



Contributos para o desenvolvimento de um Biosensor no cultivo de microalgas

Cátia Sofia Velez Silva

Trabalho de Projeto apresentado à Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Trabalho de Projeto realizado sob a orientação do Professor Doutor Sérgio Leandro, Professor Adjunto da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria

Título: Contributos para o desenvolvimento de um Biosensor no cultivo de microalgas

Copyright® Cátia Sofia Velez Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho de projeto através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

O cultivo de *Isochrysis galbana* e de *Nannochloropsis gaditana* foi efetuado em diferentes tipos de fotobioreactores (PBR). Para tal, foram definidas as curvas de crescimento para cada microalga e PBR, através da contagem direta das células por hematócitometro. De seguida estabeleceram-se as diferentes fases de crescimento para cada cultivo. Paralelamente à contagem direta das células foi efetuado por espectrofotometria um varrimento dos 400nm aos 700nm, no qual se obtiveram os seguintes comprimentos de onda 422nm, 441nm, 540nm e 547nm. Os comprimentos de onda obtidos foram correlacionados com a densidade celular, permitindo através da análise estatística definir uma reta-padrão para cada tipo de reator e microalga. A reta-padrão da *I. galbana* foi definida a 441nm no balão volumétrico e no PBR *airlift*. Por outro lado a reta-padrão da *N. gaditana* foi definida a 540nm, nos mesmos PBR.

O PBR coluna de bolhas não permitiu a definição de uma reta-padrão devido à reduzida fase exponencial presente em ambos os cultivos. Ao longo do tempo estimou-se a clorofila *a*, *c* e feofitina para a *I. galbana*. Clorofila *a* e feofitina, para a *N. gaditana* e verificou-se uma aumento ao longo do tempo, apresentando o *PBR airlift* uma maior concentração de clorofilas no dia 10 (68,4 mg L⁻¹), no entanto o método de extração utilizado não foi eficiente. A *I. galbana* apresentou uma concentração máxima de clorofila *a* de 1177,74 mg L⁻¹ no balão volumétrico, ficando por estimar a clorofila presente no PBR *airlift*. Nos cultivos de *I. galbana* e de *N. gaditana* verificou-se uma diminuição do peso seco (PS) e do peso seco livre de cinzas (PSLC) ao longo da fase de aceleração e exponencial devido à divisão celular.

O cultivo de *I. galbana* no PBR *airlift* apresentou uma densidade celular máxima muito superior aos restantes PBR's, este facto deve-se ao tipo de agitação deste PBR, à hidrodinâmica e à pouca sedimentação. Pelo contrário o PBR coluna de bolhas apresentou uma reduzida densidade celular, rendimento e taxa específica de crescimento da cultura, este facto deve-se à má homogeneização presente neste PBR, fazendo com que as microalgas não se encontrem todas sujeitas às mesmas condições e ainda à sedimentação dessas mesmas microalgas em redor do difusor, o mesmo facto verificou-se para a *N. gaditana*. A *N. gaditana* atinge uma densidade celular mais elevada no balão volumétrico do que nos restantes PBR's. Os dados obtidos no presente trabalho contribuirão para a definição de um algoritmo a ser utilizado na construção de um biosensor tendo por base a leitura da densidade ótica na região do visível através de

análise espectrofotométrica, para assim proceder à monitorização das culturas em tempo real e por métodos não intrusivos.

Palavras-Chave: *I. galbana*, *N. gaditana*, PBR

Abstract

Cultures of *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis gaditana* were performed in two different types of photobioreactors (PBR). Growth curves were established for each microalgae and PBR through direct count of cells along the time and growth phases were defined for each culture. In parallel to direct cells enumeration, was performed a spectrophotometric scan from 400nm to 700nm, where were obtained the following wavelengths 422nm, 441nm, 540nm and 547nm.

The absorbance corresponding to a specific wavelength obtained was then correlated with cell density, in order to define calibration curves for each type of reactor and microalgae species. The calibration curve for *I. galbana* where defined at 441nm for volumetric flasks and PBR *airlift*. On the other hand, the calibration curve for *N. gaditana* was defined at 540nm at the same PBRs. Bubble columns PBR did not allowed a definition of a complete growth curve due to the reduced exponential phase present in both cultures. For *I. galbana*, chlorophyll a, c and phaeophytin were estimated over time as well as for *N. gaditana*'s, except chlorophyll c. It was noted an increase over time of the former parameters, with higher concentration values of chlorophyll noted at day 10 (68,4 mg L⁻¹) with the *airlift* PBR for *N. gaditana*.

I. galbana showed a maximum concentration of chlorophyll a to 1177,74 mg L⁻¹ in a volumetric flask.. In cultures of *I. galbana* and *N. gaditana* there was a decrease in dry weight (DW) and ash-free dry weight (AFDW) during the acceleration phase and exponentially due to cell division.

The culture of *I. galbana* at PBR *airlift*, showed a cell density much higher than the others PBR's. This is fact can be attributed to the type of agitation on the PBR, hydrodynamics and little sedimentation. Relating to bubble column PBR, it was showed a reducing on cell density, yield and specific growth rate of the culture. This is due to poor mixing in this PBR, exposing the microalgae to different conditions and causing sedimentation around the diffuser. The same happened with *N. gaditana* at the bubble column, having reached its maximum cell density in the volumetric flask.

The data obtained on the present study will be extremely useful for the definition of a mathematical algorithm that will be incorporated in a biosensor. Such device will be used for the monitoring of algal cultures based on optical density measurements by spectrophotometric analysis.

Keywords: *I. galbana*, *N. gaditana* e PBR

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	v
1. Introdução.....	1
1.1 As Microalgas.....	1
1.1.1 <i>Isochrysis galbana</i>	3
1.1.2 <i>Nannochloropsis gaditana</i>	4
1.2 Cultivo de microalgas	6
1.2.1 Parâmetros de cultivo.....	6
1.2.2 Cultivo em <i>batch</i>	8
1.3 Fotobioreactor	10
1.3.1 Fotobioreactor coluna de bolhas	11
1.3.2 Fotobioreactor <i>airlift</i>	13
1.4 Potencialidades e Aplicações das microalgas	15
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Cultivo de microalgas	23
3.2 Estudos de crescimento	24
3.2.1 Curva de crescimento	24
3.2.2 Definição das fases de crescimento	25
3.2.3 Reta-Padrão.....	25
3.3 Parâmetros de cultivo.....	26
3.3.1 Determinação de Biomassa	26
3.3.2 Determinação de clorofilas e feofitina.....	27
3.4 Análise estatística	28
4. Resultados.....	29
4.1 Crescimento de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i> em balão volumétrico	29
4.1.1 Curvas de crescimento.....	29
4.1.2 Retas-padrão	31
4.1.3 Determinação de clorofila e feofitina	34
4.1.4 Determinação de biomassa.....	36
4.1.5 Conteúdo em lípidos	38
4.2 Crescimento de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i> no reator coluna de bolhas.....	38
4.2.1 Curvas de crescimento.....	38
4.2.2 Determinação de clorofila e feofitina	40

4.2.3 Determinação da biomassa	42
4.3 Crescimento de <i>I. galbana</i> e de <i>N. gaditana</i> no reator <i>airlift</i>	43
4.3.1 Curvas de crescimento	43
4.3.2 Retas-padrão.....	44
4.3.3. Determinação de clorofila e feofitina	47
4.3.4 Determinação da biomassa	48
4.4 Parâmetros de crescimento das microalgas nos diferentes reatores	49
4.5 Comparação entre a mesma cultura nos diferentes reatores.....	50
5. Discussão dos Resultados e Conclusão.....	53
5.1 Crescimento num balão volumétrico de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i>	53
5.2 Crescimento de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i> num PBR coluna de bolhas	58
5.3 Crescimento de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i> num PBR <i>airlift</i>	61
6. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	65
Bibliografia	67
Anexos	73
Anexo 1. Composição do meio f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guiklard 1975) utilizado para a cultura de microalgas em 950mL água do mar, autoclavar.	73
Anexo 2 – Contributo para o desenvolvimento de um biosensor para aplicação no cultivo de <i>N. gaditana</i> e <i>I. galbana</i>	74

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática de <i>Isochrysis galbana</i> (Adaptado de Wisely e Purday, 1963).....	3
Figura 2 - Esquema representativo das principais características estruturais da <i>N. gaditana</i> , C-cloroplasto, MP- membrana plasmática; N- núcleo, M- mitocôndria; REC- retículo endoplásmico, T- tilacoides, PC- parede celular, V- vacúolos, L- lípidos (Adaptado de Lubián, 1982).....	5
Figura 3 – Curva de crescimento de microalgas em modo <i>batch</i> , 1 – Fase lag, 2 – Fase de aceleração, 3 – Fase exponencial, 4 – Fase de desaceleração, 5 – Fase estacionária, 6 – Morte. (Adaptado de Barsanti e Gualtieri, 2006).	9
Figura 4 – Representação esquemática do reator coluna de bolhas de regime homogêneo (Adaptado de Krichnavaruk <i>et al.</i> , 2005).	12
Figura 5 – Representação esquemática do reator coluna de bolhas com regime heterogêneo, (Adaptado de Doran, 1995).....	12
Figura 6 – Representação esquemática do reator <i>airlift</i> (Adaptado de Krichnavaruk <i>et al.</i> , 2005).	14
Figura 7 - Curva de crescimento de <i>I. galbana</i> ao longo do tempo, num reator de 500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T=22±2°C, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.	29
Figura 8 – Curva de crescimento de <i>N. gaditana</i> ao longo de 10 dias, num reator balão de 500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T=22±2°C, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.	30
Figura 10 – Reta de calibração da <i>I. galbana</i> a 422, 441 540 e 547nm ao longo do tempo, num balão volumétrico, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T= 22±2°C.....	31
Tabela II - Regressão linear entre a densidade celular (células mL ⁻¹ x10 ⁶) da <i>I. galbana</i> e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r^2 - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 0,05, ou seja, sejam que $p < 0,05$	32
Figura 11 – Reta de calibração da <i>N. gaditana</i> a 422, 441 540 e 547nm ao longo do tempo, num balão volumétrico, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T= 22±2°C.....	33
Figura 12 - Concentração de clorofila a, c e feofitina (mg L ⁻¹) ao longo do tempo (dias) de <i>I. galbana</i>	34
Figura 13 - Concentração de clorofila a e feofitina (mg L ⁻¹) ao longo do tempo (dias) de <i>N. gaditana</i>	35

Figura 14 – Concentração de PS e PSLC por célula ($\text{mg célula}^{-1} \times 10^6$) de <i>I. galbana</i> ao longo do tempo.....	36
Figura 16 – Determinação da emissão da fluorescência através do vermelho do Nilo ao longo de 5 dias para a <i>I. galbana</i> e para a <i>N. gaditana</i>	38
Figura 17 - Curva de crescimento de <i>I. galbana</i> ao longo de 10 dias, num reator coluna de bolhas de 1500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.....	39
Figura 18 - Curva de crescimento de <i>N. gaditana</i> ao longo de 10 dias, num reator coluna de bolhas de 1500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.....	40
Figura 19 – Concentração de clorofila a e feofitina (mg L^{-1}) em <i>N. gaditana</i>	41
Figura 20 – Concentração de clorofila a, c e feofitina (mg L^{-1}) em <i>I. galbana</i>	41
Figura 21 – Concentração do PSLC e do PS célula ⁻¹ ($\text{mg células}^{-1} \times 10^6$) de <i>I. galbana</i> e <i>N. gaditana</i> ao longo de 7 dias.	42
Figura 22 - Curva de crescimento da <i>I. galbana</i> ao longo de 6 dias, num reator <i>airlift</i> de 4400mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.	43
Figura 23 – Curva de crescimento de <i>N. gaditana</i> ao longo de 11 dias, num reator <i>airlift</i> de 4400mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.....	44
Figura 24 – Retas-padrão da <i>I. galbana</i> a 422nm, 441nm, 540 e 547nm em relação à densidade celular na fase exponencial.....	46
Figura 25- Retas-padrão da <i>I. galbana</i> a 422nm, 441nm, 540 e 547nm em relação à densidade celular na fase exponencial.....	47
Figura 26 – Concentração de clorofila a, c e feofitinas ao longo do tempo para a <i>N. gaditana</i>	48
Figura 27 – Concentração de PS por célula ($\text{mg célula}^{-1} \times 10^6$) de <i>N. gaditana</i> ao longo do tempo.	48
Figura 28 - Crescimento de <i>I. galbana</i> no balão volumétrico, reator coluna de bolhas e reator <i>airlift</i>	50
Figura 29 - Crescimento de <i>N. gaditana</i> no balão volumétrico, reator coluna de bolhas e reator <i>airlift</i>	51

Índice de Tabelas

Tabela I - Representação taxonômica da <i>Isochrysis galbana</i> e da <i>Nannochloropsis gaditana</i> adaptado de Guiry, M. D. e Guiry, G. M. 2011).	2
Tabela II - Regressão linear entre a densidade celular (células mL ⁻¹ x10 ⁶) da <i>I. galbana</i> e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r ² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) modelo estatístico significativo, ou sejam p<0,05.....	32
Tabela III - Regressão linear entre a densidade celular (células mL ⁻¹ x10 ⁶) da <i>N. gaditana</i> e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r ² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) modelo estatístico significativo, ou sejam p<0,05.	34
Tabela IV - Regressão linear entre a densidade celular (células mL ⁻¹ x10 ⁶) da <i>I. galbana</i> e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r ² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) modelo estatístico significativo, ou sejam p<0,05.....	45
Tabela V - Regressão linear entre a densidade celular (células mL ⁻¹ x10 ⁶) da <i>N. gaditana</i> e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r ² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) modelo estatístico significativo, ou sejam p<0,05.	45
Tabela VI - Taxa de crescimento específica (d ⁻¹ , μ), número de divisões por dia (d ⁻¹ , k) e tempo de duplicação da (d ⁻¹ , T ²) de <i>I. galbana</i> , nos diferentes reatores, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T=22±2°C.....	49
Tabela VII - Taxa de crescimento específica (d ⁻¹ , μ), número de divisões por dia (d ⁻¹ , k) e tempo de duplicação da (d ⁻¹ , T ²) de <i>N. gaditana</i> , nos diferentes reatores, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T=22±2°C.....	50
Tabela VIII – Composição do meio de cultura f/2 para o cultivo de microalgas.	73
Tabela IX – Parâmetros de <i>I. galbana</i> cultivada num balão volumétrico.	74
Tabela X - Parâmetros de <i>I. galbana</i> cultivada num balão volumétrico.	74
Tabela XI - Parâmetros de <i>I. galbana</i> cultivada num PBR coluna de bolhas.....	75
Tabela XII -Parâmetros de <i>I. galbana</i> cultivada num PBR coluna de bolhas.....	75
Tabela XIII - Parâmetros de <i>I. galbana</i> cultivada num PBR <i>airlift</i>	76
Tabela XIV - Parâmetros de <i>N. gaditana</i> cultivada num balão volumétrico.	76
Tabela XV -Parâmetros de <i>N. gaditana</i> cultivada num balão volumétrico.	77
Tabela XVI - Parâmetros de <i>N. gaditana</i> cultivada num PBR coluna de bolhas.	77
Tabela XVII - Parâmetros de <i>N. gaditana</i> cultivada num PBR <i>airlift</i>	78

1. Introdução

1.1 As Microalgas

Desde tempos longínquos que o Mar tem sido fonte de alimento, minerais e produtos naturais. No entanto com o crescente aumento da população e das suas necessidades, tornou-se evidente a necessidade de desenvolver novos recursos sustentáveis assumindo-se o Mar como uma das fontes de tais recursos (Sanchez *et al.*, 2000; Muller-Feuga *et al.*, 2003)

Os organismos marinhos representam um enorme recurso, com potenciais benefícios em várias áreas (Chisti *et al.*, 2007). Entre os organismos marinhos destacam-se as microalgas e as cianobactérias que podem ser fonte de uma variedade de compostos com aplicação nas mais diversas áreas económicas (Richmond, 2004).

Atualmente estima-se que existem mais de 50.000 espécies de microalgas, sendo no entanto apenas cerca de 30.000 espécies microalgas de estudo e descrição (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas e as cianobactérias são muito importantes no reino vegetal, pois desempenham um papel significativo na produção primária dos oceanos (base da cadeia trófica marinha), desempenhando igualmente funções importantes em complexos ecossistemas marinhos, como é o caso dos recifes de coral (Shimizu, 2000). Tal como as plantas, as microalgas absorvem o dióxido carbono (CO₂) da atmosfera através da fotossíntese, libertando oxigénio. Este facto é de extremamente importante para o meio ambiente (Kukl *et al.*, 2007; Harun *et al.*, 2010).

As microalgas podem ser organismos procariótas como as cianobactérias (Cyanophyceae) ou eucariótas como as microalgas verdes, castanhas e vermelhas (Jensen e Fenical, 2000).

Devido ao seu reduzido tamanho, as microalgas não apresentam um esqueleto rígido para combater a força da gravidade como as plantas superiores, podendo ser organismos unicelulares ou coloniais e apresentar ou não mobilidade (Doran, 2005).

As microalgas que foram estudadas pertencem à classe Eustigmatophyceae (Filo Ochrophyta) e à classe Prymnesiophyceae (Filo Haptophyta) (Tabela I).

Tabela I - Representação taxonômica da *Isochrysis galbana* e da *Nannochloropsis gaditana* adaptado de Guiry, M. D. e Guiry, G. M. 2011).

Classificação	Microalga verde	Microalga castanha
Filo	Ochrophyta	Haptophyta
Subfilo	Phaeista	
Infrafilo	Limnista	
Classe	Eustigmatophyceae	Prymnesiophyceae
Ordem	Eustigmatales	Isochrysidales
Família	Monodopsidaceae	Isochrysidaceae
Gênero	<i>Nannochloropsis</i>	<i>Isochrysis</i>
Espécie	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Isochrysis galbana</i>

A reprodução é primeiramente assexuada. No entanto foram descritas algumas espécies com reprodução sexuada. A reprodução assexuada consiste na divisão da célula mãe em duas células filhas, sendo cada microalga exatamente metade do tamanho da célula mãe (Muller-Feuga *et al.*, 2003; Coleman e Proschold, 2005). As células filhas normalmente permanecem dentro da parede celular da célula mãe até ocorrerem 2 ou 3 divisões celulares. Assim o metabolismo das microalgas encontra-se diretamente relacionado com a divisão celular e o aumento de tamanho através da utilização da luz como fonte de energia (Phatarpekar *et al.*, 2000; Coleman e Proschold, 2005).

As microalgas possuem uma enorme capacidade em ajustar ou alterar a sua estrutura interna, composição bioquímica e fisiológica, podendo sintetizar uma enorme variedade de compostos, em consequência das condições ambientais ou de cultivo, como a concentração de nutrientes (Renaud *et al.*, 2002; Sayegh *et al.*, 2011). Para além destas características as microalgas possuem ainda um rápido crescimento (Mata *et al.*, 2010), o que lhes confere propriedades importantes para o seu cultivo em fotobioreatores.

1.1.1 *Isochrysis galbana*

O filo Haptophyta é caracterizado por ser um grupo de microalgas unicelulares, flageladas, e com a presença de um haptonema entre dois flagelos lisos (Figura 2). O haptonema é externamente semelhante a um flagelo, apresenta-se como uma estrutura longa que se estende ao longo da superfície do corpo celular, não se movendo contudo como um cílio/flagelo. Apresenta movimentos lentos e ainda não se encontra estudado o seu mecanismo (Matsunaga *et al.*, 2005).

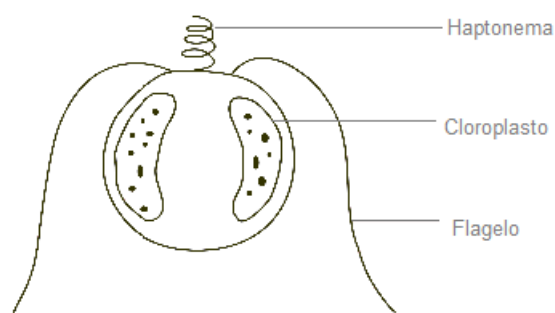


Figura 1 – Representação esquemática de *Isochrysis galbana* (Adaptado de Wisely e Purday, 1963).

As maioria das microalgas deste filo são espécies marinhas que habitam principalmente em águas quentes. O grupo encontra-se distribuído por todo o mundo e muitas vezes é uma importante fonte de alimento para as comunidades aquáticas (Sánchez *et al.*, 2000; Phatarpekar *et al.*, 2000). Algumas microalgas deste filo podem produzir *blooms algais* e causar problemas a outros organismos aquáticos, tais como os peixes em consequência da produção de dimetilsulfureto (DMS) (Matsunaga *et al.*, 2005). Entre as microalgas marinhas pertencentes a este filo destaca-se a *Isochrysis galbana* (*I. galbana*) (Sánchez *et al.*, 2000).

A *Isochrysis galbana*, Parke, M. 1949, é uma microalga flagelada, apresenta uma cor castanha-dourada (Sánchez *et al.*, 2000), com um diâmetro de 4 a 6 μm (Phatarpekar *et al.*, 2000; Bergeijk *et al.*, 2010). Possui um crescimento rápido, sendo a temperatura ótima entre os 16-22°C (Barnabé, 1994) e resistente a variações de temperatura (Sayeghe e Montagnes, 2011). Possui boas características nutritivas, sendo rica em ácidos gordos poliinsaturados (PUFA's) (Poisson e Ergan, 2000). Lin e colaboradores (2007), afirmam que apesar da sua composição bioquímica ser variável ao longo das fases de crescimento, possui como principais ácidos gordos saturados o ácido tetradecanoico (11,0-22,7%) e o ácido palmítico (9,0-21,9%). O ácido oleico, ácido gordo

monoinsaturado varia entre os 8,5-29,5%, ao passo que os PUFA's, como o ácido docosahexanóico (DHA) ocorre em percentagens que variam entre 5,3 a 14,4%. Em percentagens inferiores a 5% podem também ser encontrados ácido linoleico (ALA) e ácido gama-linolênico. Estudos anteriores, realizados com a *I. galbana* demonstraram que quando sujeitas a baixas temperaturas e sem luminosidade apresentam uma elevada quantidade de DHA na fase exponencial (Matsunaga *et al.*, 2005). Além disso, foi ainda verificado que estas microalgas são úteis para o enriquecimento da alimentação de rotíferos, larvas de várias espécies de peixes marinhos, crustáceos e bivalves, sendo amplamente utilizadas na aquacultura (Sánchez *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2007; Yingying e Changhai, 2009).

A deficiência em nutrientes no meio pode fazer com que o metabolismo da microalga se adapte às novas condições externas. Tal implica que para se atingir uma determinada biomassa com certas características bioquímicas, a composição do meio é um fator fundamental a ter em conta (Sayegh e Montagnes, 2011). Por outro lado a composição do meio de cultura afeta igualmente a taxa de crescimento específica, assim como a quantidade máxima de biomassa produzida.

Os parâmetros de cultivo de *I. galbana* podem mudar significativamente com as alterações das condições de cultura, tais como a temperatura, o caudal de arejamento, pH e a intensidade da luz (Lin *et al.*, 2007), o que implica que as alterações no meio de cultura induzam diferenças na composição bioquímica em termos dos conteúdos, proteicos, lipídicos, de hidratos de carbono e pigmentos da microalga (Phatarpekar *et al.*, 2000).

1.1.2 *Nannochloropsis gaditana*

O género *Nannochloropsis* pertence à classe Eustigmatophyceae, encontra-se habitualmente no meio marinho (Lubián, 1982), tendo no entanto recentemente sido encontrada em águas doces e salobras (Casal e Vilchez, 2007).

A espécie *Nannochloropsis gaditana*, L. M. Lubián 1982, (*N. gaditana*) é característica de águas marinhas, sendo unicelular de forma cocóide, com um diâmetro muito reduzido (menos de 5 µm), não apresentando mobilidade (Fawley e Fawley, 2007). São metabolicamente muito ativas em resultado da sua relação superfície-volume.

Estas microalgas podem encontrar-se em todos os oceanos do mundo, em concentrações que podem variar entre os 10^2 e 10^4 células por cm^3 na zona superior fótica, desempenhando um papel extremamente importante no ciclo do carbono, dos

minerais, em especialmente em águas oligotróficas (Mohammady *et al.*, 2005). A sua temperatura ótima de crescimento é abaixo dos 28°C (Barnabé, 1994).

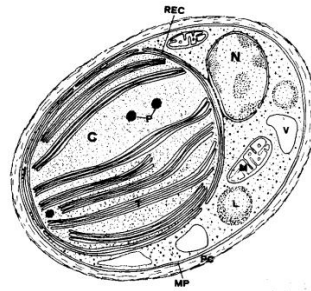


Figura 2 - Esquema representativo das principais características estruturais da *N. gaditana*, C- cloroplasto, MP- membrana plasmática; N- núcleo, M- mitocôndria; REC- retículo endoplasmático, T- tilacóides, PC- parede celular, V- vacúolos, L- lípidos (Adaptado de Lubián, 1982).

Segundo Casal e Vilchez (2007) estas microalgas possuem um plastídio amarelo-esverdeado, devido à presença de clorofila a. Contêm também violaxantina e vaucherixantina como principais pigmentos acessórios, os quais são de extrema importância a nível farmacêutico e comercial (Macías-Sánchez *et al.*, 2005). Em menores proporções apresentam uma enorme gama de pigmentos como a anteraxantina, cantaxantina, zeaxantina, e carotenos (β -caroteno) (Gentile e Blanch, 2001; Rocha *et al.*, 2003).

As microalgas deste género são de extrema importância para a aquacultura sendo utilizadas para o cultivo de peixes, rotíferos, bivalves, crustáceos e alimentação de algumas fases larvares de cefalópodes (Ferreira *et al.*, 2009). Este facto deve-se ao rápido crescimento, à elevada capacidade para acumular lípidos, podendo atingir concentrações de 65-70% do peso seco total durante a fase estacionária em resposta ao stress, nomeadamente baixas concentrações de azoto e /ou fósforo (Simionato *et al.*, 2010). O elevado teor de PUFA's de cadeia longa (EPA) (Mohammady *et al.*, 2005) presentes nestas microalgas são importantes para a prevenção de várias doenças (Casal e Vilchez, 2007).

1.2 Cultivo de microalgas

1.2.1 Parâmetros de cultivo

Há vários fatores que influenciam o crescimento de microalgas tais como os fatores abióticos, a luminosidade (qualidade, quantidade), temperatura, nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidade e produtos químicos tóxicos. Os fatores bióticos tais como a existência de microrganismos patogênicos (bactérias, fungos, vírus), a competição por outras microalgas e fatores operativos, arejamento deficiente, diluições mal efetuadas e a frequência de colheita (Mata *et al.*, 2010).

No entanto os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento das microalgas, e que serão alvo de uma descrição pormenorizada, são a quantidade de nutrientes, a luminosidade, o pH, o arejamento, a salinidade, a temperatura e contaminantes biológicos (Barsanti e Gualtieri, 2006).

1.2.1.1 Temperatura

O crescimento das microalgas é dependente da temperatura. Esta é importante para a dissociação de moléculas contendo carbono, tornando-o disponível para a fotossíntese (Kommareddy e Anderson, 2005).

A maioria das culturas de microalgas pode ser mantida a temperaturas entre os 10 e os 30°C (Barnabé, 1994). A temperatura tem impactos significativos na taxa de crescimento, no tamanho da célula e na composição bioquímica das microalgas logo é de extrema importância dar atenção a este parâmetro, pois tem efeitos na produção e consequentemente na utilização das microalgas a nível industrial e comercial. Segundo Barsanti e Gualtieri (2006), temperaturas inferiores as 18°C podem desacelerar o crescimento, enquanto temperaturas superiores a 35°C podem ser letais para a maioria das espécies. No entanto cada microalga possui características distintas na taxa específica de crescimento e na sua composição (Hu, 2004; Sayegh e Montagnes, 2011).

1.2.1.2 Luminosidade

A intensidade luminosa é um dos fatores que limita o crescimento das microalgas devido à fotossíntese (Once e Akpolat, 2006; Once e Akpolat, 2008).

As algas podem ser cultivadas utilizando luz solar ou luz artificial como fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono (Singh e Gu, 2010), sendo muitas das vezes necessário ajustar o fotoperíodo. A intensidade da luz desempenha um papel importante, mas as

exigências variam bastante com a profundidade e densidade da cultura de microalgas. Em profundidades e concentrações mais elevadas a intensidade da luz deve aumentar de modo a garantir que a luz penetre através da totalidade da cultura. No entanto se o aumento da luz for muito elevado pode resultar na fotoinibição (Hu, 2004; Barsanti e Gualtieri, 2006). Muitas microalgas podem entrar em stress quando sujeitas a 24h de iluminação, sendo muitas das vezes utilizados fotoperíodos de um ciclo dia / noite, podendo geralmente ser de 16D:8N, 14D:10N ou 12D:12 (Lorenz *et al.*, 2005).

1.2.1.3 pH

A maioria das microalgas requer diferentes pH (Kommareddy e Anderson, 2005), muito embora e na maioria dos casos, este deverá situar-se entre os 7,5 e 9 (Kong *et al.*, 2007). No entanto, segundo Muller-Feuga e colaboradores (2003) o pH pode situar-se entre os 6 e os 9, mas com um ideal próximo do 8-8,5 (Barsanti e Gualtieri, 2006). O pH do meio de cultura tem tendência para aumentar com o aumento da densidade celular e com a idade do cultivo, devido ao consumo de CO₂ por parte das microalgas. No caso de uma elevada densidade celular na cultura poderá ser adicionado CO₂ para permitir a correção de pH e aumentá-lo, podendo este atingir o seu máximo (pH=9) durante o crescimento das microalgas (Sayegh e Montagnes, 2011).

1.2.1.4 Salinidade

As microalgas marinhas são extremamente tolerante a mudanças na salinidade (Sayegh e Montagnes, 2011). A maioria das espécies cresce melhor numa salinidade ligeiramente inferior ao do seu habitat natural. Segundo segundo Barsanti e Gualtieri, (2006), as salinidades ideais encontram-se entre os 20-24 e entre os 25-27, segundo Muller-Feuga e colaboradores (2003).

1.2.1.5 Arejamento

O arejamento numa cultura de microalgas é de extrema importância, pois impede que não ocorra sedimentação, garantindo que as células se mantenham igualmente expostas à luz e aos nutrientes, evita a estratificação térmica, homogeneiza a cultura, e potencia as trocas gasosas (Gouveia, 2010). No entanto, um arejamento muito intenso pode danificar as células sendo aconselhável um caudal suave (Mata *et al.*, 2010).

1.2.1.6 Contaminantes biológicos

Os contaminantes biológicos comumente observados incluem algas, fungos, e bactérias. Segundo Moheimani (2005), uma maneira de diminuir os contaminantes e melhorar o rendimento da cultura é depois de remover o organismo indesejado da cultura, sujeitar esta mesma cultura a uma alteração temporária de fatores abióticos (temperatura, pH, ou luz) (Mata *et al.*, 2010).

1.2.2 Cultivo em *batch*

O método mais comum para o cultivo de microalgas é o cultivo em modo *batch*. Este consiste em colocar num recipiente (reator) um volume limitado de meio de cultura ao qual é adicionado o inóculo respetivo no início do cultivo (Lee e Shen, 2004; Richmond, 2004). O facto de não ocorrer entrada ou saída de matéria, conduz ao esgotamento dos nutrientes ao longo do tempo (Barsanti e Gualtieri, 2006). Neste tipo de cultivo, e para algumas espécies, torna-se necessária a existência de agitação de forma a garantir uma eficaz troca de nutrientes e gases na interface células-água. A agitação é frequentemente fornecida através da introdução de um caudal de arejamento (Richmond, 2004).

A densidade de microalgas aumenta exponencialmente até que ocorra o esgotamento de alguns fatores limitantes. Um desses fatores poderá ser a concentração de nutrientes que diminuem ao longo do tempo. De referir que, igualmente os produtos excretados pelas células vão aumentando ao longo do crescimento, sobretudo após o estabelecimento da fase estacionária, podendo tornar-se inibitórios ao seu crescimento (Doran, 2005).

Uma vez consumidos todos os recursos (nutrientes), as culturas acabaram por morrer, a não ser que sejam fornecidos novamente ao meio de cultivo. A cultura pode ser iluminada através de luz artificial ou luz natural (Andersen, 2005). Devido à facilidade deste método, o cultivo em modo *batch* é utilizado frequentemente a nível industrial (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Em cultivo tipo *batch*, a população de microalgas mostra um padrão de crescimento típico segundo uma curva sigmoide (Andersen, 2005), que consiste em diferentes fases de crescimento (Figura 4) (Barsanti e Gualtieri, 2006). As diferentes fases de crescimento da população de microalgas são as seguintes:

(1 e 2) Fase Lag e Fase de aceleração

A fase lag ou fase de latência corresponde à fase de adaptação fisiológica às condições do novo meio de cultura, devido a possíveis alterações de nutrientes, salinidade, luminosidade, irradiação, entre outros (Andersen, 2005).

O atraso no crescimento das microalgas pode estar relacionado com a presença de células não-viáveis, (Andersen, 2005) ou de esporos no inóculo. Igualmente pode também ser atribuído à adaptação do estado fisiológico do metabolismo celular para o crescimento, como o aumento dos níveis enzimáticos e metabolitos envolvidos na divisão celular e fixação de carbono. Durante esta fase a taxa de crescimento é zero (Barsanti e Gualtieri, 2006).

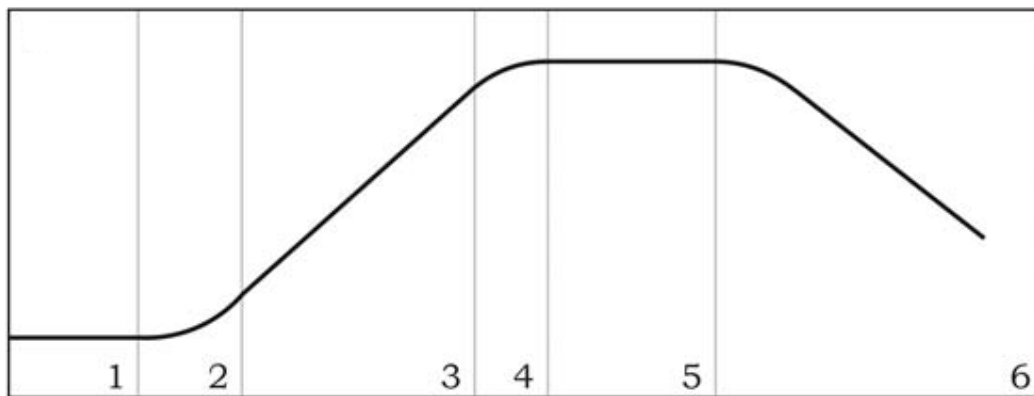


Figura 3 – Curva de crescimento de microalgas em modo *batch*, 1 – Fase lag, 2 – Fase de aceleração, 3 – Fase exponencial, 4 – Fase de desaceleração, 5 – Fase estacionária, 6 – Morte. (Adaptado de Barsanti e Gualtieri, 2006).

A sua duração depende da concentração e do estado fisiológico do inóculo (Andersen, 2005). Em seguida temos a fase de aceleração que é a fase intermédia entre a fase lag e a fase exponencial, em que a adaptação já se encontra completa (Barsanti e Gualtieri, 2006).

(3) Fase exponencial

Assim que a fase de adaptação termina as microalgas começam a crescer e a multiplicar-se, atingindo a fase máxima de multiplicação celular e de crescimento exponencial ou logaritmo do número de células (Andersen, 2005).

A cultura é composta por células jovens e ainda bioquimicamente mais ricas em proteínas do que em lípidos (Lee e Shen, 2004; Andersen, 2005). As microalgas multiplicam-se até que exista a saturação de minerais e luz solar. Geralmente as culturas

de microalgas em fase exponencial contêm mais proteína, enquanto as culturas em fase estacionária possuem mais hidratos de carbono e glicogénio (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas duplicam a sua biomassa num prazo de 24 horas durante a fase exponencial (Mata *et al.*, 2010).

A curva de crescimento, em relação à fase exponencial, desaceleração e estacionária pode ser descrita com uma função hiperbólica semelhante à de Michaelis-Menten. Estas descreve a cinética de absorção de nutrientes e a relação dinâmica a fotossíntese e luminosidade (Barsanti e Gualtieri, 2006).

(4) Fase de desaceleração

Quando a taxa de crescimento celular começa a diminuir, é indicativo de que a cultura começou a entrar na fase de desaceleração, podendo ocorrer em consequência da diminuição da quantidade de luz que chega às células, à diminuição de nutrientes, à alteração de pH, ao défice de CO₂, ou outros fatores físicos e químicos que começam a ser limitantes ao crescimento (Barsanti e Gualtieri, 2006).

(5) Fase estacionária

Após a fase de desaceleração a população de microalgas continua a aumentar. No entanto a taxa de crescimento começa a diminuir até atingir o zero, altura em que a cultura entra na fase estacionária.

Na fase estacionária a concentração de células permanece constante no seu valor máximo, até se esgotarem os nutrientes (Grobbelaar, 2004; Richmond, 2004).

(6) Fase morte

A fase final da cultura é a morte ou o *crash*, caracterizada por uma taxa de crescimento negativa. Nesta fase a qualidade do meio de cultivo começa a deteriorar-se muito significativamente, principalmente devido à acumulação de produtos de excreção tóxicos e ao esgotamento de nutrientes, não sendo possível sustentar a cultura. A densidade celular diminui rapidamente e a cultura entra em colapso (Barsanti e Gualtieri, 2006).

1.3 Fotobioreactor

O fotobioreactor pode ser definido como um sistema de cultivo para organismos fototróficos (Tredici, 2004; Harun *et al.*, 2010), nomeadamente microalgas. Através do PBR é possível controlar parâmetros físico-químicos (pH, oxigénio, CO₂, temperatura), a

evaporação e conseqüentemente aumento da salinidade, redução das perdas de CO₂. Este reator permite desse modo uma maior concentração de células e uma maior produtividade (Posten, 2009; Barsanti e Gualtieri, 2006; Singh e Gu, 2010).

O rendimento da produção de biomassa depende da quantidade de luz que atinge cada célula, sendo a relação superfície volume um fator importante para a utilização eficiente de luz em diferentes PBR's (Moheimani, 2005).

Um dos problemas que pode ocorrer nos sistemas fechados é o excesso de oxigênio dissolvido no meio produzido pela fotossíntese durante o período de luz que pode causar danos nas células (Pulz e Scheibenbogen, 1998; Matsunaga *et al.*, 2005). Existe uma enorme variedade de configurações de PBR, no entanto serão apenas abordados o PBR coluna de bolhas e *airlift*.

1.3.1 Fotobioreactor coluna de bolhas

Os PBR's coluna de bolhas são amplamente aplicados industrialmente uma vez que permitem uma eficaz transferência de massa entre a fase gasosa e líquida (exemplo, reacções químicas heterogêneas) (Lucas *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2010).

O PBR não possui partes móveis e consiste essencialmente num vaso de reação com um difusor montado na secção inferior (Bosma *et al.*, 2007; Eriksen, 2008). O difusor proporciona um diâmetro de bolhas extremamente reduzido, sendo o fluxo no PBR determinado pelas bolhas originadas por este. A agitação deste PBR é peristáltica (Kantarci *et al.*, 2005).

A hidrodinâmica e a transferência de massa do PBR dependem inteiramente do comportamento das bolhas que são libertadas a partir do difusor (Vasconcelos *et al.*, 2003). Podem ocorrer diferentes regimes de fluxo, que dependem da taxa de arejamento, do design do difusor, do diâmetro da coluna e das propriedades do meio, tais como a viscosidade. Este tipo de reator pode ter fluxo homogêneo ou heterogêneo (Doran, 1995), dependendo principalmente da velocidade superficial do ar e da sua uniformidade de distribuição (Juliá *et al.*, 2007).

O regime heterogêneo é caracterizado por um regime turbulento originando bolhas de ar irregular (Lucas *et al.*, 2005). Assim obtém-se uma distribuição mais ampla do tamanho de bolhas geradas por coalescência. A existência de um perfil de fração de gás e a presença de grandes estruturas de circulação de líquido (vortex) resultam num fluxo instável (Juliá *et al.*, 2007; Kantarcu *et al.*, 2005) (Figura 6).

Está estabelecido que os fenômenos físicos envolvidos no aparecimento e desenvolvimento dessas estruturas de vortex são resultado da inerente instabilidade da gravidade, causando distúrbios na mistura gás-líquido (Mudde, 2005).



Figura 4 – Representação esquemática do reator coluna de bolhas de regime homogêneo (Adaptado de Krichnavaruk *et al.*, 2005).

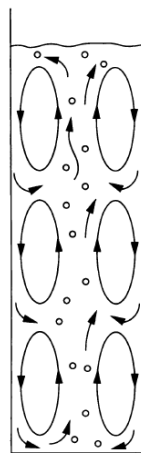


Figura 5 – Representação esquemática do reator coluna de bolhas com regime heterogêneo, (Adaptado de Doran, 1995).

O fluxo homogêneo caracteriza-se pelo tamanho quase uniforme das bolhas e por uma distribuição uniforme destas pelo difusor (Figura 5) (Juliá *et al.*, 2007).

O PBR coluna de bolhas foi desenhado sobretudo para proporcionar uma boa transferência de massa entre a fase líquida e a fase gasosa (Kantanci *et al.*, 2005).

O desempenho do PBR depende fortemente das características do fluxo (Lucas *et al.*, 2005; Darmana *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2010).

Há um crescente interesse na área da investigação e da indústria sobre a hidrodinâmica dos reatores coluna de bolhas. A nível industrial este poderá ter várias aplicações relacionadas com as diferentes áreas como a petroquímica, a bioquímica e a ambiental (Lucas *et al.*, 2005).

1.3.2 Fotobioreactor *airlift*

Os PBR's *airlift* possuem uma agitação pneumática, estes foram amplamente utilizados na indústria química, petroquímica e na indústria de bioprocessos, na produção de várias enzimas, antibióticos, proteínas, biomassa (Kilonzo *et al.*, 2010) e no tratamento de águas residuais (Luo e Al-Dahhan, 2008).

Recentemente, muitos investigadores têm vindo a recomendar a utilização deste tipo de reator na cultura de microalgas e cianobactérias (Luo e Al-Dahhan, 2008; Azher *et al.*, 2005).

Para além da estabilidade e flexibilidade operacional, este tipo de reatores melhoram significativamente a capacidade dos microrganismos fotossintéticos em receber eficientemente energia, aumentando assim o desempenho global do sistema de cultivo (Luo e Al-Dahhan, 2008).

No fotobioreactor *airlift* de circulação interna (Znad *et al.*, 2004), o padrão de circulação é definido através de um *loop* que divide o reator em duas secções distintas, cada uma com o seu padrão de fluxo próprio (Zimmerman *et al.*, 2009; Ahamed e Vermette, 2010).

Na zona ascendente (ou *riser*), secção onde ocorre a maioria das transferências gás-líquido, é injetado o gás que se liberta na parte superior, ficando a secção descendente (ou *downcomer*) na maioria dos casos desgaseificada em larga extensão (Figura 7) (Merchuk e Camacho, 2009).

Consegue-se assim um decréscimo na densidade do fluido do tubo ascendente em relação ao tubo descendente, provocando a sua circulação: da base para o topo, no tubo ascendente e em sentido inverso no tubo descendente (Znad *et al.*, 2004; Merchuk e Camacho, 2010).

Por sua vez, a velocidade de circulação está diretamente dependente do caudal de arejamento. Na zona de desgaseificação, a ação conjunta do fluxo líquido aliado à libertação do gás provoca uma mistura tão eficaz que essa zona do reator comporta-se como um tanque perfeitamente agitado. Estas características dotam o PBR *airlift* de boas

propriedades de transferência de massa líquido-sólido-gás (Jin e Lant, 2004; Mírón *et al.*, 2004).

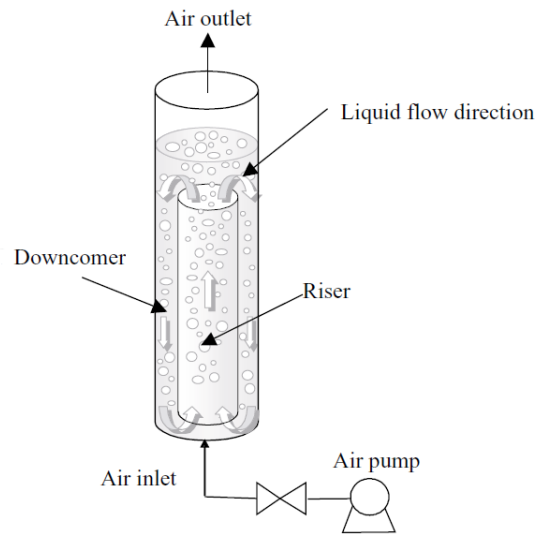


Figura 6 – Representação esquemática do reator *airlift* (Adaptado de Krichnavaruk *et al.*, 2005).

A mistura da fase gasosa e a transferência de massa gás-líquido têm, neste tipo de reator, as mesmas características que o reator coluna de bolhas, exceto nas situações em que a velocidade de circulação do líquido é elevada. Neste caso, como o gás é arrastado rapidamente para o exterior, o seu tempo de resistência no reator é pequeno e a transferência de massa é prejudicada (Fonseca e Teixeira, 2007).

Os reatores *airlift* são conhecidos, tal como os PBR colunas de bolhas, pelo baixo valor de tensões de corte associadas ao fluxo da fase fluida. Além disso, o campo de tensões de corte no interior dos reatores *airlift* é relativamente constante quando comparado com reatores do tipo coluna de bolhas. E devido às características do fluxo no seu interior, a capacidade de transferência de calor e massa aumenta ao mesmo tempo que diminui a energia consumida pela agitação (Jurascik *et al.*, 2006).

Este tipo de reator pode ser utilizado em condições assépticas, apresentando um menor consumo energético quando comparado com os PBR's com agitação mecânica. Também proporciona uma boa mistura, uma elevada transferência de massa e calor e com padrões de fluxo bem definidos (Kilonzo *et al.*, 2010).

As vantagens de utilizar este tipos de reatores são o baixo consumo de energia, não possuem partes móveis, proporcionarem uma boa suspensão de sólidos e uma elevada transferência de calor e massa. Acima de tudo fornecem uma rápida mistura mantendo o meio homogêneo (Luo e Al-Dahhan, 2008; Zimmerman *et al.*, 2009).

1.4 Potencialidades e Aplicações das microalgas

Devido à multiplicidade de aplicações das diferentes espécies de microalgas (Mirón *et al.*, 2002), recorre-se frequentemente ao cultivo de microalgas em larga escala sendo importante monitorizar diversos parâmetros da cultura, tais como a taxa específica de crescimento e a biomassa. Além disso, é igualmente importante determinar a composição bioquímica das diferentes espécies de microalgas (proteínas, lipídios e hidratos de carbono), de forma a ajustar as condições de cultivo, permitindo aos investigadores selecionar as linhagens adequadas e ajustar a taxa específica de crescimento (Sayegh e Montagnes, 2011).

As microalgas possuem um enorme potencial, começando a ser utilizadas por volta de 1950 com o intuito de retirar o CO₂ da atmosfera (Sydney *et al.*, 2010).

Além do importante papel ambiental contra o aquecimento global, a fixação de carbono é de interesse industrial, pois reduz as emissões causadas pela indústria. Por outro lado, vários autores descrevem a produção de compostos orgânicos voláteis, compostos halogenados, polissacarídeos, entre outros compostos produzidos pelas microalgas, indicando que as destino do carbono pode ser bastante diversificado e a produção de biomassa apenas um dos seus destinos (Sydney *et al.*, 2010).

Atualmente, Singh e Gu (2010) estimam que 1kg de biomassa seca de microalgas utiliza cerca de 1,83kg de CO₂, podendo a produção de microalgas ser de extrema importância, ajudando a fixar resíduos de CO₂ melhorando a qualidade do ar.

Em 1970, foi iniciada a extração de gorduras a partir de microalgas. O elevado valor nutricional das microalgas está relacionado com a sua composição química, essencialmente no que diz respeito aos lípidos, nomeadamente os ácidos gordos. Estes possuem características notáveis tais como componentes energéticos, nutrientes essenciais à alimentação e em alguns casos podem fornecer ácidos gordos importantes ao consumo humano (Sayegh e Montagnes, 2011).

Até à data os PUFA's n-3 eram obtidos principalmente através de óleo de peixe, o qual não é a fonte ideal devido à sua escassez e odor, bem como a sua variação sazonal. Devido a estes fatores, as microalgas têm vindo a ser consideradas como uma boa fonte alternativa de PUFA's n-3 (Harun *et al.*, 2010).

Estes PUFA n-3 desempenham um papel importante na saúde humana, como a prevenção de doenças cardiovasculares e circulatórias (Lin *et al.*, 2007). De acordo com

Singh e Gu, 2010 as microalgas contêm naturalmente PUFA n-3, que podem ser purificados para fornecer um suplemento alimentar de alto valor nutritivo. Nas microalgas as fontes de n-3 são normalmente EPA e DHA.

O EPA pode entrar na composição de certos fármacos que são utilizados no tratamento de doenças cardíacas e inflamatórias como a asma, artrite, enxaqueca e psoríase (Singh e Gu, 2010). As aplicações clínicas do DHA, incluem a prevenção e o tratamento de cancro, SIDA, doenças cardiovasculares, controlo e redução do colesterol, fortalecimento do sistema imunitário (Singh e Gu 2010; Collet *et al.*, 2011).

Atualmente, devido à crescente procura por fontes de energia alternativas, tem sido dado particular atenção à análise do potencial das microalgas em virtude do seu elevado teor em gordura (Singh e Gu, 2010; Amaro *et al.*, 2011; Bitog *et al.*, 2011).

Tem sido amplamente estudada a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, sendo já sido produzido com sucesso biodiesel, bioetanol e o biometano (Chisti, 2007). No entanto, até à data os biocombustíveis baseados em microalgas ainda não foram comercializados em grande escala (Ahmad *et al.*, 2011). São várias as espécies de microalgas cujo metabolismo pode ser induzido por forma a que as células possam acumular elevadas quantidades de lípidos. O teor médio de lípidos varia entre 1 e 70%, mas sob certas condições algumas espécies podem chegar a 90% do peso seco da microalga (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas frequentemente utilizadas são *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Dunaliella*, *Cylindrotheca*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia* e *Tetraselmis*. Estas possuem teores de lípidos entre 20 e 50%, cujos cultivos podem ser otimizados de forma a ser atingida uma maior produtividade (Amaro *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Mata *et al.*, 2010;).

Para além das aplicações referidas anteriormente, as microalgas podem igualmente ser extremamente úteis ao nível da biorremediação fixando o azoto dos fertilizantes (Chisti, 2007). O seu cultivo pode ser também utilizado no tratamento de efluentes orgânicos da indústria agroalimentar. Os efluentes orgânicos podem servir como meio de crescimento para o cultivo de microalgas, fornecendo nutrientes essenciais como o azoto e fósforo (Chisti, 2007).

O cultivo de microalgas acarreta uma grande vantagem para o meio ambiente, pois o seu cultivo não exige herbicidas nem pesticidas e para além disso pode produzir valiosos coprodutos como pigmentos, proteínas e lípidos (Posten e Schaub, 2009).

Certas espécies de microalgas, como as pertencentes aos géneros *Nannochloropsis* e *Isochrysis*, são igualmente aplicadas em larga escala nas aquaculturas das mais diversas espécies de recursos marinhos (Phatarpekar *et al.*, 2000), nomeadamente moluscos, camarões, larvas de peixes (Muller-Feuga., 2003), artémia, rotíferos, bivalves, copépodes (Brown *et al.*, 1997; FAO, 2006; Gouveia *et al.*, 2008; Brown, *et al.*, 2007). Outra das aplicações é a sua utilização nas rações de animais, estando muitas das microalgas já estudadas como substituto ou suplemento na alimentação animal. Estas possuem uma elevada qualidade nutricional, podendo ser utilizadas na alimentação de gado (Singh e Gu, 2010).

Recentemente, tal tem implicado o desenvolvimento de sistemas de produção de microalgas cada vez mais eficientes, possuindo uma qualidade nutricional ideal, com o objetivo de melhorar a sobrevivência e o crescimento, assim como a redução dos custos (Phatarpekar *et al.*, 2000).

As microalgas podem ainda ser utilizadas como suplemento da nutrição humana, sendo comercializadas em diferentes formas, tais como comprimidos, cápsulas e líquidos, podendo também ser incorporadas em massas, salgados, barras de chocolate ou gomas, e bebidas (Spolaore *et al.*, 2006; Gouveia *et al.*, 2008).

As microalgas podem sintetizar, metabolizar, acumular e secretar uma enorme diversidade de metabolitos primários e secundários, sendo muitos dos quais são substâncias com enorme potencial e com aplicações ao nível alimentar, farmacêutico e cosmético (Gouveia *et al.*, 2008).

Além das clorofilas, como pigmento fotossintético primário, as microalgas também possuem pigmentos secundários, tais como ficobiliproteínas e uma ampla gama de carotenoides. Estes pigmentos naturais são utilizados na fotossíntese e protegem as algas da radiação solar (Nakanishi, 2001). As microalgas são reconhecidas como uma excelente fonte de corantes naturais e nutraceuticas e espera-se que superem os sintéticos, bem como outras fontes naturais devido à sua sustentabilidade e renovação na natureza (Bernal *et al.*, 2010).

Todas as algas possuem um ou mais tipos de clorofila. A clorofila a é o principal pigmento fotossintético em todas as algas. As clorofilas são cerca de 0,5 a 1,5% do peso seco das microalgas. São utilizadas na indústria farmacêutica, devido à sua atividade “quelante”, tornando a clorofila adequada para ser utilizada em pomada, tendo vários benefícios farmacêuticos, especialmente na recuperação do fígado e úlceras, podendo

ainda ser utilizada como alimento e corante (Gouveia *et al.*, 2008). A clorofila repara ainda as células, aumentando a hemoglobina no sangue e estimula o crescimento celular (Harun *et al.*, 2010). Para além destas aplicações, e com o objetivo de melhorar a saúde pública a clorofila é ainda utilizada na indústria alimentar como suplemento nutricional em alimentos processados, em vez de pigmentos artificiais (Spolaore *et al.*, 2006; Harun *et al.*, 2010).

Nas microalgas os carotenoides funcionam principalmente como agentes fotoprotectores e como pigmento acessório, protegendo assim o aparelho fotossintético contra danos causados pela luz solar. Algumas microalgas podem começar a sintetizar carotenoides, em resposta a vários fatores ambientais e culturais (por exemplo, luz, temperatura, sais e nutrientes), no qual a alga para o seu crescimento e muda drasticamente o seu metabolismo de síntese, acumulando carotenoides secundários como uma adaptação a ambientes severos (Cardozo *et al.*, 2007). Uma dieta rica em carotenoides tem sido correlacionada com uma diminuição no risco de doenças tais como aterosclerose, cataratas e cancro (Gouveia *et al.*, 2008). Mais de 600 carotenoides podem ser encontrados na natureza, cerca de 50 possuem provitamina-A, incluindo α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina (Bernal *et al.*, 2010). No entanto, são poucos os carotenoides utilizados comercialmente, o β -caroteno e a astaxantina e em menor quantidade a luteína, zeaxantina, licopeno, são pigmentos usados na alimentação animal, produtos farmacêuticos, cosméticos e corantes alimentares (Spolaore *et al.*, 2006).

1.5 Biosensor

Um biosensor é definido como qualquer aparelho de medição que apresenta na sua constituição uma componente biológica (tecidos, micro-organismos, células, organelos, enzimas, composição bioquímica) e um elemento de tradução físico-químico da resposta a ser medida (Tkac *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas, os biosensores têm sido utilizados numa ampla variedade de aplicações (Naessens e Tran-Minh.1999). Estes biosensores são geralmente projetados para identificar um determinado parâmetro numa única amostra. Recentemente, têm sido baseados em vetores, facto que aumenta o rendimento da análise e permite a deteção através de vários parâmetros numa única análise (Chouteau *et al.*, 2004).

A construção da matriz baseada em vetores tem trazido inúmeras vantagens. Uma vantagem distinta de um biosensor baseado em vetores é a capacidade de,

simultaneamente, analisar várias amostras na presença de múltiplos parâmetros independentes (Tsai e Doong, 2005).

Atualmente, as microalgas têm sido aplicadas no desenvolvimento de biosensores pois respondem a alterações que possam ocorrer nos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, os biosensores que utilizam a *Chlorella vulgaris* para detetar o efeito de herbicidas, foram desenvolvidos com base na medição da fluorescência da clorofila a 682 nm (sob luz de excitação 469nm), dado que a clorofila aumenta quando se encontram compostos tóxicos no meio ambiente e inibem o fotossistema II (Védrine e tal., 2003; Pena-Vazquez *et al.*, 2009).

Outro exemplo é a construção de um biosensor utilizando *Chlorella sp.* imobilizada para a determinação de compostos orgânicos voláteis na forma de aerossóis (Naessens e Tran-Minh, 1999) (Chouteau *et al.*, 2004). Em 2007, foi desenvolvido um biosensor utilizando a *Tetraselmis chunii*, que se baseia na retenção de cobre (II) pela microalgas por medição volumétrica de cobre (II) (Alpat *et al.*, 2007).

Dado o crescente interesse pelas microlagas, e correspondente cultivo em grande escala, torna-se cada vez mais importante a construção de um biosensor que permita a monitorização dos cultivos microalgais em tempo real e por métodos não intrusivos.

2. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo principal a construção de uma matriz de dados (parâmetros de cultivo, composição bioquímica e celular, varrimento no visível) para a definição de um algoritmo a ser utilizado na construção de um biosensor com a finalidade de proceder à monitorização em tempo real e por método não intrusivo dos cultivos de *I. galbana* e *N. gaditana* em diferentes tipos de reatores biológicos.

Para atingir o objetivo anteriormente enunciado, pretendeu-se igualmente:

- (1) Determinar as curvas de crescimento de *I. galbana* e da *N. gaditana*, com a identificação das fases de crescimento;
- (2) Avaliar a duração das diferentes fases de crescimento;
- (3) Estimar a variação de biomassa ao longo do tempo de cultivo e composição bioquímica celular (pigmentos e conteúdo lípidico);
- (4) Comparar o crescimento em diferentes tipos de reatores (balões, fotobioreactor coluna de bolhas e *airlift*);
- (5) Monitorizar os cultivos por métodos espectrofotométricos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultivo de microalgas

As microalgas *I. galbana* e a *N. gaditana* foram obtidas através do IPIMAR/CRIPSul Estação Piloto de Piscicultura, Olhão, Portugal. A temperatura da sala de cultivo foi mantida a $22\pm 4^{\circ}\text{C}$, e as células sujeitas a um fotoperíodo dia:noite de 16h:08h e um intensidade luminosa igual a $60\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

O meio de cultura utilizado para o crescimento de todas as culturas foi o meio f/2 (Guillard e Ryther 1963). Este é definido como sendo um meio enriquecido, dado ser preparado com água salgada natural, à qual são adicionados diversas soluções de nutrientes e vitaminas (Anexo 1- Tabela VIII), com uma salinidade de 30 (Guillard e Ryther 1963).

Para a sua preparação, procedeu-se a uma filtração prévia da água salgada natural através de filtros de $0.2\ \mu\text{m}$ de porosidade, visando a remoção de microrganismos e de matéria orgânica particulada, seguida por uma esterilização por autoclavagem durante 15 minutos (à temperatura de 120°C e pressão igual a 1atm).

As culturas de *I. galbana* e *N. gaditana* foram mantidas em reatores de 500mL em cultivo modo *batch*. A cultura inicial para todos os cultivos foi de $6,5 \times 10^6$ microalgas mL^{-1} (D. O. $\pm 0,651$ aos 540nm) para a *I. galbana* e de $7,6 \times 10^6$ microalgas mL^{-1} (D.O. 0,5807 aos 540nm para a *N. gaditana*). O volume final da cultura nova continha 10% de inóculo inicial.

Para os ensaios realizados nos fotobioreactores, as condições utilizadas nos cultivos foram as descritas anteriormente com a aplicação de caudal de arejamento 2,3 ml/segundo no PBR de coluna de bolhas (volume total 1500mL) e um caudal de arejamento de 12 mL/segundo no PBR *airlift* (volume total 4400mL). Todos os cultivos foram realizados em modo *batch*.

3.2 Estudos de crescimento

3.2.1 Curva de crescimento

O estudo do crescimento envolveu a recolha diária de cada amostra em triplicado (5mL) de cada um dos reatores ao longo do tempo (dias). Posteriormente as amostras foram fixadas com 2 gotas de soluto de lugol (Panreac, Barcelona, Espanha) (Barsanti e Gualtieri, 2006) para garantir a imobilização das células, tendo-se de seguida procedido à contagem direta do número de indivíduos presentes em cada réplica. A contagem foi efetuada numa Câmara de Neubauer com 1mm de profundidade, utilizando um microscópio ótico (Zeiss, AXIOSTAR PLUS, Alemanha), com uma ampliação de 400x. O valor obtido depois de extrapolado para a área total da câmara, permitiu determinar a densidade celular (células mL⁻¹ x10⁶). Através das densidades registadas para os três triplicados, calculou-se o número médio da densidade celular e o respetivo desvio-padrão. A densidade celular média foi calculada segundo Andersen, 2005:

$$[\text{células mL}^{-1}] = M * 10000 * Fd$$

onde M é a média das microalgas na câmara de Neubauer e Fd é o fator de diluição necessário para se proceder a uma contagem viável.

Os resultados obtidos ao longo do tempo foram registados, permitindo traçar uma curva de crescimento para cada microalga e para cada um dos reatores ao longo do tempo em meio de cultura limitado. Com o auxílio do programa estatístico Sigma Plot as curvas de crescimento foram ajustadas pela aproximação à curva logística de 4 parâmetros (Ohse *et al.*, 2008), aplicando-se a seguinte fórmula:

$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{\frac{-(x-x_0)}{b}}}$$

Onde y é a densidade celular (células mL⁻¹) e x é o tempo (dias). Em cada uma das curvas de crescimento são apresentados os parâmetros (a e b, onde a determina o ponto onde a linha intersesta o eixo do Y e b corresponde ao declive da reta. Adicionalmente, determinou-se o coeficiente de determinação (r²).

Posteriormente foi calculada a taxa específica de crescimento (μ , d^{-1}). Para tal recolheu-se à seguinte fórmula (Andersen, 2005):

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{\Delta t}$$

onde N_0 é a densidade de microalgas no início de um intervalo de tempo, N_t densidade de microalgas no final de um intervalo de tempo e Δt é a variação no intervalo de tempo ($t_t - t_0$). Se o "r" é expresso em dias, em seguida, o "r" da taxa de crescimento pode ser convertido em divisões por dia (k), dividindo "r" pelo logaritmo natural (ln) de 2.0, de acordo com a seguinte fórmula (Andersen, 2005):

$$K = \frac{r}{0.6931}$$

O tempo de duplicação (T_2) da cultura é expressa na mesmas unidades de tempo do que "r", pode ser calculado a partir de uma estimativa de "r" com o uso da seguinte fórmula (Andersen, 2005):

$$T_2 = 0,6931/r$$

O rendimento da cultura foi expresso em percentagem e pode ser calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\eta = \frac{D_f - D_i}{D_i} \times 100$$

Onde D_f é a densidade celular final obtida pela cultura e D_i é a densidade celular inicial.

3.2.2 Definição das fases de crescimento

As fases de crescimento foram definidas visualmente através da análise dos resultados, e de acordo com a μ para cada uma das fases. Sendo que na fase de lag, $\mu \approx 0$, fase de aceleração $\mu < \mu_{\text{máx}}$, fase de exponencial $\mu \approx \mu_{\text{máx}}$, fase de desaceleração $\mu < \mu_{\text{máx}}$. e a fase estacionária em que $\mu = 0$.

3.2.3 Retra-Padrão

Cada uma das réplicas de 5mL, foi sujeita ao varrimento no espectrofotómetro ultravioleta-visível (UV-VIS) (Thermo, Aquamate v4,6) entre os 400 e os 700nm antes da contagem do número de células por mL, nos quais se detetou absorvâncias aos picos de

422nm, 441nm, 540nm e 547nm. Após a identificação de cada uma das fases de crescimento da curva de crescimento foi selecionada a fase exponencial e correlacionada com as absorvâncias dos diferentes comprimentos de onda correspondentes a essa fase, de modo a possibilitar a elaboração de uma reta-padrão para cada microalga nos diferentes reatores. As retas-padrão foram obtidas segundo a equação da reta:

$$\text{Absorvância} = m * \text{densidade celular} + c$$

A densidade celular (células mL⁻¹ x 10⁶), m corresponde ao declive da reta e o c corresponde à ordenada na origem. A escolha do comprimento de onda referente às retas-padrão foi efetuada com base nos valores do coeficiente de determinação (r²) e no p-value.

3.3 Parâmetros de cultivo

3.3.1 Determinação de Biomassa

A biomassa pode ser determinada através do peso seco (PS) e do peso seco livre de cinzas (PSLC). Para a determinação do PS e do PSLC, os filtros de vidro GF/F (Whatman GF/F, 47mm, tamanho do poro 0.7µm) foram sujeitos a uma pré-combustão (500°C, 4h) (Nabertherm B70) (Eaton *et al.*, 1998), pesados (Startorius AG Germany; TE 124S) e identificados.

Posteriormente, recolheram-se duplicados de *N. gaditana* e de *I. galbana* para a determinação do PS e PSLC. Foram filtrados 10mL de cada amostra por vácuo e colocados na estufa durante 24h a 60°C (Richmond, 2004), após as 24h procedeu-se à pesagem destes filtros e à determinação do PS. As amostras foram recolhidas diariamente.

A determinação do PS foi feita segundo Eaton e colaboradores (1998), Steinman e Lamberti, (1996):

$$\text{PS mg/ml} = \frac{A - B}{\text{volume amostra, mL}}$$

Onde A é o peso do filtro com a microalga seca (mg) e B é apenas o peso do filtro (mg).

De seguida, os filtros foram colocados na mufla a 540°C, 4h para se proceder à determinação do PSLC (Zhu e Lee, 1997).

A determinação do PSLC foi feita segundo Eaton, colaboradores, (1998) e Steinman e Lamberti, 1996:

$$\text{PSLC mg/mL} = \frac{C - D}{\text{volume de amostra, mL}}$$

onde C é o peso do filtro com resíduo antes mufla (mg) e D é o peso do filtro com resíduo após mufla (mg).

3.3.2 Determinação de clorofilas e feofitina

A determinação de clorofilas para cada microalga foi feito em duplicado do dia 0 até ao dia 5, recolheu-se 10mL de cada amostra, procedeu-se à filtração por vácuo, utilizando filtros de fibra de vidro (Whatman, GF/C, poro 0.45 e 25 mm de diâmetro) (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Posteriormente, foram colocados em tubos de centrífuga, tapados com folha de alumínio (os pigmentos são fotossensíveis ao calor) e congelados a uma temperatura de -20°C (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). Para a análise destas amostras, os tubos foram descongelados à temperatura ambiente. Em seguida adiciona-se, a cada tubo 10mL de acetona a 90% (v/v) (Fisher Scientific, UK), durante cerca de 10 minutos enquanto o filtro se encontra a ser macerado manualmente utilizando uma vareta de vidro. Após a maceração, os tubos foram colocados a 4°C overnight para uma extração completa, centrifugaram-se a 2880*g (Eppendorf, 5805R) durante 5 minutos (Carballo-Cardenas *et al.*, 2003). Foi retirado o sobrenadante e fez-se a leitura das absorvâncias, no espectrofotómetro UV-VIS em cuvette de quartzo, a diferentes comprimentos de onda (750nm, 665nm, 645nm e 630nm), tendo como branco a acetona a 90% (Parson *et al.*, 1981).

A concentração da clorofila a, b e c foram determinadas com base no método descrito por Parson *et al.*, 1981:

$$\text{mg pigmento L}^{-1} = \frac{C * v}{V * 10}$$

onde v é o volume de acetona (mL) e o V é o volume de amostra (mL), sendo necessário calcular a concentração de clorofilas através das seguintes equações:

$$C (\text{clorofila } a) = 11.85 E_{664} - 1.54 E_{647} - 0.08 E_{630}$$

$$C (\text{clorofila } c) = 24.52 E_{665} - 1.67 E_{664} - 7.60 E_{647}$$

A feofitina foi determinada tendo como base o método de Parson *et al.*, 1981. Nas amostras que foram analisadas, adicionou-se 20µl de HCl a 20% (Panreac, E.U.) e após 3 a 5 minutos, as amostras foram lidas novamente no espectrofotômetro de acordo com os comprimentos de onda da seguinte fórmula:

$$\text{Feofitina} = (26,7 * 17,7 * 665 \text{ depois de acidificado} - 665 \text{ antes de acidificado} * v) / (V * 10)$$

Onde as feofitinas são em mg L⁻¹, o v é o volume de acetona (mL) e o V é o volume de amostra (mL).

3.3.3 Conteúdo em Lípidos

As amostras foram recolhidas de culturas *I. galbana* e *N. gaditana* a diferentes tempos e foram analisadas pelo Departamento de Biotecnologia, Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI).

O conteúdo total de lipídios foi avaliado por citometria de fluxo multiparâmetros utilizando a fluorescência obtida pelo vermelho do Nilo (VN). Este método foi efetuado através do protocolo modificado descrito por de la Jara e seus colaboradores (2003). Adicionou-se 10µl de solução mãe de VN em acetona (0,033mg mL⁻¹) a 1mL de suspensão celular (≈ 106 células mL⁻¹). A solução foi misturada no vortex e incubada 2 minutos a 37°C, no escuro. A fluorescência obtida através do VN foi determinada utilizando o citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson Instruments, Erembodegem, Belgium) equipado com um laser de argônio (488nm). Após excitação a 488nm, o VN exibiu uma fluorescência amarelo-dourado e vermelha quando foi detetado pelos canais FL2 e FL3, respetivamente. As células não coradas foram utilizadas como controlo de autofluorescência medidos nos canais FL2 e FL3 (AFL2 e AFL3), sendo pré-marcados para todas as experiências com os mesmos valores de fluorescência. A fluorescência, correspondendo ao total de lipídios celular foi determinada com a soma dos rácios FL2/AFL2 e FL3/AFL3 (Silva *et al.*, 2009).

3.4 Análise estatística

A comparação entre as retas-padrão a diferentes comprimentos de onda para cada microalga, e o tipo de reator foi efetuada mediante a análises de variância (ANOVA) simples com P<0,05, através do software sigma plot.

4. Resultados

A *I. galbana* e a *N. gaditana* foram cultivadas em três reatores diferentes, nomeadamente, balão volumétrico, coluna de bolhas e *airlift*. O fotoperíodo foi de 16h D / 8 h N, a cultura inicial de *I. galbana* foi de $6,5 \times 10^6$ células mL^{-1} e a de *N. gaditana* foi de $7,65 \times 10^6$ células mL^{-1} para todos os cultivos, a uma temperatura de $22 \pm 4^\circ\text{C}$. Foi ainda determinada a $\mu_{\text{máx}}$ na fase exponencial e posteriormente a μ da cultura.

4.1 Crescimento de *I. galbana* e *N. gaditana* em balão volumétrico

4.1.1 Curvas de crescimento

A curva de crescimento de *I. galbana* foi definida ao longo de 7 dias, tendo sido identificadas as diferentes fases de crescimento.

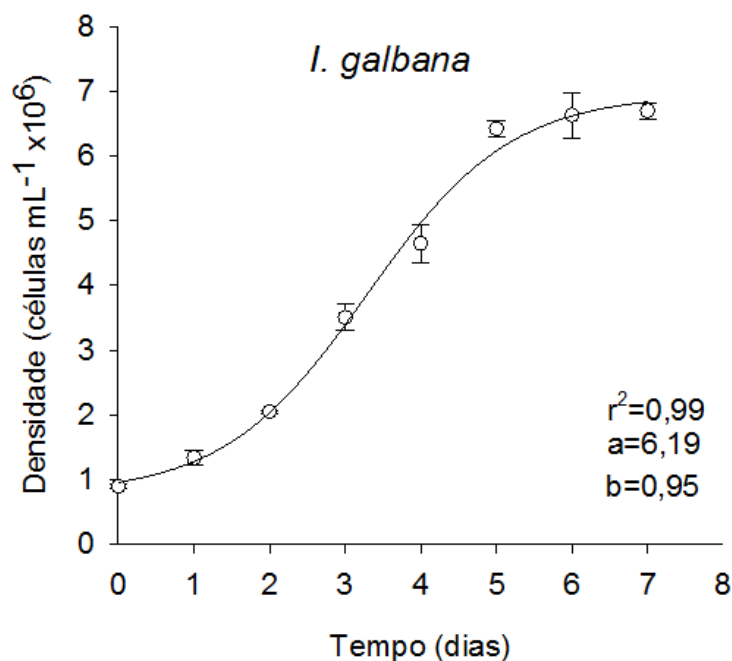


Figura 7 - Curva de crescimento de *I. galbana* ao longo do tempo, num reator de 500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22 \pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

A *I. galbana* inicia o seu crescimento na fase de aceleração, na qual começa o crescimento da microalga, decorrendo do dia 0 até ao dia 1 com uma densidade celular de $0,90 \times 10^6$ e $1,33 \times 10^6$ células mL^{-1} , respetivamente (Figura 8).

A fase exponencial ocorreu entre o dia 1 e o dia 5, sendo a densidade celular no dia 5 de $6,56 \times 10^6$ células mL^{-1} (40 d^{-1} (μ) $\approx \mu_{\text{máx.}}$). A fase estacionária ocorreu entre o dia 5 e o dia 7 atingindo uma densidade celular de $6,70 \times 10^6$ células mL^{-1} .

A curva de crescimento da *N. gaditana* foi determinada ao longo de 10 dias, nos quais também foram definidas as diferentes fases de crescimento (Figura 9).

A *N. gaditana* encontra-se na fase de aceleração do dia 0 até ao dia 1, com uma densidade celular respetivamente de $0,92 \times 10^6$ células mL^{-1} no dia 0 e de $1,16 \times 10^6$ células mL^{-1} no dia 1.

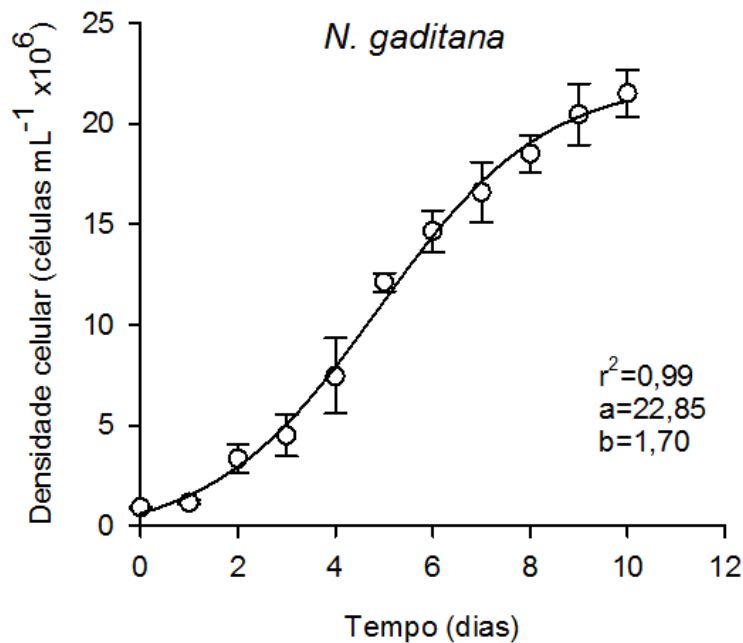


Figura 8 – Curva de crescimento de *N. gaditana* ao longo de 10 dias, num reator balão de 500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22 \pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

A *N. gaditana* começa a multiplicar-se entrando na fase exponencial do dia 1 até ao dia 7, atingindo uma densidade celular de $16,61 \times 10^6$ células mL^{-1} ($0,40 \text{ d}^{-1}$ (μ) $\approx \mu_{\text{máx.}}$). De seguida, o crescimento da cultura começa a diminuir entrando na fase de desaceleração, ocorrendo entre os dias 7 e 10 ($21,51 \times 10^6$ células mL^{-1}).

Através da análise do coeficiente de determinação ($r^2 \approx 1$), e dado que este é um indicador da qualidade de ajustamento linear, verifica-se que as curvas de *I. galbana* e de *N. gaditana* no balão volumétrico, se ajustam ao modelo proposto (curva sigmoide).

4.1.2 Retas-padrão

Após a contagem direta da *I. galbana* e da *N. gaditana* efetuou-se um varrimento entre os 300 e os 700nm e verificou-se a existência de 4 comprimentos de onda, correspondentes a 422nm, 441nm, 540nm e 547nm (Figura 10 e 11).

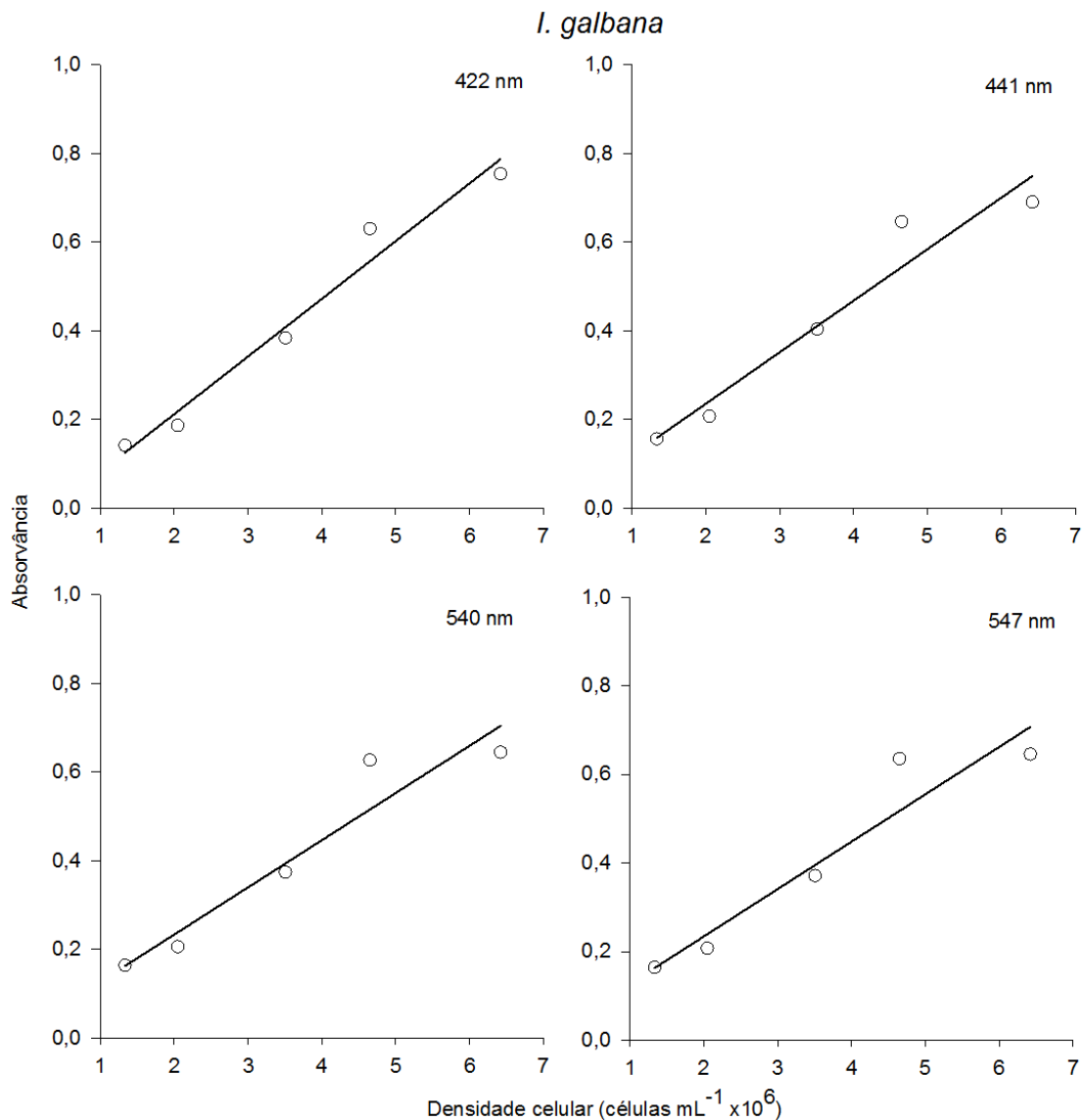


Figura 10 – Reta de calibração da *I. galbana* a 422, 441 540 e 547nm ao longo do tempo, num balão volumétrico, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, T= 22±2°C.

Com o intuito de correlacionar a densidade celular e os diferentes comprimentos de onda, construíram-se as respetivas retas-padrão. A fase escolhida para esta correlação foi a fase exponencial.

Determinadas as retas-padrão da *I. galbana*, observa-se que a reta-padrão com o comprimento de onda de 422nm apresenta um coeficiente de determinação (r^2) de 0,97 (Tabela II) e a efetuada comprimento de onda a 441nm apresenta um r^2 de 0,94.

As retas-padrão 421nm e 441nm apresentam um r^2 muito próximo de um ($p < 0,01$, Tabela II), indicando um ajustamento linear entre os dados praticamente perfeito.

Tabela II - Regressão linear entre a densidade celular (células $\text{mL}^{-1} \times 10^6$) da *I. galbana* e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. ($y = mx + c$, m - declive; c - ordenada na origem) r^2 - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 0,05, ou seja, sejam que $p < 0,05$.

ABS	m	c	r^2	p
422	0,13	-0,050	0,97	0,002(*)
441	0,12	0,003	0,94	0,007(*)
540	0,11	0,009	0,92	0,010(*)
547	0,11	0,020	0,91	0,010(*)

As retas-padrão efetuadas com um comprimento de onda de 540nm e 547nm apresentam um coeficiente de determinação (r^2) de 0,92 e 0,91 ($p < 0,05$) (Tabela II), indicando que padrão são estatisticamente significativas. Neste sentido, é possível afirmar que estas retas-padrão explicam a relação linear entre a densidade celular e as absorvâncias, relativamente aos comprimentos de onda em causa.

Das quatro retas-padrão efetuadas, referentes aos comprimentos de onda de 422 e 441nm, apresentam um r^2 mais elevado. Tal indica que estas são as retas que melhor explicam a relação existente entre a densidade celular e os dois comprimentos de onda.

Sendo a relação entre os diferentes comprimentos de onda e a densidade celular explicada pelas seguintes equações:

$$\text{Abs}_{422\text{nm}} = 0,13 \times \text{Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) - 0,050$$

$$\text{Abs}_{540\text{nm}} = 0,12 \times \text{Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,003$$

Esta mesma relação entre os diferentes comprimentos de onda e a densidade celular na fase exponencial foi determinada para o crescimento de *N. gaditana* num balão volumétrico (Figura 11).

Os diferentes comprimentos de onda apresentam um r^2 entre 0,98 e 0,99 ($p < 0,05$), Tabela III, o que indica que existe evidência estatística para afirmar que todas as retas explicam a relação existente entre a densidade celular e a absorvância aos diferentes comprimentos de onda.

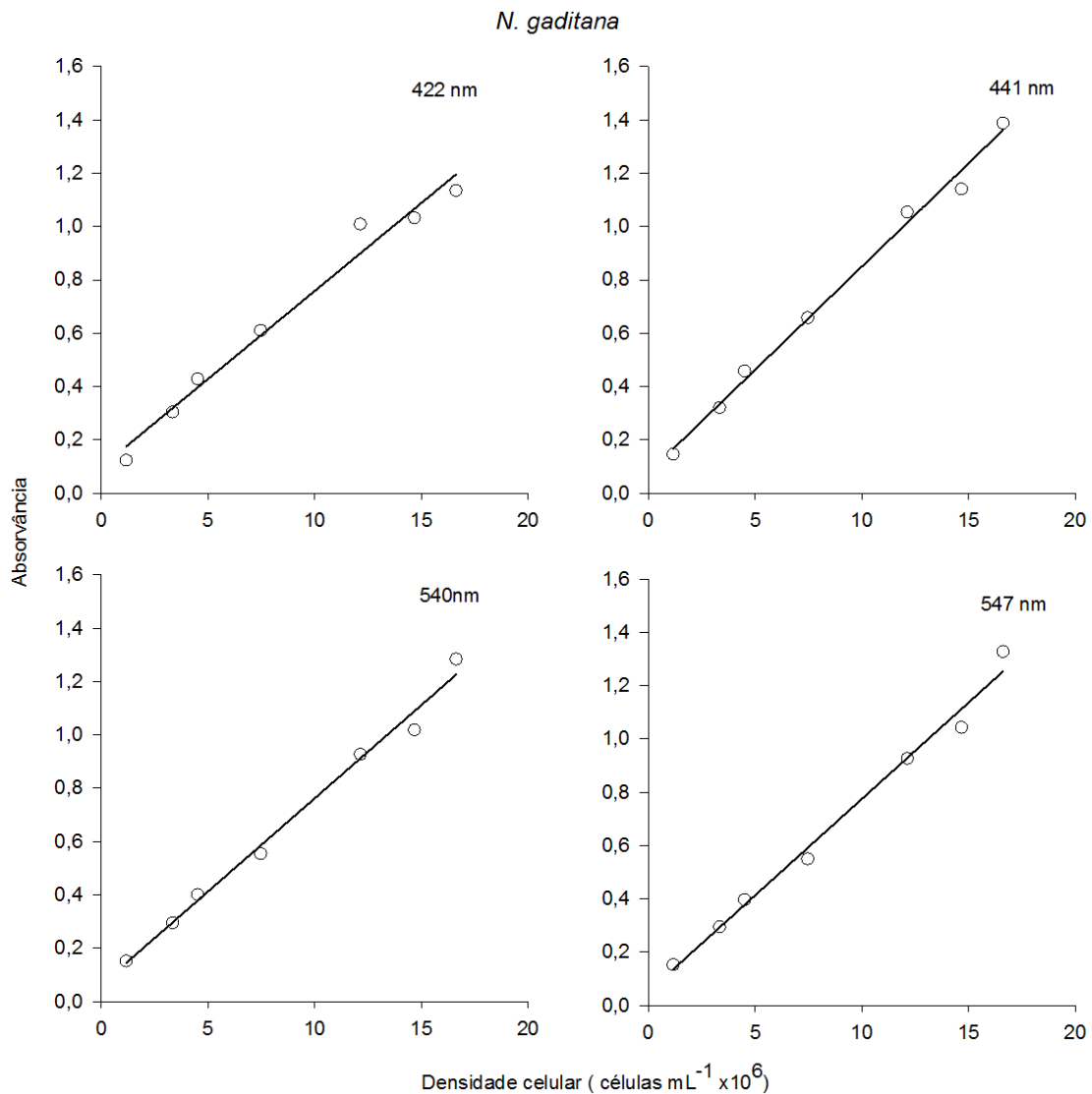


Figura 11 – Reta de calibração da *N. gaditana* a 422, 441 540 e 547nm ao longo do tempo, num balão volumétrico, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T = 22 \pm 2^\circ\text{C}$.

No entanto, dado que os comprimentos de onda de 441, 540 e 547nm apresentam um r^2 mais elevado ($p < 0,05$), Tabela III, então é possível verificar que estes são os que melhor explicam a relação existente entre a densidade celular da *N. gaditana* e a absorvância a estes comprimentos de onda. No entanto a equação da reta selecionada é a de 540nm.

Tabela III - Regressão linear entre a densidade celular (células mL⁻¹ x10⁶) da *N. gaditana* e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. ($y = mx + c$, m - declive; c - ordenada na origem) r^2 - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 0,05, ou seja, sejam que $p < 0,05$.

ABS	m	c	r^2	p
422	0,07	0,100	0,98	0,001(*)
441	0,08	0,080	0,99	0,001(*)
540	0,003	0,003	0,99	0,001(*)
547	0,07	0,050	0,99	0,001(*)

A equação que poderá traduzir a relação existente entre a densidade celular e a absorvância do comprimento de onda a 540nm é a seguinte:

$$\text{Abs}_{540\text{nm}} = 0,003 \times \text{Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,03$$

4.1.3 Determinação de clorofila e feofitina

A clorofila a, c e a feofitina foram determinadas ao longo de 5 dias para a *I. galbana* e ao longo de 7 dias para a *N. gaditana*.

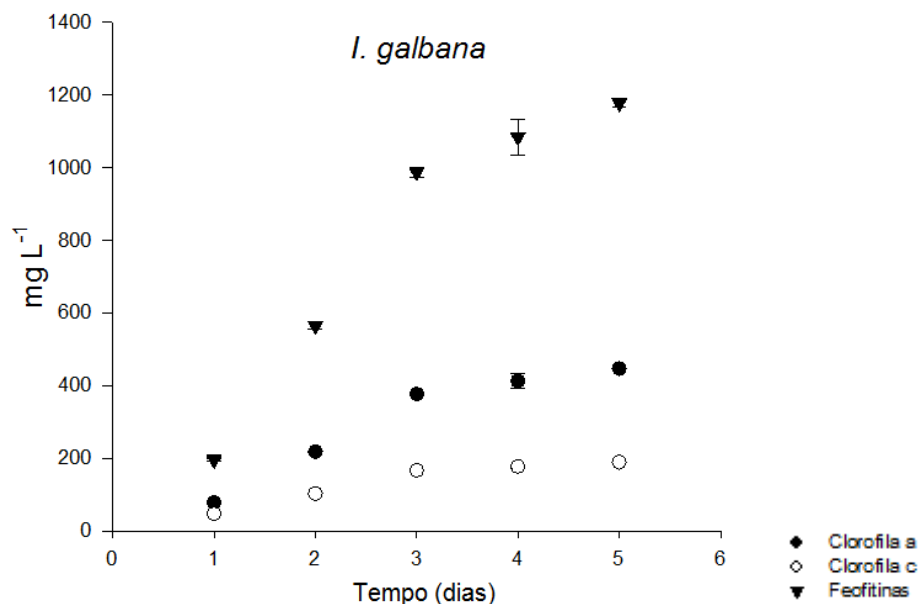


Figura 12 - Concentração de clorofila a, c e feofitina (mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias) de *I. galbana*.

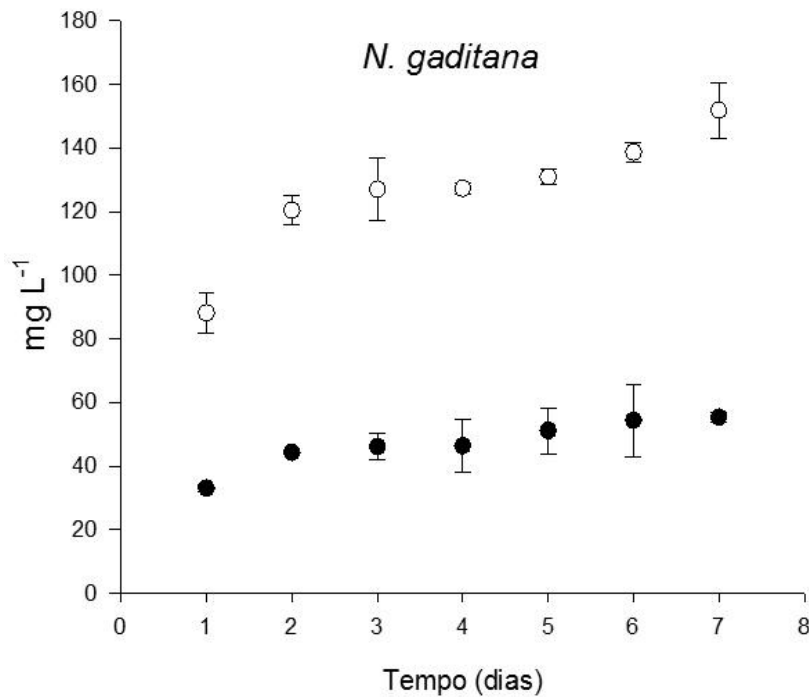


Figura 13 - Concentração de clorofila a e feofitina (mg L⁻¹) ao longo do tempo (dias) de *N. gaditana*.

A clorofila a presente na *I. galbana* apresentou uma concentração de 77,31 mg L⁻¹ no dia 1 e atingiu uma concentração máxima de 446,48 mg L⁻¹ no dia 5, a clorofila c apresentou uma menor concentração tendo no dia 1 46,63 mg L⁻¹ e ao dia 5, 188,97 mg L⁻¹. A feofitina apresentou uma concentração inicial no dia 1 de 195,7 mg L⁻¹ e no dia 5 apresentou uma concentração de 1177,74 mg L⁻¹ (Figura 12).

A *N. gaditana* apresentou uma concentração de clorofila a no dia 1 de 33,05 mg L⁻¹ e no dia 7 uma concentração máxima de 55,77 mg L⁻¹. A feofitina é o pigmento que apresenta uma maior concentração sendo esta de 151,83 mg L⁻¹ no dia 7 (Figura 13).

4.1.4 Determinação de biomassa

Em simultâneo foi também determinado o PS e o PSLC de cada microalga ao longo do tempo.

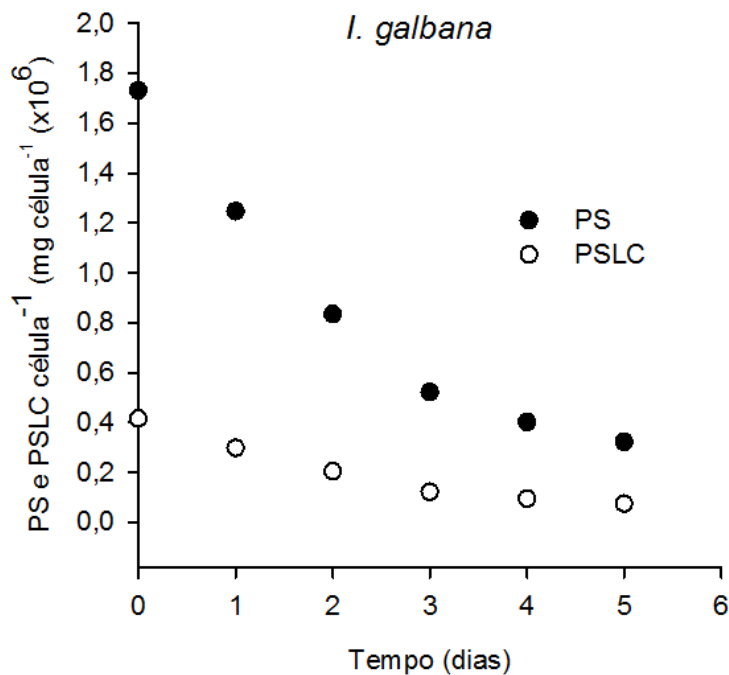


Figura 14 – Concentração de PS e PSLC por célula (mg célula⁻¹ x10⁶) de *I. galbana* ao longo do tempo.

No dia 0 a *I. galbana* apresentou uma concentração inicial de 1,73 mg células⁻¹ (x10⁶) e uma concentração final de 0,3mg célula⁻¹ (x10⁶) de PS. A concentração de PSLC inicialmente foi de 0,42 mg célula⁻¹ (x10⁶) e no dia 6 foi de 0,09 mg célula⁻¹ (x10⁶) (Figura 14).

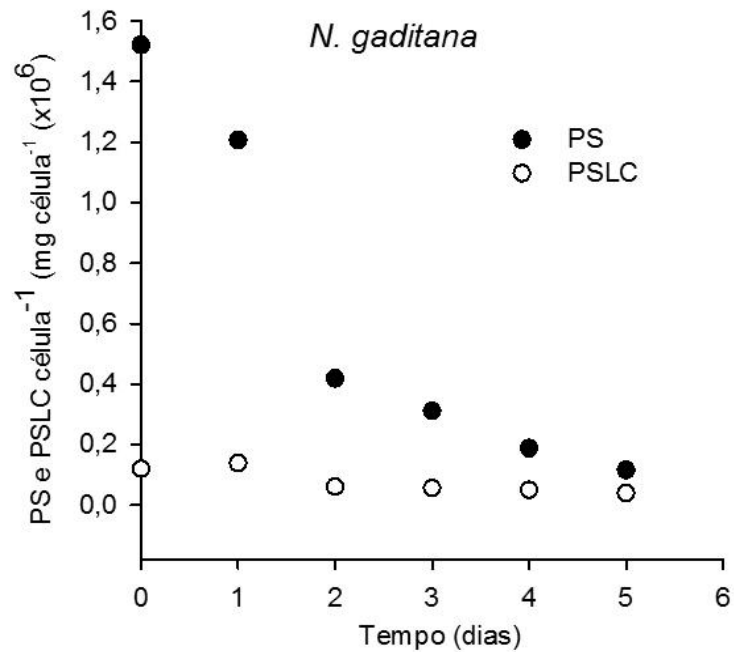


Figura 15 – Concentração de PS e PSLC por célula (mg célula⁻¹ x 10⁶) de *N. gaditana* ao longo do tempo.

A *N. gaditana* apresentou no dia 0 um PS de 1,52 mg célula⁻¹ (x 10⁶) e no dia 5 foi de 0,09 mg célula⁻¹ (x 10⁶). A concentração de PSLC no dia 0 foi de 0,12 mg célula⁻¹ (x 10⁶) e no dia 9 a concentração foi de 0,03 mg célula⁻¹ (x 10⁶) (Figura 15).

4.1.5 Conteúdo em lípidos

O método de fluorescência empregando o vermelho do Nilo foi utilizado para determinar a intensidade luminosa da *I. galbana* e da *N. gaditana* ao longo do tempo.

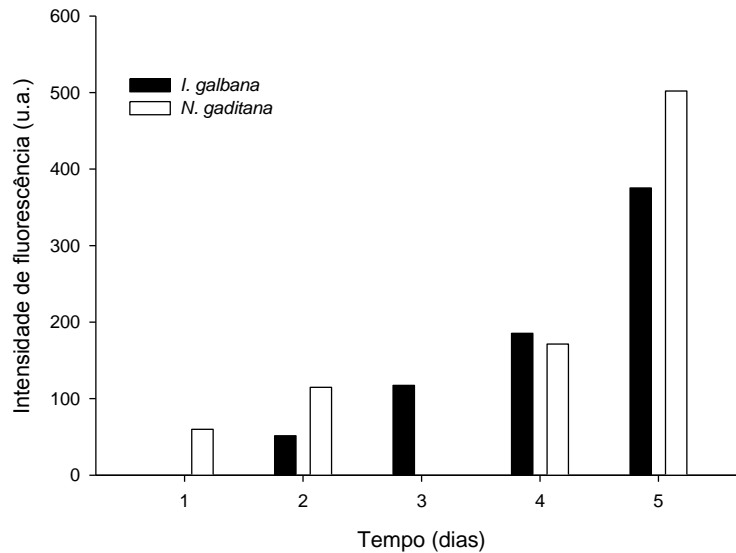


Figura 16 – Determinação da emissão da fluorescência através do vermelho do Nilo ao longo de 5 dias para a *I. galbana* e para a *N. gaditana*.

Ambas as microalgas depois de serem submetidas ao vermelho do Nilo apresentam uma elevada fluorescência que é detetada ao longo dos 5 dias. A *N. gaditana* no dia 2 apresentou uma fluorescência de 60,2 u.a. e no dia 5 de 502,1 u.a.. A *I. galbana* apresentou uma fluorescência de 51,6 u.a. no dia 1 e no dia 5 de 375,8 u.a. (Figura 16).

4.2 Crescimento de *I. galbana* e *N. gaditana* no reator coluna de bolhas

4.2.1 Curvas de crescimento

A *I. galbana* e a *N. gaditana* foram cultivadas no reator coluna de bolhas, e mantidas às mesmas condições que as microalgas cultivadas nos balões volumétricos. Contudo, importa referir que, o reator coluna de bolhas possui um volume de 1500mL.

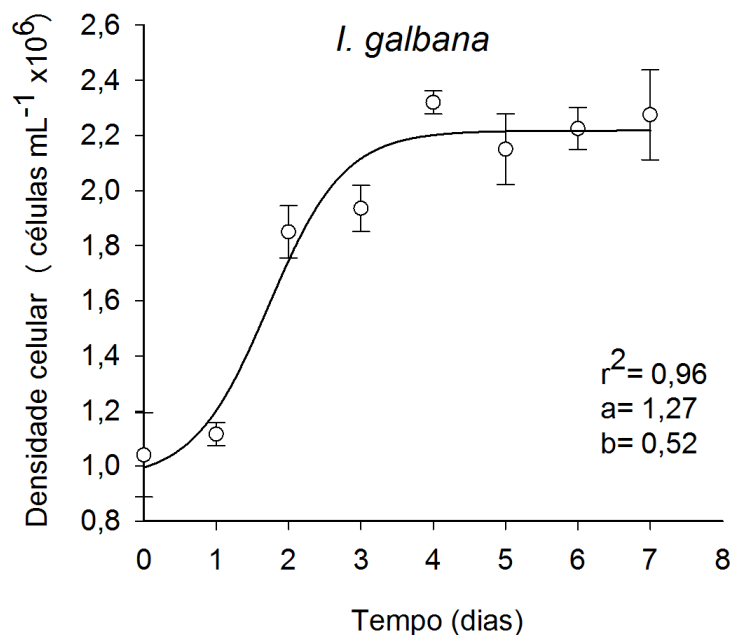


Figura 17 - Curva de crescimento de *I. galbana* ao longo de 10 dias, num reator coluna de bolhas de 1500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

O crescimento de *I. galbana* no reator coluna de bolhas da apresentou uma densidade celular de $1,04 \times 10^6$ células mL^{-1} no dia 0 e de $1,11 \times 10^6$ células mL^{-1} no dia 1. Estes dois dias correspondem à fase aceleração (Figura 17).

A fase exponencial ocorreu entre o dia 1 e o dia 2. A densidade celular no dia 2 foi de $1,85 \times 10^6$ células mL^{-1} ($0,51 \text{ d}^{-1}$ (μ) $\approx \mu_{\text{máx}}$.) A fase de desaceleração ocorreu entre o dia 2 e ao dia 4, sendo a fase estacionária registada entre o dia 4 e o dia 7. A densidade celular máxima atingida foi de $2,28 \times 10^6$ células mL^{-1} .

A *N. gaditana* apresentou uma curva de crescimento ao longo do tempo, em que a fase aceleração ocorreu entre o dia 0 ($0,80 \times 10^6$ células mL^{-1}) e o dia 3 ($1,35 \times 10^6$ células mL^{-1}), a fase exponencial decorre até ao dia 7 atingindo uma densidade celular de $2,46 \times 10^6$ células mL^{-1} , seguindo-se a fase de desaceleração e a fase estacionária (Figura 18).

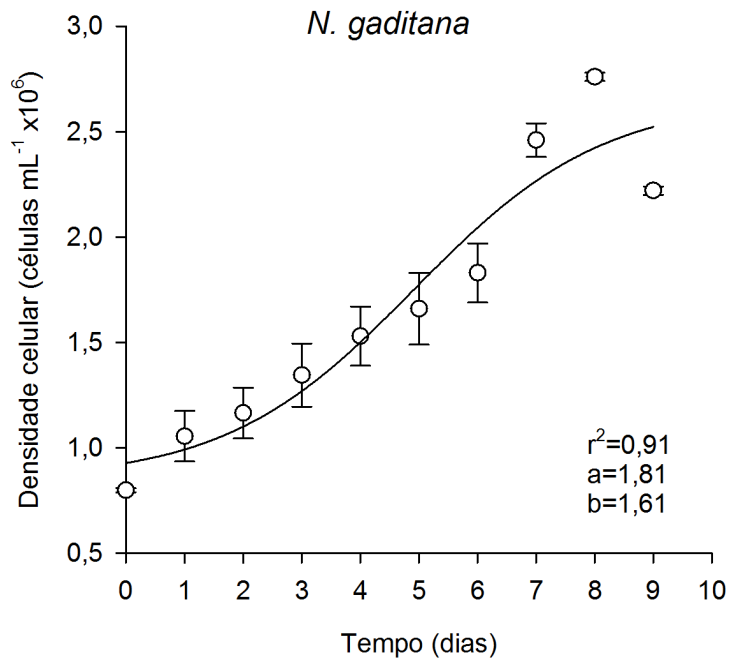


Figura 18 - Curva de crescimento de *N. gaditana* ao longo de 10 dias, num reator coluna de bolhas de 1500mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha intersecta o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

Pelos resultados obtidos, foi possível verificar que a correlação observada na curva da *I. galbana* e da *N. gaditana* é significativamente elevada ($r^2=0,96$ e $0,91$) (Figura 17 e 18).

4.2.2 Determinação de clorofila e feofitina

Ao longo de 5 dias foi determinada a clorofila a, c e a feofitina existente na *I. galbana*. A clorofila a no dia 0 foi de $51,64 \text{ mg L}^{-1}$ e aumentou ao longo do tempo atingindo no dia 4 uma concentração de $100,86 \text{ mg L}^{-1}$. A clorofila c apresentou um aumento de $18,54 \text{ mg L}^{-1}$ para $36,87 \text{ mg L}^{-1}$. Por sua vez a feofitina apresentou uma concentração inicial de $126,43 \text{ mg L}^{-1}$ e uma final de $263,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 19).

A *N. gaditana* apresentou uma concentração de clorofila a no dia 1 de $19,70 \text{ mg L}^{-1}$ e no dia 7 uma concentração máxima de $54,97 \text{ mg L}^{-1}$. A feofitina apresentou valores muito reduzidos atingindo um máximo de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 20).

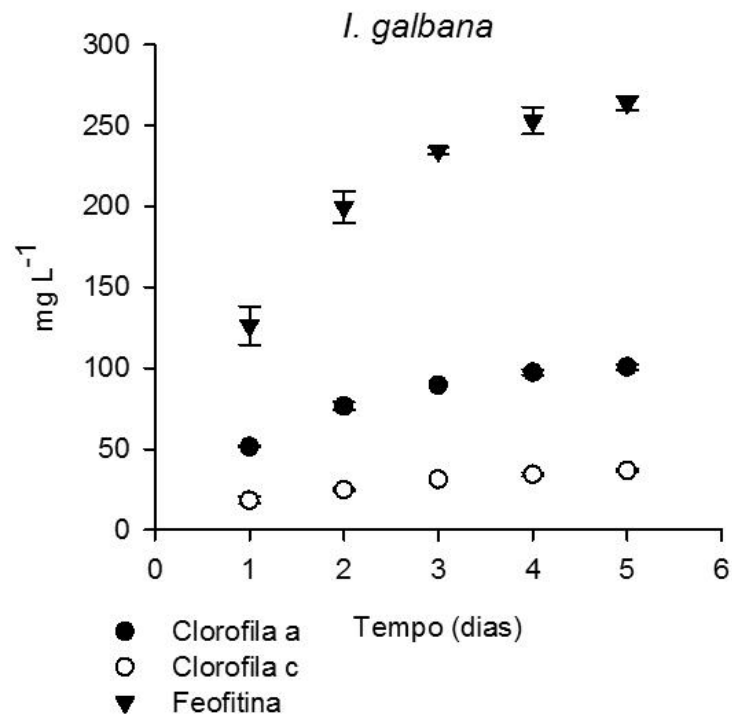


Figura 19 – Concentração de clorofila a e feofitina (mg L⁻¹) em *N. gaditana*.

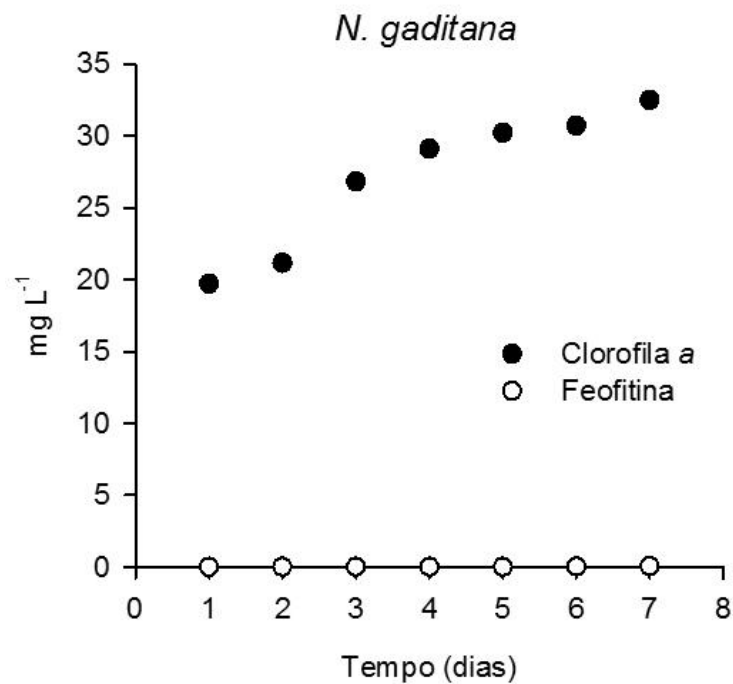


Figura 20 – Concentração de clorofila a, c e feofitina (mg L⁻¹) em *I. galbana*.

4.2.3 Determinação da biomassa

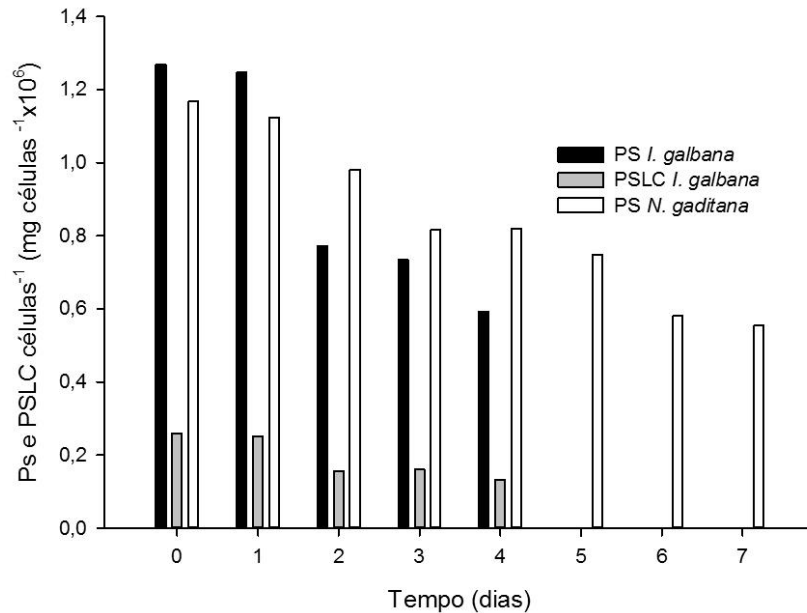


Figura 21 – Concentração do PSLC e do PS célula⁻¹ (mg células⁻¹x10⁶) de *I. galbana* e *N. gaditana* ao longo de 7 dias.

A matéria orgânica por célula ao longo do tempo vai diminuindo devido à divisão celular, tendo no dia 0 1,30 mg células⁻¹ (x10⁶) e no dia 4 0,59 mg células⁻¹ (x10⁶) para a *I. galbana*. A *N. gaditana* apresenta um PS por célula de 1,17 mg células⁻¹ (x10⁶) no dia 0, e ao fim dos 7 dias um PS de 0,55 mg células⁻¹ (x10⁶).

A matéria mineral por célula da *I. galbana* no dia 0 apresentou um valor de 0,30 mg células⁻¹ (x10⁶) e no dia 4 0,13 mg células⁻¹ (x10⁶) (Figura 21).

4.3 Crescimento de *I. galbana* e de *N. gaditana* no reator *airlift*

4.3.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento da *I. galbana* e da *N. gaditana* foram, respetivamente, determinadas ao longo de 6 e 11 dias, num reator *airlift* de 4400mL. As condições de cultivo foram idênticas aos cultivos anteriormente descritos.

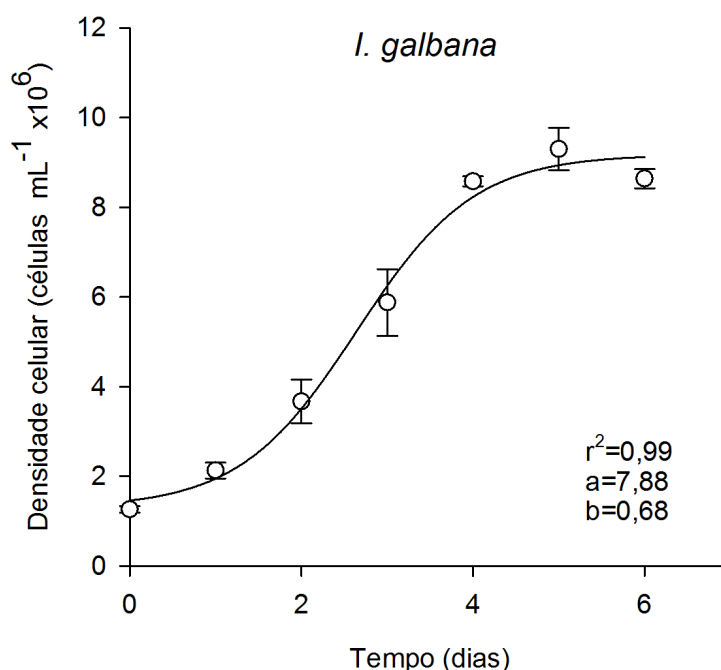


Figura 22 - Curva de crescimento da *I. galbana* ao longo de 6 dias, num reator *airlift* de 4400mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^{\circ}\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

A curva de crescimento da *I. galbana* apresenta uma densidade celular de $1,26 \times 10^6$ células mL⁻¹ no dia 0 e de $2,13 \times 10^6$ células mL⁻¹ no dia um, correspondentes à fase de aceleração, na qual se inicia o crescimento das microalgas na cultura. A fase exponencial decorre entre o dia 1 e o dia 4 atingindo uma densidade de $8,58 \times 10^6$ células mL⁻¹, no dia 4 ($0,50 \text{ d}^{-1}$ (μ) $\approx \mu_{\text{máx}}$), seguindo-se a fase estacionária que ocorre até ao dia 6 ($8,64 \times 10^6$ células mL⁻¹), na qual o crescimento cessa. O r^2 de 0,99 indica uma adequada relação entre o tempo e a densidade celular (Figura 22).

A curva de crescimento da *N. gaditana* foi determinada ao longo de 11 dias no reator *airlift* e foram identificadas as diferentes fases de crescimento.

A fase aceleração encontra-se entre o dia 0 e o dia 2 atingindo uma densidade celular de $1,17 \times 10^6$ células mL^{-1} , no dia 2 (Figura 23).

Seguidamente, verifica-se a existência da fase exponencial que termina no dia 8 com uma densidade celular de $10,59 \times 10^6$ células mL^{-1} ($0,22 \text{ d}^{-1}$ (μ)= $\mu_{\text{máx}}$) começando a fase de aceleração até ao dia 11 ($13,43 \times 10^6$ células mL^{-1}).

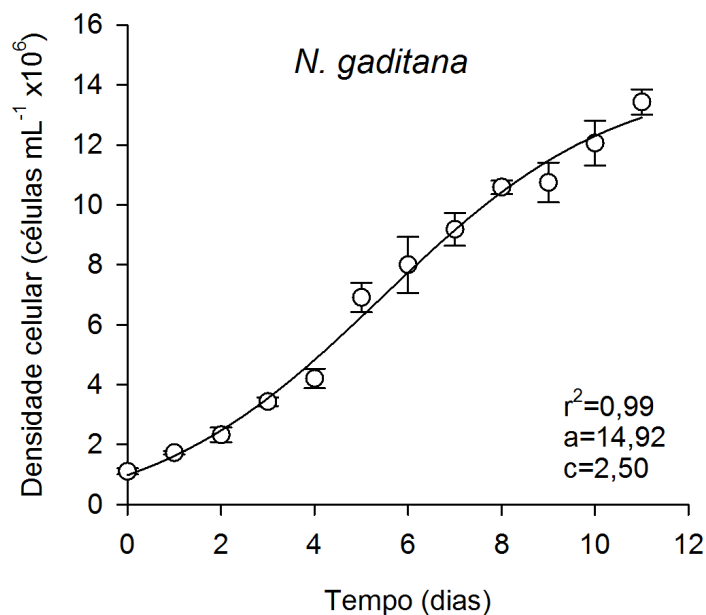


Figura 23 – Curva de crescimento de *N. gaditana* ao longo de 11 dias, num reator *airlift* de 4400mL, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$, r^2 – coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento linear, cuja variação se situa entre 0 e 1, a determina o ponto onde a linha interseca o eixo do Y e b corresponde à inclinação da reta.

Os resultados indicam que as curvas de crescimento da *I. galbana* e de *N. gaditana* no reator *airlift* se ajustam adequadamente (r^2 de 0,99). Uma vez mais indicam a existência de uma correlação adequada entre os dados obtidos e as curvas ajustadas (Figura 22 e 23).

4.3.2 Retas-padrão

De seguida procedeu-se à realização das retas-padrão referentes à densidade celular e à absorvância, a quatro comprimentos de onda (422nm, 441nm, 540nm, 547nm). Para a *I. galbana* verificou-se que qualquer das retas explica a relação existente entre as absorvâncias e a densidade celular, aos quatro comprimentos de onda (Figura 24, Tabela IV), pois apresentam um r^2 0,99. Tais relações podem ser expressas pelas seguintes equações:

$$\text{Abs422nm}=0,07x \text{ Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,03$$

$$\text{Abs441nm}=0,07x \text{ Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,03$$

$$\text{Abs540nm}=0,06x \text{ Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,03$$

$$\text{Abs547nm}=0,06x \text{ Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,03$$

Tabela IV - Regressão linear entre a densidade celular (células mL⁻¹ x10⁶) da *I. galbana* e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 0,05, ou seja, sejam que p<0,05.

ABS	m	c	r ²	p
422	0,07	0,03	0,99	<0,0001(*)
441	0,07	0,03	0,99	<0,0001(*)
540	0,06	0,03	0,99	<0,0001(*)
547	0,06	0,03	0,99	<0,0001(*)

Tabela V - Regressão linear entre a densidade celular (células mL⁻¹ x10⁶) da *N. gaditana* e a absorvância a diferentes comprimentos de onda. (y = mx + c, m - declive; c - ordenada na origem) r² - coeficiente de determinação: indicador da qualidade de ajustamento, cuja variação se situa entre a e 1; (*) o modelo é estatisticamente significativo ao nível de 0,05, ou seja, sejam que p<0,05.

ABS	m	c	r ²	p
422	15,54	0,28	0,98	0,0003(*)
441	0,07	0,02	0,98	0,0003(*)
540	0,01	0,06	0,98	0,0002(*)
547	0,06	0,03	0,98	0,0002(*)

As retas-padrão para a *N. gaditana* foram efetuadas com os valores referentes à fase exponencial.

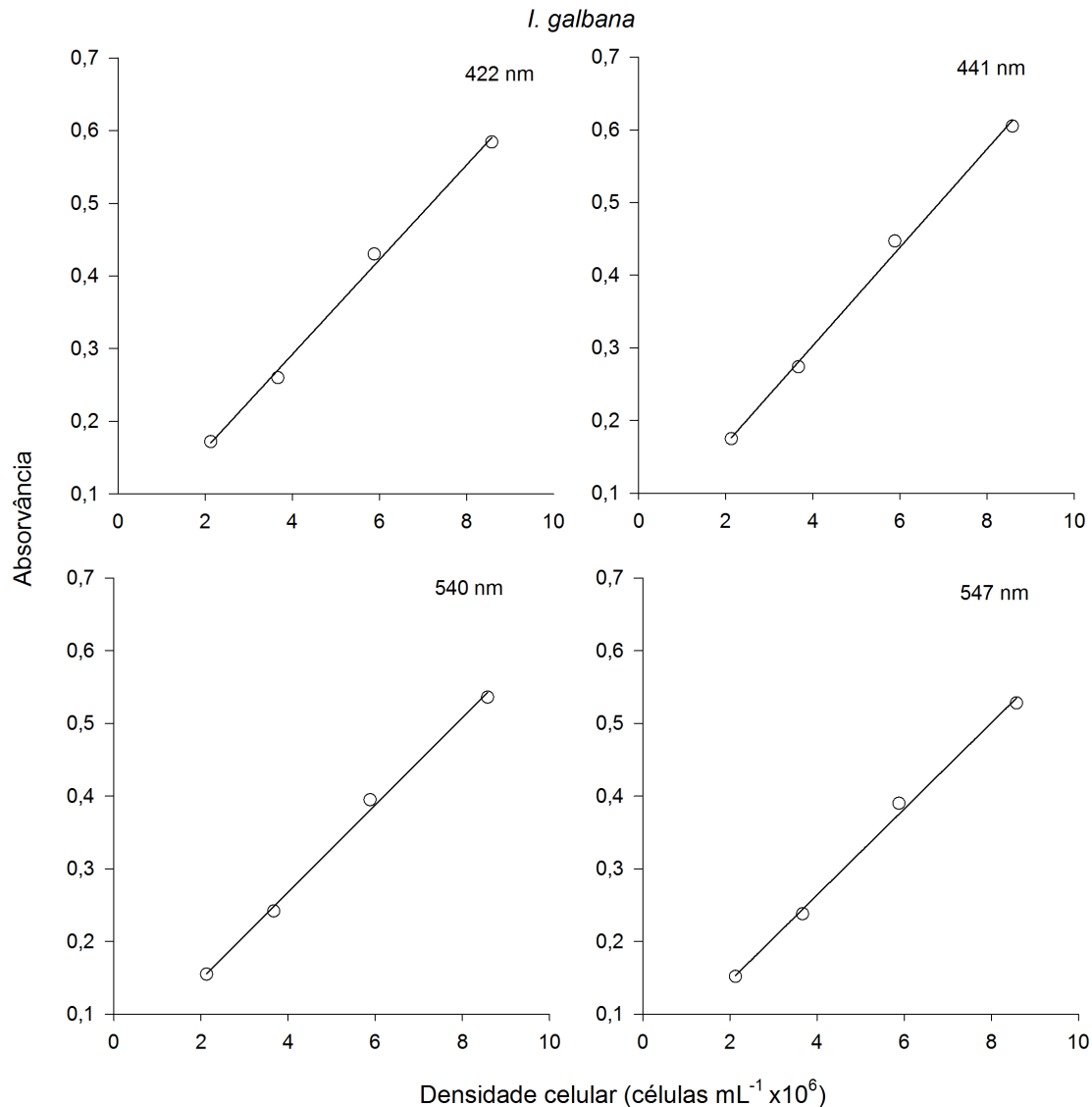


Figura 24 – Retas-padrão da *I. galbana* a 422nm, 441nm, 540 e 547nm em relação à densidade celular na fase exponencial.

Para a *N. gaditana* as retas-padrão para a com as absorvâncias aos comprimentos de onda de 422nm, 441nm e 540nm e 547nm apresentam um r^2 de 0,98 ($p < 0,05$) (Tabela IV). Neste sentido, é possível confirmar a existência de uma adequada relação entre a densidade celular e a absorvância, aos referidos comprimentos de onda (Figura 25, Tabela V).

Através da reta-padrão com o comprimento de onda a 540nm é possível verificar que a variabilidade que ocorre na absorvância é adequadamente explicada nas variações que decorrem na densidade celular.

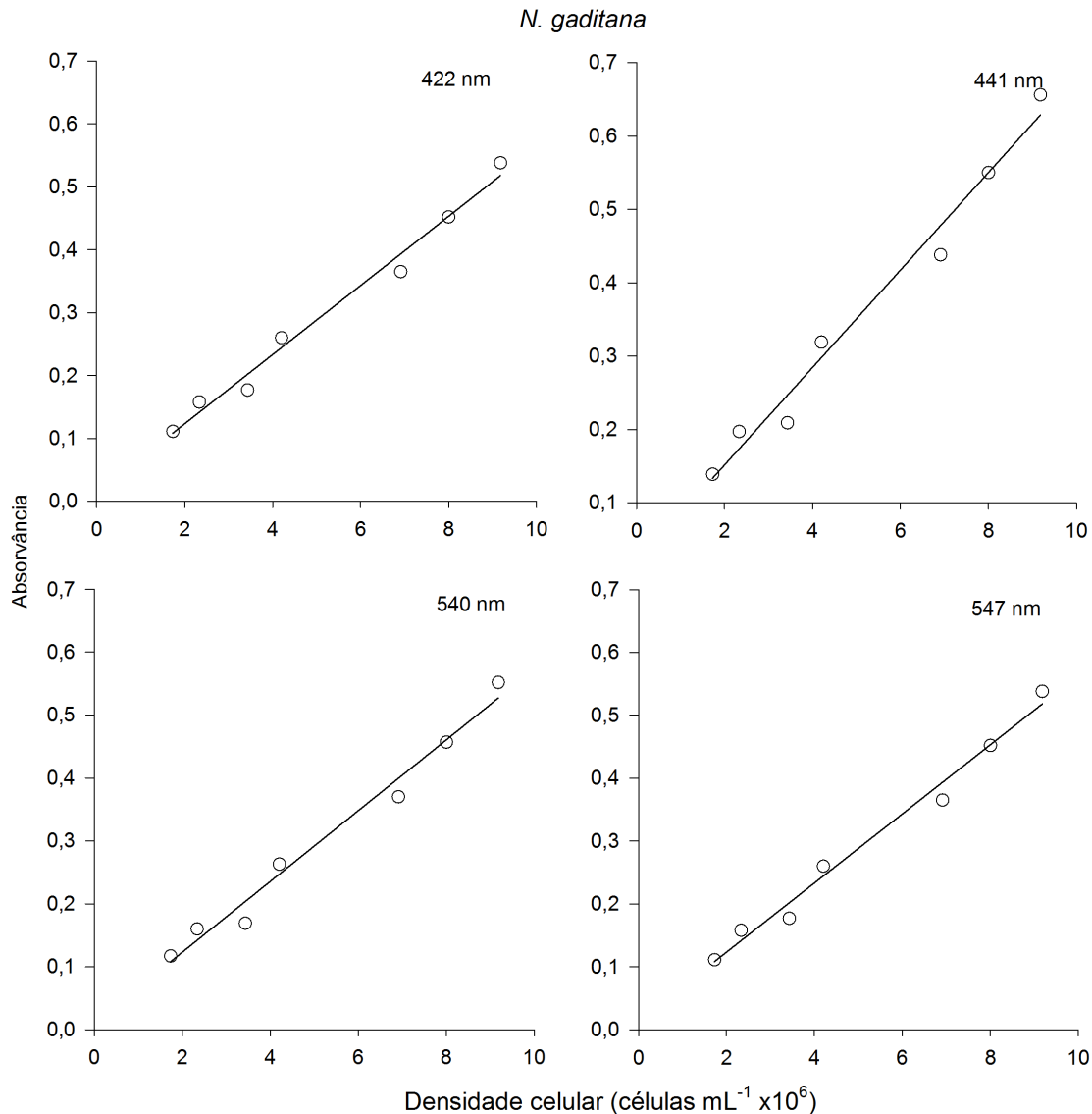


Figura 25- Retas-padrão da *I. galbana* a 422nm, 441nm, 540 e 547nm em relação à densidade celular na fase exponencial

A equação que poderá traduzir a relação existente entre a densidade celular e a absorvância a 540nm é a seguinte:

$$\text{Abs}_{540\text{nm}} = 0,07 \times \text{Densidade celular (células mL}^{-1} \times 10^6) + 0,12$$

4.3.3. Determinação de clorofila e feofitina

A concentração de clorofila *a* e feofitina foi determinada ao longo do tempo para a *N. gaditana*. A clorofila *a* apresentou no dia 0 uma concentração de 13,59 mg L⁻¹, tendo sido registados aumentos até ao dia 4 onde se obteve uma concentração de 58,86mg L⁻¹.

A partir do quarto dia a concentração aumentou lentamente até ao dia 9 onde apresentou uma concentração de 68,40 mg L⁻¹ (Figura 26).

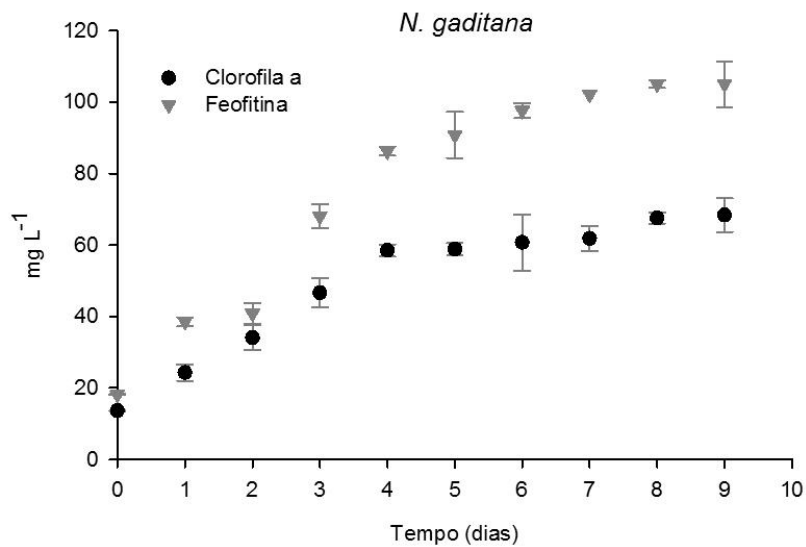


Figura 26 – Concentração de clorofila a, c e feofitinas ao longo do tempo para a *N. gaditana*.

A concentração de feofitina no dia 0 foi de 18,16 mg L⁻¹ e aumentou ao longo do tempo, atingindo uma concentração de 105 mg L⁻¹ (Figura 26).

4.3.4 Determinação da biomassa

A determinação do PS foi efetuada ao longo do tempo. Ao tempo 0 a biomassa foi de 1,08 mg células x10⁶ e no dia 9 a biomassa foi de 0,21 mg células x10⁶ (Figura 27).

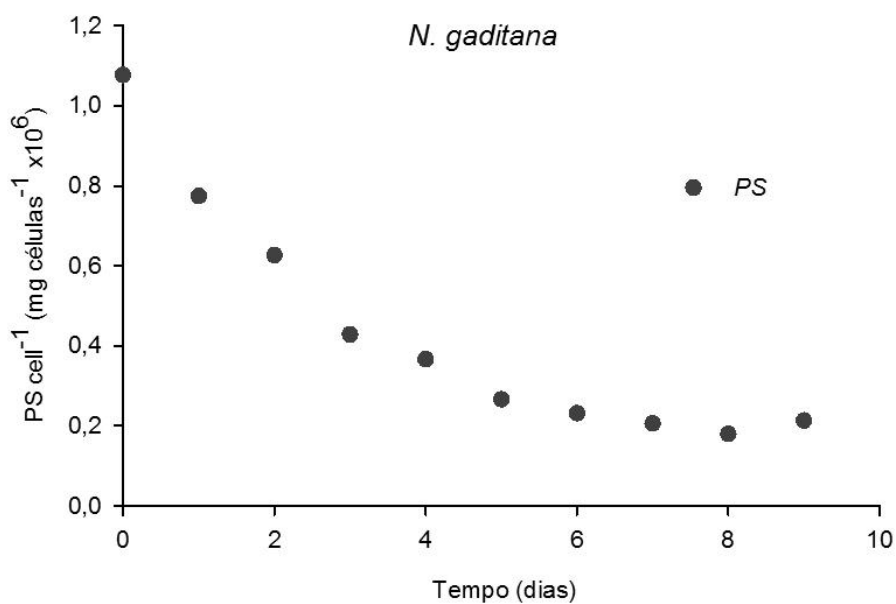


Figura 27 – Concentração de PS por célula (mg célula⁻¹ x10⁶) de *N. gaditana* ao longo do tempo.

4.4 Parâmetros de crescimento das microalgas nos diferentes reatores

Os cultivos de *N. gaditana* apresentaram rendimentos elevados no balão volumétrico e no reator *airlift*, sendo estes de 96% e de 92% respetivamente. Pelo contrario o cultivo de *N. gaditana* no reator coluna de bolhas apresenta um rendimento de cerca de 64%.

Os cultivos de *I. galbana* apresentaram um rendimento de 0,85% no reator de *airlift*, enquanto o cultivo de *I. galbana* num reator coluna de bolhas apresentou um rendimento de 47%. Já para o balão volumétrico, o crescimento de *I. galbana* apresentou um rendimento de 87%.

A taxa específica de crescimento foi calculada para cada cultivo de *I. galbana* e *N. gaditana* em cada um dos reatores.

Tabela VI - Taxa de crescimento específica (d^{-1} , μ), número de divisões por dia (d^{-1} , k) e tempo de duplicação (d^{-1} , T^2) de *I. galbana*, nos diferentes reatores, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ C$.

	Balão volumétrico	PBR coluna de bolhas	PBR <i>airlift</i>
μ	0,29	0,11	0,32
k	0,41	0,16	0,46
T_2	2,40	6,20	2,16

A taxa específica de crescimento de *I. galbana* foi mais elevada no PBR *airlift* e obteve-se um maior número de divisões por dia do que nos restantes reatores (balão volumétrico e PBR coluna de bolhas) (Tabela VI).

O mesmo não se verificou na taxa específica de crescimento da *N. gaditana* nos diferentes reatores, pois esta foi mais elevada no balão volumétrico do que nos restantes reatores (Tabela VII). O mesmo foi verificado para o número de divisões por dia e tempo de duplicação.

Tabela VII - Taxa de crescimento específica (d^{-1} , μ), número de divisões por dia (d^{-1} , k) e tempo de duplicação (d^{-1} , T_2) de *N. gaditana*, nos diferentes reatores, com um fotoperíodo de 16h D / 8 h, $T=22\pm 2^\circ\text{C}$.

	Balão volumétrico	FB coluna de bolhas	FB <i>airlift</i>
μ	0,32	0,11	0,28
k	0,45	0,16	0,40
T_2	2,20	6,10	2,50

4.5 Comparação entre a mesma cultura nos diferentes reatores

A *I. galbana* e a *N. gaditana* foram cultivadas em diferentes reatores. A *I. galbana* atingiu uma maior densidade celular no reator *airlift* e uma maior taxa específica de crescimento (Tabela VII, Figura 28) comparativamente com os restantes reatores. No entanto o crescimento desta mesma espécie no reator coluna de bolhas não foi tão eficiente obtendo uma reduzida densidade celular de cerca de 2×10^6 células mL^{-1} e uma menor taxa específica de crescimento.

O crescimento de *N. gaditana* apresenta-se mais elevado no balão volumétrico, bem como a sua taxa específica de crescimento (Tabela VIII, Figura 29), atingindo um reduzido crescimento no PBR coluna de bolhas o que é evidenciado pela reduzida taxa específica de crescimento e rendimento.

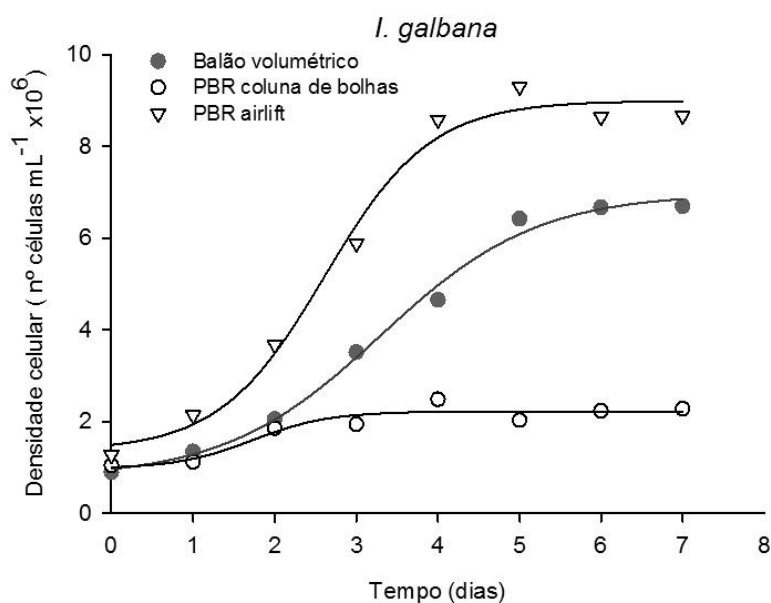


Figura 28 - Crescimento de *I. galbana* no balão volumétrico, reator coluna de bolhas e reator *airlift*.

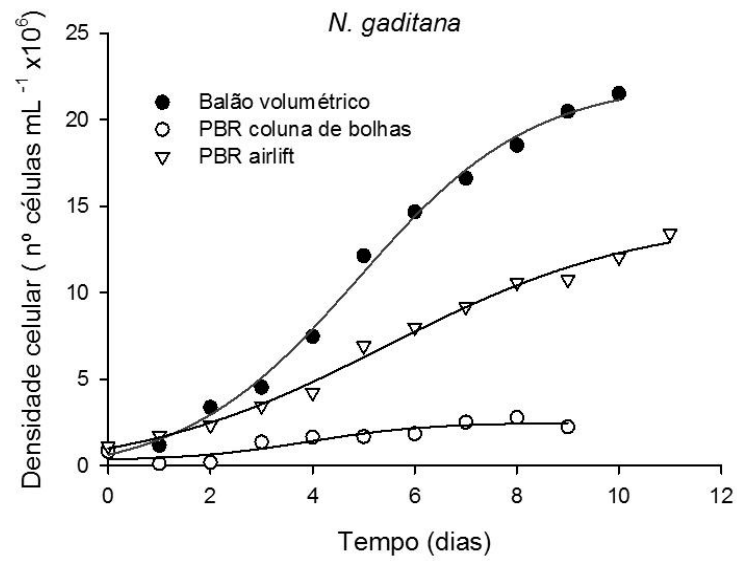


Figura 29 - Crescimento de *N. gaditana* no balão volumétrico, reator coluna de bolhas e reator *airlift*.

Comparando as duas espécies verifica-se que a *N. gaditana* apresenta um crescimento muito mais elevado no reator *airlift* e balão volumétrico. No entanto em ambas as espécies, verifica-se um reduzido crescimento no PBR coluna de bolha.

5. Discussão dos Resultados e Conclusão

5.1 Crescimento num balão volumétrico de *I. galbana* e *N. gaditana*

O crescimento de *I. galbana* e de *N. gaditana* num balão volumétrico é representado por uma curva sigmoide, que permite concluir a existência de correlação entre os dados obtidos e as curvas ajustadas (Figuras 8 e 9), na qual foram definidas as diferentes fases de crescimentos destas duas microalgas ao longo do tempo.

A *I. galbana* apresentou uma fase de aceleração do dia 0 ao dia 1 (Figura 8), de seguida ocorreu a fase exponencial com uma densidade celular máxima de $6,56 \times 10^6$ células mL⁻¹, na qual se verificou um rápido crescimento da cultura (entre os dias 2 a 5), obtendo-se uma μ e $\mu_{\text{máx}}$ elevada. A fase exponencial é composta por células jovens e bioquimicamente ricas em proteínas, seguida da fase estacionária onde se atinge a densidade celular máxima de *I. galbana* ($6,70 \times 10^6$ células mL⁻¹) permanecendo assim até se esgotarem os nutrientes.

Valenzuela-Espinoza e colaboradores (1999) obtiveram uma concentração máxima de *I. galbana* na fase exponencial ao longo de 7 dias de $6,57 \times 10^6$ células mL⁻¹, num balão volumétrico. Muito embora as condições não sejam as mesmas, a cultura foi inoculada com aproximadamente a mesma concentração inicial e obtiveram uma densidade celular da mesma ordem de grandeza comparativamente com a nossa cultura no balão volumétrico.

O cultivo da *N. gaditana* foi efetuado ao longo de 10 dias (Figura 9) e obteve uma densidade máxima de $21,51 \times 10^6$ células mL⁻¹. Forján e colaboradores (2007), obtiveram uma densidade celular máxima de *N. gaditana* de 90×10^6 células mL⁻¹ e uma concentração de clorofilla *a* de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, verificaram ainda que esta microalga apresenta um comportamento muito estável ao longo tempo.

Segundo Phatarpekar e colaboradores (2000) quanto menor forem as microalgas mais rápido será o seu crescimento. Este facto é devido ao maior rácio superfície-volume que as microalgas com um tamanho mais reduzido apresentam, assimilando os nutrientes com maior eficácia.

Embora a *I. galbana* (4-6 μm) se possa apresentar com um tamanho ligeiramente mais elevado do que a *N. gaditana*, estas apresentam aproximadamente o mesmo tamanho (<0,5 μm), sendo a diferença muito pequena. A razão para a *N. gaditana* (microalga

Discussão de Resultados e Conclusão

verde) atingir uma densidade celular mais elevada do que a *I. galbana* (microalga castanha) poderá ser explicada pelo facto de serem duas microalgas com características muito diferentes.

A contagem direta de microalgas é um método relativamente preciso mas muito demorado. Pelo contrário, o método por espectrofotometria caracteriza-se por ser rápido e prático. No entanto, a absorvância encontra-se relacionada com a quantidade de matéria, tamanho, suspensão de partículas, opacidade, comprimento de onda incidente, entre outros, o que poderá acarretar também alguns erros (Rocha *et al.*, 2003).

A reta padrão da densidade celular em função da densidade ótica possui uma aplicação prática e rápida. Para além do erro associado à contagem direta de células, a relação entre o número de células e a densidade celular depende das condições de cultura, podendo estas ser, a iluminação, o meio de cultura, fonte de carbono, idade das células, entre outros. O tamanho e o peso de cada célula não é sempre o mesmo ao longo do crescimento, conseqüentemente, uma proporcionalidade linear só é encontrada na fase exponencial (Rocha *et al.*, 2003). Este facto justifica, que as retas-padrão de cada microalga, nos diferentes PBR's tenham sido efetuadas na fase exponencial.

As retas-padrão para a *I. galbana* e para a *N. gaditana* num balão volumétrico foram efetuadas a diferentes comprimentos de onda (Tabelas II e III). No entanto, apenas os comprimentos de onda a 422nm e a 441nm obtiveram uma boa correlação entre a densidade celular da *I. galbana* e a absorvância. Deste modo, é possível concluir que 97% da variabilidade que é exibida para o comprimento de onda de 422nm é explicada pelas variações médias que existem na densidade celular, verificando se o mesmo para o comprimento de onda de 441nm, sendo no entanto a variabilidade de 94%. Para a reta-padrão a 421nm, o incremento de uma unidade da densidade celular implica, em média, um acréscimo na absorvância de 0,13 e para a reta-padrão de 441, o incremento de uma unidade da densidade celular implica, em média, um acréscimo na absorvância de 0,12.

As retas-padrão para a *N. gaditana*, na fase exponencial, aos quatro comprimentos de onda (421,441, 540 e 547nm) (Tabela III) apresentam uma ajustada correlação entre a densidade celular e os referidos comprimentos. No entanto, segundo Rocha e colaboradores (2002) o comprimento de onda a 540nm não correspondeu ao pico máximo de absorção. Contudo, é o comprimento de onda menos sensível às alterações nas condições de cultura ou mudanças de absorção. Neste sentido, a equação da reta-padrão ao comprimento de onde de 540nm, é a selecionada para exprimir a relação existente entre a densidade celular da *N. gaditana*.

Discussão de Resultados e Conclusão

De seguida, procedeu-se à quantificação de clorofila *a*, *c* e feofitina da *I. galbana* e da *N. gaditana* na fase exponencial (Figuras 12 e 13). A clorofila é um dos compostos celulares que poderá ser utilizada para estimar a biomassa de microalgas em cultura podendo ser utilizada para medir o crescimento (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002),

Os resultados deste estudo indicam que existiu na *I. galbana* um aumento exponencial no conteúdo celular de clorofila *a* e *c* até ao dia 3. Tal confirma que existe uma boa relação entre a densidade celular e o aspartato (fotossíntese) durante a cultura, já que as microalgas respondem à luz através do aumento da taxa de crescimento, à taxa fotossintética e a sua composição celular (McGowan, 2006). Porém a partir do dia 3 não existiu um aumento tão acentuado de clorofila *a*, *c* e feofitina, aumentando ligeiramente até ao dia 5. Uma possível justificação poderá estar relacionada com o facto do teor de clorofilas não depender apenas do aumento da densidade celular da cultura, mas também estar relacionada com a luz a que esta cultura se encontra sujeita (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). A clorofila *c* desempenha um importante papel na fotossíntese, pois é utilizado como fotoproteção, impedindo danos celulares (Bidigare *et al.* 2005).

O teor de clorofila *a* na *N. gaditana* aumentou consideravelmente entre o dia 1 e o dia 2, ocorrendo um ligeiro aumento entre este até ao dia 7. O teor de feofitinas apresentou um aumento entre o dia 1 e 2, mantendo-se constante até ao dia 5 e aumentando ligeiramente entre o dia 6 e o dia 7. Foi efetuado um estudo do crescimento da *N. gaditana* a uma intensidade luminosa de $70\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em que se inoculou uma concentração inicial de 5×10^6 células ml^{-1} num balão de 250mL, verificando-se uma concentração de clorofila *a* de $199,6 \pm 2,5$ ng por 10^6 células na fase exponencial (Gentile e Black, 2000).

A alta densidade celular da cultura produz zonas de sombra no balão volumétrico que reduzem a intensidade luminosa a que a cultura está sujeita (Aminot, 2000).. Devido a este facto poderão existir microalgas que se encontram a realizar a fotossíntese e outras não. Tal promove uma estabilização no teor de clorofilas, existindo uma compensação entre zona com luz e a zona de sombra (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Embora o teor de clorofilas na *N. gaditana* seja elevado, apresenta-se inferior ao teor de clorofilas presentes na *I. galbana*. Este facto pode dever-se à extração ineficiente efetuada com acetona a 90%, visto que após a maceração mecânica o filtro ainda se encontrava verde. No entanto, Nagwa-El-Din *et al.*, (2005) obteve bons resultados com a extração efetuada com acetona. Porém segundo Schumann *et al.*, (2005) a acetona é um inadequado solvente para microalgas verdes devido à presença de parede com

Discussão de Resultados e Conclusão

musculagem presente em algumas espécies de microalgas que dificulta o rebentamento da célula. Uma alternativa seria o uso do dimetilformamida (DMF). Este solvente poderá ser aplicado sem interrupção mecânica (moagem manual), e a clorofila fica estável durante semanas sem ser degradada.

O DMF penetra nas paredes celulares das microalgas com uma maior eficácia que a acetona, solubilizando os lípidos do envelope do cloroplasto e dissolvendo o pigmento alvo. Outra alternativa poderia ser a utilização de metanol em vez da acetona a 90% (Forján *et al.*, 2007). Porém a extração supercrítica com dióxido carbono apresenta melhores resultados do que o método tradicional através da extração por metanol. Contudo, este é um método muito mais dispendioso (Macías-Sáncgez *et al.*, 2005).

O PS e o PSLC foram determinados para a *I. galbana* durante 6 dias e durante 7 dias para a *N. gaditana* (Figuras 14 e 15). A partir do momento em que as células se adaptaram ao meio e entraram na fase exponencial, existiu uma diminuição no PS e PSLC por célula, uma vez que a cultura é composta por células jovens ainda bioquimicamente mais ricas em proteínas e lípidos (Lee e Shen *et al.*, 2004). O PS inicialmente é mais elevado na *I. galbana* visto que as células podem atingir um tamanho superior.

O PS é um importante parâmetro para estimar a concentração de biomassa numa cultura de microalgas (Lee e Shen, 2004). No entanto o PS de amostras marinhas pode ser afetado pela quantidade de sais absorvidos na superfície celular e presente na água intercelular. Uma possível solução é a lavagem das células, muito embora esta não seja ainda uma técnica de aceitação geral. Para a determinação do PSLC assume-se que os sais retidos no filtro e no espaço intercelular não têm efeito na medição do PS, sendo subtraído ao peso seco total após a incineração na mufla (Zhu e Lee, 1997; Richmond, 2004).

Posteriormente, foi determinado o conteúdo total de lípidos de quatro culturas de *I. galbana* e *N. gaditana* a diferentes tempos, e verificou-se um aumento do conteúdo lipídico ao longo do tempo. O dia 5 corresponde ao último dia da fase exponencial da *I. galbana* e verificaram conteúdo lipídico máximo de 375,8 u.a.. A *N. gaditana* ainda se encontrava a meio da fase exponencial no dia 5, no entanto o conteúdo lipídico já se encontrava elevado (502,1 u.a.). Porém, Chen e colaboradores (2009) determinaram o conteúdo lipídico de *Nannochloropsis* através de um método VN modificado com uma densidade celular de 10×10^5 células mL⁻¹ e verificou a existência de cerca de 2400 u.a.,

Discussão de Resultados e Conclusão

Contudo, é de referir que este utilizou um o método de extração com VN e 25% de DMSO.

O indicador VN tem sido preferencialmente utilizado para a medição fluorescente de lípidos intracelulares em células intactas, uma vez que o método é simples e rápido, e tem sido ainda amplamente utilizado para monitorizar a acumulação de trigéceridos (Pick e Rachutin-Zalagin, 2011). O VN é uma fenoxazina vermelha, serve como uma sonda lípidica devido à sua interação específica com outras moléculas hidrofóbicas. Comparativamente com outros marcadores lípidicos o VN é relativamente estável à luz e à intensidade fluorescente. O carácter fluorescente do VN varia de acordo com a sua polaridade, hidrofóbica e saturação de lípidos. A grande sensibilidade do método que visa diferentes espécies, pode ser conseguido pela seleção de excitação adequada e emissão de comprimentos de onda. O método tem sido utilizado para estimar a concentração lípidica em ciliados, microalgas, fungos e leveduras. Contudo, a fiabilidade do método VN pode ser afetada por vários fatores, tendo um estudo revelado que o NR não consegue marcar as células mortas de microalgas (Gao *et al.*, 2008).

O citómetro de fluxo de multiparâmetros pode monitorizar o conteúdo total de lípidos nas células, *in situ*, em tempo real e com uma elevada fiabilidade, durante o crescimento da cultura. A informação em tempo real do teor de lípidos numa cultura, pode ajudar na decisão sobre a estratégia de controlo do crescimento (por exemplo, ajustar o carbono/azoto) de modo a que exista um aumento no teor de lípidos. Este método tem sido utilizado para determinar o teor lípidico em diversos tipos de microalgas, como por exemplo a *Chlorella protothecoide* (Silva *et al.*, 2009), *Dunaliella salina*, *Dunaliella bardawil*, *Dunaliella parva* (Pick e Rachutin-Zalagin, 2011).

O método utilizado para determinar o conteúdo em lípidos deveria ter sido feito em paralelo com a extração por *soxhlet* utilizando *n*-hexano, a fim de se correlacionar o conteúdo em lípidos. O teste utilizado foi apenas um ensaio experimental, devendo ser repetido com réplicas para cada cultivo de *I. galbana* e *N. gaditana* e para cada reator.

Um outro fator que poderá influenciar o cultivo de microalgas é tipo de reator e o tipo de bolhas de ar causadas pelo arejamento. Num Erlenmeyer a transferência de massa de CO₂ do ar para a cultura é facilitada pelas bolhas de ar no interior da cultura, quando comparada com a taxa de transferência que ocorre na interface superficial do ar (Bitog *et al.*, 2011)

As bolhas de ar dentro da cultura também promovem a agitação, afetando a transferência de nutrientes do meio para esta através da membrana celular das microalgas, e a

distribuição de luz (ciclo escuro e claro) dentro do reator (Fernandes *et al.*, 2010). Por outro lado, a sensibilidade de diferentes espécies às forças de tensão produzidas pelas bolhas de ar é um dos fatores principais que afetam o crescimento das microalgas. A fragilidade das microalgas é referida como um dos principais problemas na sua produção de biomassa nos diferentes PBR's. Alguns autores referem a sensibilidade das células à força de tensão como uma maneira fácil de explicar a baixa produtividade e as baixas taxas de crescimento das culturas de microalgas. Contudo, as células apresentam uma enorme capacidade em se adaptarem às condições de stress (Bitog *et al.*, 2011).

Foi efetuado o cultivo de *N. gaditana* num Erlenmeyer e num reator coluna de bolhas e segundo Rocha e colaboradores (2003), no PBR coluna de bolhas o difusor originou uma grande quantidade de finos capilares de bolhas de ar enquanto o tubo de arejamento presente no Erlenmeyer originou uma pequena quantidade de bolhas grandes, o que significa uma hidrodinâmica muito diferente nestes dois tipos de PBR's. O difusor do PBR coluna de bolhas levou a uma menor taxa de crescimento celular, embora a transferência ar-líquido na cultura seja muito superior comparativamente com as bolhas grandes formadas no tubo de arejamento do Erlenmeyer (Rocha *et al.*, 2003). O mesmo se verificou no estudo efetuado no balão volumétrico e no PBR coluna de bolhas. No entanto é de salientar que existe pouca sedimentação celular no balão volumétrico.

5.2 Crescimento de *I. galbana* e *N. gaditana* num PBR coluna de bolhas

A curva de crescimento obtida ao longo do tempo num PBR coluna de bolhas para a *I. galbana* (Figura 17) apresentou uma fase exponencial muito curta, sendo esta de apenas dois dias, seguida de uma fase estacionária muito longa. A densidade celular máxima atingida foi muito reduzida ($2,28 \times 10^6$ células mL⁻¹) comparativamente com o crescimento no balão volumétrico ($6,70 \times 10^6$ células mL⁻¹, Figura 8).

A curva de crescimento efetuada para a *N. gaditana* entra na fase exponencial no dia 3 e termina no dia 7, demorando a adaptação ao meio mais tempo neste PBR (Figura 18). Também neste cultivo a densidade máxima ($2,46 \times 10^6$ células mL⁻¹) é muito inferior ao cultivo de *N. gaditana* no balão volumétrico ($21,51 \times 10^6$ células mL⁻¹). Embora as curvas de crescimento apresentem uma densidade celular menor, a qualidade do ajustamento (r^2) é aproximadamente um. Neste sentido, e dado a proximidade do indicador de qualidade do valor máximo, conclui-se que as curvas de crescimento da *I. galbana* e de *N. gaditana* no PBR coluna de bolhas se ajustam ao modelo proposto (curva sigmoide) e,

Discussão de Resultados e Conclusão

por conseguinte a correlação entre os dados obtidos e as curvas ajustadas existe e é adequada.

Embora as curvas de crescimento expliquem o crescimento das duas microalgas no PBR, obteve-se uma densidade celular máxima, um rendimento e uma taxa específica de crescimento muito reduzida. Os baixos valores poderão dever-se à sedimentação das microalgas, verificando-se que o cultivo neste tipo de reator poderá não ser o mais adequado. Este facto poderá também ser explicado através do tipo de fluxo do reator, tipo de geometria (Xu *et al.*, 2009) e devido à taxa de arejamento usada ($2,31\text{mL s}^{-1}$), podendo o crescimento ter sido limitado pelo insuficiente CO_2 que chegou às células.

O PBR coluna de bolhas é um simples vaso em que o ar é injetado na parte inferior, sendo a mistura feita aleatoriamente através das bolhas de ar ascendentes (Merchuck e Camacho, 2009). Este facto poderá levar a uma má recirculação do meio e consequentemente à sedimentação das microalgas em redor do difusor. Tal facto poderá justificar a sedimentação de ambas as microalgas após o primeiro dia de cultivo. Por outro lado, também poderá causar uma diminuição da intensidade luminosa do exterior para o interior da coluna, fazendo com que a cultura não esteja sujeitas à mesma intensidade luminosa, ficando a produção de biomassa limitada pela luz fornecida ao PBR (Darmana *et al.*, 2007; Chen, *et al.*, 2011). A luz é um fator importante na fotossíntese para o crescimento das microalgas fotoautotróficas. Quando as microalgas estão sujeitas a luz insuficiente o crescimento pode encontrar-se fotolimitado. Neste estado, um aumento da intensidade luminosa melhora o crescimento das microalgas até à saturação luminosa. Sendo o crescimento inibido quando a intensidade da luz ultrapassa a intensidade luminosa de saturação, considerando-se que o crescimento das microalgas está sob condições de fotoinibição (Chen *et al.*, 2011). Devido a este fato, é de salientar a importância da mistura nas diferentes fases (líquida, sólida e gasosa) com o intuito de evitar a sedimentação, garantir que todas as células são igualmente expostas à luz e melhorar as trocas gasosas entre o meio de cultura e o ar (Bitog *et al.*, 2011).

Segundo Bitog e colaboradores (2011), a análise da mistura das diferentes fases no PBR coluna de bolhas mostrou que este possui um tempo de mistura inferior ao PBR *airlift*. Contudo, saliente-se que os reatores *airlift* são favorecidos devido à produtividade e à eficiência na mistura e na intensidade luminosa que alcança, devido ao seu *riser* e à zona *downcomer*. A mistura para as culturas de microalgas é de extrema importância, pois homogeneiza a distribuição das células, os metabolitos, o calor e a transferência da interface gás-líquido (Eriksen, 2008).

Discussão de Resultados e Conclusão

Foi efetuado um estudo semelhante com a *Chaetoceros calcitrans*, em que o arejamento da mistura foi apenas feito por movimentos aleatórios, sem que ocorresse transferência líquido-líquido no PBR coluna de bolhas. Como as microalgas no PBR coluna de bolhas não foram devidamente recirculadas, algumas células ficaram muito expostas a altas densidades de luz na parede adjacente à parede onde a luz foi localizada (Krichnavaruk *et al.*, 2005). As microalgas que se encontram no meio da coluna foram expostas a baixas intensidades luminosas resultando numa fotossíntese ineficaz e numa baixa taxa de crescimento (Julia *et al.*, 2005).

A recirculação do meio e das microalgas pode dever-se ao tipo de difusor presente neste PBR.

O tipo de difusor utilizado neste projeto foi um difusor de sílica. Este parâmetro é muito importante, pois este pode alterar as características da bolha, e por sua vez alterarem a retenção dos gases e muitos outros parâmetros que caracterizam este tipo de PBR. O distribuidor utilizado determina o tamanho das bolhas observadas na coluna. Distribuidores com orifícios de menores dimensões formam bolhas de ar pequenas e apresentam uma melhor retenção de gases (Kantarci *et al.*, 2005). Foram efetuados estudos com outro tipo de difusor no cultivo de microalgas e verificou-se que o crescimento foi efetuado com sucesso, como é o caso da *Chlorella vulgaris* e da *Dunaliella tertiolecta* (Hulatt e Thomas, 2011). Xu e colaboradores, (2009), realizaram um estudo com a *N. gaditana* proporcionando o seu crescimento num PBR coluna de bolhas com dois tipos de bolhas (grandes e pequenas), e verificaram que existiu um melhor crescimento no PBR que apresentou bolhas de ar de maiores dimensões, e um maior cisalhamento das células com as bolhas menores.

As propriedades do meio de cultura também poderão ter um efeito significativo nas propriedades das bolhas de ar. A velocidade de ascensão de uma bolha de ar depende do tamanho da bolha. O tamanho médio da bolha de ar neste PBR foi de 0,52mm³ e no balão volumétrico de 47,69mm³.

Ao longo do crescimento da *I. galbana* e da *N. gaditana* no PBR coluna de bolhas verificou-se que o aumento da clorofila *a*, *c* e feofina (Figura 19). No entanto, a feofitina no cultivo de *N. gaditana* apresentou valores próximos de zero (Figura 20).

O PS e o PSLC da *I. galbana* e da *N. gaditana* diminuíram ao longo do tempo. Inicialmente existe uma maior biomassa, uma vez que as microalgas se encontravam em fase de aceleração. Após essa fase, com a ocorrência da fase exponencial, verificou-se

uma diminuição da biomassa por célula, devido ao facto de se encontrar a ocorrer a divisão celular, e na qual existe a multiplicação das células (Figura 20). O PS referente à *N. gaditana* apresentou-se significativamente mais elevado nos dois primeiros dias devido ao facto da densidade celular do inoculo ser bastante elevado nos primeiros dois dias e manter-se constante ao longo do restante tempo. Este facto poderá dever-se à acumulação de microalgas no PBR.

O PBR's coluna de bolhas apresenta uma altura de 58cm e um diâmetro de 5,5cm. Segundo Kantari e colaboradores (2005), o efeito da altura e do diâmetro no hidrodinamismo da coluna tem sido amplamente investigado, No PBR's coluna de bolhas o efeito do tamanho da coluna influencia negativamente a retenção de gases quando o diâmetro é muito reduzido, sendo a altura da cultura um fator importante quando ultrapassa 1 a 3 metros (Lau *et al.*, 2010)

Não se correlacionou a densidade celular com as absorvâncias aos quatro comprimentos de onda, pois a fase exponencial da *I. galbana* apenas foi de dois dias e as absorvâncias aos diferentes comprimentos de onda para a *N. gaditana* não apresentaram alterações ao longo do tempo.

5.3 Crescimento de *I. galbana* e *N. gaditana* num PBR airlift

Os PBRs *airlift* têm sido amplamente utilizados em bioprocessos (Luo e Al-Dahhan, 2008), tornando-se recentemente atrativo para o cultivo de microalgas (Krichnavaruk *et al.*, 2005). Neste estudo foi efetuado o cultivo de *I. galbana* e de *N. gaditana* num PBR, *airlift* de 4400mL.

A curva de crescimento da *I. galbana* foi determinada ao longo de 6 dias (Figura 22), e na qual foram identificadas as diferentes fases de crescimento. Inicialmente as microalgas adaptaram-se ao novo meio e começam a crescer e a multiplicar-se exponencialmente (Lee e Shen, 2004), verificando-se que a fase exponencial termina no dia 4 com $8,64 \times 10^6$ células mL⁻¹. A fase exponencial da *I. galbana* neste PBR foi rápida e apresentou uma densidade celular mais elevada do que no balão volumétrico. Embora o crescimento desta mesma espécie no PBR coluna de bolhas apresente uma fase exponencial muito curta, verifica-se que a densidade máxima obtida é muito inferior à presente no PBR *airlift* e no balão volumétrico. Tal, poderá estar relacionado com a sedimentação no reator, devido à má recirculação das zonas de luz, sombra e à taxa de arejamento que reduz a alimentação de CO₂, podendo este ser um fator limitante. Salienta-se ainda que o reator de coluna de bolhas em questão tem uma taxa de arejamento muito limitada (2,31 mLs⁻¹).

Discussão de Resultados e Conclusão

O cultivo da *N. gaditana* decorreu ao longo de 11 dias (Figura 23). Durante esse período, foram identificadas as diferentes fases da curva de crescimento e verificou-se que a fase exponencial ocorreu durante 6 dias, sendo a fase mais longa dos cultivos nos três tipos de reator. A densidade celular máxima obtida para este cultivo foi de $13,2 \times 10^6$ células mL^{-1} (fase estacionária).

O cultivo de *N. gaditana* neste reator apresentou uma densidade celular inferior ao cultivo realizado no balão volumétrico ($21,51 \times 10^6$ células mL^{-1}), mas superior ao cultivo no PBR coluna de bolhas ($2,46 \times 10^6$ células mL^{-1}).

Segundo Krichnavaruk e colaboradores, (2005), a diferença no desempenho dos reatores *airlift* e coluna de bolhas deve-se à diferença no seu comportamento. No reator coluna de bolhas o arejamento é provocado por movimentos aleatórios, podendo as células residir em alta ou baixa intensidade luminosa por um longo tempo sem circulação (Xu *et al.*, 2009), e sem que ocorra transferência líquido-líquido. A configuração do PBR *airlift* com um *riser* e um *downcomer* causa densidades desiguais de meio nas duas secções existentes no reator, sendo introduzido um determinado padrão no movimento do meio, ou seja, o meio sobe através do *riser* (zona ascendente - zona escura) e desce no *downcomer* (zonas descendente-zona clara) e é devido a este padrão de mistura que este reator se torna tão eficiente no crescimento de microalgas. Desta forma, as microalgas podem estar sujeitas a uma maior intensidade luminosa.

Os estudos efetuados com a *Chaetoceros calcitrans* demonstraram ocorrência de sedimentação das microalgas no PBR coluna de bolhas, enquanto no PBR *airlift* ocorre pouca sedimentação na parte inferior do reator devido à recirculação existente. A alta densidade celular poderia causar a precipitação celular o que levaria a uma densidade irregular ao longo da coluna. Esta acumulação de células no fundo do PBR coluna de bolhas poderia causar fome, morte e fácil contaminação de toda a cultura, reduzindo a taxa específica de crescimento das culturas de microalgas. Esta pode ter sido uma das razões para não ter sido eficiente o crescimento de *I. galbana* e *N. gaditana* no reator coluna de bolhas. Este problema não foi encontrado no reator *airlift* devido à transferência líquido-líquido que facilita a circulação das células mesmo em elevadas densidades celulares (Krichnavaruk *et al.*, 2005). Verificando-se que existe uma menor acumulação de microalgas no reator *airlift* do que PBR coluna de bolhas tanto para a *I. galbana* como para a *N. gaditana*. Merchuk e colaboradores (1998) corroboram os resultados obtidos, afirmando que o crescimento da *Porphyridium* sp. foi melhor no reator *airlift* que o cultivo a partir do reator coluna de bolhas.

Discussão de Resultados e Conclusão

A *Hematococcus pluvialis* foi cultivada no PBR *airlift* e coluna de bolhas, e mais uma vez o crescimento foi mais eficiente no PBR *airlift* devido à recirculação das diferentes fases e à pouca sedimentação das microalgas. A fotossíntese também mostrou mais eficácia neste tipo de reator. No reator coluna de bolhas, o movimento das células foi aleatório, podendo as células estar sujeitas a regiões com alta ou baixa intensidade luminosa por um longo período de tempo, sem recirculação. A alteração na morfologia de algas móveis para não-móveis foi observada no crescimento deste tipo de microalgas, o que indicou que este tipo de reator pode não ser adequado para o crescimento de microalgas (Kaewpintong *et al.*, 2007).

Foi efetuado um estudo segundo Xu colaboradores (2009), que compara o crescimento de microalgas no PBR *airlift* com o PBR coluna de bolhas, verificando-se um crescimento superior no reator *airlift*. A *Undaria pinnatifida* apresentou uma taxa específica de crescimento 50% mais elevada no reator *airlift* do que na coluna de bolhas. O rendimento do crescimento de diatomáceas também foi aproximadamente o dobro do reator *airlift* do que no reator coluna de bolhas.

A estimativa da densidade celular através da contagem direta de células exige várias réplicas ao longo de um determinado tempo, permitindo-nos determinar a taxa específica de crescimento e as alterações que podem ocorrer na cultura (Richmond, 2004; Znad *et al.*, 2004).

Foi efetuada a correlação aos diferentes comprimentos de onda e a densidade celular para a *I. galbana* (Tabela V, Figura 23) no PBR *airlift*. Através dos resultados obtidos, verificou-se a existência de uma correlação entre a densidade celular e os comprimentos de onda a 441 nm, 540nm e 547nm, sendo portanto selecionadas as equações das retas-padrão que correlacionam as absorvâncias a 441nm e a densidade celular do balão volumétrico e no PBR *airlift*.

A correlação da densidade celular da *N. gaditana* e a absorvância aos diferentes comprimentos de onda também é explicada pelas retas-padrão. No entanto, e como já foi descrito anteriormente o comprimento de onda selecionado para efetuar estas correlações são a 540nm (Tabela IV, Figura 25).

Em geral, parâmetros como a clorofila, proteínas e hidratos de carbono podem ser utilizados para acompanhar as mudanças no tamanho da população até que é atingida a fase estacionária (Masojídek *et al.*, 2004). O PBR *airlift* apresenta uma boa eficiência no cultivo de microalgas devido à sua recirculação na zona de luz e na zona de sombra,

Discussão de Resultados e Conclusão

verificando-se que a concentração de clorofila *a* e feofitona foi proporcional ao crescimento celular (Figura 26). A fotossíntese representa um processo único de conversão de energia solar e a clorofila é um indicador da taxa de fotossíntese (Chen *et al.*, 2011).

Observou-se também uma diminuição do PS por célula ao longo do tempo. Tal resultado já era esperado, dado que a do cultivo encontra-se na fase exponencial, estando a decorrer a divisão celular (Figura 27).

Nos PBR's a atenuação da intensidade da luz é dependente do caminho que a luz tem de fazer dentro do reator, da concentração celular e da absorção da luz pelas microalgas (Grima *et al.*, 1994).

Comparando a penetração da luz no reator coluna de bolhas e *airlift*, verificaram que é mais fácil a luz penetrar no PBR *airlift* do que no coluna de bolhas. No PBR coluna de bolhas a luz tem de percorrer um caminho mais longo até ao centro do reator e devido ao efeito nuvem causado pela caótica subida e bolhas na coluna (Bitog *et al.*, 2011).

Vários estudos têm demonstrado que a introdução de CO₂ na cultura de microalgas também auxilia na desoxigenação da suspensão promovendo uma mistura mais eficiente e aumentar a frequência do ciclo assim limitando a inibição de luz. No entanto, do ponto de vista económico, uma elevada taxa de arejamento aumentará os custos de execução, não sendo recomendado na produção de microalgas em larga escala (Bitog *et al.*, 2011).

O crescimento de *I. galbana* no PBR *airlift* apresentou uma densidade celular mais elevada do que nos restantes reatores, apresentando também uma taxa específica da cultura de crescimento mais elevada (0,23d⁻¹). No entanto o rendimento desta mesma cultura (92%) é inferior ao rendimento da cultura efetuada no balão volumétrico (96%) (Tabela VII, gráfico 28). O mesmo não se verificou para a *N. gaditana* pois apresentou uma maior μ da cultura, um maior rendimento e uma maior densidade celular no balão volumétrico (Tabela VIII, gráfico 29).

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Em suma, pode concluir-se que o PBR *airlift* é adequado para o crescimento de *I. galbana* e de *N. gaditana*, obtendo-se elevadas densidades celulares, clorofila e PS no crescimento de *I. galbana*. No entanto a *N. gaditana* apresentou uma densidade mais elevada no balão volumétrico, o mesmo se verifica para a clorofila e PS. O PBR coluna de bolhas não se apresenta eficaz para o crescimento deste tipo de microalgas. As retas-padrão obtidas para todos os cultivos apresentam uma boa correlação entre a densidade celular e a absorvância aos diferentes comprimentos de onda, obtendo-se a 441nm a reta-padrão para a *I. galbana* e a 540nm a reta-padrão para a *N. gaditana*. O método de extração de clorofila *a* e feofitina para a *N. gaditana* não se apresentou eficiente.

O estudo deste tipo de microalgas é de extrema importância pois permite determinar as retas-padrão para cada um dos reatores e determinar qual o que favorece um melhor crescimento. Através dos resultados obtidos é possível iniciar a construção de uma matriz de dados que permitirá definir um algoritmo matemático. No entanto, o algoritmo a definir será específico para uma determinada espécie. A robustez do algoritmo (modelo matemático) dependerá do número de observações que estiveram na base da sua definição.

Poderá ainda ser alargado este tipo de abordagem a outras espécies de microalgas que se julguem ser importantes para o seu crescimento em larga-escala, que necessitem de uma contínua monitorização de diversos parâmetros da cultura (nº indivíduos, taxa de crescimento conteúdo em clorofila, conteúdo lipídico entre outros). Para completar os parâmetros de cultivo que se puderam correlacionar com os dados obtidos por espectrofotometria, deverá ser efetuada a determinação do conteúdo lipídico para o balão volumétrico e o PBR *airlift*. Aos parâmetros da matriz aqui estudados, poderão adicionar-se a viabilidade celular. Futuramente, dever-se-ia efetuar a quantificação de clorofila e feofitina por um método alternativo, como por exemplo o DMF, no caso da *N. gaditana*. Um parâmetro a acrescentar poderia ser também o conteúdo de carotenoides.

Futuramente deverão ser correlacionados os diversos parâmetros de cultivo com os dados obtidos por espectrofotometria do visível, de modo a que matriz de dados permita definir um algoritmo matemático para a construção de um biosensor aplicável na monitorização de cultura de microalgas, através de um método não intrusivo.

Bibliografia

- Ahamed, A. e Vermette, P., 2010. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube *airlift* bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 49, 379–387.
- Ahmad, A. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C. e Lim, J. K., 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15, 584–593.
- Amaro, H. M., Guedes, C. e Malcata, F. X., 2011. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel and nutrients balance. Publisher: Elsevier Ltd. 88,3402-3410.
- Aminot, A. e Rey, F., 2000. Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods. *International Council for the Exploration of the Sea*. 1-25. Acedido online dia 28 março de 2011. Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 589.
- Azher, N., Gourich, B., Vial, C., Soulami, M., Bouzidi, A., Barkaoui, M. e Ziyad, M., 2005. Influence of alcohol addition on gas hold-up, liquid circulation velocity and mass transfer coefficient in a split-retangular *airlift* bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 23, 161–167.
- Barsanti, L. e Gualtieri, P., 2006. *Algae-Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 1st ed. Taylor e Francis Group. London, England. 209-249.
- Bidigare, R. R., Heukelem, L. V. e Trees, C.C., 2005. Analysis of Algal Pigments by High-Performance Liquid Chromatography. Andersen, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. 1st ed., Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 327-346.
- Bitog, J. P., Lee, I. B., Lee, C. G., K. S. Kim, Hwang, H. S., Hong, S. W., Seo, I. H., Kwon, K. S. e Mostafa, E. (2011). Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. *Computers and Electronics in Agriculture*. 76, 131–147.
- Bosma R, van Zessen E, Reith JH, Tramper J, Wijffels RH, 2007. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 97,1108–1120.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151, 315-331.
- Carballo-Cárdenas, E. C., Tuan, P. M., Janssen, M., Wijffels e R. H., 2003. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomolecular Engineering*. 20, 139-147.
- Cardozo, K. H. M., Guarantini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo, P. e Pinto, E., 2007. Comparative Biochemistry and Physiology. 46, 60–78.
- Casal, E. F. I. G. C. e Vilchez, C., 2007. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex. 356-364.
- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J. M. e Durrieu, C., 2004. Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors and Bioelectronics*. 19, 1089–1096.
- Chen, C-Y., Yeh, K-L., Aisyah, R., Lee, D-J e Chang, J.S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*. 102, 71–81.

- Chen, W., Sommerfels, M. e Hu, Q., 2011. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresource Technology* 102, 135–141.
- Chen, X., Goh, Q. Y., Tan, W., Hossain, I., Chen, W. N. e Lau, R., 2011. Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters. *Bioresource Technology*. 102, 6005–6012.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294–306.
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R-G., Steyer J-P., 2011. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. 102, 207–214.
- Coleman e Proschold, 2005. Controlo f sexual reproduction in algae in culture. Chapter 23. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 389-402
- Darmana, D. Henket, R. L.B., Deen, N.G. e Kuipers, J. A. M. 2007. Detailed modelling of hydrodynamics, mass transfer and chemical reactions in a bubble column using a discrete bubble model: Chemisorption of CO₂ into NaOH solution, numerical and experimental study. *Chemical Engineering Science*. 62, 2556 – 2575.
- Doran, P. M., 2005. *Bioprocess Engineering Principles*. 1^o Ed. Academic Press Limited, London, Reino Unido. 333-340.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S. e Greenberg, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Method 10300 C, D. 20th ed. 1998. American Public Health Association, Washington, D.C.
- Eriksen, N. T., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett*. 30, 1525–1536.
- Fawley, K. P. e Fawley, M. W., 2007. Observations on the Diversity and Ecology of Freshwater Nannochloropsis (Eustigmatophyceae), with Descriptions of New Taxa. *Protist*. 158, 325—336.
- Fernandes, B. D., Dramone, G. M., Teixeira, J. A. e Vicente, A. A., 2010. Light Regime Characterization in an *Airlift* Photobioreactor for Production of Microalgae with High Starch Content. *Appl Biochem Biotechnol*. 16, 218–226.
- Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J. e Otero., A., 2009. Enriching Rotifers with “Premium” Microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Mar Biotechnol*. 11, 585-59.
- Forján, E., Garbayo, I, Casal, C. e Vilchez, C., 2007. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. En: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Microbiology Book Series, Vol. I, pp. 356-364. Formatex. Badajoz, Espanha.
- Gentile, M.-P. e Blanch, H. W., 2001. Physiology and Xanthophyll Cycle, Activity of *Nannochloropsis gaditana*. *Biotechnology and bioengineering*. 74, 1-12.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acedido a 25 Setembo 2011.
- Grima, E.M., Camacho, F.G., Perez, J.A.S., Sevilla, J.M.F., Fernandez, F.G.A. e Gomez, A.C., 1994. A Mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*. 61, 167–173.
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A. e Bandarra, N.M., 2008. Microalgae in Novel Food Products. *Food Chemistry Reserch Developments*. 2, 1-37.
- Gouveia, L., 2011. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. 1st ed. Springer, Lisboa, Portugal. 13-20.

- Grobbelaar, J. U., 2004. Algal Nutrition – Mineral Nutrition. Richmond, A., (Eds). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. Oxford, London, 97-115.
- Harteveld, W.K., Juliá, J.E., Mudde, R.F. e Van den Akker, H., 2004. Large scale vortical structures in bubble columns for gas fractions in the range of 5%–25%. In: CHISA Conference.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G. M. e Danquah, M. K., 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14, 1037–1047
- Kantarci, N., Borak, F. e Ulgen, O., 2005. Bubble column reactors. Process Biochemistry. 40, 2263–2283.
- Kilonzo, P. M., Margaritis, A., e Bergougnou, M. A., 2010. Hydrodynamic characteristics in an inverse internal-loop *airlift*-driven fibrous-bed bioreactor. Chemical Engineering Science 65, 692–707.
- Kommareddy, A.R. e Anderson, G.A., 2005. Mechanistic Modeling of Photobioreactor System. Published by the American Society of Agricultural and Biological Engineers. Paper No. 057007.
- Kommareddy, A.R., Anderson, G.A., 2004. Analysis of Currents and Mixing in a Modified Bubble Column Reactor. Published by the American Society of Agricultural and Biological Engineers. Paper No. 043071.
- Kong, Q., Yu, F., Chen, P., Ruan, R., 2007. High Oil Content Microalgae Selection for Biodiesel Production. Published by the American Society of Agricultural and Biological Engineers. Paper No. 077034.
- Krichnavaruk, S., Loataweesup, W., Powtongsook, S. e Pavasant, P., 2005. Optimal growth conditions and the cultivation of *Chaetoceros calcitrans* in *airlift* photobioreactor. Chemical Engineering Journal. 105, 91–98.
- Kuhl, M., Chen, M. e Larkum, A. W. D, (2007). Biology of the Chlorophyll D-containing *Cyanobacterium acarychlois* marina. Seckbach, J. (Ed.) Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments, 1st ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 150.
- Jensen, P. R. e Fenical, W. 2000. Marine Microorganisms and Drug Discovery: Current Status and Future Potential. Fusetani, N. (Ed.) Drugs from the sea, 1st ed., Karger, Tokyo, Japão, 6, 29.
- Jin, B. e Lant, P., 2004. Flow regime, hydrodynamics, floc size distribution and sludge properties in activated sludge bubble column, air-lift and aerated stirred reactors. Chemical Engineering Science. 59, 2379 – 2388.
- Jurascik, M., Hucik, M., Sikula, I., Annus e Markos, J., 2006. Influence of Biomass on Hydrodynamics of an Internal Loop Airlift Reactor. Chem. Pap.. 60, 441—445.
- Lau, R., Mo, R. e Sim, W. S. B., 2010. Bubble characteristics in shallow bubble column reactors. Chemical engineering research and design. 88, 197–203.
- Lee, Y.-K. e Shen., H., 2004. Basic Culturing. Richmond, A., (Eds). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. pp 20-83.
- Lee, Y. K. e Zhu, C. J., 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. Journal of Applied Phycology. 9, 189–194.
- Lin, Y.H., Chang, F.L., Tsao, C. T. e Leu, J.-Y. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. Biochemical Engineering Journal. 37, 166–176.

- Lu, Q., 2004. Environmental Effects on Cell Composition. Richmond, A., (Eds). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. 83-96.
- Lubián, L. M. 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa*. 4,28 7-293.
- Lau, R., Mo, R. e Sim, W. S.B, 2010. Bubble characteristics in shallow bubble column reactors. *Chemical engineering research and design*. 88, 197–203.
- Lucas, D., Prasser, H.-M. e Manera, A. 2005. Influence of the lift force on the stability of a bubble column. *Chemical Engineering Science*. 60, 3609 – 3619.
- Luo, H-P. e Al-Dahhan M. H., 2008. Local characteristics of hydrodynamics in draft tube *airlift* bioreactor. *Chemical Engineering Science*. 63, 3057- 3068.
- Macías-Sánchez, M. D., Mantell, C., Rodríguez, M., Ossa, E. M., Lubián, L. M. e Montero, O., 2004. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. *Journal of Food Engineering*. 66, 242-251.
- Majojídek, J., Koblížek, M. e Torzillo, G., 2004. Photosynthesis in Microalgae. Richmond, A., (Eds). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. 20-83.
- Mata, T. M., Martins, A. A. e Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232.
- Matsunaga, T., Takeyama, H. e Miyashita, 2005. Marine Microalgae. *Marine Biotechnology I*, Yves, G. e Ulber, R. (Eds.) 1st ed. Springer-Verlag, Berlin, Alemanha. 166-182.
- Merchuk, J. C. e Camacho, F.G., 2009. Bioreactors, *Airlift* Reactors. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons. 320-394.
- Merchuk, J. C., Ronen, M., Geris, S. e Arad, S., 1998. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp., *Biotechnol. Bioeng.* 59, 705–713.
- Mirón, A. S., García, M. C. C., Camacho, F. G., Grima, E. M. e Chisti, Y., 2002. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and *airlift* photobioreactors: studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 1015–1023.
- Mirón, A. S., García, M. C. C., Camacho, F. G., Grima, E. M. e Chisti, Y., 2004. Mixing in bubble column and *airlift* reactors. *Chemical Engineering Research and Design*. 82, 1367–1374.
- Mohammady, N. G., Chen, Y. C., Mahdy, A. R. A. e Mohammad, R. F., 2005. Physiological responses of the eustigmatophycean *Nannochloropsis salina* to aqueous diesel fuel pollution. *Oceanologia*. 47, 75-92.
- Moheimani, N. R., 2005. The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation. PhD thesis, Murdoch University.
- Mudde, R.F., 2005. Gravity-driven bubbly flows. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 37, 393-423.
- Muller-Feuga, A., Moal, J. e Kaas, R., 2003. The Microalgae of Aquaculture, Støttrup, J. G. & McEvoy, L. A. (Eds.). *Live Feeds in Marine Aquaculture*, 1st ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom. Pp 206-253.
- Nakanishi, K., 2001. Chlorophyll rich and salt resistant *Chlorella*. *European Patent*. 1, 42-985.
- Naessens, M. e Tran-Minh, C., 1999. Biosensor using immobilized *Chlorella* microalgae for determination of volatile organic compounds. *Sensors and Actuators*. 59, 100–102.

- Oncel, S., Sukan, V. F., 2008. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). *Bioresource Technology*. 99, 4755–4760.
- Oncel, S.S., Akpolat, O., 2006. An integrated photobioreactor system for the production of *Spirulina platensis*. *Biotechnology*. 5, 365–372.
- Parsons, T. R., Maita, Y. e Lalli, C. M., 1981. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis. Pergamon Press. Oxford, New York. 173-200.
- Pick, U. e Rachutin-Zalugin, T., 2011. Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae. *Journal of Microbiological Methods*.
- Poisson, L. e Ergan, F., 2000. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *Journal of Biotechnology*. 91, 75–81.
- Posten, C. e Schaub, G., 2009. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels—A process view. *Journal of Biotechnology*. 142, 64–69.
- Posten, C., 2009. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* 3, 165–177.
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:287–293.
- Pulz, O. e Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: Design and Performance with Respect to Light Energy Input. Scheper, T. (Ed.) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer, Berlin Heidelberg, 124-148.
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, Parry, Parry, D. L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 211, 195–214.
- Richmond, A., 2004. Biological Principles of Mass Cultivation. Richmond, A., (Ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. pp 547.
- Rocha, J. M. S., Garcia, J. E. C. e Henriques, M. H. F., 2003. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*. 20, 237-242.
- Sanchez, S., Martínez, M. E. e Espinola, F., 2000. Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*. 6, 13–18.
- Sayegh, F.A. Q. e Montagnes, D. J. S., 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology*. 102, 3007–3013.
- Schwedwe, T., Lindequist, U. e Lalk, M., 2005. Screening for New Metabolites from Marine Microorganisms. Scheper, T. (Ed). *Marine Biotechnology I*, 1st ed. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 2-42.
- Shimizu, Y., 2000. Microalgae as a Drug Source. Fusetani N. (Ed). *Drugs from the Sea*. Basel, Karger, Tokyo, Japan, 30-45.
- Simionato, D., Sforza, E., Corteggiani-Carpinelli, E., Bertucco, A., Giacometti, G. M. e Morosinotto, T., (2010). Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: effects on lipids accumulation. 1-23.
- Singh, J. e Gu, S., 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 2596–2610.

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., and Isambert, A., 2006. Commercial Applications of Microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2, 87–96.
- Steinman, A. D. and G. A. Lamberti. 1996. Biomass and pigments of benthic algae. Hauer, F. R. and G.A. Lamberti (eds). In "Methods in stream Ecology". Academic Press, San Diego, CA. 297-302-
- Sydney, E. B., Sturm, W., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Larroche, C. e Soccol, C. R., 2010. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*. 101, 5892–5896.
- Tkac, J., Vostiar, I., Girton, L., Gemeiner, P. e Sturdik, E., 2003. Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation. *Biosensors and Bioelectronics*. 18, 1125-1134.
- Tredici, M. R., 2004. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. Richmond, A., (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. pp 97-115.
- Tsai, H. C. e Doong, R., 2005. Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 20, 1796–1804.
- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R. e Núñez-Cabrero, F., 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*. 25, 207–216.
- Vasconcelos, J. M. T., Rodrigues, J. M. L, Orvalho, S. C. P., Alves, S. S., Mendes, R. L. e Reis, A., 2003. Effect of contaminants on mass transfer coefficients in bubble column and *airlift* contactors. *Chemical Engineering Science*. 58, 1431 – 1440.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, Y., 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint.
- Yingying, S. e Changhai, W., 2009. The Optimal Growth Conditions for the Biomass Production of *Isochrysis galbana* and the Effects That Phosphorus, Zn²⁺, CO₂ and Light Intensity Have on the Biochemical, Composition of *Isochrysis galbana* and the Activity of Extracellular CA. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 25-231.
- Xu, K., Weathers, P. J., Xiong, X. R. e Liu, C. Z., 2009. Review- Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci*. 9, 178-189.
- Zimmerman, W. B., Hewakandamby, B. N., Tesar, V., Bandulasena, H.C.H., e Omotowa, O. A., 2009. On the design and simulation of an *airlift* loop bioreactor with microbubble generation by fluidic oscillation. *Food and bioproducts processing*. 87, 215–227.
- Znad, H., Bálés. V., Kawase, Y., 2004. Modeling and scale up of *airlift* bioreactor. *Computers and Chemical Engineering*. 28, 2765–2777.

Anexos

Anexo 1. Composição do meio f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guiklard 1975) utilizado para a cultura de microalgas em 950mL água do mar.

Tabela VIII – Composição do meio de cultura f/2 para o cultivo de microalgas.

Componentes	Solução stock (g/L H ₂ O)	Quantidade (mL)	Concentração final (Molar)
NaNO ₃	75	1	8,82x10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5	1	3,62x10 ⁻⁵
Solução com metais	-	1	-
Solução de vitaminas	-	0,5	-
Solução de metais adicionar a 950mL de água e autoclavar			
FeCl ₂ 6H ₂ O	-	3,15g	1,17x10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA	-	4,36g	1,17x10 ⁻⁵
CuSO ₄ 5H ₂ O	9,8	1	3,93x10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6,3	1	2,60x10 ⁻⁸
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0	1	7,65x10 ⁻⁸
CoCl ₂ 6H ₂ O	10,0	1	4,20x10 ⁻⁸
MnCl ₂ 4H ₂ O	180,0	1	9,10x10 ⁻⁷
Solução de vitaminas em 950mL de água estéril			
Thiamine HCl (vit. B ₁)	-	200mg	2,96x10 ⁻⁷
Biotin (vit. H)	0,1	10	2,05x10 ⁻⁹
Cyanocobalamin (vit. B ₁₂)	1,0	1	3,69x10 ⁻¹⁰

Anexo 2 – Contributo para o desenvolvimento de um biosensor para aplicação no cultivo de *N. gaditana* e *I. galbana*

Tabela IX – Parâmetros de *I. galbana* cultivada num balão volumétrico.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Absorvância 422nm	Desvio-padrão	Absorvância 441nm	Desvio-padrão	Absorvância 540nm	Desvio-padrão	Absorvância 547nm	Desvio-padrão
0	0,894	0,040	0,122	0,008	0,123	0,010	0,140	0,009	0,139	0,008
1	1,335	0,120	0,141	0,011	0,156	0,009	0,164	0,005	0,164	0,006
2	2,048	0,020	0,186	0,027	0,207	0,029	0,206	0,023	0,207	0,023
3	3,567	0,200	0,384	0,046	0,403	0,047	0,374	0,038	0,371	0,038
4	4,650	0,300	0,630	0,049	0,646	0,048	0,627	0,041	0,635	0,042
5	6,420	0,130	0,754	0,022	0,690	0,009	0,645	0,043	0,645	0,044
6	6,630	0,350	1,064	0,073	0,822	0,061	1,039	0,066	1,039	0,066
7	6,700	0,120	1,207	0,093	1,154	0,180	1,206	0,081	1,219	0,080

Tabela X - Parâmetros de *I. galbana* cultivada num balão volumétrico.

Tempo (dias)	Clorofila a (mg L ⁻¹)	Desvio-padrão	Clorofila c (mg L ⁻¹)	Desvio-padrão	Feofitina (mg L ⁻¹)	Desvio-padrão	PS célula ⁻¹ (mg célula ⁻¹ x10 ⁶)	Desvio-padrão
0							1,730	0,416
1	77,314	1,430	46,633	1,500	195,711	3,700	1,246	0,299
2	217,652	2,480	102,513	4,000	564,438	9,100	0,834	0,205
3	375,930	5,160	166,419	3,000	987,099	12,400	0,521	0,123
4	412,386	20,470	177,063	4,800	1084,287	49,100	0,402	0,095
5	446,482	3,050	188,968	3,600	1177,737	10,000	0,322	0,075

Tabela XI - Parâmetros de *I. galbana* cultivada num PBR coluna de bolhas.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Absorvância 422nm	Desvio-padrão	Absorvância 441nm	Desvio-padrão	Absorvância 540nm	Desvio-padrão	Absorvância 547nm	Desvio-padrão
0	1,04	0,153	0,079	0,004	0,08	0,004	0,07	0,003	0,066	0,003
1	1,115	0,042	0,137	0,01	0,138	0,009	0,116	0,005	0,114	0,005
2	1,85	0,095	0,157	0,009	0,172	0,008	0,14	0,005	0,134	0,006
3	1,94	0,08	0,166	0,008	0,174	0,01	0,157	0,668	0,147	0,01
4	2,48	0,04	0,177	0,018	0,183	0,019	0,152	0,018	0,149	0,017
5	2,025	0,128	0,182	0,005	0,189	0,007	0,155	0,01	0,152	0,008
6	2,23	0,08	0,189	0,015	0,195	3,016	0,162	0,012	0,159	0,012
7	2,28	0,16	0,279	0,012	0,301	0,057	0,268	0,01	0,274	0,01
8	1,98	0,06	0,152	0,012	0,153	0,011	0,124	0,009	0,125	0,009

Tabela XII -Parâmetros de *I. galbana* cultivada num PBR coluna de bolhas.

Tempo (dias)	Clorofila a mg L ⁻¹	Desvio-padrão	Clorofila c mg L ⁻¹	Desvio-padrão	Feofitina mg L ⁻¹	Desvio-padrão	PS célula ⁻¹ (mg célula ⁻¹ x10 ⁶)	Desvio-padrão
0							1,269	0,259
1	51,640	0,610	18,540	2,280	126,430	11,900	1,247	0,251
2	76,640	2,390	24,940	0,840	199,580	9,630	0,773	0,157
3	89,630	0,000	31,390	0,000	234,425	1,890	0,734	0,160
4	97,490	1,560	34,450	0,960	252,850	8,300	0,593	0,133
5	100,860	1,560	36,870	0,770	263,795	4,530		

Tabela XIII - Parâmetros de *I. galbana* cultivada num PBR airlift.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Absorvância 422nm	Desvio-padrão	Absorvância 441nm	Desvio-padrão	Absorvância 540nm	Desvio-padrão	Absorvância 547nm	Desvio-padrão
0	1,265	0,075	0,094	0,010	0,098	0,006	0,088	0,003	0,086	0,003
1	2,130	0,176	0,172	0,010	0,175	0,010	0,155	0,006	0,152	0,007
2	3,670	0,484	0,260	0,011	0,274	0,0076	0,242	0,008	0,238	0,003
3	5,880	0,743	0,431	0,002	0,447	0,002	0,395	0,002	0,39	0,001
4	8,580	0,111	0,584	0,010	0,605	0,004	0,536	0,004	0,528	0,004
5	9,300	0,477	0,694	0,010	0,714	0,006	0,634	0,004	0,626	0,004
6	8,640	0,211	0,181	0,002	0,186	0,002	0,170	0,003	0,168	0,003

Tabela XIV - Parâmetros de *N. gaditana* cultivada num balão volumétrico.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Absorvância 422nm	Desvio-padrão	Absorvância 441nm	Desvio-padrão	Absorvância 540nm	Desvio-padrão	Absorvância 547nm	Desvio-padrão
0	0,920	0,020	0,091	0,009	0,102	0,008	0,120	0,010	0,120	0,009
1	1,160	0,700	0,124	0,014	0,146	0,012	0,152	0,010	0,153	0,008
2	3,340	1,030	0,304	0,049	0,321	0,051	0,295	0,040	0,295	0,041
3	4,510	1,880	0,429	0,073	0,458	0,082	0,401	0,070	0,397	0,069
4	7,460	0,460	0,611	0,134	0,658	0,151	0,554	0,200	0,550	0,117
5	12,130	1,040	1,009	0,024	1,054	0,026	0,926	0,040	0,926	0,037
6	14,660	1,500	1,032	0,166	1,140	0,173	1,019	0,160	1,043	0,163
7	16,610	0,910	1,135	0,018	1,388	0,182	1,284	0,180	1,327	0,174
8	18,520	1,520	1,992	0,102	2,162	0,096	2,023	0,110	2,079	0,107
9	20,480	1,250	2,227	0,123	2,443	0,130	2,258	0,110	2,335	0,108
10	21,510	1,120	2,842	0,081	2,960	0,103	2,781	0,080	2,863	0,076

Tabela XV -Parâmetros de *N. gaditana* cultivada num balão volumétrico.

Tempo (dias)	Clorofila a mg L ⁻¹	Desvio- padrão	Feofitna mg L ⁻¹	Desvio- padrão	PS célula ⁻¹ (mg célula ⁻¹ x10 ⁶)	Desvio- padrão
0					1,269	0,259
1	33,050	1,209	88,110	6,158	1,522	0,120
2	44,330	0,494	120,420	4,625	1,207	0,138
3	46,130	4,288	127,090	9,851	0,419	0,060
4	46,370	8,444	127,270	1,633	0,310	0,055
5	51,170	7,172	130,830	2,461	0,188	0,050
6	54,380	11,454	138,710	2,949		
7	55,330	1,662	151,830	8,656		

Tabela XVI - Parâmetros de *N. gaditana* cultivada num PBR coluna de bolhas.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Clorofila a (mg L ⁻¹)	Feofitna (mg L ⁻¹)	PS célula ⁻¹ (mg célula ⁻¹ x10 ⁶)
0	1,040	0,153			
1	1,1150	0,042	19,709	0,013	1,166
2	1,850	0,095	21,156	0,015	1,124
3	1,940	0,08	26,817	0,016	0,981
4	2,480	0,04	29,100	0,017	0,816
5	2,025	0,128	30,199	0,020	0,819
6	2,230	0,08	30,708	0,030	0,748
7	2,280	0,16	32,482	0,062	0,582
8	1,980	0,06	19,709	0,013	

Tabela XVII - Parâmetros de *N. gaditana* cultivada num PBR *airlift*.

Tempo (dias)	Densidade celular (células L ⁻¹)	Desvio-padrão	Absorvância 422nm	Absorvância 441nm	Absorvância 540nm	Absorvância 547nm	Clorofila <i>a</i> (mg L ⁻¹)	Desvio-padrão	Feofitina (mg L ⁻¹)	Desvio-padrão	PS célula ⁻¹ (mg célula ⁻¹ x10 ⁶)
0	1,110	0,101					13,588	0,100	18,156	0,100	1,076
1	1,730	0,051	0,138	0,139	0,117	0,111	24,250	2,280	38,582	1,257	0,774
2	2,330	0,241	0,197	0,197	0,16	0,158	34,078	3,509	40,851	2,886	0,626
3	3,430	0,144	0,202	0,209	0,169	0,177	46,661	4,057	68,085	3,210	0,428
4	4,200	0,325	0,312	0,319	0,263	0,26	58,496	1,697	86,241	1,257	0,366
5	6,910	0,491	0,423	0,438	0,37	0,365	58,864	1,669	90,780	6,419	0,266
6	8,000	0,933	0,532	0,55	0,457	0,452	60,698	7,886	97,589	2,096	0,231
7	9,180	0,548	0,626	0,656	0,552	0,538	61,870	3,446	102,120	0,000	0,205
8	10,590	0,226					67,539	1,554	104,980	1,048	0,179
9	10,750	0,664					68,399	4,700	104,987	6,416	0,213
10	12,060	0,747									
11	13,430	0,418									