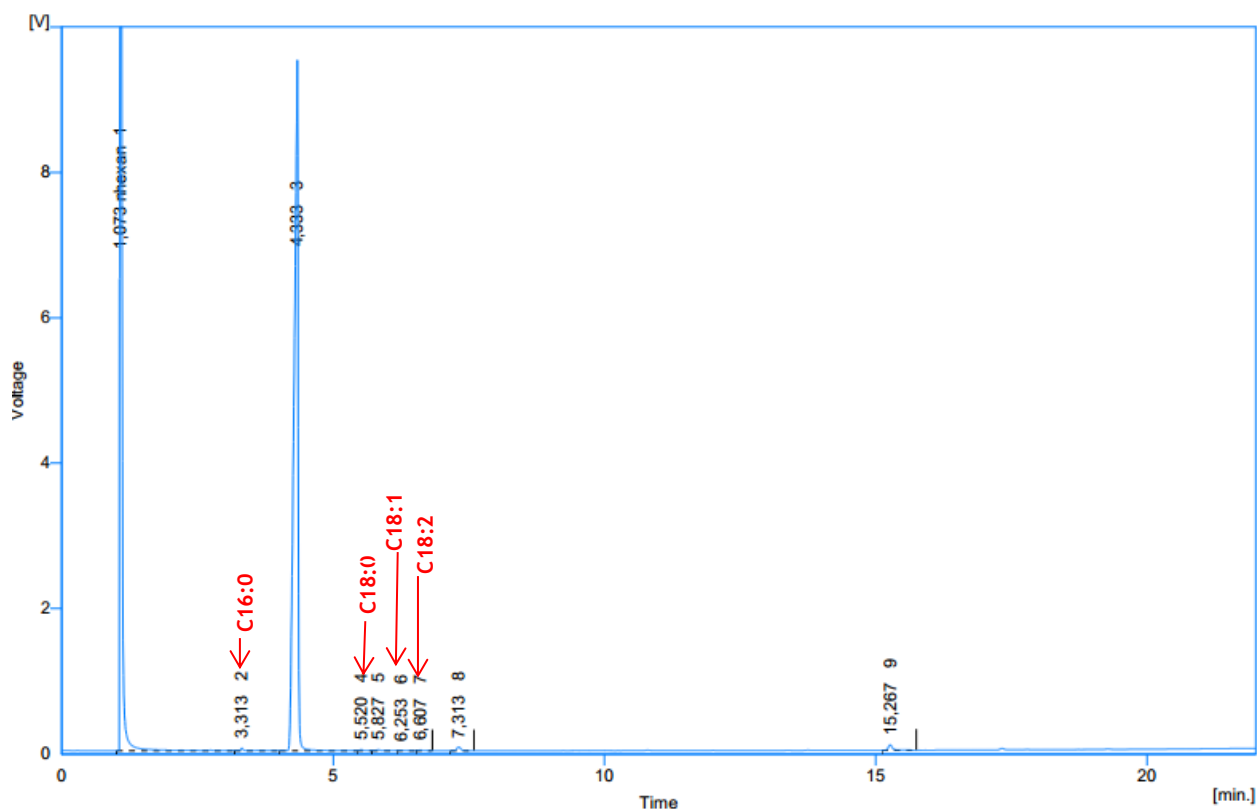


Figura 3.14- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da *Chlamydomonas* sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de arabinose.

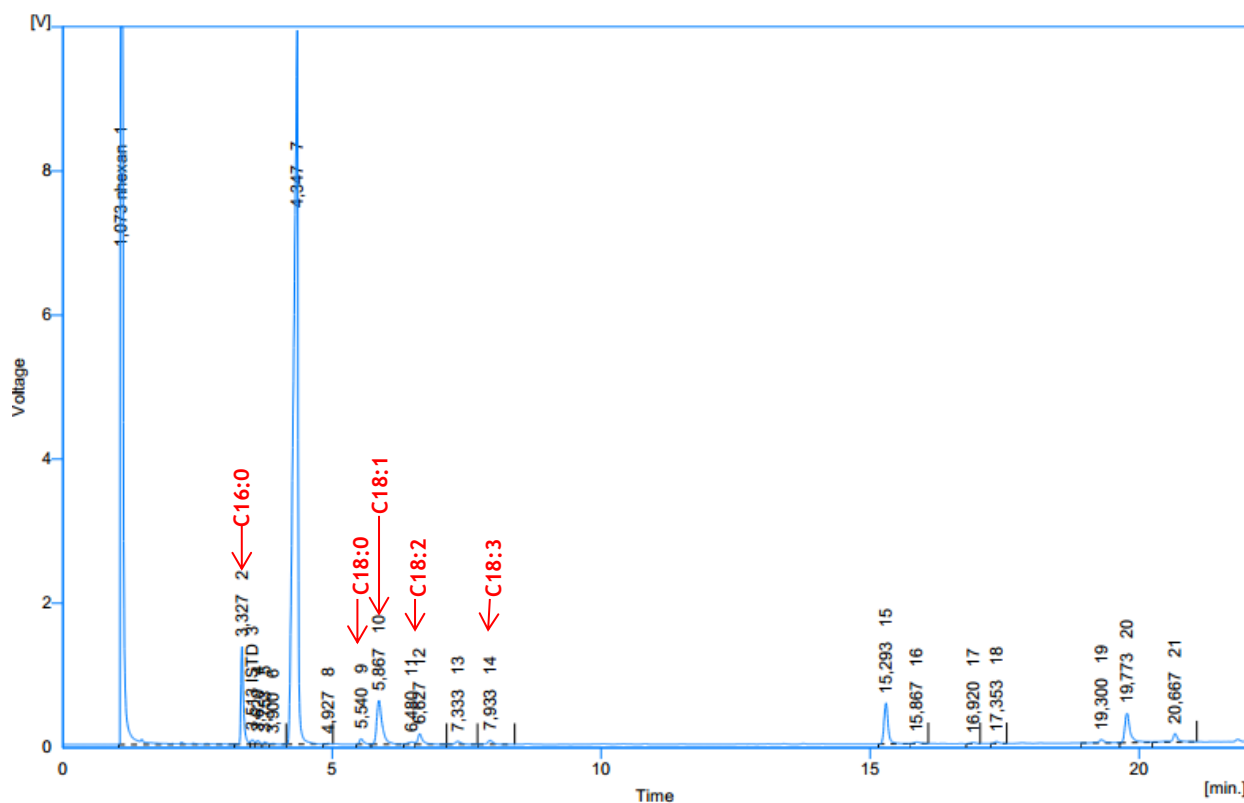


Figura 3.15- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da *Chlamydomonas* sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro sem adição de açúcar.

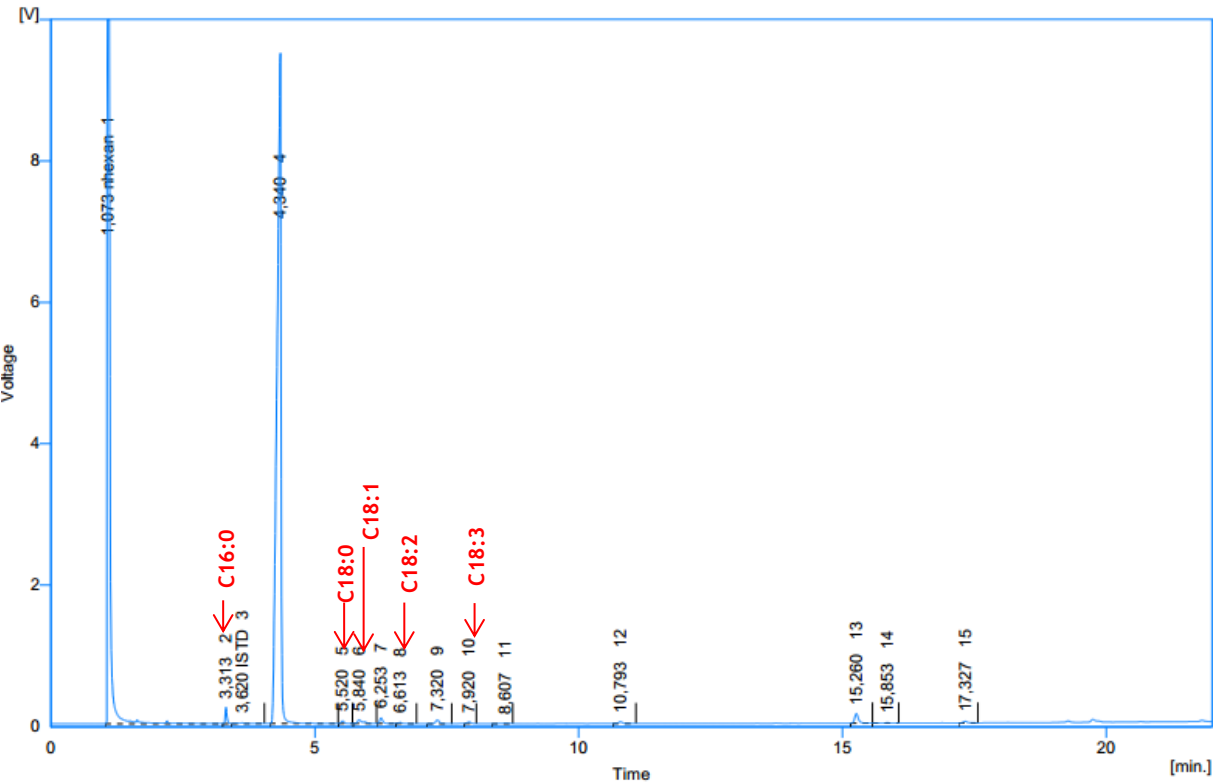


Figura 3.16- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da *Chlamydomonas* sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de ribose.

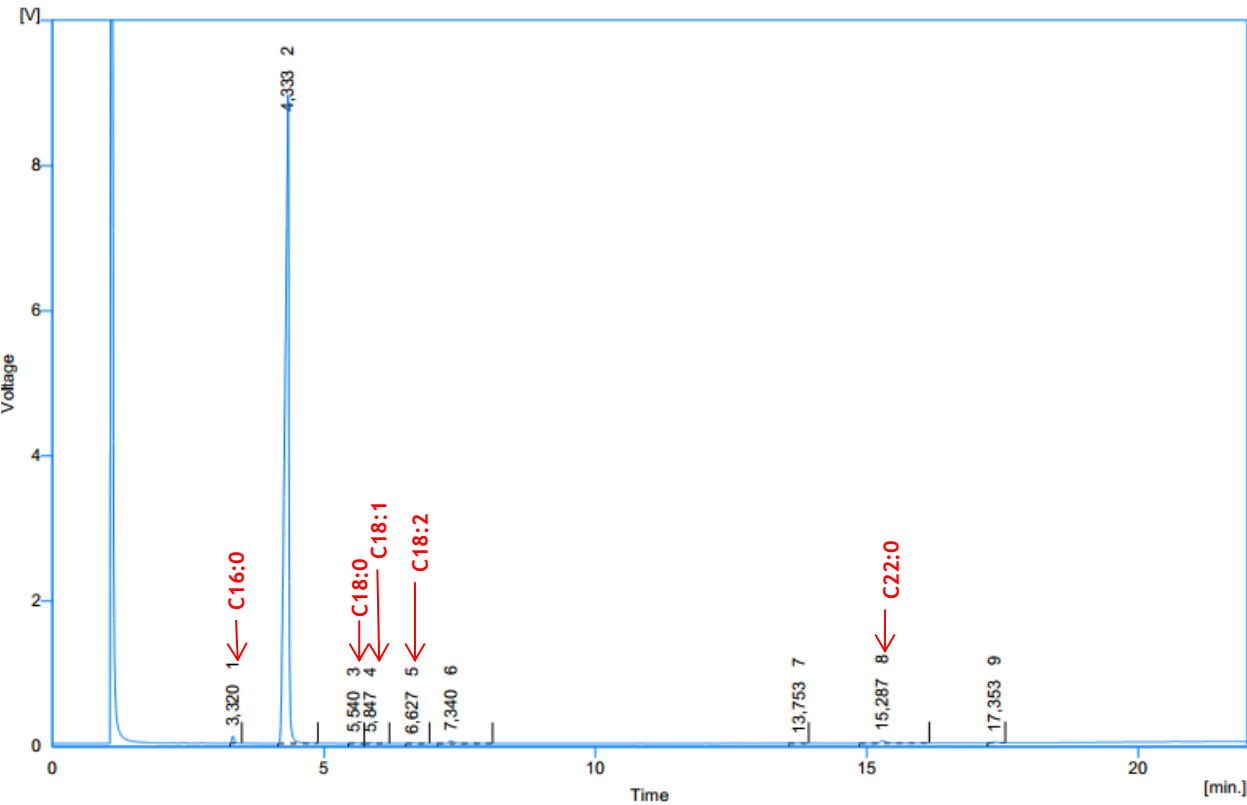


Figura 3.17- Cromatograma do biodiesel produzido com óleo extraído da *Chlamydomonas* sp. cultivada em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro com adição de xilose.

4 Conclusões

Pode-se concluir, com a realização deste trabalho, que:

- A cultura em meio BBM-3N com 20% de efluente cervejeiro apresentou um crescimento contínuo e estável e, das culturas com adição de açúcar xilose, arabinose ou ribose, a cultura com adição de xilose a 0,25 g/L foi aquela que promoveu maior concentração de biomassa algal num menor espaço de tempo (0,678 g/L ao fim de 10 dias);
- A adição de açúcar xilose potencia o crescimento de biomassa, sem contudo potenciar o aumento do teor lipídico;
- No estudo do cultivo nas diferentes concentrações de efluente (5%, 10%, 20%, 30% e 40%), aparentemente a que apresentou melhor crescimento foi a cultura com 40% de efluente. Porém esta poderá não ser a melhor escolha já que o meio apresentava uma cor escura, maior carga orgânica e está mais suscetível a contaminações;
- Por análise das taxas de crescimento (μ), o mais coerente seria a utilização do meio de cultura com concentração de 40% de efluente, pois este apresentou um valor de $\mu = 0,301d^{-1}$. De qualquer modo seria aconselhável fazer leituras mais frequentes uma vez que em termos de resultados se obteria melhor precisão matemática;
- O teor de óleo produzido a partir da cultura sem adição de açúcar foi de 53,5% e o teor de óleo obtido a partir das culturas com adição do açúcar xilose, ribose e arabinose foi de 25,5%, 26,0% e 39,0%, respetivamente;
- A análise aos ésteres de óleo de microalga cultivada com ausência de açúcar revelou que o predominante é o palmitato (29,1%), e com adição dos açúcares xilose, ribose e arabinose verificou-se que o predominante também é o palmitato (27,8%, 18,3% e 16,9% respetivamente). Estão também presentes o oleato, linolato e estearato.

4.1 Objetivos Realizados

Com este trabalho foi possível elaborar a curva de crescimento da microalga *Chlamydomonas* sp. em meio BBM-3N com efluente cervejeiro em diferentes concentrações. Foi possível testar a adição de alguns dos açúcares disponíveis por valorização do subproduto (drêche) da indústria cervejeira como fonte extra de carbono para o crescimento das microalgas.

Da biomassa cultivada nas diferentes condições de ensaios, foram extraídos os lipídeos por um método utilizando co-solventes, a seguir foram quantificados e posteriormente foram transesterificados e avaliado o perfil dos ésteres por cromatografia gasosa.

4.2 Trabalho Futuro

Propõe-se, em trabalhos futuros:

- Realizar o estudo com outras espécies de microalgas;
- Estudar o comportamento da *Chlamydomonas sp.* em meio com adição de outros açúcares ou outros compostos como fonte de carbono;
- Avaliar o consumo por parte das microalgas dos vários compostos existentes no efluente cervejeiro (nomeadamente CQO, N e P);
- Otimização das condições de cultivo das microalgas em efluente cervejeiro com adição de outra fonte de carbono (por exemplo CO₂) para uma utilização em maior escala.

4.3 Apreciação final

O desenvolvimento de um estudo como este do ponto de vista económico-ambiental é de grande importância, já que as microalgas apresentam grande potencial quando se fala em energias renováveis.

Referências

- Abou-Shanab, R.A.I., Hwang, J.H., Cho, Y., Min, B., Jeon, B.H. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. *Applied Energy*, **88**: 3300-3306 (2011).
- Adam, F., Albert-Vian, M., Peltier, G., Chemat F. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresour. Technol.* **114**: 457-465 (2012).
- Aliyu, S., Bala, M. Brewer’s spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, **10**(3):324-331, 2011.
- Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*, **88**(10): 3402-3410 (2011).
- ANP - Agência Nacional de Petróleo, 2012. *Produção de Biodiesel no Brasil*. Acessado em 12/04/2013: <http://www.anp.gov.br/>
- APCV, Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja. *Produção de Cerveja Nacional* (2011). Acessado em 01/06/2013: <http://www.apcv.pt/apcv.php?op=15>
- Arredondo, B.O., Vázquez-Duhalt, R. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. **17**: 99-111 (1991).
- Benemann, J. R. Microalgae products and production: an overview. *Journal of Industrial Microbiology*, **31**(5): 247-256 (1990).
- Bertoldi, F.C., Sant’anna, E., Oliveira, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. *B.CEPPA*, Curitiba **26**(1): 9-20 jan/jun (2008).
- Bligh, G., Dyer, W. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**(8): 911-917 (1959).
- Borowitzka, M.A. Algal biotechnology products and processes. Matching science and economics. *J. Appl. Phycol.* **4**: 267-279 (1992).
- Bosma, R., van Spronsen, W.A., Tramper, J., Wijffels, R.H. Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae. *Journal of Applied Phycology*, **15**(2-3): 143-153 (2003).
- Brächer, E.H., Freitas, B.C.B., Morais, E.G., Costa, J.A.V. Cultivo mixotrófico de *Spirulina paracas* utilizando pentoses como fonte de carbono e determinação de

proteínas. *XX Congresso de Iniciação Científica| III Mostra Científica da Universidade Federal de Pelotas*, Brasil (2011).

- Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(2): 557-577 (2010).
- Brito, A., Peixoto, J., Oliveira, J., Oliveira, J., Costa, C., Nogueira, R., Rodrigues, A. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry - Brewery and Winery Wastewater Treatment: Some Focal Points of Design and Operation*, Vasso Oreopoulou e Winfried Russ Editors, (2006).
- Camargos, R. *Avaliação da viabilidade de se produzir Biodiesel através da transesterificação de óleo de grãos de café defeituosos*. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia da UFMG. Belo Horizonte-Brasil (2005).
- Canakci, M., Van Gerpen, J. Biodiesel Production via Acid Catalysis, *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **42**(5), 1203-1210 (1999).
- Cantrell, K. B., Ducey, T., Ro, K. S., Hunt, P. G. Livestock waste to bioenergy generation opportunities. *Bioresour. Technol.*, **99**:7941-7953 (2008).
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* **26**: 126-131, (2008).
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**(3): 294-306 (2007).
- Chisti, Y., Yan, J. Energy from algae: Current status and future trends: Algal biofuels- A status report. *Applied Energy* **88**(10): 3277-3279 (2011).
- Cordero, B., Voltolina, D. Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. *Aquacultural Engineering*, **16**(4): 205-211 (1997).
- Costa, J.A.V., Morais, M.G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, **102**: 2-9 (2011).
- Csordas, A., Wang, J.K. An integrated photobioreactor and foam fractionation unit for the growth and harvest of *Chaetoceros spp.* in open systems. *Aquacultural Engineering*, **30**(1-2): 15-30 (2004).
- Danquah M.K., Gladman, B., Moheimani, N., Forde, G.M. Microalgal growth characteristics and subsequent influence on dewatering efficiency. *Chemical Engineering Journal*, **151**(1-3): 73-78 (2009).

- Day, A.G., Brinkmann, D., Franklin, S., Espina, K., Rudenko, G., Roberts, A., Howse, K.S. Safety evaluation of a high-lipid algal biomass from *Chlorella protothecoides*. *Regul Toxicol Pharmacol* **55**(2): 166-180 (2009).
- Desmorieux H, Decaen N. Convective drying of *Spirulina* in thin layer. *Journal of Food Engineering*, **66**(4): 497-503 (2005).
- Dismukes, G.C., Damian, C., Bennet, N., Ananyey, G.M., Posewitz, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 235-240 (2008).
- Driessen, W., Vereijken, T. *Recent developments in biological treatment of brewery effluent*, The Institute of Guild of Brewing Convention, Livingston, Zambia, Março 2-7, (2003).
- Duarte, J.H., Ávila, A.L., Oliveira, E.G., Pinto, L.A.A. Avaliação da cinética de secagem e reidratação da microalga *Spirulina Platensis*. *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil (2009).
- EBB - European Biodiesel Board, 2013. *Biodiesel*. Acessado em 10/04/2013: <http://www.ebb-eu.org/members.php>
- Eurobserv'er. Biofuels barometer - Systèmes solaires. *Le journal des énergies renouvelables* 210, Juillet 2012. URL: <http://www.eurobserv-er.org/pdf/baro210.pdf> (acedido 20/05/2013).
- Feng, Y., Wang, X., Logan, B; E., Lee, H. Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **78**: 873-880 (2008).
- Fonseca, M., Teixeira, J. *Reactores Biológicos*, 1ª edição, Lisboa, Lidel - edições técnicas, Lda (2011).
- Freedman, B., Pryde, E.H., Mounts, T.L. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal American Oil Chemical Society* **61**(10): 1638-1643 (1984).
- Gerpen, J.V. Biodiesel Processing and Production. *Fuel Processing Technology*, **86**(10): 1097-1107 (2005).
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N. and Steyer, J.P. Review: Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: Focus on cultivation and biofuel production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **6**(1): 105-113 (2012).
- Gouveia, L. e Oliveira, A. Microalgae as raw materials for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **36**: 269-274 (2009).

- Gouveia, L., 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer, 68 pp.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *Journal of the Royal Society Interface*, 7:703-726 (2010).
- Griffiths, Erick W. *Removal and Utilization of Wastewater Nutrients for Algae Biomass and Biofuels*, All Graduate Theses and Dissertations, Paper 631, Utah State University (2009).
- Grima, E., M. Belarbi, E.-H., Fernández, F.G.A., Medina, A.R., Chisti, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics, *Biotechnology Advances*, 20(7-8), 491-515 (2003).
- Grima, E.M., Medina, A.R., Giménez, A.G., Perez, J.A.S., Camacho, F.G., Sanchez, J.L.G. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. *JAOCs*, 71(9): 955-959 (1994).
- Guelcher, S.A., Kanel, J.S. *Method for dewatering microalgae with a bubble column*, US Patent 5910254 - Filed Dec. 20, 1996 (1999).
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M., Webley, P. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102: 178-185 (2011).
- Harris, E. H. *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, Volume 1, 2nd Edition, Elsevier Oxford, United Kingdom (2009).
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Soushames, T., Foulkes, L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. *Aquaculture Research*, 31(8-9): 637-659 (2000).
- Heineken Brasil. *O processo de produção de cerveja* (2012). Acessado em 03/06/2013: <http://www.heinekenbrasil.com.br/?Curiosidades-O-passo-a-passo-da-producao-cervejeira>
- Hernández, A.G., Vázquez-Duhalt, R., Saavedra, M.P.S., Carreón, L.S., Jiménez, A.M. Biodiesel a partir de Microalgas. *BioTecnología*, 13(3): 38-61 (2009).
- Howard, E.E., Alianell, G.A., Riding, T.J., Barile, P.J., Foster, T.R. *Systems and methods for large scale production and harvesting of oil-rich algae*, US Patent No. US 2008/0096267A1 (2008).
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639 (2008).

- Huang, C.W., Hung, Y.I. Brewery wastewater treatment by contact oxidation process. *Proc. of the 41st Industrial Waste Conference*, May, Purdue University, pp. 90-98, Lewis Publishers, Chelsea, MI (1987).
- Huntley, M.E., Redalje, D.G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12: 573-608 (2007).
- Júnior, R.M.C. *Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do biodiesel de microalga por metanólise in situ*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil (2010).
- Knuckey, R.M., Brown, M.R., Robert, R., Frampton, D.M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3): 300-313 (2006).
- Koopman, B., Lincoln, E.P. Autoflotation Harvesting of Algae from High-Rate Pond Effluents. *Agricultural Wastes*, 5(4): 231-246 (1983).
- Kurano, N., Ikemoto, H., Miyashita, H., Hasegawa, T., Hata, H., Miyachi, S. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. *Energy Convers. Mgmt.* 36(6-9): 689-692 (1995).
- Kurano, N., Miyachi, S. Selection of microalgal growth model for describing specific growth rate-light response using extended information criterion. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4): 403-408 (2005).
- LeClair, B. P. Performance monitoring program - Molsons brewery deep shaft treatment system. *Proc. of the 9th Industrial Waste Conference*, May, Purdue University, pp. 256-268, Butterworth Publishers, MA (1984).
- Lepage, G., Roy, C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research*, 25: 1391-1396 (1984).
- Levin G. V., Clendenning J.R., Gibor A., Bogar F.D. Harvesting of Algae by Froth Flotation. *Applied Microbiology*, 10(2): 169-175 (1962).
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., Dubois-Calero, N. Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4): 815-820 (2008).
- López, M.C. G-M, Sánchez, E. D. R., López, J.L.C., Fernández, F.G. A., Sevilla, J.M.F., Rivas, J., Guerrero, M.G., Grima, E. M. Comparative analysis of the outdoor culture of

- Haematococcus pluvialis* in tubular and bubble column photobioreactors, *Journal of Biotechnology*, **123**(3): 329-342 (2006).
- Lourenço, S.O. *Variação da composição bioquímica de microalgas marinhas em cultivos, com ênfase nos efeitos da disponibilidade do elemento nitrogênio*. Dissertação de doutoramento. Instituto Oceanógrafo da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (2006).
 - Ma, F.; Hanna, M. A. Biodiesel Production: a review. *Bioresource Technology*. **70**(1): 1-15 (1999).
 - Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**(1): 217-232 (2010).
 - Matthews, H.D., Caldeira K. Stabilizing climate requires near-zero emissions. *Geophys Res Lett* **35**(4): L04705 (2008).
 - Moraes, E.G., Bracher, E.H., Freitas, B.C.B., Costa, J.A.V., Atala, D.I.P. Cultivo mixotrófico e determinação de carboidratos de *Dunaliella Salina* utilizando pentoses como fonte de carbono. Apresentado em XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro, Brasil (2012).
 - Moura, R.F. *Otimização das etapas de pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática da drêche cervejeira a açúcares com vista à produção de bioetanol*. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (2012).
 - Muliterno, A., Mosele, P.C., Costa, J.A.V., Hemkemeier, M., Bertolin, T.E., Colla, L.M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina Platensis* em batelada alimentada. *Ciência e Agrotecnologia*, **29**(6): 1132-1138 (2005).
 - Murzin, D., Salmi, T. Catalysis for Lignocellulosic Biomass Processing: Methodological Aspects. *Catal. Lett.* **142**(6):676-689, 2012.
 - Mussato, S., Dragone, G., Roberto, I. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potencial applications - Review. *Journal of Cereal Science*, **43**(1):1-14, 2006.
 - Nagle, N., Lemke, P. Production of methyl ester fuel from microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **24-25**(1): 355-361 (1990).
 - Neto, P.R.C., Rossi, L.F.S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. *Química Nova*, **23**(4): 531-537 (2000).

- Nichols, H.W. and Bold, H.C. *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. Nov. J. Phycol. 1: 34-8 (1965).
- Oh, H.M., Lee, S.J., Park, M.H., Kim, H.S., Kim, H.C., Yoon, J.H., Kwon, G.S., Yoon, B.D. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49, *Biotechnology Letters*, 23(15): 1229-1234 (2001).
- Oliveira, O.S.B.C. *Otimização da produtividade lipídica da microalga Arthrospira Platensis como matéria-prima para biocombustíveis*. Tese de mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, Julho de 2009.
- Parente, E.J.S. *Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado*. Tecbio, Fortaleza, Brasil, 2003.
- Pérez, H.E.B. *Biodiesel de Microalgas*. Parte I. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN. São Paulo, p. 1-19. (2007) Acessado em 6/4/2013: www.energiaverde.com.br
- Poelman, E., DePauw, N., Jeurissen, B. Potential of electrolytic flocculation for recovery of microalgae. *Resources Conservation and Recycling*, 19(1): 1-10 (1997).
- Portal do Biodiesel, 2011. *Programa Nacional do Biodiesel*. Acessado em 12/04/2013: <http://www.biodieselbr.com>
- Raposo, M. F. J., Oliveira, S. E., Castro, P. M., Bandarra, N. M., Morais, R. M. On the Utilization of Microalgae for Brewery Effluent Treatment and Possible Applications of the Produced Biomass, *The Institute of Brewing & Distilling*, 116(3): (2010).
- Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Black Well Science (2004).
- Rodolfí, L., Zittelli, G., Bassil, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102: 100-112 (2009).
- Rodrigues A.C., Brito A.G., Melo L.F. Posttreatment of a brewery wastewater using a sequencing batch reactor. *Water Environ Res.*, 73(1): 45-51 (2011).
- Rodrigues, J.B.R., Filho, P.B. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinicultura enriquecido com uréia, *Biotemas*, 17(2): 7-26 (2004).

- Rossignol, N., Lebeau, T., Jaouen, P., Robert, J.M. Comparison of two membrane-photobioreactors, with free or immobilized cells, for the production of pigments by a marine diatom. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **23**(5): 495-501 (2000).
- Scragg, A.H, Illman, A.M., Carden, A., Shales, S.W. Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor, *Biomass and Bioenergy*, **23**(1): 67-73 (2002).
- Sebrae. *Biodiesel*, 1ª edição. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, Brasília, Brasil, abril de 2007.
- Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P. *A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program - biodiesel from algae*. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p. (1998) www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf (acedido em 02/06/2013)
- Sierra, E., Ación, F.G., Fernández, J.M., García, J.L., González, C., Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae, *Chemical Engineering Journal*, **138**(1-3): 136-147 (2008).
- Sim, T.S., Goh, A., Becker, E.W. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. *Biomass*, **16**(1): 51-62 (1988).
- Smith, V.H., Sturm, B.S.M. et al. The ecology of algal biodiesel production. *Trends in Ecology & Evolution* **25**(5): 301-309 (2010).
- Sobczuk, T.M., Chisti, Y. Potential fuel oils from the microalga *Choricystis minor*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **85**(1): 100-108 (2010).
- Song, D., FU J., Shi D. Exploitation of oil-bearing microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, **24**(3): 341-8 (2008).
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**(2): 87-96 (2006).
- Tam, K., Yang, C.H., Matsumoto, M. R., Crowley, D.E., Sheppard, J.D. Comparison of PCR-DGGE and selective plating methods for monitoring the dynamics of a mixed culture population in synthetic brewery wastewater, *Biotechnol. Prog.*, **21**(3): 712-719 (2005).
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F., Rincón, B. Assessment of a microalgae pond for post treatment of the effluent from an anaerobic

fixed bed reactor treating distillery wastewater, *Environmental Technology*, **29**(9): 985- 992 (2008).

- Ugwo, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology*, **99**(10): 4021-4028 (2008).
- Unicer. *O processo de produção de cerveja*. Acedido a 05/06/2013 em: http://www.unicer.pt/fotos/gca/1118251879brochura_cerveja.pdf
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **79**(5): 707-718 (2008).
- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., Nelson, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock, *Journal of Environmental Engineering*, **135**(11): 1115-1122 (2009).
- Zhang, X. W., Zhang, Y. M., Chen, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, **34**: 477-481 (1999).

Anexo 1 Composição do meio de cultura *BBM-3N*

Na Tabela A1.1 apresenta-se a descrição da composição do meio de cultura que foi usado como base na formulação dos meios usados neste trabalho. Este meio de cultura difere do meio *Bold Basal Medium* (BBM) convencional (Nichols, 1965) pelo fato de ter na sua composição o triplo da quantidade de N da formulação original.

Tabela A1.1- Composição do meio de cultura Bold Basal Medium with 3-fold Nitrogen, modified (BBM-3N).

	Reagente	Concentração na solução (g/L)	Volume de solução (mL/L _{meio})
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	15,00	5,0
	KH ₂ PO ₄	35,00	5,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	15,00	5,0
	NaNO ₃	75,00	10,0
	CaCl ₂ .2H ₂ O	5,00	5,0
	NaCl	5,00	5,0
	EDTA-Na ₂ + KOH	50,00+31,00	1,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O + H ₂ SO ₄	4,98+1,00 mL	2,0
	H ₃ BO ₃	11,42	1,0
Micronutriente	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,412	0,5
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,232	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,252	
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,080	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,192	
	H ₂ O destilada		961,0

Na Tabela A1.2 apresenta-se a descrição da composição do meio de cultura *Bold Basal Medium* (BBM).

Tabela A1.2- Composição do meio de cultura *Bold Basal Medium* (BBM).

	Reagente	Concentração na solução (g/L)	Volume de solução (mL/L _{meio})
Macronutriente	K ₂ HPO ₄	15,00	5,0
	KH ₂ PO ₄	35,00	5,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15,00	5,0
	NaNO ₃	25,00	10,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	5,00	5,0
	NaCl	5,00	5,0
	EDTA-Na ₂ + KOH	50,00+31,00	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O + H ₂ SO ₄	4,98+1,00 mL	1,0
	H ₃ BO ₃	11,42	1,0
Micronutriente	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82	1,0
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57	
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49	
	MoO ₃	0,71	
	H ₂ O destilada		961,0

Anexo 2 Procedimentos

EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

A extração dos lipídeos contidos nas microalgas foi feita usando o método de Bligh and Dyer (1959) modificado, que se descreve de seguida:

- 1) Pesagem da biomassa num tubo utilizável na centrífuga
- 2) Adição dos solventes na proporção (1;2;0,8), respetivamente, clorofórmio, metanol e água

(Nota: nesta fase não é necessário adicionar água uma vez que a biomassa é húmida, sendo necessário determinar a quantidade de água).

- 3) Levar ao aparelho de ultrassons (Baldelin Sonorex TK30) durante 30 minutos
- 4) Adição dos solventes na proporção (2;2;1,8), respetivamente, clorofórmio, metanol e água
- 5) Levar ao aparelho de ultrassons (Baldelin Sonorex TK30) durante 30 minutos
- 6) Centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos (centrífuga ECCO Tvp 25 Nr 8601)

(Nota: a esta altura formam-se 3 fases: a superior rica em água e metanol, a intermediária constituída por biomassa e a inferior rica em clorofórmio e lípidos)

- 7) Descarte da fase superior
- 8) Recuperação da fase inferior para um tubo de vidro previamente pesado
- 9) Evaporação do clorofórmio (ao ar)
- 10) Pesagem do tubo para quantificação os lipídeos

ESTERIFICAÇÃO

Os óleos extraídos são convertidos em ésteres metílicos usando o método descrito por Lepage e Roy (1986), modificado de acordo com a descrição seguinte:

- 1) Redissolução dos lípidos extraídos: para 10 mg de óleo, adição de 2 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) (Adição da quantidade adequada à massa de óleo disponível)
- 2) Adição de metanol e ácido sulfúrico 95-97%, reagente e catalisador de transesterificação, respetivamente: para 10 mg de óleo adição de 1mL de metanol e

0,3 mL de ácido sulfúrico. (Adição da quantidade adequada à massa de óleo disponível)

- 3) Roscar a tampa. Agitação vigorosa durante 5 minutos
- 4) Pesagem do tubo com a mistura
- 5) Reação durante 10 minutos a 100°C (digestor ECO 16 Thermoreactor Velp Scientifica)
- 6) Adição de 1 mL de água para separação de fases
- 7) Agitação

(Nota: por adição de água formam-se duas fases, a superior rica em água, metanol e ácido sulfúrico, e a inferior rica em clorofórmio e ésteres).

- 8) Descarte da fase superior
- 9) Adição de 1 mL de água para lavagem
- 10) (Separação das fases)
- 11) Descarte da fase superior
- 12) Adicionar 1 mL de água para lavagem
- 13) Filtrar a fase inferior com um filtro com poro 0,26 µm (com o auxílio de uma seringa)
- 14) Deixar evaporar o clorofórmio, em hotte.

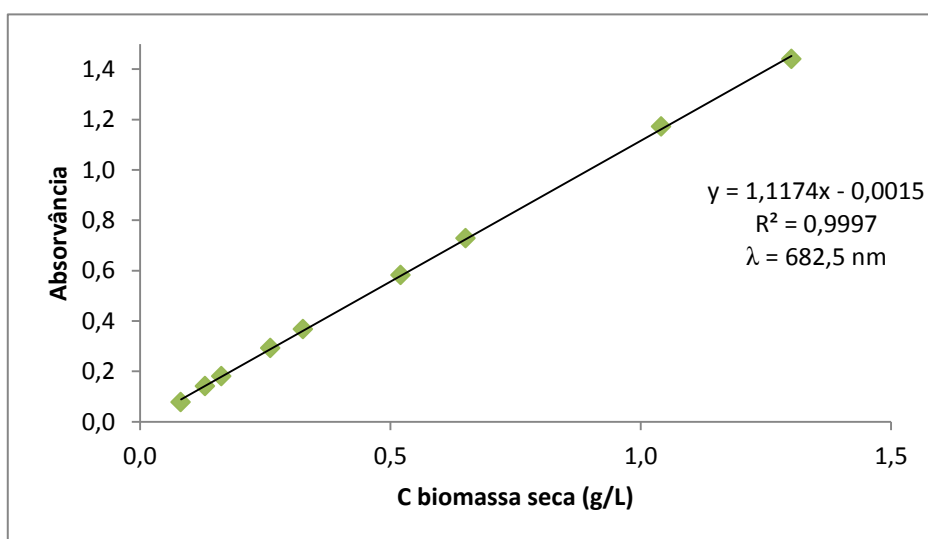
Anexo 3 Ensaios de crescimento

O crescimento da *Chlamydomonas sp.* foi monitorizado através da medição da densidade ótica das culturas. Assim, prepararam-se soluções padrão de microalgas com concentração específica e fez-se a leitura da Absorvância correspondente, em espectrofotômetro UV/Vis a 682,5 nm. Na Tabela A3.3 encontram-se os valores de Absorvância medidos para as diversas soluções padrão preparadas. Na Figura A3.1 apresenta-se a curva de calibração correspondente.

Tabela A3.3- Valores de Absorvância medida a $\lambda=682,5$ nm, obtidos para as diferentes concentrações padrão.

Padrão	C _{biomassa seca} (g/L)	Absorvância ($\lambda=682,5$ nm)
1	1,3010	1,440
2	1,0408	1,172
3	0,6505	0,729
4	0,5204	0,582
5	0,3253	0,368
6	0,2602	0,293
7	0,1626	0,181
8	0,1301	0,141
9	0,0813	0,078

Figura A3.1- Curva de calibração de Absorvância medida a $\lambda=682,5$ nm vs concentração de biomassa seca para a *Chlamydomonas sp.*



Na Tabela A3.4 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de arabinose na concentração de 0,25 g/L.

Tabela A3.4- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,25 g/L.

	A1.1							A1.2								
Dia	Abs (682,5nm)					Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)					Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,102	0,102	0,103			0,102	0,093	0	0,113	0,114	0,115			0,114	0,103	0,007
	0,102	0,102	0,103						0,112	0,114	0,115					
	0,102	0,102	0,103						0,112	0,114	0,115					
2	0,22	0,195	0,197	0,215	0,220	0,210	0,190	2	0,185	0,182	0,183	0,181		0,188	0,169	0,014
	0,221	0,198	0,199	0,215	0,220				0,185	0,182	0,185	0,18				
	0,221	0,198	0,199	0,217	0,220				0,185	0,182	0,185	0,181				
5	0,254	0,252	0,260	0,276		0,260	0,234	5	0,205	0,213	0,269	0,281	0,277	0,230	0,207	0,020
	0,254	0,251	0,260	0,276					0,206	0,213	0,269	0,281	0,276			
	0,254	0,251	0,260	0,276					0,208	0,212	0,269	0,281	0,277			
7	0,212	0,205	0,213	0,204	0,208	0,208	0,188	7	0,285	0,293	0,293	0,291	0,293	0,289	0,260	0,051
	0,212	0,204	0,213	0,203	0,208				0,284	0,293	0,287	0,293	0,294			
	0,212	0,205	0,212	0,203	0,209				0,285	0,292	0,285	0,293	0,293			
9	0,119	0,116	0,116	0,122		0,118	0,107	9	0,286	0,281	0,294	0,285		0,286	0,258	0,107
	0,118	0,116	0,117	0,122					0,284	0,281	0,293	0,287				
	0,118	0,113	0,117	0,122					0,285	0,28	0,294	0,288				
12	0,092	0,136	0,096	0,096		0,105	0,095	12	0,304	0,318	0,304	0,312		0,306	0,275	0,127
	0,092	0,133	0,096	0,097					0,300	0,31	0,304	0,309				
	0,091	0,133	0,097	0,098					0,299	0,31	0,304	0,309				
14	0,112	0,100	0,099	0,100		0,103	0,093	14	0,304	0,309	0,314	0,309		0,309	0,277	0,130
	0,11	0,101	0,100	0,100					0,304	0,309	0,314	0,308				
	0,112	0,101	0,099	0,100					0,304	0,308	0,311	0,309				
16	0,127	0,171	0,138	0,120		0,137	0,124	16								
	0,126	0,171	0,127	0,120												
	0,124	0,174	0,124	0,120												

Na Tabela A3.5 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de arabinose na concentração de 0,50 g/L.

Tabela A3.5- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,50 g/L.

A2.1								A2.2								
Dia	Abs (682,5nm)					Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)					Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,114	0,115	0,115			0,115	0,104	0	0,067	0,066	0,070			0,067	0,062	0,030
	0,114	0,116	0,115						0,067	0,065	0,070					
	0,115	0,116	0,115						0,067	0,065	0,069					
2	0,188	0,185	0,19	0,187		0,188	0,169	2	0,184	0,184	0,184	0,187	0,184	0,184	0,166	0,002
	0,188	0,185	0,19	0,186					0,184	0,184	0,184	0,187	0,184			
	0,188	0,185	0,19	0,186					0,184	0,184	0,184	0,186	0,184			
5	0,163	0,204	0,22	0,239	0,244	0,196	0,176	5	0,171	0,215	0,222	0,238	0,24	0,203	0,183	0,005
	0,163	0,204	0,22	0,242	0,244				0,171	0,216	0,222	0,237	0,238			
	0,163	0,204	0,22	0,242	0,243				0,171	0,216	0,222	0,370	0,237			
7	0,214	0,219	0,22	0,208	0,214	0,217	0,196	7	0,163	0,163	0,165	0,165	0,164	0,164	0,148	0,034
	0,214	0,217	0,22	0,209	0,214				0,162	0,165	0,165	0,165	0,167			
	0,214	0,217	0,22	0,211	0,214				0,161	0,164	0,165	0,165	0,168			
9	0,227	0,237	0,245	0,240		0,242	0,218	9	0,152	0,159	0,157	0,153		0,158	0,143	0,053
	0,227	0,239	0,243	0,240					0,156	0,161	0,158	0,152				
	0,279	0,240	0,242	0,238					0,159	0,162	0,157	0,152				
12	0,264	0,283	0,277	0,276		0,274	0,247	12	0,131	0,125	0,131	0,170		0,129	0,117	0,092
	0,264	0,281	0,277	0,277					0,131	0,125	0,131	0,160				
	0,263	0,281	0,277	0,277					0,131	0,125	0,131	0,151				
14	0,311	0,328	0,315	0,318		0,319	0,287	14	0,105	0,105	0,098	0,115		0,103	0,093	0,137
	0,311	0,333	0,315	0,315					0,105	0,105	0,098	0,115				
	0,312	0,333	0,316	0,313					0,105	0,105	0,099	0,113				
16								16	0,139	0,113	0,121	0,117		0,125	0,113	
									0,142	0,113	0,120	0,117				
									0,142	0,112	0,120	0,117				

Na Tabela A3.6 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de xilose na concentração de 0,25 g/L.

Tabela A3.6- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,25 g/L.

Xil 1.1							Xil 1.2							
Dia	Abs (682,5nm)				Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)				Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,052	0,056	0,057	0,059	0,056	0,052	0	0,058	0,063	0,066	0,066	0,062	0,057	0,004
	0,053	0,056	0,057	0,059				0,058	0,064	0,065	0,066			
	0,053	0,056	0,057	0,058				0,058	0,065	0,065	0,066			
3	0,254	0,252	0,252		0,252	0,227	3	0,328	0,33	0,326		0,253	0,227	0,001
	0,252	0,253	0,252					0,336	0,331	0,326				
	0,252	0,253	0,252					0,339	0,33	0,327				
5	0,45	0,449	0,452		0,451	0,405	5	0,632	0,64	0,626		0,634	0,569	0,116
	0,452	0,447	0,453					0,635	0,642	0,625				
	0,452	0,447	0,454					0,635	0,644	0,626				
10	0,733	0,727	0,738	0,737	0,735	0,659	10	0,627	0,757	0,721		0,702	0,630	0,021
	0,73	0,729	0,752	0,733				0,629	0,757	0,72				
	0,73	0,73	0,753	0,729				0,629	0,756	0,722				

Na Tabela A3.7 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de xilose na concentração de 0,50 g/L.

Tabela A3.7- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,50 g/L.

Xil 2.1							Xil 2.2							
Dia	Abs (682,5nm)				Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)				Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,044	0,045	0,046	0,046	0,045	0,042	0	0,046	0,049	0,051	0,049	0,049	0,045	0,002
	0,044	0,045	0,046	0,047				0,047	0,049	0,050	0,050			
	0,044	0,045	0,047	0,047				0,047	0,049	0,049	0,050			
3	0,254	0,251	0,255	0,248	0,253	0,227	3	0,257	0,259	0,260		0,258	0,233	0,004
	0,253	0,252	0,253	0,249				0,257	0,258	0,260				
	0,252	0,251	0,253	0,249				0,257	0,258	0,260				
5	0,440	0,450	0,430		0,441	0,396	5	0,302	0,315	0,308		0,309	0,278	0,084
	0,443	0,447	0,432					0,302	0,316	0,310				
	0,446	0,447	0,432					0,302	0,313	0,311				
10	0,846	0,994	1,025	1,010	0,952	0,853	10	0,570	0,546	0,574	0,54	0,561	0,503	0,248
	0,840	0,991	1,022	1,007				0,560	0,549	0,570	0,539			
	0,842	0,989	1,019	1,003				0,558	0,553	0,566	0,540			

Na Tabela A3.8 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de ribose na concentração de 0,25 g/L.

Tabela A3.8- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,25 g/L.

R1.1						R1.2						
Dia	Abs (682,5nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)			Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,015	0,016	0,016	0,016	0,016	0	0,015	0,016	0,016	0,016	0,016	0
	0,016	0,016	0,016				0,016	0,016	0,016			
	0,016	0,016	0,016				0,016	0,016	0,016			
3	0,108	0,112	0,115	0,112	0,102	3	0,124	0,129	0,128	0,127	0,115	0,009
	0,11	0,113	0,113				0,124	0,128	0,128			
	0,111	0,113	0,113				0,125	0,126	0,129			
6	0,108	0,105	0,107	0,106	0,097	6	0,137	0,159	0,143	0,146	0,132	0,025
	0,107	0,105	0,107				0,138	0,159	0,142			
	0,106	0,105	0,107				0,139	0,159	0,14			
8	0,125	0,133	0,118	0,126	0,114	8	0,069	0,073	0,078	0,073	0,066	0,034
	0,123	0,136	0,119				0,068	0,074	0,075			
	0,123	0,136	0,119				0,068	0,075	0,074			
12	0,149	0,154	0,148	0,150	0,136	12	0,093	0,124	0,093	0,104	0,094	0,029
	0,167	0,144	0,144				0,092	0,126	0,093			
	0,167	0,132	0,147				0,092	0,127	0,095			

Na Tabela A3.9 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas suplementadas pela adição de ribose na concentração de 0,50 g/L.

Tabela A3.9- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,50 g/L.

R2.1						R2.2						
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5nm)			Média	Conc. (g/L)	σ (g/L)
0	0,022	0,02	0,02	0,021	0,020	0	0,022	0,02	0,02	0,021	0,020	0
	0,022	0,02	0,02				0,022	0,02	0,02			
	0,022	0,019	0,02				0,022	0,019	0,02			
3	0,122	0,129	0,128	0,126	0,114	3	0,113	0,112	0,114	0,112	0,101	0,009
	0,121	0,128	0,129				0,109	0,111	0,112			
	0,121	0,126	0,129				0,109	0,111	0,113			
6	0,165	0,164	0,159	0,160	0,145	6	0,075	0,078	0,078	0,077	0,070	0,053
	0,159	0,163	0,157				0,075	0,077	0,077			
	0,158	0,162	0,156				0,076	0,077	0,076			
8	0,08	0,084	0,084	0,084	0,076	8	0,107	0,11	0,112	0,111	0,101	0,017
	0,081	0,087	0,085				0,107	0,11	0,112			
	0,081	0,088	0,085				0,106	0,122	0,112			
12	0,09	0,09	0,09	0,089	0,081	12	0,068	0,062	0,061	0,064	0,058	0,016
	0,089	0,088	0,09				0,068	0,061	0,062			
	0,088	0,086	0,09				0,068	0,061	0,062			

Na Tabela A3.10 e Tabela A3.11 apresentam-se os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas realizadas com diferentes contributos de efluente cervejeiro real, sem suplementação de pentoses.

Tabela A3.10- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com efluente cervejeiro nas percentagens de 5%, 10% e 20%.

5%						10%						20%					
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)
0	0,01	0,014	0,015	0,013	0,013	0	0,018	0,021	0,021	0,019	0,019	0	0,017	0,019	0,022	0,019	0,019
	0,009	0,015	0,015				0,019	0,021	0,02				0,017	0,019	0,022		
	0,01	0,014	0,016				0,019	0,021	0,02				0,017	0,019	0,022		
2	0,071	0,075	0,073	0,073	0,067	2	0,089	0,091	0,093	0,095	0,087	2	0,093	0,096	0,095	0,095	0,087
	0,071	0,075	0,074				0,088	0,092	0,092				0,093	0,098	0,096		
	0,071	0,075	0,074				0,088	0,092	0,091				0,093	0,098	0,096		
6	0,111	0,114	0,113	0,112	0,102	6	0,099	0,104	0,102	0,123	0,112	6	0,121	0,127	0,122	0,123	0,112
	0,110	0,113	0,113				0,099	0,104	0,103				0,122	0,126	0,122		
	0,110	0,113	0,114				0,099	0,103	0,102				0,122	0,125	0,123		
9	0,102	0,105	0,107	0,105	0,096	9	0,077	0,079	0,076	0,150	0,136	9	0,15	0,149	0,152	0,150	0,136
	0,102	0,106	0,108				0,077	0,078	0,077				0,149	0,150	0,152		
	0,102	0,106	0,109				0,078	0,078	0,077				0,149	0,150	0,15		
12	0,090	0,095	0,100	0,095	0,086	12	0,139	0,134	0,134	0,160	0,145	12	0,168	0,161	0,156	0,160	0,145
	0,091	0,093	0,098				0,137	0,134	0,134				0,164	0,159	0,156		
	0,093	0,095	0,101				0,137	0,134	0,135				0,162	0,161	0,154		
15	0,089	0,082	0,083	0,083	0,075	15	0,141	0,143	0,146	0,128	0,116	15	0,121	0,129	0,129	0,128	0,116
	0,083	0,079	0,084				0,14	0,148	0,149				0,122	0,132	0,136		
	0,080	0,081	0,084				0,142	0,146	0,149				0,120	0,133	0,132		
17	0,161	0,166	0,169	0,166	0,150	17	0,16	0,159	0,157	0,195	0,176	17	0,200	0,198	0,197	0,195	0,176
	0,162	0,163	0,171				0,16	0,162	0,159				0,195	0,192	0,199		
	0,164	0,166	0,174				0,159	0,163	0,159				0,188	0,185	0,202		
20	0,136	0,158	0,156	0,149	0,134	20	0,184	0,189	0,18	0,129	0,117	20	0,128	0,145	0,122	0,129	0,117
	0,131	0,155	0,155				0,18	0,189	0,18				0,120	0,140	0,123		
	0,137	0,156	0,154				0,18	0,188	0,183				0,122	0,139	0,122		
23	0,162	0,177	0,164	0,164	0,149	23	0,195	0,197	0,193	0,155	0,140	23	0,153	0,156	0,149	0,155	0,140
	0,160	0,168	0,162				0,198	0,199	0,193				0,151	0,159	0,153		
	0,159	0,161	0,167				0,199	0,203	0,193				0,152	0,162	0,156		

Tabela A3.11- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com efluente cervejeiro nas porcentagens de 30% e 40%.

30%						40%					
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)
0	0,022	0,023	0,023	0,023	0,022	0	0,02	0,022	0,022	0,022	0,021
	0,022	0,022	0,023				0,02	0,022	0,023		
	0,022	0,023	0,023				0,02	0,022	0,024		
2	0,096	0,098	0,097	0,097	0,088	2	0,102	0,101	0,102	0,101	0,092
	0,096	0,098	0,098				0,101	0,101	0,101		
	0,096	0,098	0,098				0,101	0,1	0,101		
6	0,185	0,189	0,187	0,187	0,168	6	0,164	0,167	0,169	0,167	0,150
	0,183	0,189	0,187				0,165	0,166	0,169		
	0,183	0,189	0,187				0,165	0,166	0,168		
9	0,17	0,182	0,177	0,175	0,158	9	0,095	0,098	0,099	0,096	0,087
	0,169	0,179	0,176				0,096	0,094	0,095		
	0,169	0,177	0,177				0,096	0,094	0,094		
12	0,187	0,197	0,203	0,194	0,175	12	0,105	0,102	0,106	0,102	0,093
	0,187	0,19	0,203				0,104	0,101	0,101		
	0,187	0,192	0,203				0,103	0,099	0,099		
15	0,138	0,132	0,132	0,133	0,121	15	0,112	0,115	0,114	0,114	0,104
	0,131	0,136	0,132				0,112	0,118	0,112		
	0,128	0,142	0,129				0,112	0,119	0,114		
17	0,207	0,197	0,201	0,198	0,178	17	0,134	0,126	0,139	0,135	0,122
	0,197	0,196	0,197				0,137	0,132	0,135		
	0,194	0,196	0,194				0,139	0,131	0,142		
20	0,141	0,142	0,143	0,144	0,130	20	0,101	0,098	0,099	0,098	0,089
	0,144	0,142	0,149				0,102	0,095	0,097		
	0,146	0,141	0,146				0,102	0,09	0,096		
23	0,179	0,163	0,187	0,176	0,158	23	0,142	0,143	0,14	0,141	0,128
	0,175	0,163	0,185				0,141	0,142	0,138		
	0,176	0,17	0,182				0,139	0,146	0,141		

A Tabela A3.12 apresenta os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas realizadas com 20% (v/v) de efluente cervejeiro real, com suplementação de xilose na fase estacionária, com concentração de 0,25g/L (CsXil 0,25 Fase estacionária).

Tabela A3.12- - Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de xilose na concentração de 0,25 g/L na fase estacionária

Xil 1.1						Xil 1.2					
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)
1	0,026	0,023	0,023	0,024	0,023	1	0,036	0,037	0,037	0,036	0,034
	0,026	0,023	0,023				0,035	0,037	0,037		
	0,025	0,023	0,023				0,035	0,037	0,037		
5	0,104	0,105	0,109	0,106	0,096	5	0,084	0,084	0,086	0,085	0,077
	0,104	0,105	0,109				0,084	0,084	0,086		
	0,104	0,105	0,109				0,084	0,085	0,085		
7	0,11	0,11	0,111	0,111	0,101	7	0,093	0,093	0,093	0,092	0,084
	0,111	0,111	0,112				0,09	0,091	0,094		
	0,111	0,111	0,112				0,089	0,093	0,093		
14	0,085	0,085	0,088	0,086	0,078	14	0,023	0,025	0,028	0,025	0,024
	0,085	0,085	0,088				0,023	0,025	0,028		
	0,085	0,084	0,088				0,023	0,025	0,028		
16	0,168	0,159	0,17	0,165	0,149	16	0,066	0,071	0,066	0,067	0,061
	0,168	0,159	0,169				0,066	0,07	0,066		
	0,167	0,159	0,17				0,066	0,07	0,06		
19	0,111	0,123	0,123	0,119	0,108	19	0,065	0,072	0,065	0,068	0,063
	0,114	0,122	0,121				0,065	0,075	0,065		
	0,116	0,121	0,118				0,065	0,078	0,065		

A Tabela A3.13 apresenta os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas realizadas com 20% (v/v) de efluente cervejeiro real, com suplementação de arabinose na fase estacionária, com concentração de 0,25 g/L.

Tabela A3.13- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de arabinose na concentração de 0,25 g/L na fase estacionária.

A2.1						A2.2					
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)
1	0,035	0,036	0,038	0,036	0,034	1	0,039	0,041	0,04	0,040	0,037
	0,035	0,036	0,038				0,038	0,041	0,04		
	0,035	0,036	0,038				0,038	0,041	0,04		
5	0,086	0,084	0,086	0,085	0,078	5	0,095	0,098	0,098	0,097	0,088
	0,086	0,084	0,086				0,095	0,097	0,098		
	0,085	0,084	0,086				0,095	0,096	0,098		
7	0,091	0,089	0,092	0,091	0,083	7	0,0115	0,116	0,115	0,104	0,095
	0,091	0,089	0,094				0,115	0,115	0,117		
	0,091	0,089	0,092				0,116	0,115	0,117		
14	0,04	0,04	0,04	0,040	0,037	14	0,025	0,04	0,04	0,035	0,033
	0,04	0,04	0,041				0,025	0,04	0,041		
	0,04	0,04	0,041				0,025	0,04	0,041		
16	0,098	0,101	0,099	0,099	0,090	16	0,096	0,1	0,1	0,099	0,090
	0,098	0,099	0,098				0,098	0,1	0,1		
	0,098	0,098	0,098				0,098	0,099	0,1		
19	0,13	0,138	0,135	0,135	0,122	19	0,144	0,146	0,147	0,145	0,131
	0,13	0,138	0,136				0,144	0,146	0,145		
	0,131	0,138	0,137				0,145	0,146	0,145		

Na Tabela A3.14 apresenta os resultados obtidos na determinação das concentrações de biomassa das culturas realizadas com 20% (v/v) efluente cervejeiro real, com suplementação de ribose na fase estacionária, com concentração de 0,25 g/L.

Tabela A3.14- Ensaios de crescimento em meio BBM-3N com 20% (v/v) de efluente cervejeiro com adição de ribose na concentração de 0,25g/L na fase estacionária.

R2.2						RR5					
Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)	Dia	Abs (682,5 nm)			Média	Conc. (g/L)
1	0,065	0,066	0,067	0,066	0,061	0	0,027	0,028	0,029	0,028	0,027
	0,065	0,066	0,068				0,027	0,029	0,029		
	0,065	0,066	0,068				0,027	0,028	0,029		
2	0,092	0,092	0,093	0,092	0,084	4	0,121	0,125	0,122	0,122	0,111
	0,092	0,092	0,092				0,121	0,123	0,122		
	0,092	0,093	0,092				0,12	0,123	0,121		
5	0,02	0,021	0,017	0,020	0,019	6	0,106	0,11	0,111	0,109	0,099
	0,021	0,021	0,018				0,106	0,109	0,111		
	0,021	0,021	0,018				0,105	0,11	0,111		
7	0,091	0,091	0,088	0,090	0,082	8	0,107	0,11	0,112	0,111	0,101
	0,091	0,091	0,089				0,107	0,11	0,112		
	0,091	0,091	0,089				0,106	0,122	0,112		
9	0,166	0,17	0,166	0,168	0,152	12	0,171	0,165	0,174	0,170	0,154
	0,169	0,171	0,168				0,17	0,166	0,174		
	0,168	0,171	0,167				0,17	0,166	0,174		
12	0,073	0,082	0,086	0,079	0,072	13	0,156	0,16	0,161	0,160	0,144
	0,073	0,082	0,083				0,157	0,161	0,162		
	0,073	0,081	0,078				0,156	0,162	0,161		
14	0,26	0,265	0,248	0,256	0,230	14	0,217	0,231	0,22	0,224	0,202
	0,26	0,26	0,251				0,217	0,228	0,228		
	0,26	0,248	0,249				0,218	0,228	0,233		
16	0,046	0,067	0,063	0,062	0,057	15	0,257	0,258	0,25	0,253	0,227
	0,041	0,083	0,062				0,257	0,253	0,239		
	0,049	0,087	0,058				0,259	0,257	0,243		
19	0,143	0,144	0,135	0,140	0,127	18	0,273	0,276	0,293	0,282	0,253
	0,142	0,132	0,145				0,28	0,278	0,293		
	0,147	0,121	0,153				0,27	0,277	0,294		
						21	0,224	0,235	0,244	0,234	0,211
							0,232	0,239	0,237		
							0,231	0,239	0,228		

As taxas de crescimento das microalgas nas culturas em meio aditivado com diferentes porcentagens de efluente foram calculadas e encontram-se representadas nas Figura A3.2 a Figura A3.6:

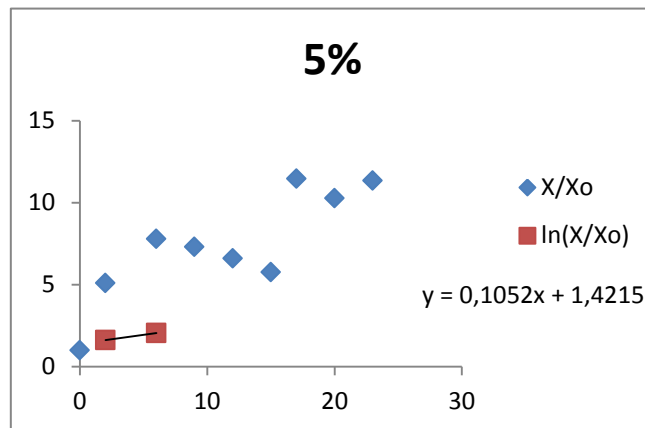


Figura A3.2- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 5% de efluente.

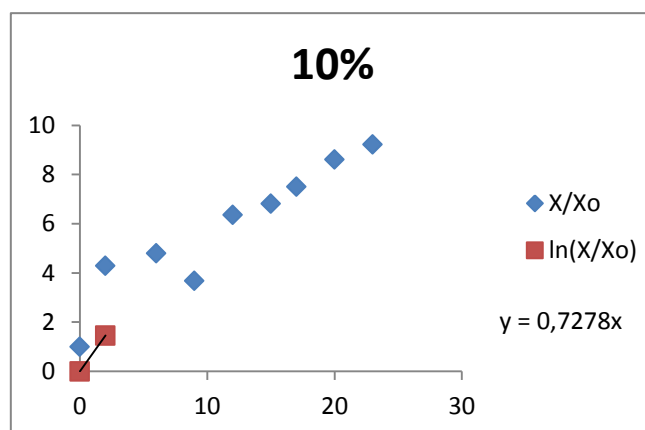


Figura A3.3- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 10% de efluente.

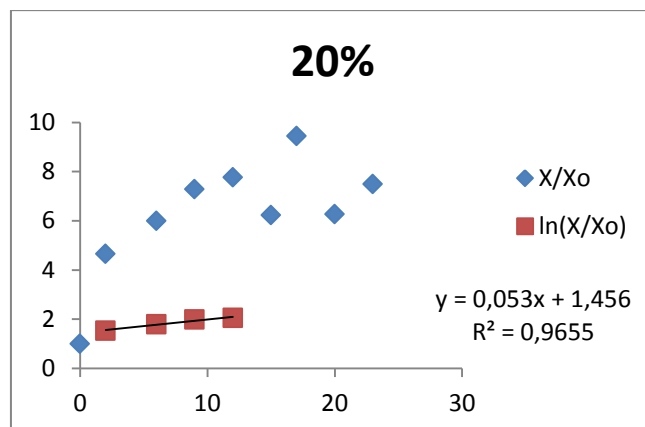


Figura A3.4- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 20% de efluente.

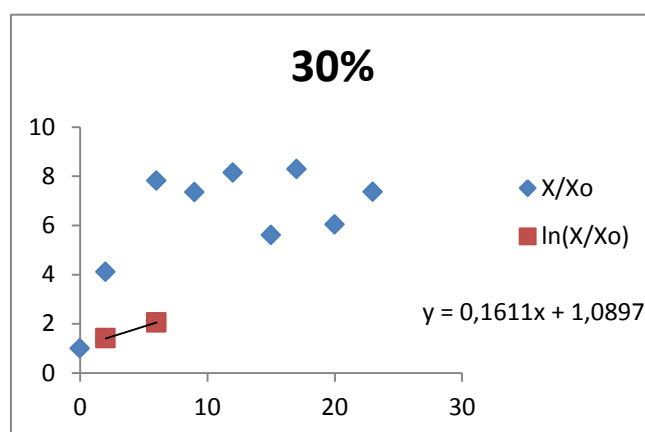


Figura A3.5- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 30% de efluente.

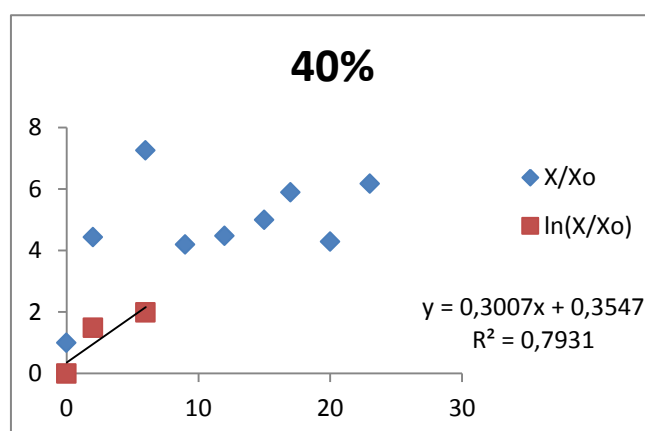


Figura A3.6- Regressão linear da curva de crescimento na fase de crescimento exponencial da cultura cultivada com 40% de efluente

Anexo 4 Tabelas de resultados: extracção e transesterificação

Na Tabela A4.15 encontram-se os resultados da extração de óleo, bem como todas as quantidades de solventes necessários para o ensaio decorrido.

Tabela A4.15- Teores de óleo da microalga *Chlamydomonas sp.*

Amostra	m. biomassa (g)	m. água (g)	Vol. Clorofórmio (mL)	Vol. Metanol (mL)	Vol. Clorofórmio (mL)	Vol. Água (mL)	m. tubo sem rolha (g)	m. tubo+lipídeos (g)	m. lipídeos (g)	Teor de lipídeos
CsAq1	0,9115	0,8659	1,0824	2,1648	1,0824	1,0824	12,6217	12,6467	0,0250	55%
CsAq2	0,9745	0,9258	1,1572	2,3144	1,1572	1,1572	12,7977	12,8232	0,0255	52%
CsXil1	0,8680	0,8506	1,0633	2,1266	1,0633	1,0633	12,8676	12,8730	0,0054	31%
CsXil2	0,6261	0,6136	0,7670	1,5339	0,7670	0,7670	12,8563	12,8588	0,0025	20%
CsRib2	0,9334	0,9147	1,1434	2,2868	1,1434	1,1434	12,6622	12,6677	0,0055	29%
CsRib3	0,9269	0,9084	1,1355	2,2709	1,1355	1,1355	12,7822	12,7862	0,0040	22%
CsRib5	0,9774	0,9579	1,1973	2,3946	1,1973	1,1973	12,7587	12,7640	0,0053	27%
CsAra1	0,8660	0,8487	1,0609	2,1217	1,0609	1,0609	12,6764	12,6832	0,0068	39%

Na Tabela A4.16 apresentam-se os ésteres identificados nas amostras produzidas, sua quantificação e tempo de retenção.

Tabela A4.16- Ésteres identificados no óleo de *Chlamydomonas* sp. e sua quantificação

	Tempo (min)	Área (mV.s)	Teor de ésteres (%)	Éster	%
CSAQ	3,327	4478,819	22,8	Palmitato (C16:0)	29,1
	3,513	277,725		--	1,8
	3,62	235,388		--	1,5
	3,753	155,84		--	1,0
	3,9	78,227		--	0,5
	4,927	43,618		--	0,3
	5,54	414,955		Estearato (C18:0)	2,7
	5,867	4374,397		Oleato (C18:1)	28,4
	6,48	255,554		--	1,7
	6,627	909,141		Linolato (C18:2)	5,9
	7,333	309,193		--	2,0
	7,933	407,436		Linolenato (C18:3)	2,6
	15,293	3031,317		--	19,7
	15,867	194,834		--	1,3
	16,92	87,293		--	0,6
	17,353	155,846		--	1,0
CSAra	3,313	172,531	7,7	Palmitato (C16:0)	16,9
	5,52	58,239		Estearato (C18:0)	5,7
	5,827	68,607		Oleato (C18:1)	6,7
	6,253	34,921		--	3,4
	6,607	38,931		Linolato (C18:2)	3,8
	7,313	245,617		Linolenato (C18:3)	24,0
	15,267	404,671		--	39,5
CSRib	3,313	534,14	22,5	Palmitato (C16:0)	18,3
	3,62	120,605		--	4,1
	5,52	137,136		Estearato (C18:0)	4,7
	5,84	371,323		Oleato (C18:1)	12,7
	6,253	331,63		--	11,3
	6,613	70,961		Linolato (C18:2)	2,4
	7,32	253,859		--	8,7
	7,92	108,526		Linolenato (C18:3)	3,7
	8,607	34,22		--	1,2
	10,793	134,178		--	4,6
	15,26	669,756		--	22,9
	15,853	35,352		--	1,2
	17,327	121,408		--	4,2
CSXiI	3,32	305,795	19,1	Palmitato (C16:0)	27,8
	5,54	61,462		Estearato (C18:0)	5,6
	5,847	88,657		Oleato (C18:1)	8,0
	6,627	53,005		Linolato (C18:2)	4,8
	7,34	231,621			21,0
	13,753	20,759			1,9
	15,287	274,338		C22:0	24,9
	17,353	66,15			6,0