

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis* sp.

Joana Janelas Rodrigues Pereira de Mascarenhas Gaivão

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA GEOGRÁFICA, GEOFÍSICA E ENERGIA



Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis* sp.

Joana Janelas Rodrigues Pereira de Mascarenhas Gaivão

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Orientadores:

Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino

Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva

2013

Agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Ana Cristina Oliveira, por todo o seu apoio, conhecimentos transmitidos, tempo dispendido, paciência e amizade.

À minha coorientadora, Doutora Luísa Gouveia, pelos conselhos, motivação, energia e conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa.

A ambas, gostaria de agradecer pela oportunidade que me proporcionaram em abraçar este projecto.

A todos os que tive o prazer de conhecer, e com os quais pude conviver e trabalhar na Unidade de Bioenergia do LNEG, tanto pela força anímica como pelo auxílio em muitos passos. Um agradecimento especial à Eng.^a Ana Tropecêlo, pelo seu apoio em inúmeros ensaios e trabalhos realizados, e à D. Graça Gomes e à D. Natércia Sousa pela prestabilidade e apoio constante nos ensaios realizados.

A todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra, foram essenciais e revitalizadores ao longo de todo este processo de aprendizagem.

À minha família, em especial à minha mãe, por tudo, à minha irmã, por toda a amizade, ao meu marido pela paciência, amizade e compreensão, e ao meu pequeno companheiro, Duarte Gaivão.

Abstract

The importance of biofuels is growing as society devotes more attention to climate changes and the international community debates more strict commitments on the environment. This context increases the research and development of new sources of energy and production methods of alternative fuels that pretend to be, at the same time, environment friendly and competitive from the economic point of view.

The main purpose of this thesis is to contribute to the optimization of the biofuel production process from microalgae, in particular the biodiesel. Hence, the goal was to optimize lipid extraction by studying several methods of cell rupture and different biomass states (oven and freeze dried and wet). The microalgal oil quality to fatty acid ester (biodiesel) production was assessed. Oil conversion processes, such as transesterification of the extracted oil and direct transesterification from the biomass, were also evaluated.

Initially, the influence of the cell rupture method - mechanical (coffee grinder and/or ball mill) and thermodynamic (microwaves or autoclave) - on the amount of extracted lipids of *Nannochloropsis* sp., using hexane as extraction solvent, was performed. The best result, $42.4 \pm 0.2\%$ (g of lipids / 100 g of oven dried biomass), was obtained when the biomass was pre-treated in a coffee grinder followed by a ball mill.

The quality of the obtained microalgae oil was not influenced by the biomass state nor by the cell rupture pre-treatment process, being mainly composed by palmitic (C16:0), palmitoleic (C16:1) and oleic (C18:1) acids. The linoleic acid (C18:3) content is quite low ($< 0.35\%$ m/m), and much less than the specified limit on the EN 14214 standard ($< 12\%$ m/m), which result in a high quality biodiesel in terms of this parameter. On the other hand, the presence of the polyunsaturated fatty acid (PUFA) over 1% (m/m) does not meet the EN 14214 specification. To use this oil to biodiesel production, this PUFA should be partially removed or a mixture with other oil(s) should be used.

The microalgae biomass oil (89.6% of the lipid fraction, or 38% g oil / g biomass) was subjected to direct transesterification and the influence of the various parameters on the ester content was assessed. The conditions that were set as more favorable correspond to 3.16 g of methanol / 100 g of dry biomass, 1.2% v/v of catalyst (sulphuric acid), 6 h and 50°C, that allows to obtain 95% of esters. In terms of the pre-treatment process, the coffee grinder followed by the ball mill, once again, proved to be the most efficient process, promoting an increase in the transesterification reaction rate.

This process of direct conversion (with no biomass oil extraction) was compared with the transesterification of biomass extracted oil, which is the traditional biodiesel production method. The obtained results, after comparing the two methodologies, demonstrate that direct transesterification represents a viable alternative to biodiesel production from microalgae, given the decrease on operational units and therefore the reduction of both production costs (energy, materials) and final product cost, presenting itself as a more environmentally sustainable process.

Key-Words: Microalgae, *Nannochloropsis* sp., biodiesel, Oil direct transesterification, Cell rupture

Resumo

Os biocombustíveis têm vindo a assumir uma maior relevância na sociedade devido às alterações climáticas e aos compromissos internacionais assumidos por diversos países. É neste contexto que se tem vindo a investir no desenvolvimento e investigação de novas matérias-primas e em novas formas de produção desses combustíveis alternativos, menos poluentes e de modo a torná-los mais competitivos.

Esta dissertação tem como objectivo principal contribuir para a optimização de processos envolvidos na produção de biocombustíveis, em particular de biodiesel, a partir de microalgas. Assim, pretendeu-se optimizar a extracção dos lípidos, estudando vários métodos de rutura celular e o estado da biomassa e avaliou-se qual o processo mais vantajoso, em termos económicos e ambientais, de conversão desse óleo em ésteres de ácidos gordos (biodiesel).

Numa primeira fase, e de modo a avaliar a influência do método de rutura celular na contabilização do teor de lípidos presentes na microalga em estudo - *Nannochloropsis* sp. – realizaram-se ensaios de extracção com hexano após a biomassa microalgal ter sido sujeita a processos mecânicos (moinho de café e/ou moinho de bolas) e termodinâmicos (microondas ou autoclave). O melhor resultado, $42,4 \pm 0,2$ % (g lípidos / 100 g biomassa seca em estufa), foi obtido com o pré-tratamento com moinho de café seguido de moinho de bolas. O estado da biomassa microalgal (seca em estufa, liofilizada ou húmida), assim como o processo de pré-tratamento, mostraram não ter influência na qualidade do óleo obtido, no qual o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1) e o ácido oleico (C18:1) são os principais constituintes. O teor de ácido linolénico (C18:3) é bastante baixo (< 0,35% m/m), e muito inferior ao limite especificado na norma EN 14214 (< 12% m/m), o que permitirá obter um biodiesel de qualidade no que respeita a este parâmetro. Pelo contrário, a presença do ácido gordo polinsaturado C20:5, em teores superiores a 1% (m/m), faz com que o produto da transesterificação deste óleo não cumpra a especificação da norma EN 14214 em relação a este parâmetro, situação que implicará a utilização de misturas com outros óleos ou a prévia remoção parcial deste ácido.

A fracção saponificável presente na biomassa microalgal (89,6% da fracção lipídica ou seja, 38 % g óleo / g biomassa) foi sujeito a transesterificação direta, tendo-se avaliado a influência de diversos parâmetros no teor de ésteres obtidos. As condições estabelecidas como as mais adequadas correspondem a 3,16 g metanol / 100 mg de biomassa seca, 1,2 % v/v de catalisador (ácido sulfúrico), 6 h e 50 °C, que permite obter 95 % de ésteres. Em termos de processo de pré-tratamento verificou-se que o do moinho de café seguido de moinho de bolas, foi, mais uma vez o mais eficiente, promovendo um aumento da velocidade da reacção de transesterificação.

Este processo de conversão direta (sem extracção do óleo da biomassa) foi comparado com o da transesterificação do óleo extraído da biomassa ou seja, com o processo convencional de produção de biodiesel. Dos resultados obtidos e após comparação das duas metodologias, parece evidente que a transesterificação direta representa uma alternativa interessante na produção de biodiesel a partir de microalgas, dada a redução das unidades de operação e, conseqüentemente, a redução tanto nos custos de produção (energéticos, materiais, etc.) como do produto final, apresentando-se como um processo ambientalmente mais sustentável.

Palavras-chave: Microalga, *Nannochloropsis* sp., biodiesel, Transesterificação direta do óleo, Rutura celular

Índice

Agradecimentos.....	i
Abstract	iii
Resumo.....	v
1. Introdução.....	1
1.1 Panorama Energético.....	1
1.1.1 Portugal	1
1.2 Biocombustíveis	4
1.3 Biodiesel.....	6
1.3.1 Matérias-primas para a produção de biodiesel	8
1.3.2 Métodos de produção	8
1.3.2.1 Transesterificação.....	9
a) Transesterificação alcalina	11
b) Esterificação/Transesterificação ácida	11
1.3.3 Qualidade do Biodiesel	12
1.4 Microalgas	14
1.4.1 Composição Lipídica.....	15
1.4.2 Produção de biodiesel a partir de microalgas	16
1.4.2.1 Limitações económicas do processo	18
2. Materiais e Métodos	21
2.1 Materiais.....	21
2.1.1 Microalga.....	21
2.1.2 Reagentes.....	22
2.1.3 Meio de crescimento da microalga.....	22
2.2 Métodos.....	22
2.2.1 Crescimento da microalga	22

2.2.2	Colheita da biomassa microalgal.....	23
2.2.3	Rutura celular e extração de lípidos da biomassa microalgal.....	23
2.2.3.1	Pré-tratamento de rutura celular.....	23
a)	Moinho de bolas.....	24
b)	Micro-ondas.....	24
c)	Autoclave.....	24
2.2.3.2	Extração por solvente.....	25
2.2.4	Caracterização da fração lipídica.....	27
2.2.4.1	Índice de acidez.....	27
2.2.4.2	Índice de iodo.....	29
2.2.4.3	Perfil e composição em ácidos gordos.....	30
2.2.5	Ensaio de conversão do óleo microalgal em biocombustível.....	32
2.2.5.1	Esterificação / Transesterificação direta (sem extração do óleo).....	32
2.2.5.2	Esterificação / Transesterificação do óleo extraído da biomassa.....	34
2.2.6	Caracterização do biocombustível.....	34
2.2.6.1	Teor de ésteres metílicos e de éster metílico do ácido linolénico.....	34
2.2.6.2	Cromatografia preparativa.....	34
3.	Resultados e Discussão.....	36
3.1	Rutura celular e extração de lípidos da microalga <i>Nannochloropsis</i> sp.....	36
3.1.1	Seleção do Método de Rutura Celular.....	36
3.2	Caracterização da fração lipídica.....	39
3.2.1	Teor de glicéridos.....	39
3.2.2	Perfil e composição em ácidos gordos.....	39
3.2.3	Índice de acidez e Índice de iodo.....	41
3.3	Transesterificação Direta.....	42
3.3.1	Efeito da quantidade de metanol.....	42
3.3.2	Efeito da quantidade de catalisador.....	43
3.3.3	Efeito do tempo de reação.....	44

3.3.4	Efeito do pré-tratamento.....	46
3.3.5	Efeito do estado da biomassa	46
3.3.6	Efeito da temperatura	48
3.3.7	Efeito do tipo de álcool.....	49
3.4	Transesterificação do óleo.....	50
3.5	Comparação dos processos de transesterificação	51
4.	Conclusão.....	53
5.	Bibliografia.....	55
6.	Anexos.....	61

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Dependência energética (%) de Portugal (2000-2010) (dados – DGEG, 2013).....	2
Figura 1.2 - Evolução do consumo de energia primária em Portugal (DGEG, 2013).....	2
Figura 1.3 - Produção de energia em Portugal (1971-2009) (IEA, 2013).....	3
Figura 1.4 - Separação das fontes de energia para consumo final nos diferentes sectores, em Portugal (IEA, 2013).....	3
Figura 1.5 - Evolução da produção de bioetanol nos principais países produtores deste biocombustível (dados - Renewable Fuels Association, 2012)	4
Figura 1.6 - Evolução do consumo de biocombustíveis no sector dos transportes na União Europeia (EU-27) (dados - Biofuels Barometer, 2012).....	5
Figura 1.7 - Consumo total de cada tipo de biocombustível, no sector dos transportes, na UE em 2011 (dados - Biofuels Barometer, 2012)	5
Figura 1.8 - Variação das emissões médias de motores diesel com diferentes percentagens de incorporação de Biodiesel (de B0 a B100) (U.S. Department of Energy, 2013).....	8
Figura 1.9 - Esquema do processo para produção de biodiesel (adaptado de Gerpen, 2005)	9
Figura 1.10 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, em que R1, R2 e R3 são cadeias longas de hidrocarbonetos (adaptado de Mata <i>et al.</i> , 2010)	9
Figura 1.11 - Reações envolvidas na transesterificação de triglicéridos (Shibasaki-Kitakawa <i>et al.</i> , 2007).....	10
Figura 1.12 - Reação de saponificação (Gerpen, 2005)	11
Figura 1.13- Catálise ácida (Gerpen, 2005).....	11
Figura 1.14 - Imagem, ao microscópio, da microalga <i>Chlorella</i>	14
Figura 1.15 – Etapas da produção de biodiesel a partir da cultura de microalgas (adaptado de Mata <i>et al.</i> , 2010)	17
Figura 1.16 - Processo de produção do biodiesel microalgal (Milledge <i>et al.</i> , 2011)	19
Figura 1.17 – (A) Sistemas fechados – Fotobioreactor (Fonte - http://www.aquafuels.eu/attachments/079_D%20202.2%20Proceedings.pdf) (B) Sistema Aberto (Fonte - http://www.makebiofuel.co.uk/biofuel-from-algae).....	19
Figura 2.1 – Imagem ao microscópio da <i>Nannochloropsis</i> sp.	21
Figura 2.2 - Mangas de polipropileno com a cultura da microalga <i>Nannochloropsis</i> sp.	22
Figura 2.3 – Aspecto da biomassa microalgal seca depois da homogeneização	23
Figura 2.4 - (A) Moinho de bolas a funcionar e (B) interior de um “cápsula” com a biomassa já moída	24
Figura 2.5 – Montagem do sistema de extração Soxhlet utilizado.....	26
Figura 2.6 – Rotavapor para evaporação do solvente.....	27

Figura 2.7 – Processo de transferência da amostra para o frasco <i>Erlenmeyer</i> na determinação do índice de iodo	30
Figura 2.8 – Frasco encapsulável com a amostra de microalga	32
Figura 2.9 – Estratificação das fases, após adição de clorofórmio e água à mistura reacional	33
Figura 2.10 – Revelação da placa de cromatografia na câmara de iodo	35
Figura 3.1 – Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de <i>Nannochloropsis</i> sp. seca, sujeita a diferentes processos de ruptura celular. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	36
Figura 3.2 - Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de <i>Nannochloropsis</i> sp. liofilizada, sujeita a diferentes processos de ruptura celular. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	37
Figura 3.3 - Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de <i>Nannochloropsis</i> sp. húmida, sujeita a diferentes processos de ruptura celular.....	38
Figura 3.4 – Efeito de vários pré-tratamentos na recuperação de carotenóides em acetona (1-sem pré-tratamento, 2- autoclave, 3- ácido clorídrico - 15 min., 4- ácido clorídrico - 30 min, 5- hidróxido de sódio - 15 min., 6- hidróxido de sódio - 30 min., 7- enzimas, 8- ruptura mecânica, 9- pulverização) (Grima <i>et al.</i> , 2003)	39
Figura 3.5 - Composição do óleo da microalga <i>Nannochloropsis</i> sp. seca e relação com os diferentes pré-tratamentos de ruptura celular.....	40
Figura 3.6 - Composição do óleo da microalga <i>Nannochloropsis</i> sp. liofilizada e relação com os diferentes pré-tratamentos de ruptura celular	41
Figura 3.7 - Influência da quantidade de metanol no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4h; 1,8 % v/v H ₂ SO ₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	43
Figura 3.8 - Influência da quantidade de H ₂ SO ₄ no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4h; 4ml de metanol). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	44
Figura 3.9 - Influência do tempo no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	45
Figura 3.10 - Efeito do tempo de reação na conversão em ésteres, a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄)	45

Figura 3.11 – Influência do pré-tratamento de moinho de café e moinho de bolas e da ausência de pré-tratamento em ensaios de 4h e 24h, no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.....	46
Figura 3.12- Influência do estado da microalga seca e liofilizada sem pré-tratamento e com pré-tratamento de moinho de café e moinho de bolas, em ensaios de 4h e 24h, no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa de <i>Nannochloropsis</i> sp. (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	47
Figura 3.13 - Efeito do tempo de reação na conversão em ésteres, a partir da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. sem qualquer tipo de pré-tratamento (condições: 50 ⁰ C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄).....	47
Figura 3.14 - Fase final de separação dos ésteres com clorofórmio no ensaio de esterificação / transesterificação com biomassa húmida.	48
Figura 3.15 - Influência da temperatura em ensaios de 4h e 24h no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa de <i>Nannochloropsis</i> sp. (condições: 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H ₂ SO ₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	49
Figura 3.16 - Volume de fase do clorofórmio, obtida após retirar os 3,5ml necessários para preparação da amostra para cromatografia (13 – reacção com etanol; outros - reacção com metanol).....	50
Figura 3.17 – Teor de ésteres metílicos (% m/m) obtidos a partir do óleo extraído, com hexano, da biomassa seca de <i>Nannochloropsis</i> sp. (condições: 4ml de metanol; 1,2 % v/v H ₂ SO ₄ ; 200rpm; 50 ⁰ C. Quantidade de óleo inicial =100 mg). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Consumo de biocombustíveis em alguns países da União Europeia, 2011 (em tep) (dados - Biofuels Barometer, 2012).....	6
Tabela 1.2 – Comparação de algumas propriedades do biodiesel e do gasóleo.....	7
Tabela 1.3 - Especificações da norma europeia de qualidade do biodiesel (EN 14214:2012).....	12
Tabela 1.4 - Conteúdo de lípidos de algumas espécies de microalgas (% peso seco) (Gong <i>et al.</i> , 2011).....	16
Tabela 2.1 – Composição do meio de crescimento para a microalga <i>Nannochloropsis</i> sp.....	22
Tabela 2.2 - Diferentes combinações de pré-tratamentos/estado da microalga.....	25
Tabela 3.1 – Efeito do método de rutura no teor de lípidos totais obtido para a microalga <i>Nannochloropsis</i> sp. seca, liofilizada e húmida	38
Tabela 3.2 – Comparação da composição de ácidos gordos da microalga <i>Nannochloropsis</i> sp.....	41
Tabela 3.3 – Efeito do tipo de álcool na transesterificação do óleo da biomassa de <i>Nannochloropsis</i> sp. seca em estufa e com pré-tratamento em moinho de café e moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de álcool e 1,2% v/v H ₂ SO ₄)	49
Tabela 6.1 – Tabela de Reagentes	61

1. Introdução

1.1 Panorama Energético

O crescente aumento dos consumos energéticos deverá conduzir a uma utilização mais racional da energia, numa base estrategicamente adequada por forma a garantir a competitividade de um país (Magueijo *et al.*, 2010), assim como impulsionar o desenvolvimento e diversificação das fontes de energia renováveis, dada a escassez dos recursos energéticos fósseis (segurança energética), das flutuações de mercado (competitividade) e por questões ambientais (combate ao efeito de estufa).

É expectável que o crescimento de novas economias, como a Índia e a China, faça com que o consumo global de energia aumente, criando ainda mais problemas ambientais (Mata *et al.*, 2010).

A continuação do uso de combustíveis fósseis como energia primária é agora amplamente reconhecida como insustentável dada a depleção de recursos e devido à sua contribuição para a poluição ambiental (Ahmad *et al.*, 2011).

Na União Europeia tem havido um esforço no aumento e desenvolvimento de diversos tipos de energia renovável, na poupança de energia e no aumento da eficiência energética. Estas são partes importantes do pacote de medidas necessárias para reduzir as emissões de gases com efeito de estufa (GEE) e cumprir o estabelecido no Protocolo de Quioto à Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre alterações climáticas, bem como outros compromissos, assumidos a nível comunitário e internacional, de redução das emissões de gases com efeito de estufa para além de 2012 (Directiva 2009/28/CE).

Atualmente, quase todas as fontes de energia renovável (hídrica, solar, eólica, marés e geotérmica) são utilizadas na produção de eletricidade (Schenk *et al.*, 2008).

Por outro lado, o sector dos transportes é um sector com especial peso no consumo de combustíveis fósseis sendo, por isso, o maior responsável pelas emissões de gases com efeito de estufa, nomeadamente dióxido de carbono, pelo que a substituição dessa fonte energética torna-se particularmente importante.

Assim, o recurso a veículos com menores emissões de gases, a utilização de combustíveis mais eficientes e a obrigatoriedade de uso de biocombustíveis¹ ou outros combustíveis obtidos de fontes renováveis podem ser passos importantes no decréscimo da dependência energética, por parte de países que não são produtores, e na segurança do abastecimento, promovendo uma sustentabilidade ambiental que vai de encontro às ambições internacionais – atingir a meta de 10% de biocombustíveis ou outros combustíveis renováveis no sector dos transportes até 2020, a introduzir de forma economicamente eficaz.

1.1.1 Portugal

Em Portugal, que tem uma elevada dependência energética e os compromissos internacionais de redução dos gases com efeito de estufa (GEE) supracitados tem-se verificado, nos últimos anos, uma tendência decrescente na importação de energia, tendo atingido em 2010 cerca de 77% (Figura 1.1), embora ainda bem acima da média europeia (UE-27) de 53,9% (DGEG, 2013).

¹ Biocombustível – combustível líquido ou gasoso para transportes, produzido a partir de biomassa

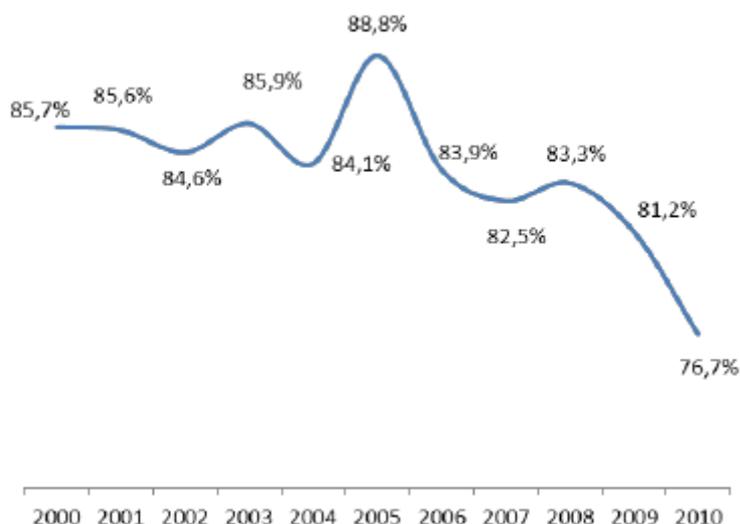


Figura 1.1 - Dependência energética (%) de Portugal (2000-2010) (dados – DGE, 2013)

Sendo Portugal um país com escassos recursos energéticos endógenos, esta diminuição da dependência deve-se ao aumento do uso de renováveis, entre outras fontes de energia, na substituição das fontes convencionais (Figura 1.2) contribuindo, assim, para a tendência decrescente de importação de energia ao longo destes últimos anos.

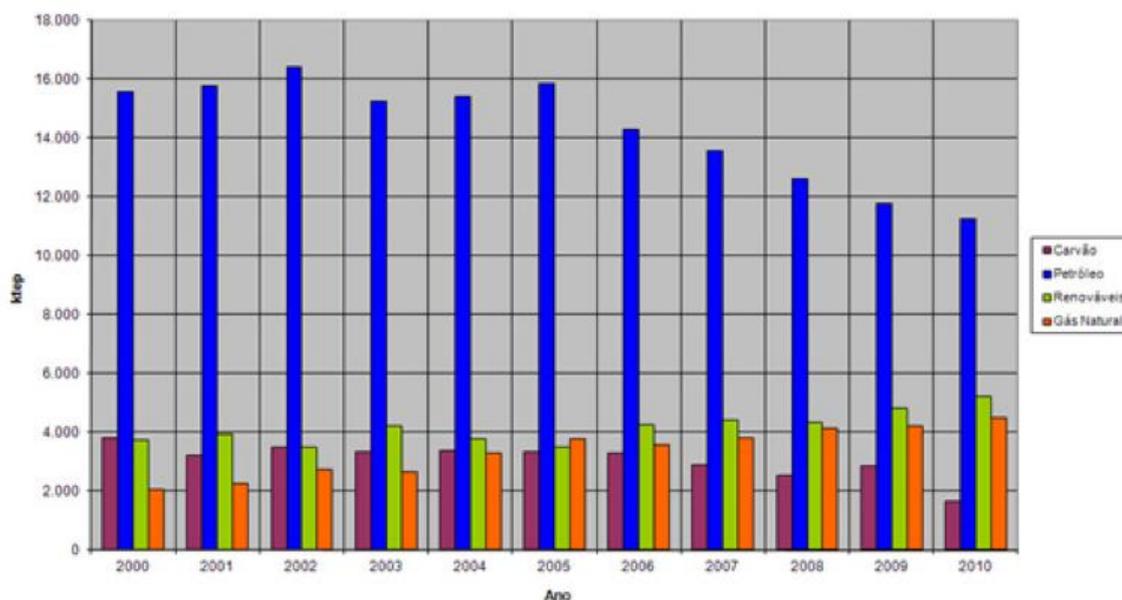


Figura 1.2 - Evolução do consumo de energia primária em Portugal (DGE, 2013)

Contudo, não é só o perfil de consumo que tem mudado, também o da produção de energia tem alterado ao longo dos anos, havendo um notável aumento das fontes renováveis (Figura 1.3).

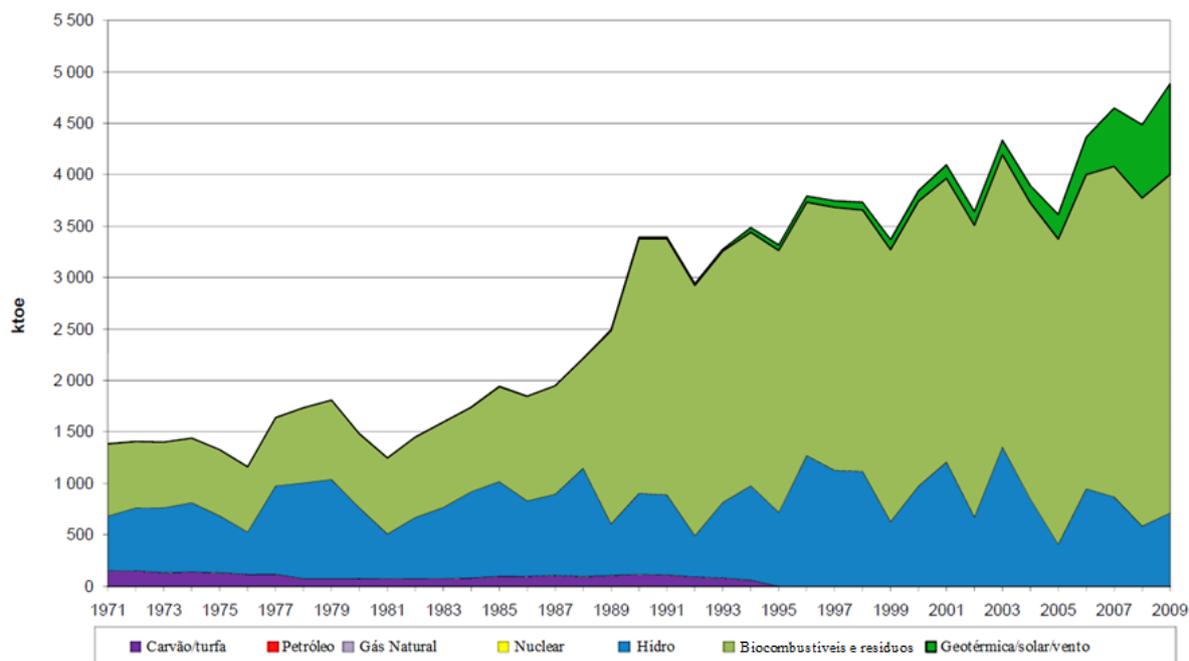
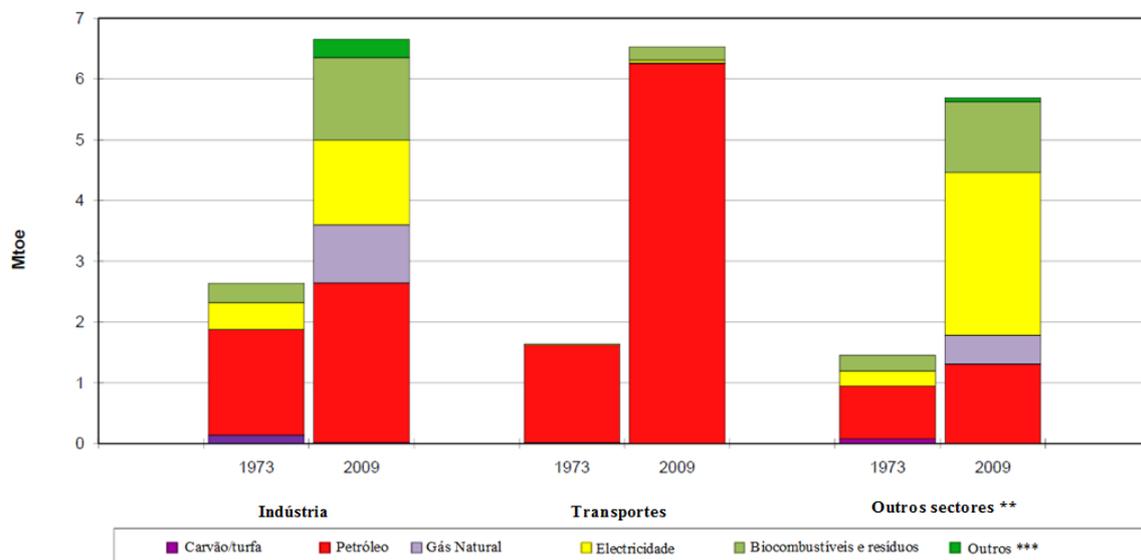


Figura 1.3 - Produção de energia em Portugal (1971-2009) (IEA, 2013)

À semelhança da União Europeia, grande parte da energia utilizada em Portugal, em particular no sector dos transportes, é com recurso ao petróleo, importado, dado não sermos um país produtor desta fonte de energia (Figura 1.4).



** - Inclui residências, serviços comerciais e públicos, agricultura/silvicultura, pesca e não especificados.

*** - Inclui o uso direto de energia geotérmica/solar térmica e o calor produzido em cogeração

Figura 1.4 - Separação das fontes de energia para consumo final nos diferentes sectores, em Portugal (IEA, 2013)

1.2 Biocombustíveis

Uma das alternativas aos combustíveis fósseis no sector dos transportes são os biocombustíveis, dado que apresentam inúmeros benefícios relacionados com a segurança energética, a economia e o meio ambiente (Nigam, et al., 2011). Por este motivo, o seu consumo/produção tem vindo a crescer a nível mundial, sendo que os Estados Unidos e o Brasil têm sido os principais produtores de bioetanol, um biocombustível que pode ser utilizado como aditivo ou substituto da gasolina (Figura 1.5).

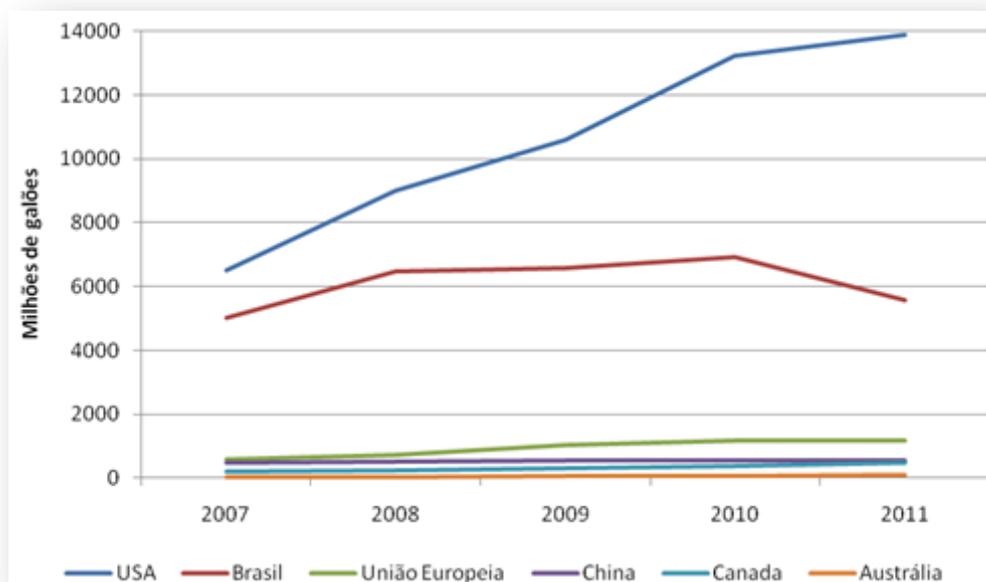


Figura 1.5 - Evolução da produção de bioetanol nos principais países produtores deste biocombustível (dados - Renewable Fuels Association, 2012)

Na União Europeia (EU-27) também se verificou, na última década, um aumento do consumo de biocombustíveis no sector dos transportes (Figura 1.6). Como se pode observar na Figura 1.7, o biodiesel tem sido o biocombustível mais utilizado na UE (77,6 %), dada a sua adequabilidade para motores diesel, cuja representatividade nos países europeus é superior aos motores a gasolina, onde o bioetanol tem aplicação.

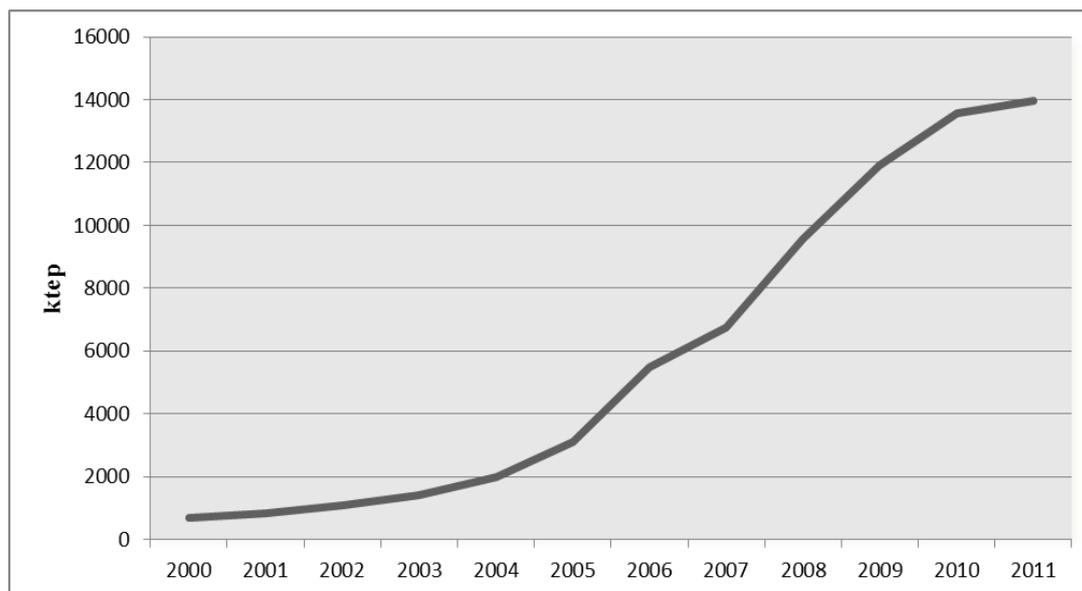


Figura 1.6 - Evolução do consumo de biocombustíveis no sector dos transportes na União Europeia (EU-27) (dados - Biofuels Barometer, 2012)

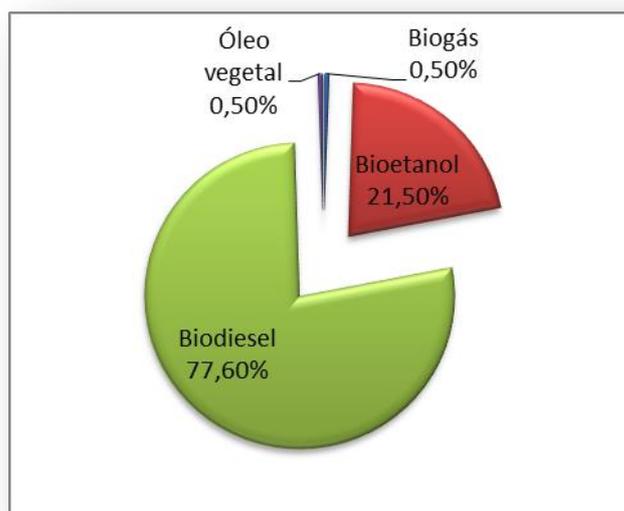


Figura 1.7 - Consumo total de cada tipo de biocombustível, no sector dos transportes, na UE em 2011 (dados - Biofuels Barometer, 2012)

Os principais países europeus consumidores/produtores de biodiesel têm sido a Alemanha, a França, a Itália e a Espanha, com um valor para 2011 de 6 908 ktep, correspondendo a cerca de 64% do total de biodiesel consumido na UE (Tabela 1.1). A Alemanha e a França lideram também em termos de produção de bioetanol embora, como já referido, com valores substancialmente inferiores aos verificados para o biodiesel. Em Portugal, o consumo de bioetanol foi mesmo inexistente, enquanto que de biodiesel se consumiu em 2011 um total de 306 894 tep (Tabela 1.1), valor correspondente à produção nacional deste biocombustível.

Tabela 1.1 - Consumo de biocombustíveis em alguns países da União Europeia, 2011 (em tep) (dados - Biofuels Barometer, 2012)

	País	Bioetanol	Biodiesel	Outros biocombustíveis	Total consumo
1	Alemanha	795.142	2.143.929	17.675	2.956.746
2	França	392.200	2.034.500	0	2.426.700
3	Itália	145.744	1.286.711	0	1.432.455
4	Espanha	229.579	1.443.131	0	1.672.710
5	Reino Unido	327.028	729.077	0	1.056.105
6	Polónia	153.676	858.986	34.608	1.047.270
7	Áustria	68.912	349.074	13.674	431.660
8	Suécia	200.673	229.808	64.372	494.853
9	Bélgica	48.121	273.308	0	321.429
10	<i>Portugal</i>	<i>0</i>	<i>306.894</i>	<i>0</i>	<i>306.894</i>
11	República Checa	59.282	240.566	0	299.848
12	Holanda	147.344	163.371	0	310.715
13	Roménia	71.582	126.373	0	197.955
14	Hungria	54.123	110.003	0	164.126
15	Eslováquia	39.983	123.722	0	163.705
16	Grécia	0	103.396	0	103.396
17	Finlândia	79.487	92.345	268	172.100
18	Irlanda	29.628	67.704	0	97.332
19	Lituânia	9.204	35.372	0	44.576
20	Eslovénia	3.744	31.620	0	35.364
21	Luxemburgo	5.131	38.425	0	43.556
22	Letónia	7.649	34.020	0	41.669
23	Dinamarca	135.426	4.419	0	139.845
24	Chipre	0	15.899	0	15.899
25	Bulgária	0	0	0	0
26	Estónia	0	0	0	0
27	Malta	0	0	0	0
		3.003.658	10.842.653	130.597	13.976.908

1.3 Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível obtido a partir de matérias-primas com elevado teor em glicéridos, que pode ser usado directamente e em qualquer proporção nos motores *diesel* existentes, não sendo necessárias modificações significativas nestes e mantendo um bom desempenho do motor (Mata, 2010; Nascimento *et al.*, 2012).

Na Tabela 1.2 encontra-se a comparação entre algumas propriedades do diesel convencional, do biodiesel obtido a partir de oleaginosas e do obtido a partir de microalgas.

Como se pode verificar, a utilização de qualquer um dos biocombustíveis referidos permite obter praticamente a mesma *performance* do gasóleo convencional, em termos de energia (PCS) (Patil *et al.*, 2012), dado que apresentam um valor na mesma gama do gasóleo (Brennan *et al.*, 2010).

Em termos de viscosidade, quer o biodiesel de oleaginosas quer o de microalgas apresentam, em geral, valores que respeitam o máximo permitido. Esta é uma propriedade muito importante em combustíveis para motores *diesel* com injectores directos, pois quando o seu valor é elevado, provoca uma fraca atomização do combustível, uma combustão incompleta e uma deposição de carbono nos injectores (Encinar *et al.*, 2010), para além de dificultar o arranque a frio.

Como se pode constatar, o biodiesel é menos volátil (ponto de inflamação >100 °C) o que o torna mais seguro tanto em termos de armazenamento como de transporte e manuseamento (Nascimento *et al.*, 2012) tornando, contudo, a ignição mais difícil (Encinar *et al.*, 2010).

Tabela 1.2 – Comparação de algumas propriedades do biodiesel e do gasóleo (adaptado de Brennan *et al.*, 2010)

Propriedades	Biodiesel de oleaginosas	Biodiesel de microalgas	Gasóleo
Poder Calorífico Superior [MJ.kg ⁻¹]	31,8-42,3	41	45,9
Viscosidade Cinemática [mm ² .s ⁻¹]	3,6-9,48	5,2	1,2-3,5
Densidade [kg.l ⁻¹]	0,86-0,895	0,864	0,83-0,84
Carbono [%m/m ⁻¹]	77	-	87
Hidrogénio [%m/m ⁻¹]	12	-	13
Oxigénio [%m/m ⁻¹]	11	-	0
Enxofre [%m/m ⁻¹]	0,0-0,0015	-	0,05 máx.
Ponto de ebulição [°C]	315-350	-	180-340
Ponto de inflamação [°C]	100-170	115	60-80
Ponto de turvação [°C]	-3 a 12	-	-15 a 5
Ponto de fluidez [°C]	-15 a 10	-12	-35 a -15
Número de cetano	45-65	-	51

Têm sido apontadas diversas vantagens ao biodiesel, nomeadamente a baixa toxicidade, a biodegradabilidade e o facto de ser produzido a partir de fontes renováveis apresentando, consequentemente, diversos benefícios ambientais, como a diminuição de emissões de monóxido de carbono, hidrocarbonetos, partículas e eliminação dos óxidos de enxofre (SO_x) e, redução de emissão de Gases com Efeito de Estufa (GEE) (Figura 1.8). Apesar destas vantagens, existe, contudo, um aumento de óxidos de azoto (NO_x), que tendo um aumento inferior quando comparado com a redução dos outros poluentes, estes óxidos estão intimamente ligados com os problemas de poluição do ar, como o Smog fotoquímico, buraco do ozono e chuvas ácidas.

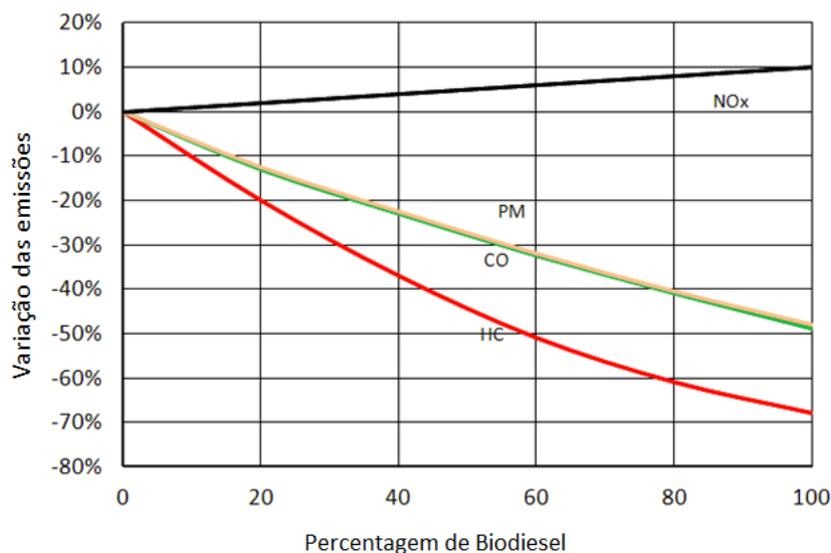


Figura 1.8 - Variação das emissões médias de motores diesel com diferentes percentagens de incorporação de Biodiesel (de B0 a B100) (U.S. Department of Energy, 2013)

Além disso, uma adição de biodiesel numa proporção de 1 a 2% no gasóleo pode converter um combustível com más propriedades lubrificantes num combustível aceitável (Ahmad *et al.*, 2011).

1.3.1 Matérias-primas para a produção de biodiesel

As matérias-primas tradicionalmente utilizadas para a produção de biodiesel são de origem agrícola como, por exemplo, colza, girassol, soja ou palma. A tecnologia de conversão destas matérias-primas está completamente desenvolvida e aplicada no mercado, sendo os biocombustíveis obtidos muitas vezes referidos na literatura como de 1^a geração. No entanto, as culturas mencionadas levantam sérios problemas ao nível da sustentabilidade ambiental, dado que necessitam de imensa água, fertilizantes químicos e pesticidas (Veillette *et al.*, 2012), assim como problemas na competição entre o sector alimentar e energético, fazendo variar o valor destes bens que são, também, de consumo humano e animal. Para além disto, também contribuem para a escassez de água potável e para a destruição de florestas (Nigam *et al.*, 2011).

Para colmatar algumas das desvantagens associadas à produção de biodiesel de 1^a geração, pode-se recorrer à utilização de culturas não alimentares (ex: *Jatropha*, mamona) e/ou de resíduos ricos em material glicéridico (ex: óleos alimentares usados, gordura animal, efluentes urbanos e industriais), sendo esta a principal vantagem e avanço em relação à anterior geração (Nigam *et al.*, 2011).

É também referida na literatura a 3^a geração de biocombustíveis, que engloba a produção de biodiesel a partir de micro-organismos (leveduras, fungos, micróbios e de microalgas). Neste trabalho, será estudada a utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel (secção 1.3).

De referir que a 2^a e 3^a geração de biocombustíveis são consideradas, em termos de um desenvolvimento sustentável, mais vantajosas do que a 1^a geração, uma vez que conduzem também (para além das outras vantagens já referidas) a uma maior redução das emissões de GEE.

1.3.2 Métodos de produção

A produção de biodiesel pode ser realizada por diferentes métodos, entre os quais as microemulsões, a pirólise (*cracking* térmico) ou a transesterificação (Ahmad *et al.*, 2011). O processo industrial mais

usado é o de transesterificação, também designado de alcoólise, pois corresponde à solução mais promissora para o problema da elevada viscosidade das matérias-primas (Ahmad *et al.*, 2011), dado que o óleo vegetal ou animal é transformado num líquido mais fluído e com características diferentes. Na figura 1.9 apresenta-se um esquema geral do processo de produção de biodiesel por transesterificação.

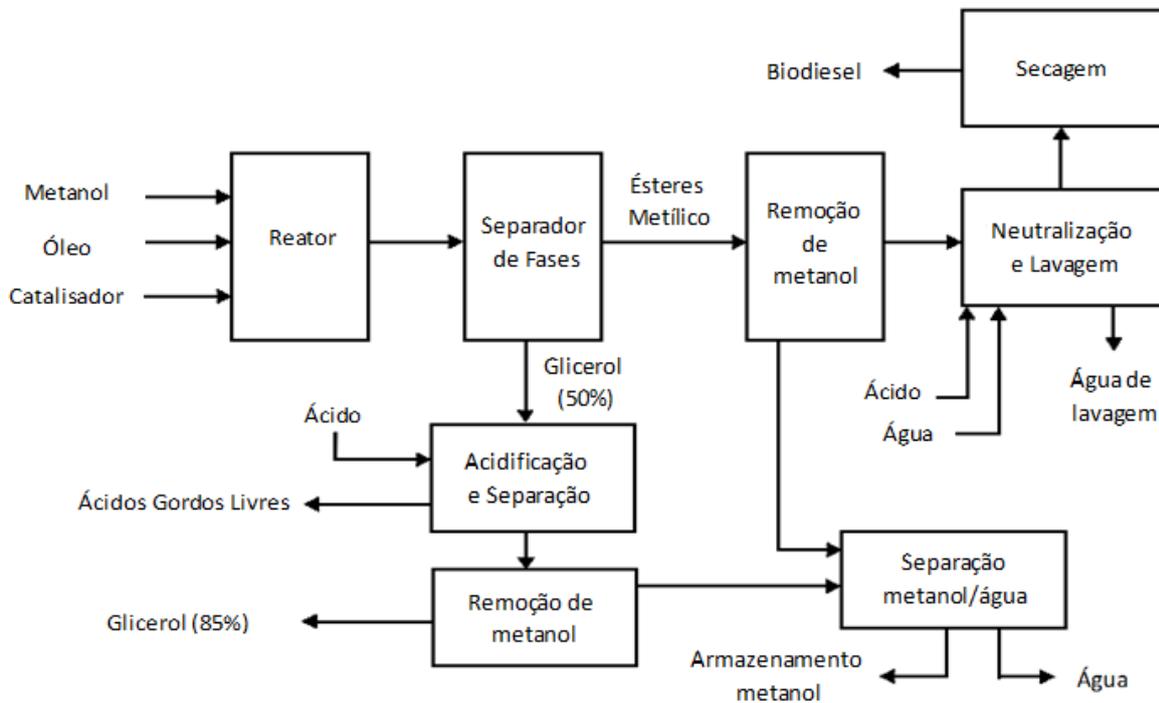


Figura 1.9 - Esquema do processo para produção de biodiesel (adaptado de Gerpen, 2005)

1.3.2.1 Transesterificação

Na reação de transesterificação, os óleos/gorduras, que são ésteres de ácidos monocarboxílicos saturados ou insaturados com um triálcool (glicerol), vulgarmente denominados triglicéridos, reagem com um álcool, na presença de um catalisador, originando ésteres de ácidos gordos (biodiesel) como produto e glicerol como subproduto (Leung *et al.*, 2010) (Figura 1.10).

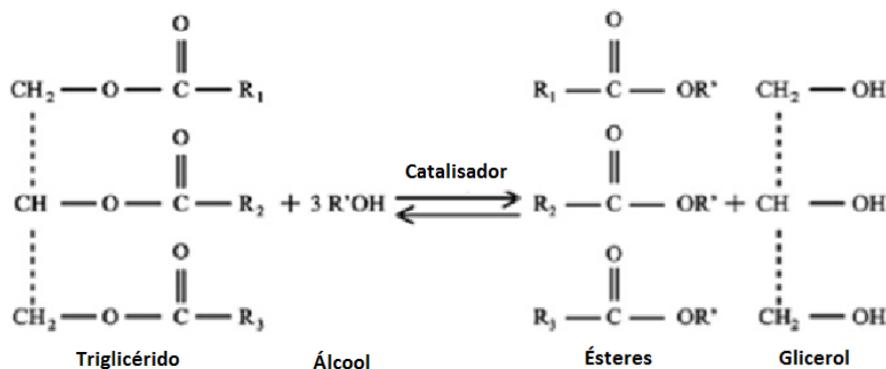


Figura 1.10 - Reação de transesterificação para a produção de biodiesel, em que R1, R2 e R3 são cadeias longas de hidrocarbonetos (adaptado de Mata *et al.*, 2010)

No esquema acima, R1, R2 e R3 representam cadeias de ácidos gordos, correspondendo nos óleos vegetais e gordura animal essencialmente a ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolénico.

Na reação de transesterificação estão envolvidas três reações sucessivas que decompõem os triglicéridos em diglicéridos (com formação de um éster), os diglicéridos em monoglicéridos (com formação de outro éster) e os monoglicéridos em éster e glicerol, de acordo com esquema da Figura 1.11.

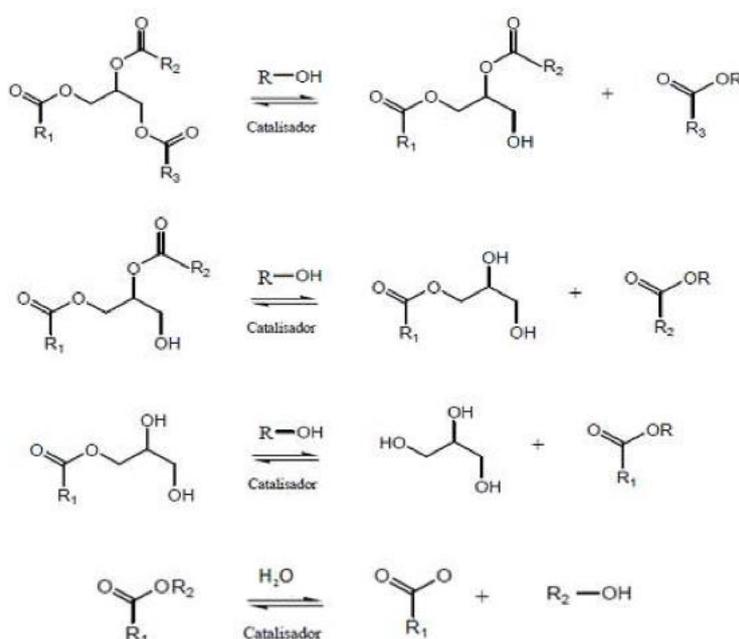


Figura 1.11 - Reações envolvidas na transesterificação de triglicéridos (Shibasaki-Kitakawa *et al.*, 2007)

A transesterificação de óleos vegetais corresponde a uma reação reversível, cuja cinética é regida pelo princípio enunciado em 1888 pelo químico francês Henry-Louis Le Chatelier (1850-1936). Portanto, o rendimento da reação dependerá do deslocamento do equilíbrio químico em favor dos ésteres, através da otimização de fatores, tais como a temperatura de reação, a concentração e o caráter ácido-base do catalisador, bem como o excesso estequiométrico do agente de transesterificação (álcool) (Ramos *et al.*, 2003) ou ainda pela contínua remoção de um dos produtos da reação (Morrison *et al.*, 1973).

Os álcoois usados nesta reação podem ser o metanol, o etanol ou o butanol, em que os respectivos mono-ésteres formados são metílicos, etílicos ou butílicos. O metanol é normalmente o escolhido devido à sua elevada disponibilidade e maior polaridade, assim como pela maior facilidade na separação dos produtos de reação, ésteres e glicerol. No entanto, o etanol é menos tóxico que o metanol e o biodiesel produzido pode ser 100% natural caso a origem do etanol seja de fonte renovável, quando obtido por via fermentativa a partir de produtos agrícolas, ao passo que o metanol é derivado do petróleo (Demirbas, 2005).

Contudo, o maior custo associado ao etanol e que constitui a principal condicionante do uso deste álcool em detrimento do metanol, deriva de estar maioritariamente disponível em mistura com a água, o que requer que seja submetido a um processo de desidratação antes da produção do biodiesel, encarecendo o processo (Antczak *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2011), dado que a presença da água faz

com que a reação ocorra no sentido inverso ao da produção de ésteres, originando sabão, com consequente redução no teor de ésteres (Parawira, 2010).

Os catalisadores utilizados para estas reações podem ser homogêneos (ácidos ou alcalinos) ou heterogêneos (enzimas imobilizadas, óxidos metálicos, etc) (Gong *et al.*, 2011). Dos catalisadores ácidos, o mais usado é o ácido sulfúrico, dado que é um ácido de baixo custo e é relativamente abundante, enquanto que de entre os catalisadores básicos os mais usados são o hidróxido de sódio (NaOH), o hidróxido de potássio (KOH) e o metóxido de sódio.

Assim, e dentro da vasta gama de combinações possíveis no processo de transesterificação, essas escolhas devem se feitas com base nas características do óleo, que devem ser previamente conhecidas de modo a estabelecer as condições reacionais que permitam obter o melhor rendimento em ésteres.

a) Transesterificação alcalina

O método mais usado industrialmente para a produção de biodiesel é a transesterificação com catalisador básico, uma vez que permite obter elevadas conversões para tempos de reação mais reduzidos (cerca de 4000 vezes), comparativamente com a catálise ácida, que é significativamente mais lenta (Carrero *et al.*, 2011).

Contudo, apesar da catálise alcalina homogênea ser uma reação mais rápida, não permite a neutralização dos ácidos gordos livres presentes no óleo ocorrendo, pelo contrário, a reação de saponificação destes com a base presente em solução (Figura 1.12). Este facto limita a utilização de catalisadores alcalinos a processos em que a matéria-prima contenha uma baixa quantidade de ácidos gordos livres (< 2 mg KOH/g).

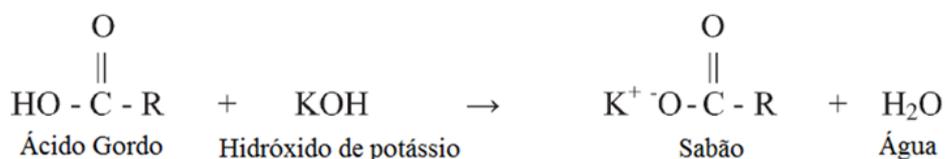


Figura 1.12 - Reação de saponificação (Gerpen, 2005)

b) Esterificação/Transesterificação ácida

Caso a matéria-prima tenha uma acidez elevada, a metodologia mais adequada será optar por um pré-tratamento por esterificação ácida, por forma a reduzir a acidez por conversão dos ácidos gordos livres em ésteres (Figura 1.13), seguido da reação de transesterificação básica para conversão dos glicéridos.

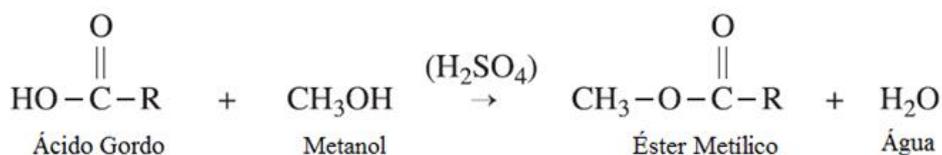


Figura 1.13- Catálise ácida (Gerpen, 2005)

O recurso apenas a catálise ácida também é possível, permitindo obter elevados teores em ésteres por conversão quer dos ácidos gordos livres quer dos glicéridos, embora a reação seja muita lenta e, portanto, menos vantajosa do ponto de vista de economia do processo. Uma outra desvantagem associada a estes processos catalíticos está relacionada com elevada corrosibilidade do catalisador, o que pode causar danos nos equipamentos (Parawira, 2010).

1.3.3 Qualidade do Biodiesel

A qualidade do biodiesel é de extrema importância dado que um produto de má qualidade pode provocar sérios problemas no veículo onde for utilizado. Assim, este produto deverá cumprir com as especificações da norma europeia EN 14214, a qual impõe limites para vários parâmetros físicos e químicos e indica quais os ensaios a utilizar para avaliação desses parâmetros (Tabela 1.5).

O não cumprimento das especificações pode causar, por exemplo, problemas de corrosão (para um teor de água ou um índice de acidez elevados), de deposição de carvão na bomba de injeção e nos anéis dos pistões (para um teor de glicerol e de glicéridos superior ao permitido) entre outros (Mittelbach *et al.*, 1985).

Tabela 1.3 - Especificações da norma europeia de qualidade do biodiesel (EN 14214:2012)

Característica	Unidade	Limite		Método de ensaio
		Inferior	Superior	
Teor de FAME	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Massa volúmica a 15°C	kg/m ³	860	900	EN ISO 3675
				EN ISO 12185
Viscosidade a 40°C	mm ² /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Ponto de inflamação	°C	101	-	EN ISO 2719
				EN ISO 3679
Índice de cetano	-	51,0	-	EN ISO 5165
Corrosão da lâmina de cobre (3h a 50°C)	classificação	Classe 1		EN ISO 2160
Estabilidade à oxidação, a 110°C	h	8,0	-	EN 14112
				EN 15751
Índice de acidez	mg KOH/g	-	0,50	EN 14104
Índice de iodo	g iodo/100g	-	120	EN 14111
				EN 16300
Éster metílico do ácido linolénico	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Esteres metílicos polinsaturados (ligações duplas ≥ 4)	% (m/m)	-	1,00	EN 15779
Teor de metanol	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Teor de monoglicéridos	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Teor de diglicéridos	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Teor de triglicéridos	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Glicerol livre	% (m/m)	-	0,02	EN 14105
				EN 14106
Glicerol total	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Teor em água	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminação total	mg/kg	-	24	EN 12662
Teor em cinzas sulfatadas	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Teor em enxofre	mg/kg	-	10,0	EN ISO 20846
				EN ISO 20884
				EN ISO 13032
Metais do grupo I (Na + K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108
				EN 14109
				EN 14538
Metais do grupo II (Ca + MG)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Teor em fósforo	mg/kg	-	4,0	EN 14107
				EN 16294

1.4 Microalgas

As microalgas são a forma mais primitiva das plantas, sendo a forma mais antiga de vida. Estão presentes em todos os ecossistemas, existindo uma grande variedade de espécies que vivem numa ampla gama de condições ambientais (Nigam *et al.*, 2011). Embora se estime que existam aproximadamente 50000 espécies de microalgas, aproximadamente 30000, foram estudadas e analisadas (Mata *et al.*, 2010) e apenas um número muito limitado (cerca de 10) são hoje comercializadas.

As microalgas são organismos fotossintéticos, que graças à sua “maquinaria fotossintética” são capazes de transformar a energia luminosa em energia química com a produção de compostos orgânicos.

Nos últimos 50 anos tem-se assistido a um interesse crescente pelas microalgas, dado o seu potencial como fonte proteica, suplementos para alimentação humana e animal, compostos de química fina, compostos terapêuticos, em aquacultura e recentemente o seu uso como vetor energético. Podem ser usadas para “nutracêuticos” ou “alimentos funcionais” (ex. carotenóides, antioxidantes, ácidos gordos polinsaturados, polissacáridos, vitaminas, fitoesteróis, minerais ou outros aditivos alimentares), cosméticos, biomateriais, moléculas bioativas com aplicações em agricultura, medicina humana, e veterinária, tratamento de esgotos, biosorção de metais pesados, biofertilização e acondicionador de solos para a agricultura, biomassa algal para alimentação animal e humana, algas fixadoras de CO₂ para obviar o problemático efeito de estufa (Marques *et al.*, 2011; Gouveia, 2011).

A primeira cultura em grande escala foi realizada em meados dos anos 60, no Japão, por Nihon Chlorella com uma cultura de *Chlorella* (Figura 1.14). O interesse pelas microalgas como fonte de energia aumentou em 1970 durante a primeira crise petrolífera (Mata *et al.*, 2010).

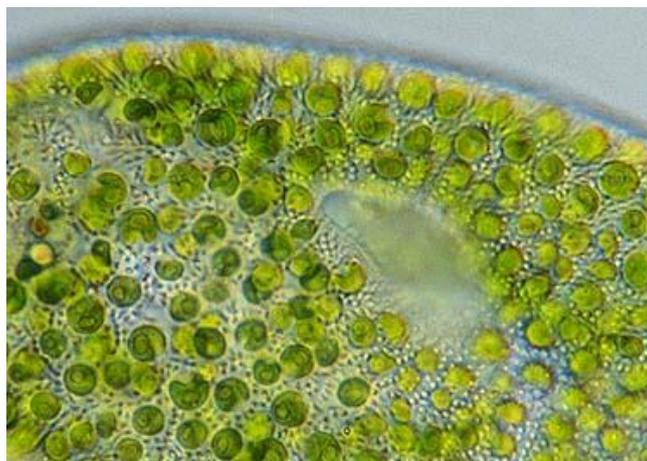


Figura 1.14 - Imagem, ao microscópio, da microalga *Chlorella*

Ao longo desses anos, vários programas de investigação e desenvolvimento foram criados tendo em vista a produção de biocombustíveis a partir de microalgas. No entanto, concluiu-se que o uso destas para uma produção barata de biodiesel embora tecnicamente viável, precisava de mais tempo e de elevado investimento para alcançar as altas produções pretendidas, investimento esse que foi entretanto descontinuado por volta de 1995 (Mata *et al.*, 2010).

A recente volatilidade do preço do petróleo e o seu expectável aumento nos próximos anos, juntamente com a necessidade de reduzir emissões poluentes, impulsionaram, de novo, o interesse na produção de biodiesel utilizando microalgas (Mata *et al.*, 2010).

As microalgas apresentam-se como uma alternativa sustentável pois são o produtor biológico de óleo mais eficiente do planeta e uma fonte de biomassa versátil podendo, muito em breve, tornar-se numa das culturas mais importantes. Algumas das vantagens associadas a esta matéria-prima prendem-se com a sua:

- elevada eficiência fotossintética;
- alta produtividade em biomassa;
- elevada taxa de crescimento, superior à das plantas superiores;
- elevada fixação de CO₂.

Além disso, as microalgas crescem em meio líquido (que pode ser facilmente manipulado), em variados climas e em terras não aráveis, incluindo zonas marginais não adequadas para fins agrícolas (deserto e litoral), com água não potável ou salobra (podendo inclusivamente serem usados efluentes vários). Também utilizam muito menos água do que as culturas tradicionais e não conduzem ao deslocamento de culturas agrícolas, nem à desertificação dos terrenos. Para além disso, a colheita da biomassa pode ser diária (ao contrário das plantas oleaginosas, em que a colheita é sempre sazonal) (Gouveia *et al.*, 2008; Veillette *et al.*, 2012).

Embora o mecanismo fotossintético das microalgas seja similar ao encontrado nas plantas superiores, a sua eficiência é muito superior devido à sua estrutura simples. Para além disso, o meio aquoso em que se inserem promove um acesso mais fácil à água, ao CO₂ e a outros nutrientes necessários ao seu crescimento (ex. azoto e fósforo). É por estas razões, que as microalgas são capazes de produzir cerca de 30 vezes mais quantidade de óleo, por unidade de área de terreno, do que as culturas oleaginosas (Chisti, 2007). Além disso, são capazes de duplicar o seu número de 1 a 3 vezes em apenas 24 horas (Veillette *et al.*, 2012)

Algumas espécies de microalgas possuem um elevado conteúdo de lípidos (20-50% do peso seco) (Patil *et al.*, 2012), que pode ser aumentado através da otimização do seu crescimento, nomeadamente por variação de alguns factores, por exemplo, por limitação de azoto, aumento do pH e luminosidade. Desta forma, não só existe um aumento na quantidade de lípidos como uma mudança gradual da sua composição (Nigam *et al.*, 2011; Wahlen *et al.*, 2011).

1.4.1 Composição Lipídica

O conteúdo em lípidos numa microalga, assim como a composição destes, varia consideravelmente de espécie para espécie. Esta variação está relacionada com diversos factores, tais como o ciclo de vida da microalga, as condições de cultivo, a temperatura, a intensidade luminosa, idade da cultura, entre outros. Na Tabela 1.4 encontram-se exemplos, do conteúdo lipídico de algumas espécies de microalga.

Os ácidos gordos, que são os constituintes das moléculas de lípidos, podem ser classificados com base no número total de átomos de carbono da cadeia carbonada e no número de duplas ligações. Podem também ser classificados com base na polaridade da molécula do grupo principal, tendo-se lípidos neutros (glicéridos e ácidos gordos livres) e lípidos polares (fosfolípidos e glicolípidos). Os lípidos totais englobam estas duas categorias.

Tabela 1.4 - Conteúdo de lípidos de algumas espécies de microalgas (% peso seco) (Gong *et al.*, 2011)

Espécie	Lípidos (%, m/m)
<i>C. protothecoides</i>	15-58
<i>Chlorococcum</i> sp.	19
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19-22
<i>D. salina</i>	6-25
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27
<i>Nannochloropsis</i> sp.	21-36
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22-30
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29-65
<i>Pavlova salina</i>	31
<i>Pavlova lutheri</i>	36
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Scenedesmus</i> sp.	20-21

1.4.2 Produção de biodiesel a partir de microalgas

Todos os processos existentes de produção de biodiesel a partir das microalgas incluem uma unidade de produção onde as células são cultivadas, seguido da separação das células do meio de cultura e posterior extração dos lípidos. Após a extração, a conversão dos lípidos pode depois ser efectuada através de técnicas semelhantes às usadas na produção de biodiesel a partir das matérias-primas “convencionais” (Mata *et al.*, 2010).

Na Figura 1.15 apresenta-se, esquematicamente, a cadeia de valor associada à produção de biodiesel a partir das microalgas. Esta engloba várias etapas:

- seleção da espécie de microalga, com elevado teor de óleo e mais adequada às condições a que vai ser exposta, quer ambientais quer em termos de *design* do fotobioreactor;
- cultura da microalga, etapa onde as células permanecem durante o tempo necessário para atingirem o máximo de crescimento, também em termos de teor lipídico, eventualmente através da criação de condições de *stress*;
- colheita da biomassa microalgal do bioreactor quando esta se encontrar na fase de crescimento estacionário, separação do meio de cultura e concentração da biomassa, e eventual secagem;
- pré-tratamento (ruptura celular) e extração dos lípidos, através de um solvente; os lípidos são separados dos restos celulares, isolados do solvente de extração e de alguma água residual;
- conversão em biodiesel, através da reação de transesterificação (Halim *et al.*, 2012).

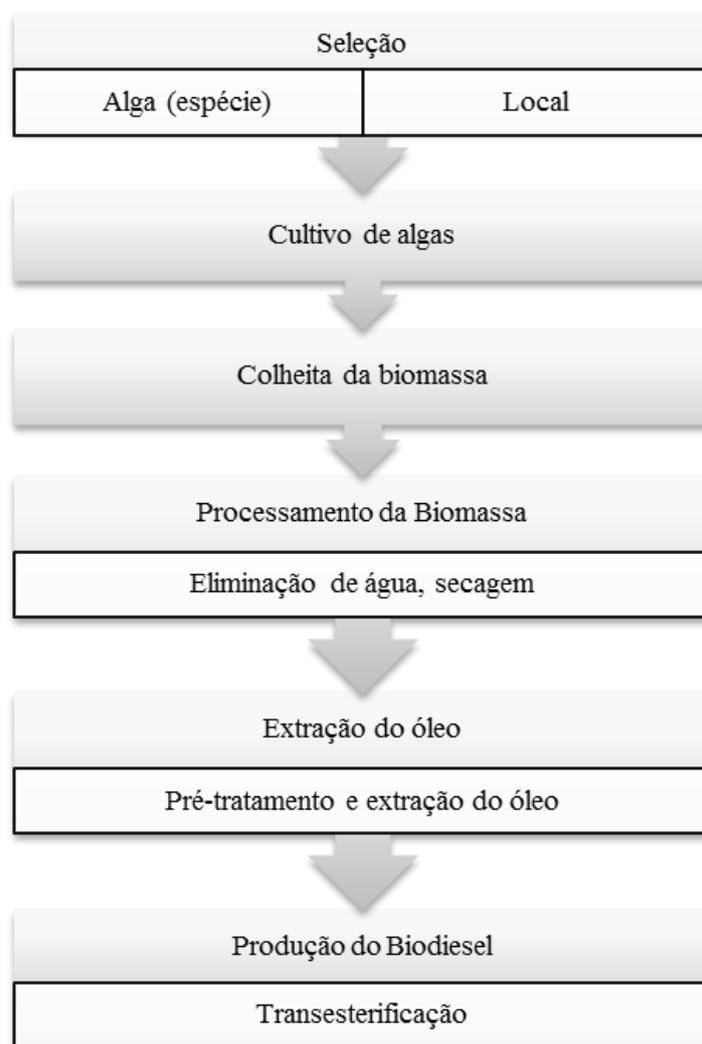


Figura 1.15 – Etapas da produção de biodiesel a partir da cultura de microalgas (adaptado de Mata *et al.*, 2010)

De notar que o sucesso da indústria de produção deste tipo de biodiesel se baseia num elevado rendimento em toda a cadeia de valor, sendo fundamental que a espécie de microalga selecionada apresente uma qualidade de óleo apropriado, não só baseado na sua produtividade volumétrica mas também na sua adequada composição (Nascimento *et al.*, 2012).

A etapa correspondente à extração do óleo (Figura 1.15) pode ser evitada, se a reação de transesterificação for realizada diretamente sobre a biomassa microalgal.

A etapa de extração dos óleos, que de acordo com o estudo de Wahlen *et al.*, (2011), de análise do ciclo de vida de produção de biodiesel a partir de microalgas, consome 90% da energia do processo, pode ser evitada se a reação de transesterificação for realizada directamente sobre a biomassa microalgal.

Esta técnica de extração e conversão de triglicéridos em biodiesel numa única etapa apresenta-se, em diversos aspectos, vantajosa em relação ao processo em duas etapas envolvendo a extração do óleo e a sua conversão dado que:

- É um processo menos poluente, com menos resíduos, e que apresenta um rendimento de 10 a 20 % superior (o que pode ser justificado pela eventual captura de ácidos gordos da parede da célula da biomassa microalgal (Johnson *et al.*, 2009);
- Evita o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, assim como o passo de separação deste, que é um passo dispendioso;
- Diminui as unidades de processo e os custos associados à conversão (Ehimen *et al.*, 2010);
- Tem um impacto positivo na economia de todo o processo (Wahlen *et al.*, 2011) e, conseqüentemente, uma diminuição do preço final do biodiesel (Ehimen *et al.*, 2010).

Apesar da transesterificação directa ou transesterificação *in situ* não ser uma técnica inovadora, dado que já é muito utilizada na preparação de FAME quando se pretende determinar a composição em ácidos gordos dos lípidos contidos numa amostra (Wahlen *et al.*, 2011), não existe ainda muita informação sobre a sua utilização para a produção de biodiesel a partir da biomassa microalgal (Johnson *et al.*, 2009). De qualquer forma, é já considerada como um forte candidato para a produção de biodiesel em grande escala (Sathish *et al.*, 2012).

Dadas as vantagens referidas, esta área tem sido alvo de grande interesse, e é um dos temas abordados neste trabalho.

1.4.2.1 Limitações económicas do processo

Embora a produção de biodiesel a partir de microalgas seja tecnicamente viável, a economia do processo em larga escala tem sido um factor limitante à sua ampla utilização.

Atualmente, de entre os diferentes passos da cadeia de produção de biodiesel a partir de microalgas (Figura 1.17), os principais obstáculos são a etapa de colheita/concentração da biomassa, que necessita de melhoramentos substanciais por forma a tornar o biodiesel competitivo com os combustíveis fósseis (Chisti, 2007), assim como a etapa da extração do óleo .

Por forma a reduzir os custos de produção é ainda de considerar o aproveitamento da biomassa, depois de lhe ser extraído o óleo, para utilização como fertilizante ou ração, para produção de biogás por intermédio de um processo anaeróbio de fermentação, produção de hidrogénio por fermentação no escuro e/ou a extração de compostos químicos de elevado valor comercial num processo de biorefinaria (Gouveia, 2011). Nobre *et al.* (2013) usaram a microalga *Nannochloropsis* sp. para a extração de óleos (para biodiesel), extração de pigmentos carotenóides (para a indústria alimentar) e do resíduo da biomassa produziram hidrogénio por fermentação com bactérias.

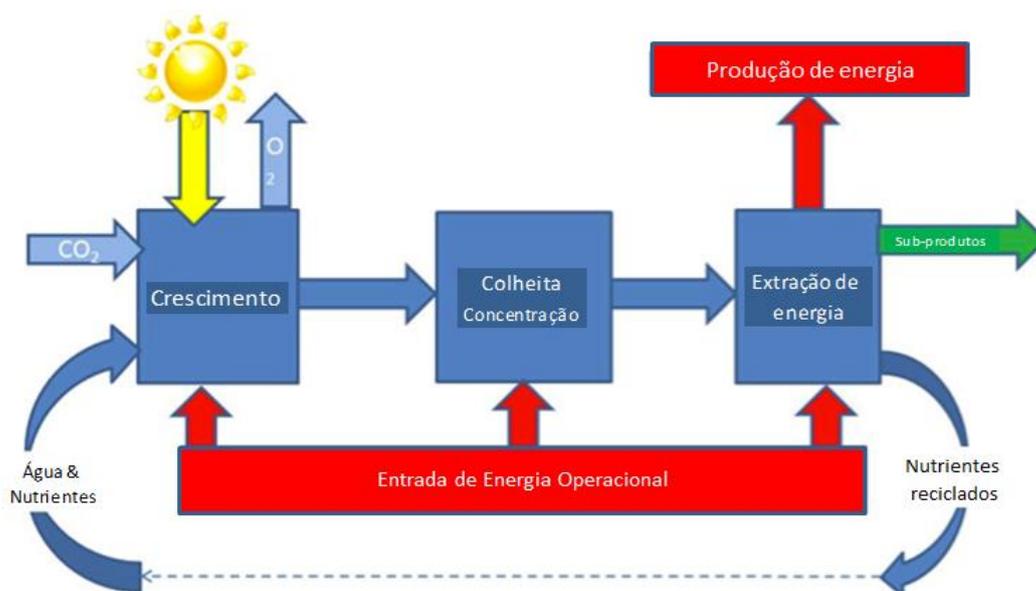


Figura 1.16 - Processo de produção do biodiesel microalgal (Milledge *et al.*, 2011)

Analisando um pouco mais em pormenor cada uma das etapas do processo (Figura 1.16), tem-se:

- A. Crescimento - este pode ser realizado em sistemas fechados (Figura 1.17 (A)) ou em sistemas abertos (Figura 1.17 (B)); estes últimos são o processo mais antigo e simples que se encontram, regra geral, localizados ao ar livre e dependendo da luz natural como iluminação, enquanto que os sistemas fechados podem ser localizados tanto no interior como no exterior sendo, contudo, mais comum no exterior para que possam usufruir da luz natural evitando, assim, mais um custo na produção. Até ao momento, a *design* e operação destes sistemas têm vindo a ser alvo de discussão e desenvolvimento, mas ainda nenhum dos modelos foi ainda lançado para comercialização na produção de biodiesel a partir do óleo das microalgas (Moozami *et al.*, 2012). Tem sido feito um grande esforço nesta pesquisa pois é considerado um passo fundamental e determinante na viabilidade económica do processo (Mata *et al.*, 2010).

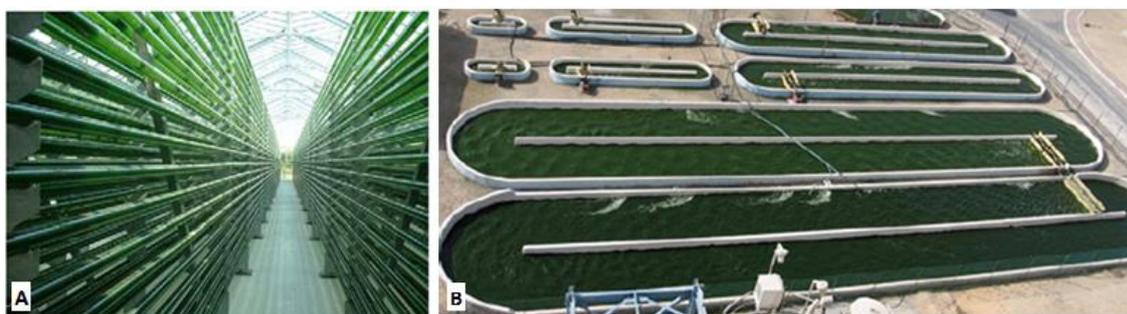


Figura 1.17 – (A) Sistemas fechados – Fotobioreactor (Fonte - http://www.aquafuels.eu/attachments/079_D%202.2%20Proceedings.pdf) (B) Sistema Aberto (Fonte - <http://www.makebiofuel.co.uk/biofuel-from-algae>)

- B. Colheita e concentração - a etapa de colheita é dependente de energia e representa, como já referido, a principal percentagem do custo total de produção (20-40%) (Griffiths *et al.*, 2011). Os processos de colheita que têm sido estudados incluem a centrifugação, a filtração, a

ultrafiltração, a sedimentação gravitacional e a flotação. Estes processos têm ainda sido combinados com um passo adicional de floculação química ou com a combinação de floculação-flotação, ou ainda com técnicas de electro-coagulação (Uduman *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2013). A escolha do processo mais adequado depende das propriedades das microalgas, dado que cada espécie representa um desafio devido ao seu tamanho/dimensão, densidade, propriedades da superfície da célula, e do valor do produto final desejado (Brennan *et al.*, 2010). Até à data ainda não se encontrou um método universal de colheita, sendo esta uma área em desenvolvimento (Gouveia, 2011). Ainda neste passo de colheita e concentração, a remoção da água e a secagem são processos dispendiosos e de uso intensivo de energia (Sathish *et al.*, 2012; Grima *et al.*, 2003).

- C. Extração do óleo – esta etapa tem um consumo energético elevado, de tal modo que a energia final disponível a partir dos lípidos recuperados não consegue satisfazer os requisitos de energia desta etapa, para qualquer um dos métodos (Goodall *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013). Para este fim existem diversos métodos baseados em ação mecânica, como por exemplo os homogeneizadores, ultrassons, autoclave, moinho de bolas, e os que não são por ação mecânica, como é o caso da congelação, solventes orgânicos, choques osmóticos e reações ácidas, básicas e enzimáticas (Mata *et al.*, 2010).
- D. A rutura mecânica é preferível em detrimento da rutura química dado que evita a contaminação química e preserva as propriedades do conteúdo das células (Chisti *et al.*, 1986).

Embora a maioria dos autores refira que a etapa da colheita é a mais dispendiosa, nalguns trabalhos da literatura é referido que o processo de rutura das células e subsequente extração do óleo é o passo que necessita de mais energia para a produção do biodiesel (Milledge *et al.*, 2011).

O presente trabalho incidiu no estudo de metodologias de rutura celular, de modo a otimizar a extração de óleo da biomassa microalgal, e conversão do óleo extraído por esterificação / transesterificação na presença de um catalisador ácido. Este processo foi comparado com a transesterificação direta do óleo presente na biomassa microalgal, sem qualquer extração prévia. Neste processo foram estudados fatores que afetam a eficiência da transesterificação, tais como a quantidade e o tipo de álcool (metanol e etanol), a quantidade de catalisador (ácido sulfúrico), a temperatura e o tempo de reação, o estado da biomassa (húmida, seca ou liofilizada) e o pré-tratamento.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Microalga

Utilizou-se neste trabalho a microalga *Nannochloropsis* sp., que é uma microalga (Figura 2.1), essencialmente de água salgada. Embora considerada uma alga promissora para aplicações industriais devido à sua capacidade para acumular níveis elevados de ácidos gordos poli-insaturados, tem sido mais recentemente estudada com vista à produção de biocombustíveis.

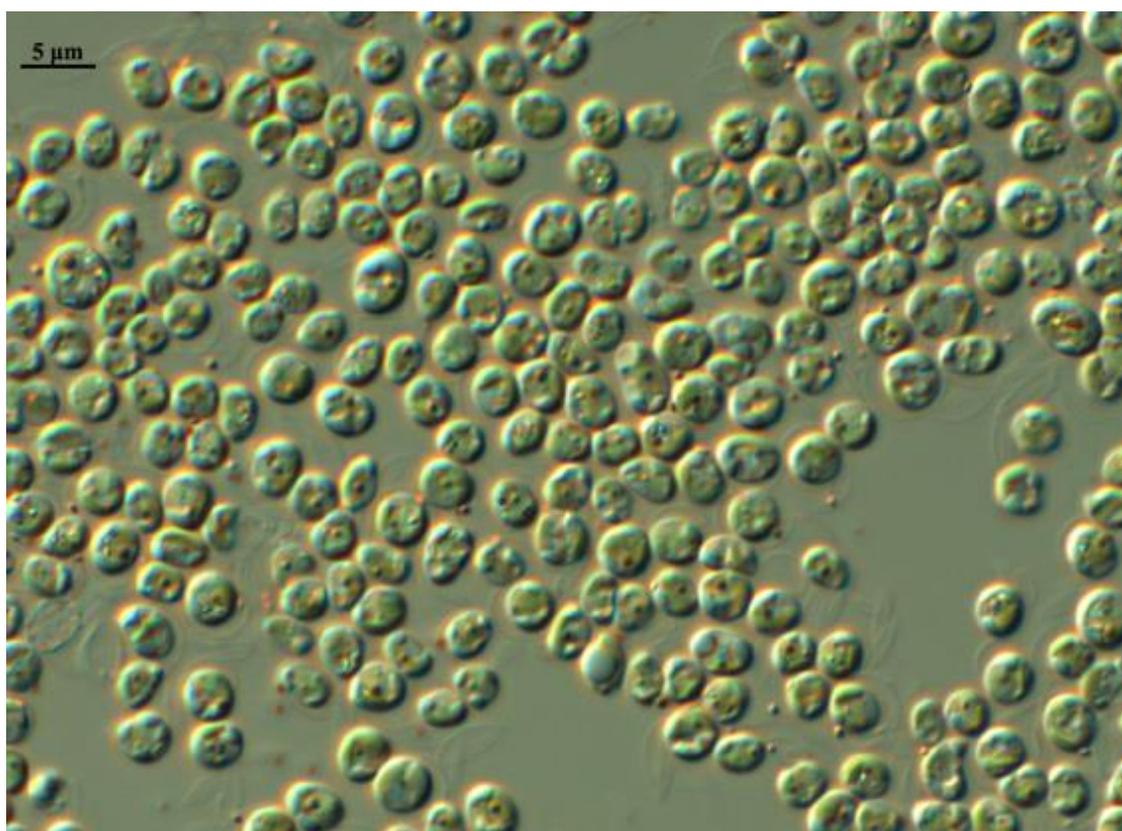


Figura 2.1 – Imagem ao microscópio da *Nannochloropsis* sp.

A microalga (NANNO-2) foi adquirida à algoteca SERI, apresentando a seguinte taxonomia:

Filo: *Heterokontophyta*

Classe: *Eustigmatophyceae*

Família: *Eustigmataceae*

Género: *Nannochloropsis*

Espécie: *Nannochloropsis* sp.

2.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho encontram-se descritos na Tabela 6.1 dos Anexos.

2.1.3 Meio de crescimento da microalga

A microalga *Nannochloropsis* sp. foi crescida num meio GPM modificado, contendo a composição indicada na Tabela 2.1 em 75% de água do mar filtrada (filtro GF/C) e 25% de água desionizada.

Tabela 2.1 – Composição do meio de crescimento para a microalga *Nannochloropsis* sp.

Reagente	Concentração
KNO ₃	0,200 g/L
K ₂ HPO ₄	0,038 g/L
H ₃ BO ₃	0,034 g/L
Na ₂ EDTA	0,030 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	4,30 mg/L
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,45 mg/L
ZnCl ₂	0,30 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,13 mg/L

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento da microalga

O crescimento da microalga foi realizado em manga de polietileno (PBR) com uma capacidade de aproximadamente 10 L, exposta a uma iluminação artificial contínua (8 lâmpadas fluorescentes *Philips 36W/52* cada) e com agitação ascendente por meio de ar comprimido (1 vvm), (reator de coluna de bolhas), a uma temperatura constante de 25°C.



Figura 2.2 - Mangas de polipropileno com a cultura da microalga *Nannochloropsis* sp.

A cultura da microalga foi crescida durante aproximadamente 40 dias, de modo a garantir uma elevada acumulação de lípidos durante a fase estacionária (20 dias).

2.2.2 Colheita da biomassa microalgal

A colheita da biomassa foi realizada após paragem da agitação, seguida de centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min (*Centrífuga Beckman Avanti J-25I*).

Uma parte da biomassa húmida foi liofilizada (Liofilizador *Thermo Scientific - Heto Power Dry LL3000*), outra parte foi seca a 70°C², até peso constante (*Estufa de Ventilação Memmert Celsius 2000*) e outra parte foi guardada húmida a -18°C.

2.2.3 Rutura celular e extração de lípidos da biomassa microalgal

2.2.3.1 Pré-tratamento de rutura celular

Antes de se proceder à extração da fracção lipídica da biomassa microalgal, esta foi sujeita a diferentes tipos de pré-tratamento de modo a se definir o mais eficiente em termos de rutura/enfraquecimento da parede celular, aspecto avaliado através da posterior determinação do teor em óleo obtido em cada caso. Assim, foram testados alguns processos mecânicos (moinho de bolas) e termodinâmicos (microondas e autoclave). Antes dos ensaios de rutura celular, as amostras de biomassa seca foram sujeitas a uma homogeneização do tamanho de partículas (Figura 2.3), utilizando um moinho de café da marca *Moulinex*.



Figura 2.3 – Aspecto da biomassa microalgal seca depois da homogeneização

² A biomassa seca em estufa é designada, neste trabalho, por biomassa seca.

a) **Moinho de bolas**

Neste tratamento mecânico foram moídos, de cada vez, 0,5 g de biomassa seca ou liofilizada, ou quantidade equivalente de biomassa húmida, num moinho de bolas (*Retsch MM400*), durante 3,5 minutos usando 8 bolas de aço *inox* (10 mm Ø), e uma frequência de 25Hz (Figura 2.4). Ao fim deste tempo, a biomassa moída foi cuidadosamente removida para uma caixa de Petri.

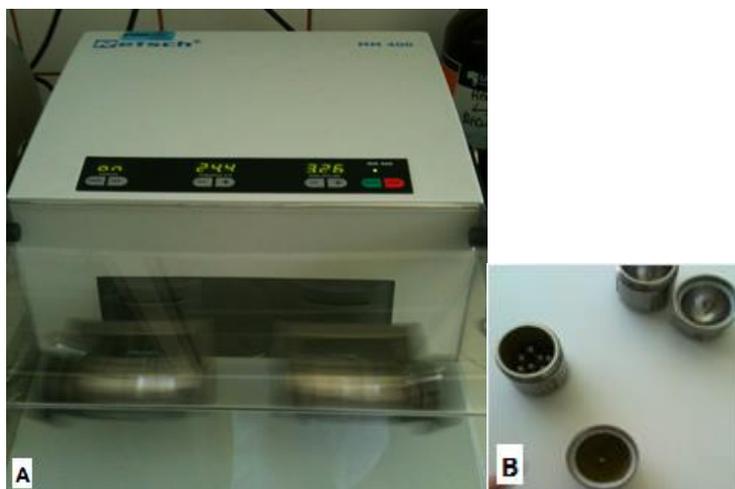


Figura 2.4 - (A) Moinho de bolas a funcionar e (B) interior de um “cápsula” com a biomassa já moída

b) **Micro-ondas**

As amostras (seca, liofilizada e húmida, em quantidade equivalente) a serem testadas (cerca de 2g) foram colocada numa caixa de Petri, durante 10 min, num equipamento de micro-ondas (*Kunft; Pot: 700 w*), na sua potência máxima.

c) **Autoclave**

Neste processo de pré-tratamento, amostras de 2g de alga seca, liofilizada ou húmida (em quantidade equivalente), foram colocadas em frascos *Erlenmeyer* rolhados com rolha de algodão e levados ao autoclave (HL-36AC da Newclave) durante 30 minutos a uma temperatura de 120°C e uma pressão de 1bar.

Por aplicação destes pré-tratamentos à biomassa nos seus diferentes estados (seca, liofilizada e húmida) foram feitas 12 combinações (Tabela 2.2) e, portanto, realizados posteriormente 12 ensaios de extração de óleo.

Tabela 2.2 - Diferentes combinações de pré-tratamentos/estado da microalga

Estado	Húmida	Seca	Liofilizada	
Pré-Tratamento				
Moinho de café	-	1	-	
Moinho de bolas	1	1	1	
Moinho de café com Moinho de bolas	-	1	-	
Micro-ondas	1	1	1	
Auto-clave	1	1	1	
Moinho de café com Auto-clave	-	1	-	
	3	6	3	12

2.2.3.2 Extração por solvente

O processo de extração soxhlet é um dos tratamentos mais utilizados para a extração de componentes solúveis, de uma amostra, dado o seu baixo custo e o fácil manuseamento. O tratamento consiste em retirar de uma amostra sólida componentes que tenham solubilidade no solvente utilizado, sendo os restantes e indesejáveis componentes insolúveis no mesmo.

Reagente: n-Hexano

Procedimento experimental

1. Pesou-se para dentro de um cartucho de extração (VWR), de celulose, 0,5g de amostra de alga seca ou liofilizada; no caso da biomassa húmida foi utilizada quantidade equivalente;
2. Mediram-se, com uma proveta, aproximadamente 160 ml de n-hexano, que foram transferidos para um balão de destilação de 250 ml;
3. Colocou-se um pouco de algodão embebido em hexano dentro do cartucho, por forma a evitar perda de biomassa no processo de extração;
4. Fechou-se o cartucho e colocou-se no extractor *soxhlet*; este por sua vez foi apoiado no balão de destilação a um condensador (Figura 2.5);
5. Após o início da ebulição do hexano, baixou-se a potência da manta de aquecimento (*P Selecta*);
6. O processo de extração foi realizado durante 6h, altura em que o sistema de aquecimento foi desligado e a mistura hexano/fração lipídica deixada a arrefecer;

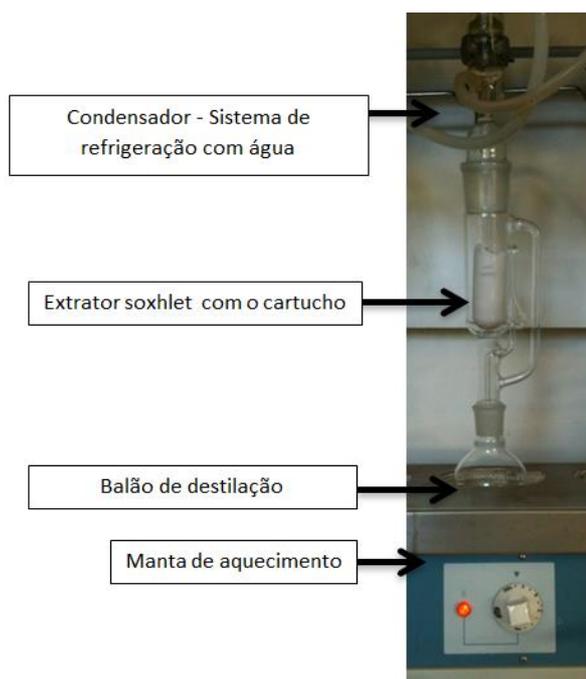


Figura 2.5 – Montagem do sistema de extração Soxhlet utilizado

7. Em seguida, e com a mistura à temperatura ambiente, procedeu-se à sua filtração (filtros *MN-Düren; 640d; 11cm diâmetro*; porosidade $0,05 \mu\text{m}$), para um balão de 100 ml previamente tarado (*Estufa de Ventilação Memmert Celsius 2000*);
8. A mistura filtrada foi levada ao rotavapor (*R-200 Buchi*) (Figura 2.6) a 40°C e 210mbar, durante aproximadamente 20min, de modo a eliminar o solvente.
9. Procedeu-se ainda à secagem em estufa, a 103°C , durante 1 hora, antes de realizar a pesagem para contabilização da fração lipídica extraída.



Figura 2.6 – Rotavapor para evaporação do solvente

10. A quantidade de fração lipídica extraída é calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{ fração lipídica} = \frac{\text{peso}_{\text{final}} - \text{peso}_{\text{inicial}}}{p_{\text{amostra}}} \times 100 \quad \text{Equação 2.1}$$

onde:

peso_{final} – peso, em gramas, do balão contendo o óleo após evaporação e secagem da amostra

peso_{inicial} – peso, em gramas, do balão vazio

p_{amostra} – peso, em gramas, da amostra de microalga

2.2.4 Caracterização da fração lipídica

A fração lipídica extraída foi caracterizada nalguns parâmetros químicos que são necessários conhecer quando o objectivo é a sua conversão em biodiesel.

2.2.4.1 Índice de acidez

O índice de acidez é definido pela massa de hidróxido de potássio, em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos gordos livres contidos num grama de óleo.

A sua determinação foi feita com base na norma portuguesa (EN ISO 660:2009) para óleos e gorduras animais e vegetais, e consiste na neutralização por titulometria ácido-base dos ácidos gordos livres contidos na amostra em análise.

Reagentes

- Mistura dissolvente – volumes iguais de etanol a 95% (C₂H₆O) e éter etílico (C₄H₁₀O), neutralizados com a solução de 0,1N de hidróxido de potássio (KOH), utilizando-se como indicador umas gotas da solução alcoólica de fenolftaleína;
- Solução aquosa de hidróxido de potássio (0,1N) – dissolveu-se aproximadamente 0,562g de KOH em água desmineralizada (Millipore), para um volume final de 100ml;
- Solução alcoólica de fenolftaleína, 1% p/v.

Procedimento experimental

Pesou-se, para um frasco *Erlenmeyer*, aproximadamente 0,2g de amostra às quais se adicionou 100ml da mistura dissolvente e algumas gotas da solução alcoólica de fenolftaleína. Titulou-se com uma solução de KOH 0,01N (diluição de 1/10 da solução KOH 0,1N) sob agitação constante até ao aparecimento de uma cor rosada persistente durante 15 segundos.

Após a titulação da amostra, procedeu-se à padronização do titulante utilizado. Para o efeito, utilizou-se uma solução de HCl 0,1N e titularam-se duas tomas de 2ml cada, na presença de algumas gotas de fenolftaleína.

A normalidade da solução aquosa de KOH é dada pela equação:

$$N_{KOH} = \frac{N_{HCl} \times V_{HCl}}{V_{KOH}} \quad \text{Equação 2.2}$$

onde:

V_{KOH} – volume da solução de KOH (ml)

V_{HCl} – volume da solução padrão de HCl (ml)

N_{HCl} – normalidade da solução padrão de HCl (N)

O Índice de Acidez (IA) da amostra é dado por:

$$IA(mgKOH.g^{-1}) = \frac{(V \times N \times 56,11)}{m} \quad \text{Equação 2.3}$$

onde:

V – volume da solução de KOH (ml)

N – normalidade da solução de KOH (N)

m – massa da toma de amostra (g)

56,11 – massa equivalente do KOH (g/eq)

Os resultados podem também ser apresentados em acidez (%), expressa em função do ácido oleico, de acordo com a equação:

$$\text{acidez (\% ácido oleico)} = \frac{(V \times N \times 282,45)}{m \times 10} \quad \text{Equação 2.4}$$

onde:

282,45 – massa equivalente de ácido oleico (g/eq)

10 – factor de conversão para percentagem

2.2.4.2 Índice de iodo

O índice de iodo é definido pela quantidade de halogéneo absorvida pela porção de amostra testada, em gramas de iodo por 100mg de amostra de óleo.

O índice de iodo foi determinado titrimetricamente de acordo com a norma (NP EN ISO 3961:2003), que permite avaliar o grau de insaturação de misturas de ácidos gordos. O método consiste na promoção da reação entre o óleo e uma solução de halogéneo, no escuro e durante um determinado intervalo de tempo à temperatura ambiente. O excesso de halogéneo vai depois oxidar uma solução de iodeto convertendo-o em iodo livre cuja quantidade é posteriormente determinada por titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Foi realizado um ensaio “branco” que permite, por diferença, determinar a quantidade de halogéneo que reagiu com a amostra, isto é, a quantidade de halogéneo que é absorvida pela amostra.

Reagentes

- Solução de iodeto de potássio (100g/L) – dissolveu-se 10g de iodeto de potássio (KI) em 100ml de água desmineralizada;
- Indicador de cozimento de amido – dissolveu-se 0,5g de amido em 3ml de água fria até a formação de uma pasta e adicionou-se 100ml de água a ferver. A solução foi depois submetida a 3 minutos de fervura e deixada a arrefecer;
- Solução aquosa de tiosulfato de sódio (0,1M) – utilizou-se a solução padrão Titrisol (0.1mol) dissolvida para 1000ml;
- Solvente - Misturou-se em partes iguais (20ml) de ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) e de ciclo-hexano (C_6H_{12});
- Reagente de Wijs (0,2N) – reagente comercial, contendo monocloreto de iodo em ácido acético.

Procedimento Experimental

Pesou-se (balança *Mettler Toledo AB204-S*; Max: 220g; Erro: 0,1mg), para um corredor de pesagem, aproximadamente 140 mg da fração lipídica extraída da microalga seca, com pré-tratamento em autoclave.

Transferiu-se a amostra de óleo para um frasco *Erlenmeyer* rolhado de 500ml, com ajuda de 20ml do solvente (Figura 2.7).



Figura 2.7 – Processo de transferência da amostra para o frasco *Erlenmeyer* na determinação do índice de iodo

Adicionou-se 25ml da solução de Wijs, com pipeta volumétrica, tendo-se, logo de seguida, rolhado o frasco. Agitou-se levemente e colocou-se em repouso, no escuro, durante uma hora. Ao fim desse tempo, adicionou-se 20ml da solução de iodeto de potássio e 150ml de água.

Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio 0,1N até a solução adquirir uma coloração amarelo claro, altura em que se adicionou 0,5ml da solução indicadora de cozimento de amido, e continuou-se a titular, sob forte agitação, até desaparecimento da cor.

Em paralelo foi realizado um ensaio em branco, sem adição de amostra.

O índice de iodo é dado por:

$$II(gI_2 | 100g) = \frac{((V_b - V_a) \times c \times 12,69)}{m} \quad \text{Equação 2.5}$$

onde,

V_a – volume tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra (ml)

V_b – volume de tiosulfato de sódio gasto no ensaio em branco (ml)

c – concentração da solução de tiosulfato de sódio (N)

m – massa da amostra (g)

12,69 – factor procedente da razão entre a constante k (número de electrões transferidos) e M_I (massa molar do iodo)

2.2.4.3 Perfil e composição em ácidos gordos

A avaliação qualitativa e quantitativa da composição de uma amostra de óleo em termos de ácidos gordos, é obtida por análise cromatográfica após derivatização da amostra.

Este processo encontra-se definido na norma (EN ISO 5509:2001) e inclui a saponificação dos glicéridos com hidróxido de sódio (NaOH), seguida da conversão dos sabões em ésteres metílicos por reação com uma solução metanólica de trifluoreto de boro (BF₃).

Reagentes

- NaOH em metanol (0,5M) – dissolver 2g de NaOH em 100ml de metanol
- Solução metanólica de BF₃ (15%)
- Iso-octano, para cromatografia
- Solução saturada de cloreto de sódio (NaCl)
- Sulfato de sódio anidro p.a.

Procedimento Experimental

Em balão de 50ml de fundo redondo, pesou-se aproximadamente 150mg de amostra e adicionou-se 4ml da solução de NaOH, juntamente com reguladores de ebulição. De seguida colocou-se num banho previamente aquecido a 85°C e levou-se à ebulição com refluxo, agitando levemente de minuto a minuto, de modo a impedir a formação de um anel de NaOH à volta do balão. Passados 10 minutos adicionou-se 5ml da solução de BF₃ e manteve-se em ebulição durante mais 3 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se 3ml de iso-octano, retirando-se imediatamente o balão do banho. Ainda com o balão montado na coluna adicionou-se 20ml da solução saturada de NaCl. Retirou-se o balão, tapou-se e agitou-se fortemente durante 15 segundos. Encheu-se o balão até cima com a solução de NaCl. Finalmente, após a separação das fases, retirou-se a fase superior com o auxílio de uma pipeta, fazendo-a passar por sulfato de sódio anidro para eliminar resíduos de água, para um tubo de ensaio.

A 1,5ml de amostra derivatizada foi adicionado, como padrão interno, 15mg de nonadecanoato de metilo (C19:0). Esta amostra foi posteriormente analisada por cromatografia (cromatógrafo Varian 3800), equipado com detector de ionização à chama (FID) e coluna capilar (Supelcowax 10, comprimento 30m, diâmetro interno 0,32mm e espessura de filme 0,25 µm) nas seguintes condições:

- Temperatura inicial da coluna – 200°C (durante 20 minutos)
- Taxa de aquecimento da coluna – 20°C/min
- Temperatura final da coluna – 220°C (durante 10 minutos)
- Temperatura do injetor – 250°C
- Temperatura do detector – 250°C
- Gás de arraste – Hélio

A composição da amostra, em termos de percentagem relativa de cada um dos ésteres de ácidos gordos, foi dada por:

$$\text{Éster}_i (\% m/m) = \frac{A_i}{(\Sigma A)} \times 100 \quad \text{Equação 2.6}$$

onde:

A_i – área do pico i

ΣA – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:1

O teor de ésteres de ácidos gordos na fração lipídica, foi determinado através da expressão:

$$\text{Ésteres (\% m/m)} = \frac{(\Sigma A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{m_{EI}}{m} \times 100 \quad \text{Equação 2.7}$$

onde:

ΣA – área total dos picos dos ésteres metílicos de C14:0 a C24:0

A_{EI} – área do pico correspondente ao padrão interno

m_{EI} – massa do padrão interno (mg)

m – massa da toma de amostra (mg)

2.2.5 Ensaios de conversão do óleo microalgal em biocombustível

2.2.5.1 Esterificação / Transesterificação direta (sem extração do óleo)

Por forma a converter em ésteres os ácidos gordos livres e os glicéridos presentes na biomassa da microalga *Nannochloropsis* sp., foram realizados vários ensaios, na presença de álcool (metanol ou etanol) e de um catalisador ácido (ácido sulfúrico). Os ensaios foram levados a cabo em frascos de 20ml, encapsulados com cápsula em alumínio e septo de butyl/PTFE (da marca VWR), numa incubadora orbital (*Lab-Line Orbit Environ Shaker*) a 50°C e 200rpm. Para cada ensaio pesou-se, para o respectivo frasco, aproximadamente 100 mg de biomassa microalgal seca (Figura 2.8), à qual se adicionou o álcool e o catalisador, na combinação em estudo.



Figura 2.8 – Frasco encapsulável com a amostra de microalga

Quando atingido o tempo de reação pretendido, adicionaram-se à mistura reacional 2ml de clorofórmio e 5ml de água desmineralizada; agitou-se e deixou-se em repouso para estratificação das fases e posterior extração da camada de clorofórmio contendo os ésteres (fase inferior) (Figura 2.9).

Foram adicionados, mais 2 vezes, 2ml de clorofórmio, procedendo-se do mesmo modo e juntando as várias fases do clorofórmio, contendo os ésteres. Esta fase foi depois seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e guardada para posterior análise em termos de teor de ésteres.



Figura 2.9 – Estratificação das fases, após adição de clorofórmio e água à mistura reacional

Nos ensaios de otimização das condições reacionais foi estudado o efeito de diversos fatores, nomeadamente, da quantidade de metanol e de ácido sulfúrico e do tempo de reação. O estudo foi realizado com a biomassa seca sujeita a pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas, nas seguintes condições:

- Efeito da quantidade de metanol

Condições fixas		Condições variáveis
Ácido	1,8% (v/v) H ₂ SO ₄	Δ Álcool Metanol [mL]
Microalga	seca	
Pré-tratamento	Moinho de café e moinho de bolas	1
Tempo	4 h	2
Rotação	200 rpm	3
Temperatura	50°C	4

- Efeito da quantidade de catalisador

Condições fixas		Condições variáveis
Álcool	4 mL de metanol	Δ Ácido H ₂ SO ₄ (% v/v)
Microalga	seca	
Pré-tratamento	Moinho de café e moinho de bolas	0,8
Tempo	4 h	1
Rotação	200 rpm	1,125
Temperatura	50°C	1,2
		1,6
		1,8
		2

O efeito do tempo de reação foi estudado nas condições estabelecidas como as mais adequadas, em termos de quantidade de metanol e de ácido sulfúrico, para a conversão do óleo contido na biomassa microalgal em ésteres metílicos. Nessas condições foi também avaliado o efeito do pré-tratamento de rutura celular (sem pré-tratamento e com pré-tratamento moinho de café/moinho de bolas) e do estado da biomassa (seca e liofilizada).

Foi ainda realizado um ensaio em que se variou o tipo de álcool (etanol em vez de metanol), nas melhores condições escolhidas como mais adequadas para a reação de esterificação/transesterificação.

2.2.5.2 Esterificação / Transesterificação do óleo extraído da biomassa

O óleo extraído da biomassa microalgal foi utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Os ensaios foram realizados nas condições seleccionadas como as mais adequadas para a conversão com a biomassa seca, em termos de álcool e catalisador, 4ml e 1,2% v/v em relação ao metanol, respectivamente, a 50°C e 200rpm. Após atingido o tempo de reação pretendido, procedeu-se ao tratamento da amostra conforme descrito anteriormente no processo de esterificação/transesterificação direta (sem extração de óleo).

2.2.6 Caracterização do biocombustível

2.2.6.1 Teor de ésteres metílicos e de éster metílico do ácido linolénico

O teor de ésteres metílicos numa amostra é determinado por cromatografia em fase gasosa segundo a norma EN 14103:2003. Este parâmetro corresponde à quantidade total, expressa em percentagem mássica, dos vários ésteres metílicos derivados de ácidos gordos, com cadeias usualmente entre C14:0 e C24:0.

Procedimento Experimental

Dos 6ml de clorofórmio extraídos após a reação (esterificação ácida), 3,5ml foram evaporados num banho termostaticado a 80°C (Precistern da marca *P Selecta*), adicionando-se de seguida à amostra evaporada 1,5ml da solução de padrão interno (C19:0), com a concentração de 10mg/ml, em n-heptano.

A amostra foi posteriormente analisada por cromatografia em fase gasosa, nas condições descritas no ponto 2.2.4.3.

2.2.6.2 Cromatografia preparativa

A cromatografia em placa é uma técnica cromatográfica utilizada para identificar a presença de componentes em amostras, através da utilização de uma placa de vidro com uma camada de sílica-gel isenta de gordura.

Foi utilizada esta técnica para identificar a presença de mono-, di- e triglicéridos na amostra, após reação de esterificação/transesterificação, bem como a formação de ésteres.

Reagentes

- Solução eluente (85 ml de éter petróleo 60/80 °C, 15 ml de éter etílico e 1ml de ácido acético);
- Iodo sólido

Procedimento Experimental

A aproximadamente 1cm do bordo da placa foi traçada uma linha (a lápis) e identificados os locais para aplicação da amostra a analisar. Colocou-se a amostra com o auxílio de uma pipeta e secou-se

com azoto. A placa foi introduzida numa câmara de vidro transparente, fechada, contendo a solução eluente.

Quando a solução eluente atingiu o cimo da placa (sem sair da mesma), esta foi retirada da câmara, seca ao ar ou com azoto, e transferida para outra câmara idêntica, mas contendo iodo sólido, para a revelação dos componentes presentes na amostra (Figura 2.10).



Figura 2.10 – Revelação da placa de cromatografia na câmara de iodo

3. Resultados e Discussão

3.1 Rutura celular e extração de lípidos da microalga *Nannochloropsis* sp.

A microalga *Nannochloropsis* sp. acumula lípidos, no meio intracelular, pelo que, tendo em vista a produção de biodiesel a partir da biomassa desta microalga, se torna necessário proceder à rutura da parede celular para contabilização da quantidade de óleo presente.

3.1.1 Seleção do Método de Rutura Celular

A rutura da parede celular da microalga em estudo foi realizada com dois tipos de métodos físicos distintos: mecânicos (moinho de café e moinho de bolas) e termodinâmicos (microondas e autoclave). Estes processos foram aplicados à biomassa seca assim como à liofilizada e à húmida, tendo-se realizado 12 ensaios independentes (tabela 2.1).

O teor de lípidos totais após a biomassa seca ter sido sujeita a pré-tratamento e extração por hexano foi contabilizada, encontrando-se os resultados obtidos na Figura 3.1.

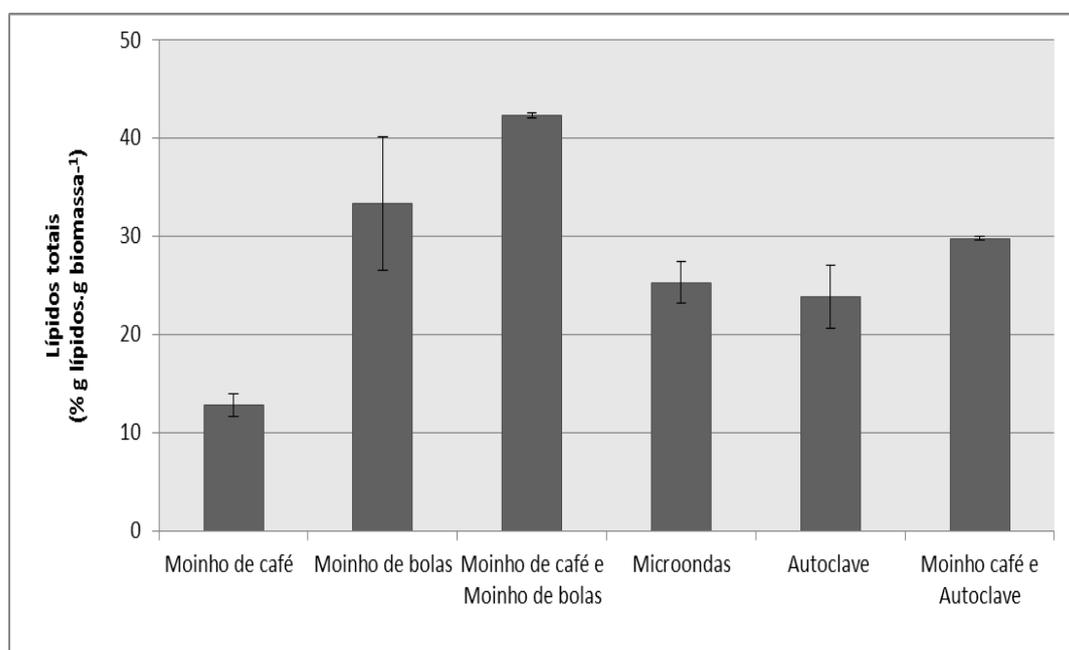


Figura 3.1 – Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. seca, sujeita a diferentes processos de rutura celular. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

Como se pode observar, o valor mais elevado de lípidos totais é conseguido quando a biomassa foi sujeita a pré-tratamento no moinho de café seguido do moinho de bolas. Nesta situação conseguiu-se uma extração de lípidos totais de 42,4% (g lípidos/g biomassa seca). Um valor inferior foi obtido quando a biomassa não foi sujeita a moagem prévia no moinho de café (34% (g lípidos/g biomassa seca)) observando-se, neste caso, uma elevada variabilidade nos valores dos resultados (elevado desvio padrão), o que realça a importância deste passo por forma a homogeneizar a amostra de biomassa. Verificou-se ainda que a extração de lípidos totais de uma amostra apenas sujeita a moagem no moinho de café levou à obtenção de uma quantidade de lípidos totais de 12,8% (g lípidos/ 100g

biomassa seca), mostrando que este processo por si só não conduz a uma rutura/fragilização eficiente da parede celular da microalga em estudo.

Valores não superiores a 30% (g lípidos/g biomassa seca) foram também observados quer para o pré-tratamento em autoclave quer no microondas, mesmo quando a amostra foi previamente moída no moinho de café.

Estes resultados mostram a influência do pré-tratamento na rutura celular e, conseqüentemente, na acessibilidade do solvente, utilizado na extração, aos lípidos que se encontram localizados no meio intracelular.

Para o caso da microalga liofilizada (Figura 3.2), os pré-tratamentos com o moinho de bolas e na autoclave conduziram a valores semelhantes, 28,9% (g lípidos/g biomassa liofilizada) e 28,7% (g lípidos/g biomassa liofilizada), respectivamente, embora cerca de 15% inferiores ao máximo conseguido para a biomassa seca. De salientar, no entanto, que no caso da biomassa liofilizada não se procedeu ao pré-tratamento no moinho de café pois a amostra apresentava-se, aparentemente, homogénea. A comparação destes resultados com os obtidos com a biomassa seca, nas mesmas condições de pré-tratamento (sem moagem no moinho de café), parecem indicar uma maior eficácia do processo em autoclave para a biomassa liofilizada e do processo de moagem no moinho de bolas para a biomassa seca. No entanto, tem de ser ter em conta nestas observações, os elevados valores de desvio padrão associados.

O pré-tratamento no microondas mostrou uma aplicabilidade bastante diferente dependendo do estado da biomassa (seca ou liofilizada) (Figuras 3.1 e 3.2), sendo mesmo muito pouco eficiente no caso da biomassa liofilizada.

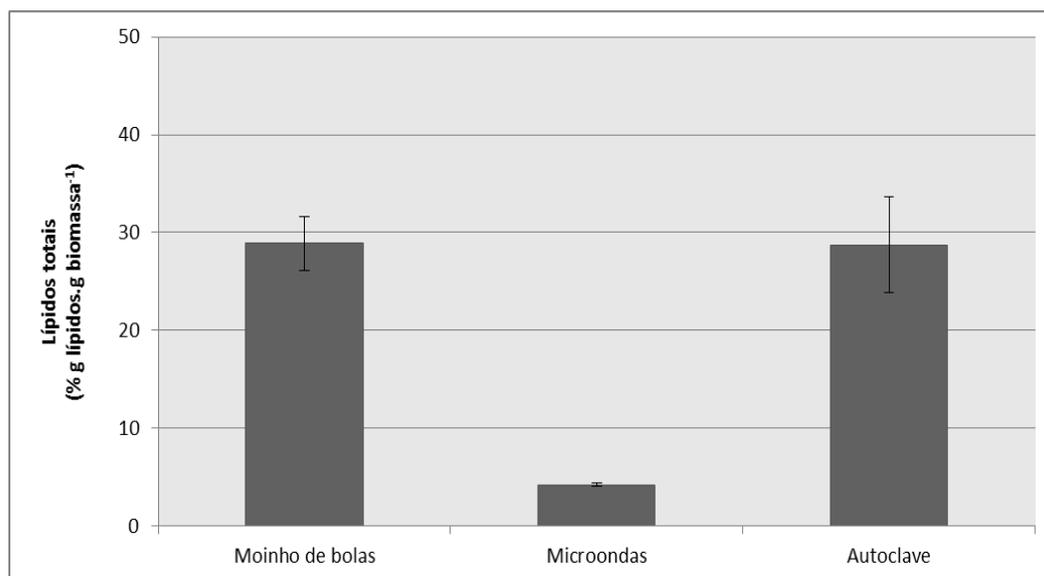


Figura 3.2 - Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. liofilizada, sujeita a diferentes processos de rutura celular. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

Nos ensaios em que se utilizou a biomassa húmida (Figura 3.3), o teor de lípidos totais determinado não ultrapassou os 7,65% (g lípidos/g biomassa húmida), independentemente do processo de pré-tratamento, não se justificando a realização de mais ensaios dada a escassez de amostra. Os resultados podem ser explicados pelo facto de, neste caso, a biomassa ter um teor em água de cerca de 80%, factor limitante para o passo de extração em soxhlet, com hexano, o qual é conhecido ser pouco eficiente na presença de elevados teores de água (> 10%).

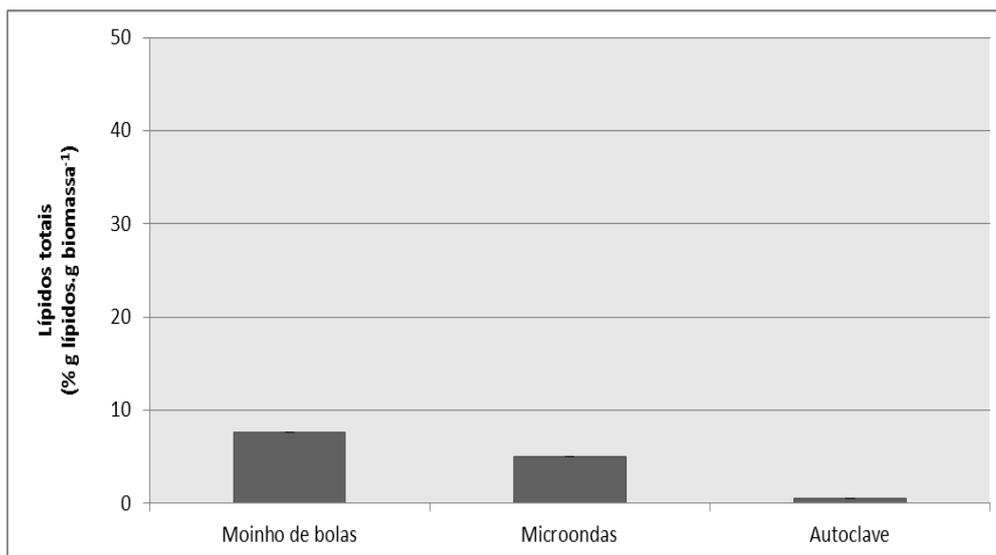


Figura 3.3 - Teor de lípidos extraídos da biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. húmida, sujeita a diferentes processos de rutura celular.

Com base nos resultados obtidos (tabela 3.1) pode-se concluir que, de todos os processos de pré-tratamento estudados, o que permite obter o percentual lipídico por grama de biomassa mais elevado é o do moinho de bolas combinado com o moinho de café, utilizando a biomassa seca. Isto pode ser justificado pelo facto da combinação destes 2 processos provocarem uma rutura mais eficiente nas paredes da célula, comparativamente com os outros métodos.

O valor obtido ($42,4 \pm 0,2\%$ (g lípidos/g biomassa seca)) é concordante com o referido por Nobre *et al.* (2013) para a *Nannochloropsis* sp. utilizando quer extração soxhlet com hexano (40,7g lípidos/g biomassa seca) quer a extração com uma mistura CO_2 + etanol (20% m/m) em condições supercríticas (45g lípidos/g biomassa seca).

Tabela 3.1 – Efeito do método de rutura no teor de lípidos totais obtido para a microalga *Nannochloropsis* sp. seca, liofilizada e húmida

	Teor de Lípidos (g lípidos extraídos/100 g biomassa)					
	Seca		Liofilizada		Húmida	
Moinho de café	12,8	± 1,2	-	-	-	-
Moinho de bolas	33,3	± 6,8	28,9	± 2,7	7,6	
Moinho de café com moinho de bolas	42,4	± 0,2	-	-	-	-
Microondas	25,3	± 2,1	4,2	± 0,2	5,0	
Autoclave	23,9	± 3,2	28,7	± 4,9	0,6	
Moinho de café com autoclave	29,8	± 0,2	-	-	-	-

Existem na literatura vários estudos de rutura celular nomeadamente para a recuperação, por exemplo, de astaxantina a partir da alga *Haematococcus pluvialis* (Mendes-Pinto *et al.*, 2001), tendo-se verificado (Figura 3.4) que o processo de autoclave e do homogeneizador apresentavam um rendimento 3 vezes superior aos outros métodos testados (Grima *et al.*, 2003).

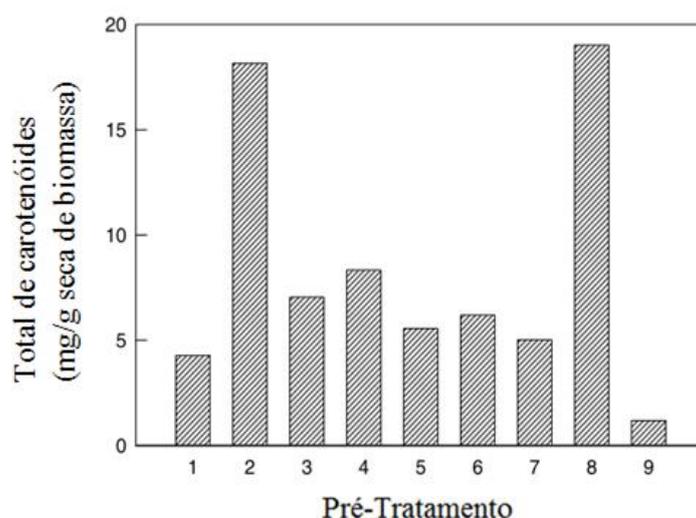


Figura 3.4 – Efeito de vários pré-tratamentos na recuperação de carotenóides em acetona (1-sem pré-tratamento, 2- autoclave, 3- ácido clorídrico - 15 min., 4- ácido clorídrico - 30 min, 5- hidróxido de sódio - 15 min., 6- hidróxido de sódio - 30 min., 7- enzimas, 8- rutura mecânica, 9- pulverização) (Grima *et al.*, 2003)

No entanto, para a extração dos açúcares da microalga *Scenedesmus obliquus* verificou-se que o melhor método seria o uso de H_2SO_4 (2N) (Miranda *et al.*, 2012).

3.2 Caracterização da fração lipídica

3.2.1 Teor de glicéridos

As microalgas têm, na sua constituição, lípidos neutros/apolares (glicéridos) e polares (fosfolípidos, glicolípidos), sendo que os apolares são extraídos pelo solvente – hexano – utilizado neste trabalho. No entanto, dado que no processo de extração são extraídas juntamente com os glicéridos outras moléculas apolares (vitaminas, carotenóides), a contabilização dos glicéridos é de grande importância já que são estes que serão convertidos, posteriormente, em biodiesel, através da reação de transesterificação.

Os resultados obtidos, após derivatização da amostra (secção 2.2.4.3), mostraram que dos 42,4% (m/m) de lípidos totais extraídos da biomassa seca da microalga *Nannochloropsis* sp., 89,6% correspondem à fracção lipídica (glicéridos + ácidos gordos livres) ou seja, a matéria-prima que pode ser convertida em biodiesel. Assim, o teor máximo de ésteres metílicos que se poderá obter a partir da biomassa da microalga em estudo será de 38% (g lípidos/g biomassa).

3.2.2 Perfil e composição em ácidos gordos

As fracções lipídicas extraídas após a biomassa ter sido sujeita a diferentes processos de pré-tratamento de rutura celular, assim como resultantes da biomassa nos seus diferentes estados (húmida, seca e liofilizada), foram analisadas por cromatografia gasosa capilar (secção 2.6.1) de modo a se avaliar a influência dos referidos processos/estados na composição em ácidos gordos.

Como se pode observar pelas Figuras 3.5 e 3.6, o perfil de ácidos gordos é independente do estado em que se encontra a biomassa (seca ou liofilizada) e do processo de pré-tratamento utilizado, sendo o óleo essencialmente constituído por ácidos gordos insaturados. A análise da composição em ácidos gordos permite constatar que o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1) e o ácido oleico (C18:1) são os principais constituintes do óleo da microalga *Nannochloropsis* sp. estudada neste trabalho, o que é concordante com a caracterização apresentada por outros autores (Carrero, et al., 2011) e (Gouveia, et al., 2008). No entanto, como se pode observar por comparação dos dados apresentados na tabela 3.2, a percentagem relativa de cada ácido gordo no óleo microalgal apresenta variações, o que pode estar associado com o modo de cultivo da microalga ou com a altura em que é realizada a colheita.

Como se pode constatar pelos dados obtidos (Figuras 3.5 e 3.6), a associação das alterações acima referidas com o processo de pré-tratamento utilizado para a rutura celular não se mostrou muito evidente. Para a biomassa seca (Figura 3.5) não existe alteração significativa da composição em ácidos gordos do óleo obtido quando a biomassa foi sujeita a pré-tratamento no moinho de bolas ou no microondas, verificando-se apenas uma ligeira alteração (diminuição do teor de C18:1 e aumento dos teores de C16:0 e C16:1) quando o processo de autoclave foi utilizado. Este fato pode estar relacionado com as diferentes condições de pressão e temperatura a que o óleo foi sujeito. Uma ligeira diminuição do teor de ácido oleico (C18:1) foi também observada para o óleo obtido a partir da biomassa liofilizada sujeita a pré-tratamento na autoclave (Figura 3.6), quando comparado com o teor obtido com o pré-tratamento no moinho de bolas.

De referir que o teor de ácido linolénico (C18:3) presente em todos os casos é bastante baixo ($< 0,35\%$ m/m), e muito inferior ao limite especificado na norma EN 14214 ($< 12\%$ m/m), o que permitirá obter um biodiesel de qualidade no que respeita a este parâmetro. Pelo contrário, a presença do ácido gordo polinsaturado C20:5, em teores superiores a 1% (m/m), faz com que o produto da transesterificação deste óleo não cumpra a especificação da norma EN 14214 em relação a este parâmetro. Esta situação implicará a utilização de misturas com outros óleos ou a prévia remoção total ou parcial deste ácido tipo ómega-3, que tem um elevado valor comercial, para a obtenção de um produto com um teor de ácidos gordos polinsaturados dentro das especificações exigidas ($< 1\%$ m/m).

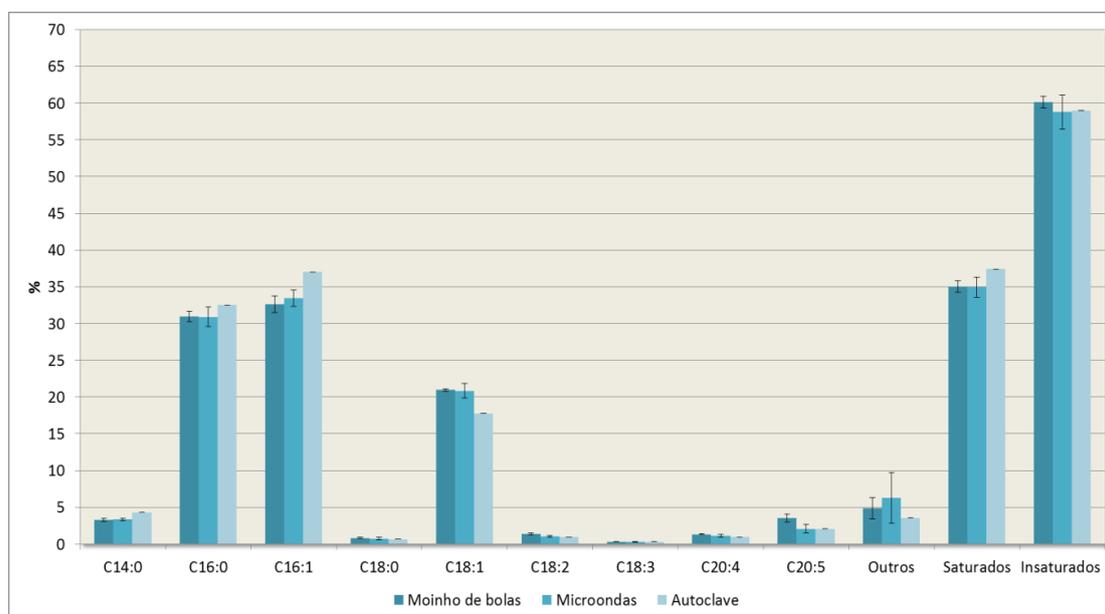


Figura 3.5 - Composição do óleo da microalga *Nannochloropsis* sp. seca e relação com os diferentes pré-tratamentos de rutura celular

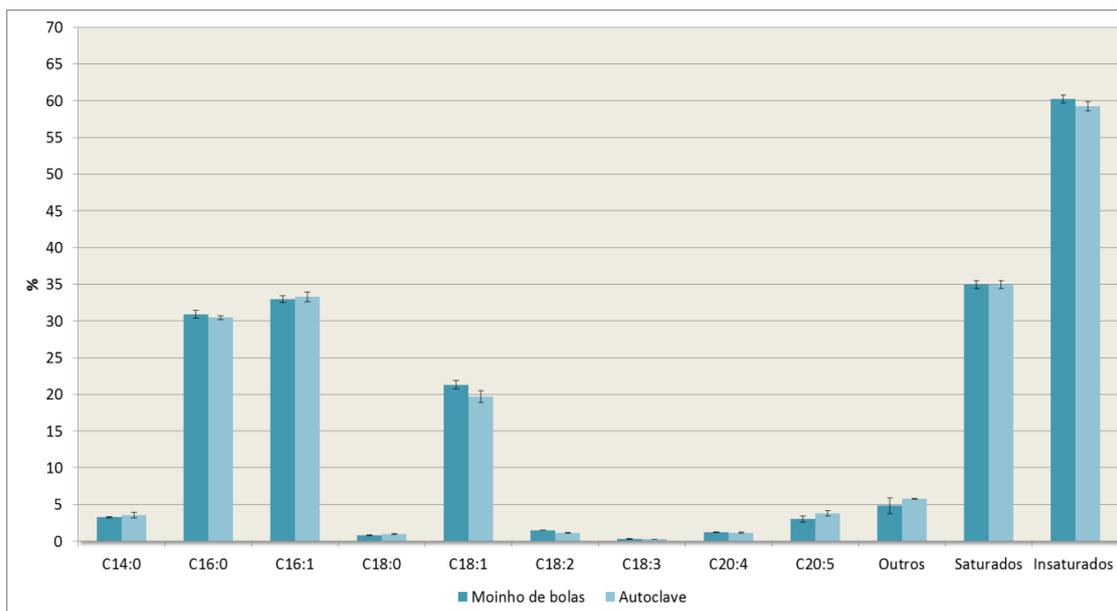


Figura 3.6 - Composição do óleo da microalga *Nannochloropsis* sp. liofilizada e relação com os diferentes pré-tratamentos de rutura celular

Tabela 3.2 – Comparação da composição de ácidos gordos da microalga *Nannochloropsis* sp.

Médias	Amostra	Gouveia <i>et al.</i> , 2008
	(% m/m)	(% m/m)
C14:0	3,14	7,16
C16:0	30,66	23,35
C16:1	31,91	26,87
C18:0	0,85	0,45
C18:1	20,88	13,20
C18:2	1,42	1,21
C18:3	0,30	n.d.
C20:4	1,27	2,74
C20:5	3,82	14,31
Outros	5,76	10,71
Saturados	34,64	30,96
Insaturados	59,60	59,20
Polisaturados	5,09	17,05

3.2.3 Índice de acidez e Índice de iodo

O índice de acidez do óleo é um parâmetro de extrema importância na medida em que vai permitir estabelecer o processo mais adequado para a conversão da matéria-prima em ésteres (biodiesel). De acordo com a literatura Gerpen, 2005, para valores de índice de acidez superiores a 2mg KOH/g o

processo de transesterificação deve ser realizado na presença de um catalisador ácido, de modo a que não só os triglicéridos mas também os ácidos gordos livres sejam convertidos em ésteres e, portanto, não haja perda de rendimento mássico. Como se pode observar na tabela 3.3, o óleo microalgal em estudo apresenta um índice de acidez de 15,26mg KOH/g o que implicará, como referido, o recurso a um processo de catálise ácida para a sua conversão. Nesta situação, a utilização de catalisador básico levaria à formação de sabões, por reação com os ácidos gordos livres, e conseqüente redução no rendimento final do processo.

Tabela 3.3 – Índice de acidez e Índice de iodo do óleo microalgal da *Nannochloropsis* sp.

Índice de acidez	15,3	mg KOH/g
Índice de iodo	67	g iodo/100g

O óleo microalgal foi também caracterizado em termos de índice de iodo (Tabela 3.3). Este parâmetro que mede o grau de insaturação do óleo é, portanto, dependente da composição da matéria-prima. O índice de iodo da *Nannochloropsis* sp. apresentou um valor bastante inferior ao especificado na norma de qualidade do biodiesel (EN14214) (<120 gI₂/100g). Esta situação é comprovada pelo elevado teor de ácidos gordos insaturados identificados na amostra de óleo analisada (Tabela 3.2). Quanto maior for o índice de iodo maior é a possibilidade de oxidação, formação de depósitos e deterioração da lubricidade (Nascimento *et al.*, 2012).

3.3 Transesterificação Direta

Uma alternativa ao processo convencional de obtenção de biodiesel a partir do óleo extraído das microalgas é a transesterificação direta *in-situ* ou seja, sem extracção do óleo da biomassa microalgal. Considera-se que este processo tem imenso potencial dada a redução das unidades de operação existindo, assim, uma redução tanto nos custos de produção como no conseqüente custo do produto final.

Neste trabalho, o processo de produção de ésteres de ácidos gordos por transesterificação direta, utilizando a biomassa de *Nannochloropsis* sp., foi estudado, avaliando-se a influência da quantidade e do tipo de álcool, da quantidade de catalisador, do tempo, do pré-tratamento, do estado da biomassa e da temperatura de reação.

A escolha do catalisador a utilizar teve por base o valor do índice de acidez determinado para o óleo da microalga em estudo (Tabela 3.3). Assim, a elevada quantidade de ácidos gordos livres presentes no óleo microalgal levou a que se optasse por um catalisador ácido, em vez de um catalisador alcalino, dado que a utilização deste último conduziria a uma reação de saponificação dos ácidos gordos livres. A produção de sabões dificultaria o processo de separação e purificação do biodiesel, para além de uma elevada perda em rendimento mássico.

3.3.1 Efeito da quantidade de metanol

Para o estudo da influência do metanol na conversão do óleo presente na biomassa, realizaram-se ensaios em que se variou a quantidade de álcool presente em reação, mantendo-se fixa a concentração de catalisador (1,8 % v/v em relação ao metanol), tendo-se considerado para a determinação dos ésteres um tempo de reação de 4 horas. Como se pode observar na Figura 3.7, o aumento da quantidade de metanol na mistura reacional conduziu a um aumento do teor de ésteres metílicos, sendo que o valor máximo atingido se encontra próximo do valor correspondente ao rendimento máximo do processo (37,6 %). Estes resultados mostram que a utilização de 3ml de metanol na mistura reacional

permite uma elevada conversão em ésteres. No entanto, os ensaios posteriores foram realizados com 4ml de metanol na mistura reacional para garantir que o equilíbrio estava sempre atingido.

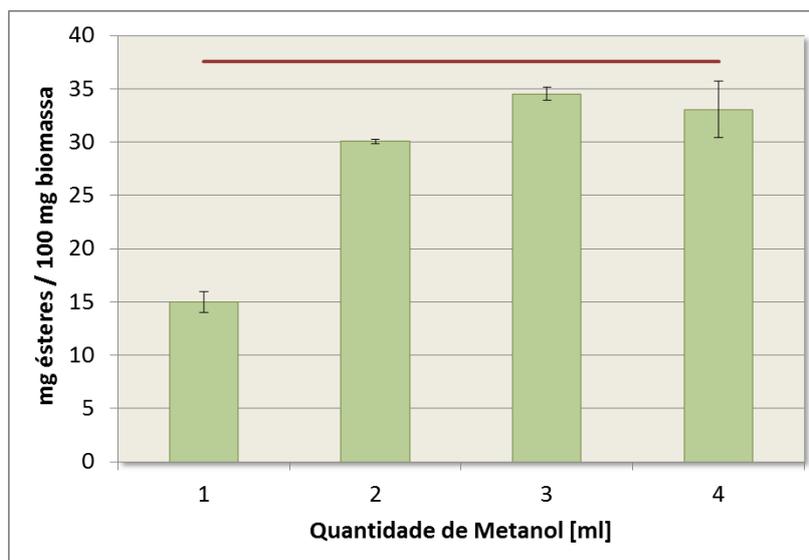


Figura 3.7 - Influência da quantidade de metanol no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4h; 1,8 % v/v H₂SO₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

Este comportamento está de acordo com o obtido por Wahlen *et al.*(2011) em ensaios de transesterificação direta da microalga *Chaetoceros gracilis*, nos quais a partir de 5ml não existe um aumento da conversão em ésteres.

3.3.2 Efeito da quantidade de catalisador

De modo a avaliar a influência do catalisador (H₂SO₄) na esterificação / transesterificação do óleo contido na biomassa microalgal, realizaram-se vários ensaios em que se manteve fixa a quantidade de metanol (4ml) e se variou a quantidade de ácido presente na mistura reacional. Os resultados obtidos (Figura 3.8) mostram haver um aumento da conversão em ésteres com o aumento do ácido presente em reação até 1,2 % v/v (em relação ao metanol), valor a partir do qual o aumento do catalisador não tem influência na conversão em ésteres. Estes resultados estão de acordo com o observado por outros autores Wahlen *et al.*, 2011, onde a variação do catalisador acima de 1,2% v/v também não conduziu a alterações significativas na quantidade de ésteres formada.

Assim, em termos de catalisador ácido, a quantidade mínima necessária para se obter uma elevada percentagem de ésteres a partir do óleo da biomassa microalgal é de 1,2 % v/v (48 µL), tendo sido esta a quantidade escolhida para os estudos posteriores.

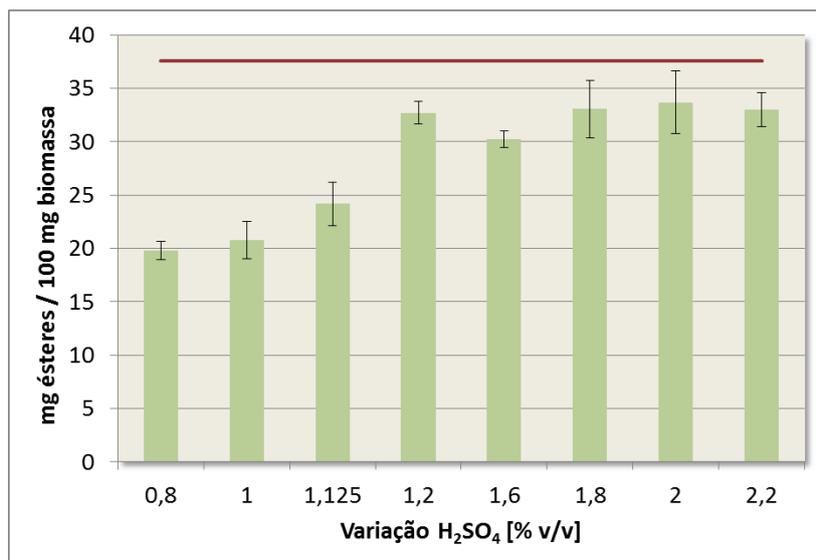


Figura 3.8 - Influência da quantidade de H₂SO₄ no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4h; 4ml de metanol). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

3.3.3 Efeito do tempo de reação

Para avaliar o tempo ao fim do qual se atinja o equilíbrio da reação em estudo, foram realizados ensaios nas condições de quantidade de metanol e de ácido sulfúrico já selecionadas (4ml e 1,2 % v/v, respectivamente). Verificou-se que, ao fim de 6 horas, 95% da fracção saponificável já se encontra convertida em ésteres (Figura 3.9), não justificando prolongar a reação por mais tempo, atendendo às variações existentes e aos gastos associados. Este ensaio foi também seguido por cromatografia em placa (Figura 3.10), podendo-se observar a presença de triglicéridos para as 3h de reação, a qual se desvanece para as 6h e é inexistente ao fim de 16h, tempo ao qual apenas se detecta a presença de ésteres metílicos.

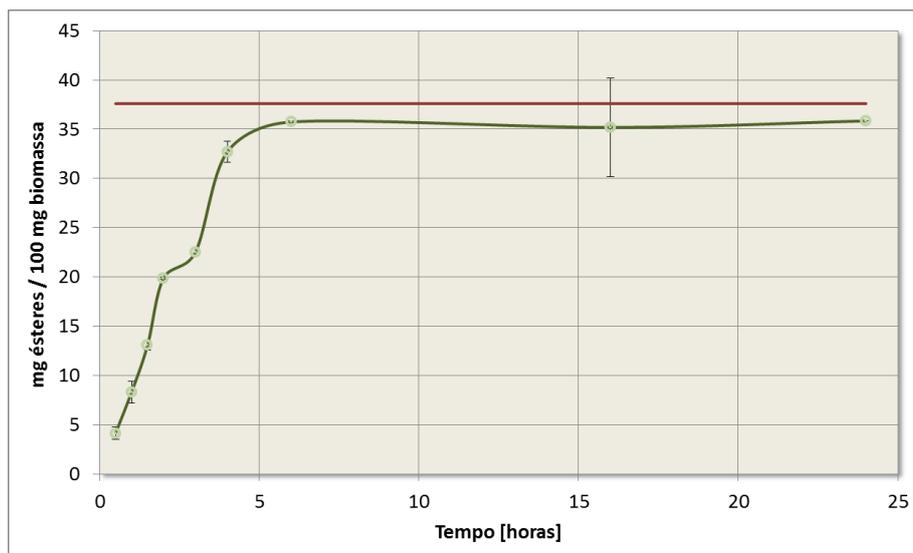


Figura 3.9 - Influência do tempo no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

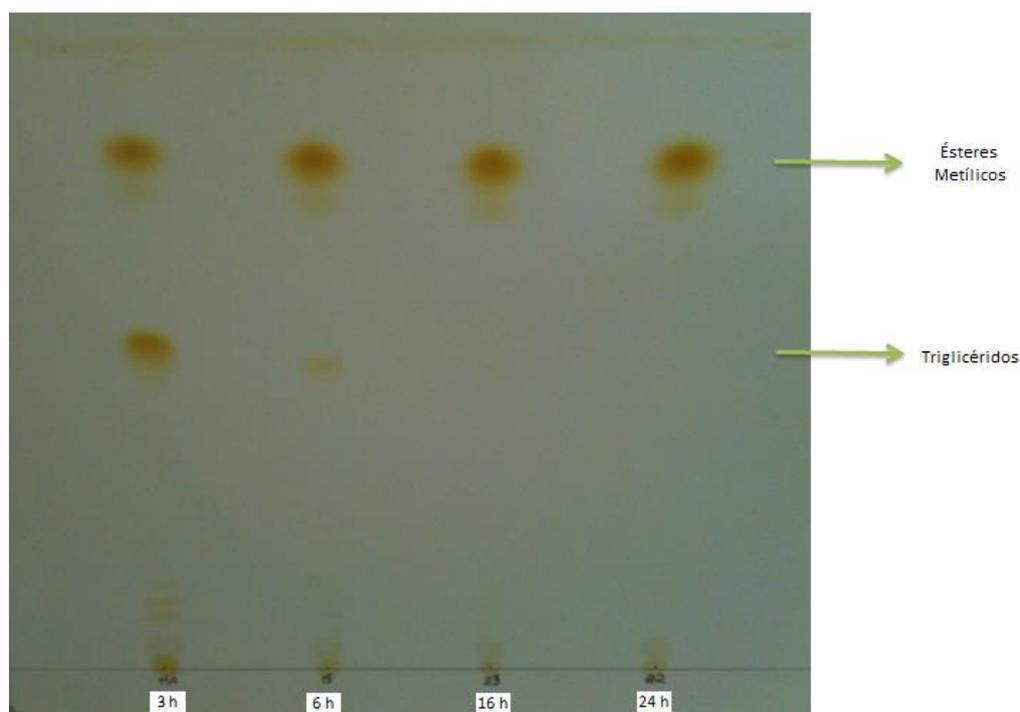


Figura 3.10 - Efeito do tempo de reação na conversão em ésteres, a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. após pré-tratamento no moinho de café e no moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄)

3.3.4 Efeito do pré-tratamento

Todos os ensaios acima descritos tiveram como pré-tratamento da biomassa seca a combinação do moinho de café com o moinho de bolas. A reação foi posteriormente realizada com a biomassa seca sem qualquer pré-tratamento de ruptura celular de modo a se avaliar a necessidade dessa etapa no processo. Como se pode observar na Figura 3.11, a biomassa seca sem pré-tratamento apresenta, ao fim de 24 horas, praticamente o mesmo resultado que a biomassa seca com pré-tratamento. No entanto, a reação de conversão é mais lenta quando não houve ruptura celular, o que é mostrado pelos valores obtidos ao fim de 4h de reação. Esta observação deve-se ao facto de haver mais dificuldade no acesso ao óleo no caso em que a parede celular não foi fragilizada / destruída. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de uma avaliação económica de modo a definir o processo mais viável (tempo vs pré-tratamento) para a conversão dos lípidos presentes na biomassa seca.

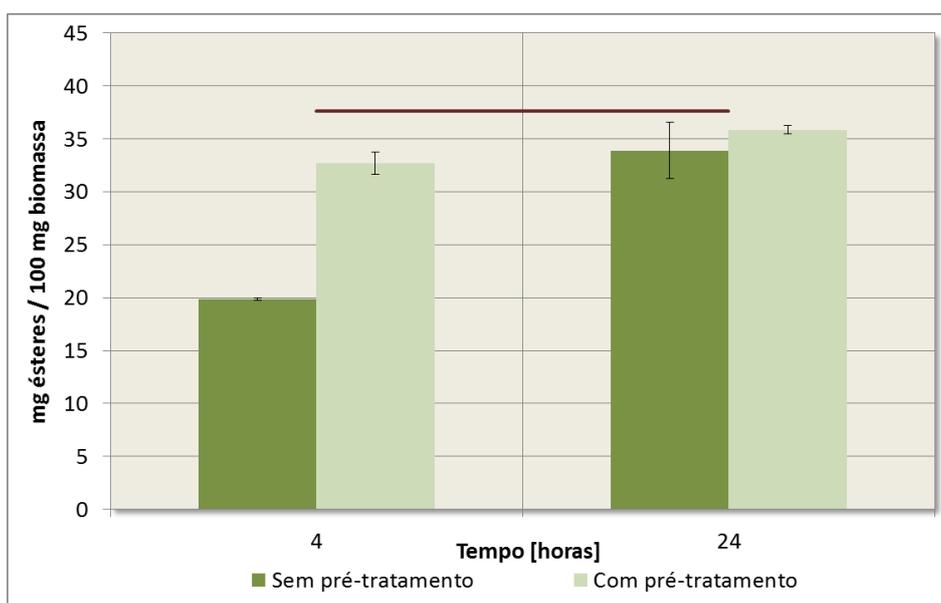


Figura 3.11 – Influência do pré-tratamento de moinho de café e moinho de bolas e da ausência de pré-tratamento em ensaios de 4h e 24h, no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

3.3.5 Efeito do estado da biomassa

Amostras de biomassa seca e liofilizada, sem qualquer tipo de pré-tratamento, foram utilizadas para se estudar a influência do processo de secagem na conversão em ésteres. Os resultados obtidos (Figura 3.12) sugerem que o processo de liofilização promove o enfraquecimento da parede celular facilitando, assim, a ação do metanol e do ácido sulfúrico na extração dos lípidos intracelulares, o que se traduz num aumento da velocidade da reação. Neste caso, o estudo foi também acompanhado por cromatografia em camada fina (Figura 3.13), que confirmou a presença de triglicéridos às 4h de reação, os quais são inexistentes ao fim de 24h, tempo para o qual apenas foi observada a presença de ésteres metílicos.

Verificou-se, ainda, que o processo de pré-tratamento com moinho de café e moinho de bolas promove, como já referido, um aumento na velocidade da reacção de transesterificação observando-se, para as 4h de reação, um valor de teor de ésteres da mesma ordem de grandeza do obtido às 24h na ausência de pré-tratamento.

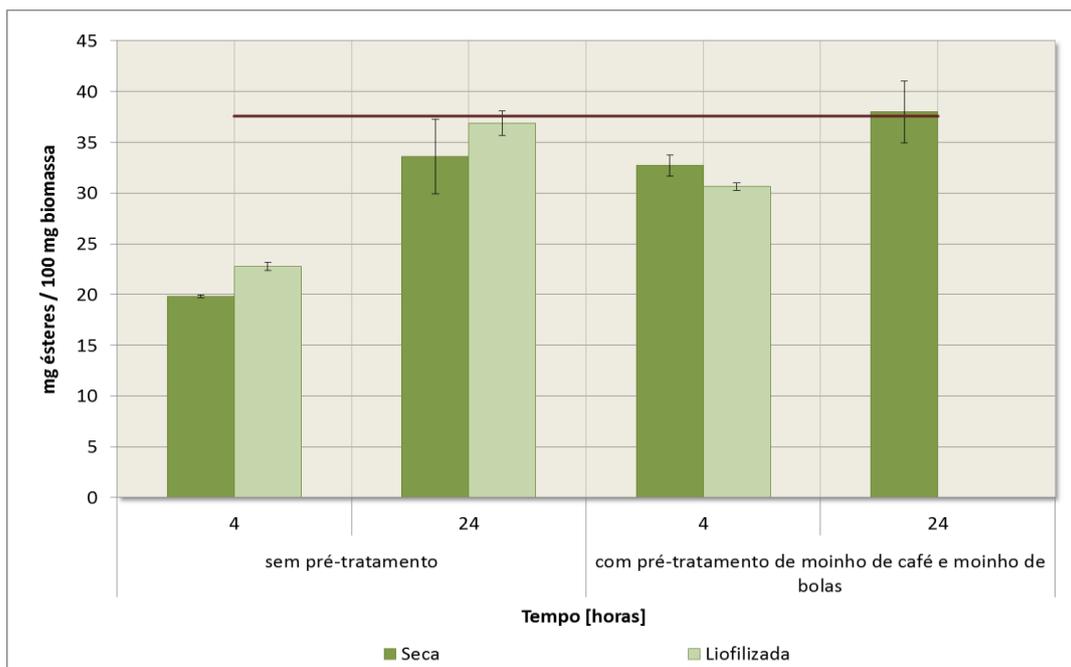


Figura 3.12- Influência do estado da microalga seca e liofilizada sem pré-tratamento e com pré-tratamento de moinho de café e moinho de bolas, em ensaios de 4h e 24h, no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa de *Nannochloropsis* sp. (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

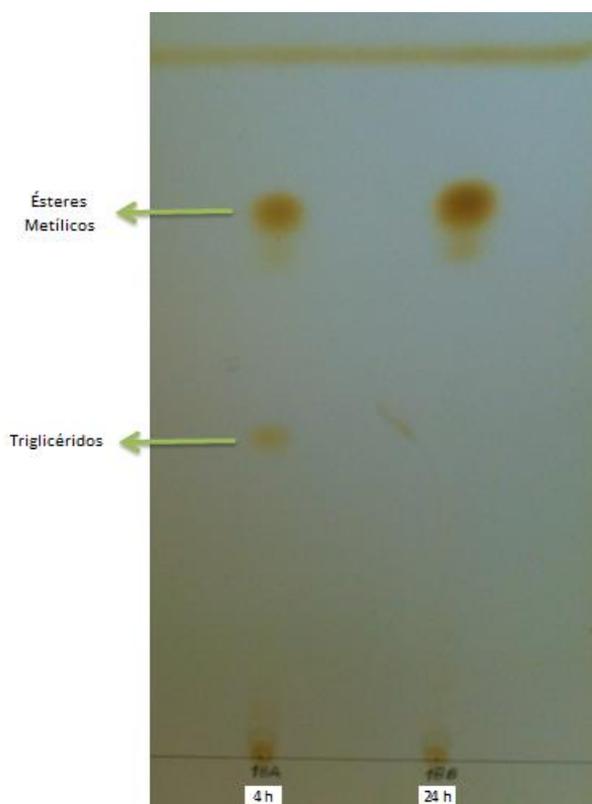


Figura 3.13 - Efeito do tempo de reação na conversão em ésteres, a partir da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. sem qualquer tipo de pré-tratamento (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄)

Para avaliar o efeito da humidade no processo de conversão dos lípidos, foram realizados ensaios com a biomassa microalgal não sujeita a qualquer processo de secagem após o passo de concentração por centrifugação. No entanto, na presença de elevada quantidade de água na biomassa (cerca de 80%), não se observou estratificação das fases (Figura 3.14) na etapa de remoção dos ésteres com o clorofórmio (secção 2.2.5) e, portanto, não foi possível a contabilização dos ésteres formados.



Figura 3.14 - Fase final de separação dos ésteres com clorofórmio no ensaio de esterificação / transesterificação com biomassa húmida.

Johnson *et al.* (2009) verificou que a utilização da biomassa húmida da microalga *Schizochytrium limacinum* não permitia obter rendimentos competitivos (quando comparados com a biomassa seca), sendo sugerido que esta seja seca antes do processo de transesterificação direta. A mesma sugestão é referida por outros autores (Veillette *et al.*, 2012; Halim *et al.*, 2012; Wahlen *et al.*, 2011), após estudos do efeito do teor de humidade da biomassa microalgal na conversão em ésteres. De acordo com Wahlen *et al.* (2011), este problema poderá ser compensado com o aumento do volume de metanol, o que se apresenta vantajoso pela redução dos custos associados à secagem da biomassa.

3.3.6 Efeito da temperatura

A temperatura a que se realiza a etapa de conversão é importante na medida em que contribui para os gastos energéticos do processo global. Dado que todos os ensaios de optimização foram realizados a 50°C, a influência da temperatura foi estudada por variação desta para 40°C. Como se pode observar na Figura 3.15, a reação de esterificação / transesterificação é bastante mais lenta quando a temperatura é mais baixa (40°C), verificando-se para as 4 horas de reação uma variação de cerca de 50% no teor em ésteres. Essa diferença deixa de ser significativa quando o equilíbrio da reação é atingido.

De acordo com a literatura (Ehimen *et al.*, 2010; Wahlen *et al.*, 2011) o aumento de temperatura (inferior à temperatura de ebulição do metanol) diminui o tempo necessário para a obtenção do máximo rendimento. Este fato está também patente nos resultados do presente trabalho (Figura 3.15).

De notar ainda que nos ensaios a 40°C a separação da fase do clorofórmio, contendo os ésteres, foi muito mais difícil devido a uma estratificação muito mais lenta.

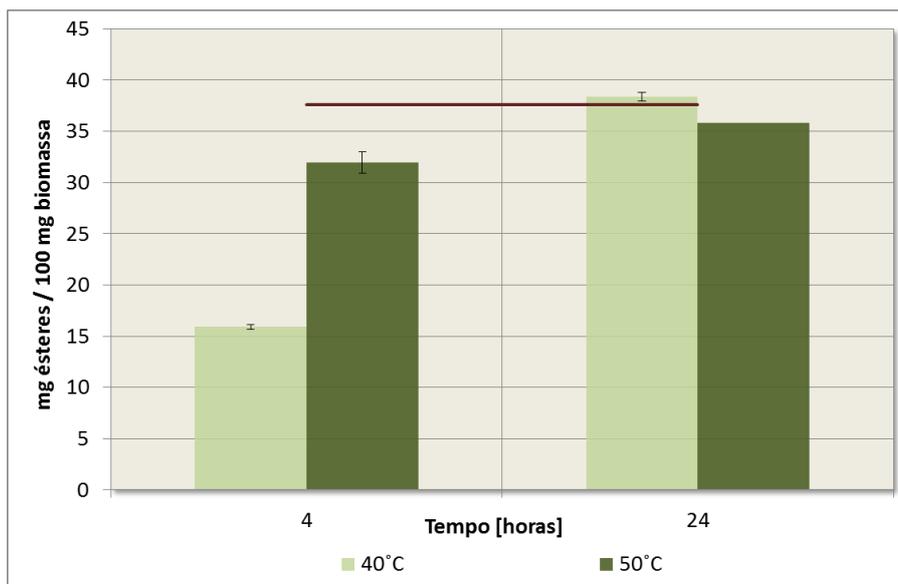


Figura 3.15 - Influência da temperatura em ensaios de 4h e 24h no teor de ésteres metílicos obtidos a partir da biomassa de *Nannochloropsis* sp. (condições: 200rpm; 4ml de metanol; 1,2% v/v de H₂SO₄). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

3.3.7 Efeito do tipo de álcool

Embora o metanol seja o álcool mais utilizado a nível industrial para a produção de biodiesel, dado ser o mais barato, existem muitos estudos que referem a utilização de outros tipos de álcoois, como é o caso do etanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, entre outros, na reação de transesterificação (Wahlen *et al.*, 2011).

No presente estudo testou-se, para além do metanol, a utilização de etanol na conversão da fracção saponificável da biomassa microalgal seca, em estufa, sujeita a pré-tratamento no moinho de café e moinho de bolas. Os resultados mostram que na presença de etanol, para o mesmo tempo de reação, se obtém menos de metade da quantidade de ésteres quando comparado com a reação com o metanol (Tabela 3.3), considerando a presença dos ésteres nos 6 mL de clorofórmio usado como solvente na etapa de separação. No entanto, no ensaio com etanol foi obtido um maior volume da fase do clorofórmio (Figura 3.16) o que se traduz numa sub-contabilização do teor de ésteres etílicos. Esta diferença de volumes pode ser associada à polaridade dos álcoois utilizados, nomeadamente ao carácter anfipático (polar e apolar) do etanol que facilita a solubilização deste no clorofórmio (apolar), e consequente aumento de volume de fase. No caso do metanol esta situação não acontece dado este ser uma molécula polar.

Tabela 3.3 – Efeito do tipo de álcool na transesterificação do óleo da biomassa de *Nannochloropsis* sp. seca em estufa e com pré-tratamento em moinho de café e moinho de bolas (condições: 50°C; 200rpm; 4ml de álcool e 1,2% v/v H₂SO₄)

Álcool	mg ésteres/100 mg de biomassa
Etanol	14,3 ± 0,098
Metanol	32,7 ± 1,039



Figura 3.16 - Volume de fase do clorofórmio, obtida após retirar os 3,5ml necessários para preparação da amostra para cromatografia (13 – reacção com etanol; outros - reacção com metanol)

De qualquer forma, mesmo tendo em conta a diferença de volumes acima referida, o teor de ésteres etílicos obtido por transesterificação do óleo presente na biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. é sempre inferior ao teor de ésteres metílicos contabilizados.

3.4 Transesterificação do óleo

Nas condições estabelecidas como mais adequadas para a reação de esterificação / transesterificação direta da biomassa microalgal (4ml de metanol e 1,2% v/v de catalisador ácido) foi realizada a conversão do óleo extraído pelo hexano na extração Soxhlet (seção 2.2.3.2).

Como se pode observar na Figura 3.17, a partir das 17 horas de ensaio atinge-se praticamente o máximo de conversão, correspondendo a 89,6 % de ésteres metílicos. Tendo em consideração a quantidade da fracção saponificável presente na fracção lipídica (90%), o teor de ésteres obtido é de cerca de 100%. De notar, no entanto, que este processo foi realizado em condições de razão molar metanol:FFA e quantidade de catalisador inferior aos utilizados na transesterificação directa (sem extração do óleo da biomassa) o que terá contribuído para o elevado tempo necessário para que se atingisse o equilíbrio da reação. A realização deste ensaio com uma quantidade inicial de óleo equivalente à presente em 100 mg de biomassa microalgal (38 mg óleo), permitiria a comparação dos dois processos em termos da evolução da conversão ao longo do tempo. Este ensaio, no entanto, não foi possível de realizar devido ao consumo total da biomassa do lote em estudo. No entanto, com o óleo extraído, seria de esperar uma conversão mais rápida (< 6h), devido ao maior contacto deste com o metanol e o catalisador.

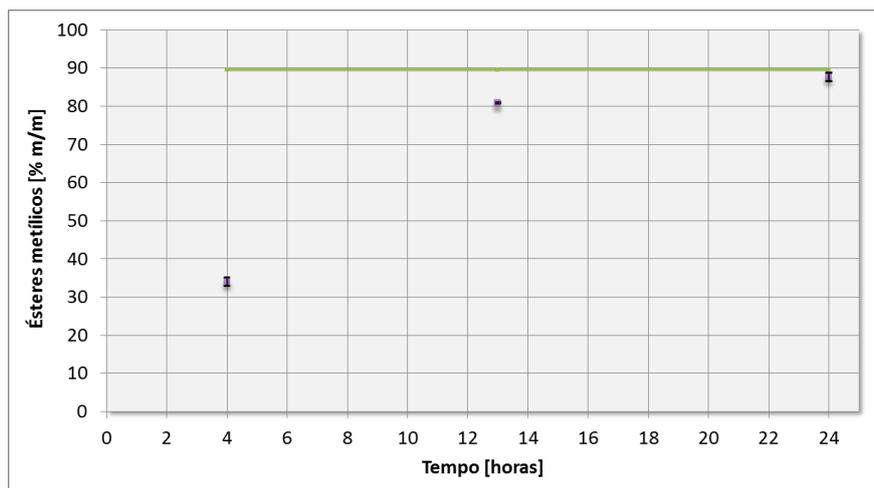


Figura 3.17 – Teor de ésteres metílicos (% m/m) obtidos a partir do óleo extraído, com hexano, da biomassa seca de *Nannochloropsis* sp. (condições: 4ml de metanol; 1,2 % v/v H₂SO₄; 200rpm; 50°C. Quantidade de óleo inicial =100 mg). Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

3.5 Comparação dos processos de transesterificação

De modo a se poder avaliar qual dos processos de esterificação/transesterificação estudados tem maior viabilidade para ser implementado para produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis* sp., há que analisar os custos de operação para cada caso. Estes custos incluem reagentes e electricidade utilizados nas diferentes etapas.

Neste trabalho apenas se fez um levantamento dos reagentes e processos envolvidos na conversão do óleo microalgal em ésteres, não tendo em consideração os associados à cultura, recolha, concentração, secagem e pré-tratamento (ruptura celular) da biomassa dado serem etapas anteriores (e iguais nos dois processos) ao que se está a comparar.

Assim, no caso da transesterificação direta (sem extração do óleo da biomassa microalgal) é necessário ter em conta:

- Para reacção:
 - Catalisador (ácido sulfúrico – H₂SO₄)
 - Álcool (metanol)
 - Clorofórmio
 - Rotavapor (secagem da fase do clorofórmio) (Electricidade)
 - Incubadora (t= 6 h) (Electricidade)

Para a transesterificação do óleo, após extração do óleo da biomassa microalgal, é necessário contabilizar:

- Para a extração:
 - Solvente (Hexano)
 - Extração sob aquecimento (t=6h) (Electricidade)
 - Rotavapor (evaporação do solvente) (Electricidade)

- Secagem (Electricidade)

- Para reação:
 - Catalisador (ácido sulfúrico - H₂SO₄);
 - Álcool (Metanol)
 - Clorofórmio
 - Rotavapor (secagem da fase do clorofórmio) (Electricidade)
 - Incubadora (não determinado, mas expectável ser < 6h)

Parece evidente que a transesterificação direta representa uma alternativa interessante na produção de biodiesel a partir de microalgas, dado o menor número de passos e os bons resultados conseguidos. No entanto, seria conveniente fazer um estudo de análise do ciclo de vida e balanço económico aos dois processos, de modo a avaliar cada um deles e definir qual o economicamente mais viável, uma vez que ambientalmente a transesterificação direta é mais sustentável (menores volumes de solventes e menor gasto energético).

4. Conclusão

Actualmente, a produção de biodiesel a partir de microalgas ainda não é economicamente viável, dado que há passos na sua cadeia de produção, tais como o cultivo, a colheita, a rutura e a extração dos óleos, que são muito dispendiosos, tornando o produto final muito caro, difícil de competir com os combustíveis fósseis.

Neste trabalho estudaram-se diferentes tipos de pré-tratamentos de rutura da parede celular da microalga *Nannochloropsis* sp., assim como as diferentes variáveis na transesterificação direta do óleo presente na biomassa microalgal, de modo a otimizar o processo para o qual se obtém um maior rendimento, ao mais baixo custo de produção.

Na rutura celular verificou-se que, para a *Nannochloropsis* sp., o melhor método foi o pré-tratamento em moinho de café seguido de moinho de bolas, para a biomassa seca em estufa, onde se obteve 42,4g lípidos/100g biomassa.

Em termos de qualidade dos óleos extraído pode-se concluir que estes são independentes do estado em que se encontra a biomassa (seca em estufa, liofilizada ou húmida) e do processo de pré-tratamento utilizado (moinho de café, moinho de bolas, microondas ou autoclave), apresentando todos a mesma composição em ácidos gordos, quando sujeitos às diferentes combinações.

Na transesterificação direta da biomassa microalgal seca conclui-se que:

- O rendimento mais elevado é conseguido para uma quantidade de álcool de 3,16 g (4 mL) de metanol / 100 mg de biomassa seca, conjugado com 1,2% v/v (em relação ao álcool) de ácido sulfúrico. Nestas condições a catálise ácida tem lugar, sendo este processo aconselhado para o tipo de matéria-prima em estudo devido à quantidade de ácidos gordos livres presentes (IA=15,26 mg KOH/g). Em termos de tempo, e para as condições descritas, verificou-se que ao fim de 6 horas de reação, 95% do óleo já está convertido em ésteres.
- Verificou-se ainda que o processo de pré-tratamento mais eficiente foi o do moinho de café seguido de moinho de bolas, promovendo um aumento da velocidade da reação de transesterificação. Na biomassa sujeita a este pré-tratamento de rutura celular observou-se, para as 4h de reação, um valor de teor de ésteres da mesma ordem de grandeza do obtido às 24h, na ausência de pré-tratamento. Desta forma, torna-se necessária uma avaliação económica de modo a permitir definir o processo mais viável.
- Em termos de estado da biomassa, verificou-se que a biomassa liofilizada, quando comparada com a biomassa seca em estufa, apresenta uma maior velocidade de reação, levando a concluir que o processo de liofilização promove o enfraquecimento da parede celular facilitando o acesso do álcool e do catalisador ao óleo presente na biomassa. Foram também feitos ensaios com a biomassa húmida (80%) não tendo, no entanto, sido possível a contabilização dos ésteres, concluindo-se, tal como referido por outros autores, a necessidade de secagem para a realização do ensaio.
- Na avaliação do parâmetro temperatura, foram ensaiadas duas temperaturas diferentes, 40°C e 50°C. Para 4h de ensaio, os 10°C de diferença levaram à obtenção do dobro de ésteres para a temperatura mais elevada. Desta forma, e dado este ser um fator importante para os gastos energéticos do processo global, também se sugere neste caso uma avaliação da viabilidade económica, dado que ao fim de 24h se obtém praticamente a mesma quantidade de ésteres, para as duas temperaturas.

Dos estudos efetuados parece evidente que a transesterificação direta representa uma alternativa interessante na produção de biodiesel a partir de microalgas, dado o menor número de passos e os bons resultados conseguidos, sendo um processo ambientalmente mais sustentável.

O estudo do ciclo de vida de ambos os processos bem como a respetiva avaliação económica deverão constituir trabalho futuro.

5. Bibliografia

Ahmad A. L., Mat Yasin N. H., Derek C. J.C., Lim J.K. (2011) *Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review*, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 15, 584-593. - doi: 10.1016/j.rser.2010.09.018.

Amaro, H. M., Guedes, A. C. e Malcata, F. X. (2011) *Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel*, Applied Energy, 88, 3402-3410, doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014.

Antczak, M. S., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S., (2009) *Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process*, Renewable Energy, 34(5), 1185–1194, doi:10.1016/j.renene.2008.11.013.

Biofuels Barometer- EurObserv'ER – Julho de 2012 – Systemes Solaires - Le journal des energies renouvelable, n° 212, 42-62.

Brennan, L. e Owende, P. (2010) *Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2), 557-577, doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.

Campenni, L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, A. C., Aires-Barros, M. R., Palavra, A. M. F. e Gouveia, L. (2012) *Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga Chlorella protothecoides under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions*, Bioenergy and Biofuels, 97(3), 1383-1393, doi:10.1007/s00253-012-4570-6

Carrero, A., Vicente, G., Rodríguez, R., Linares, M. e del Peso, G. L. (2011) *Hierarchical zeolites as catalyst for biodiesel production from Nannochloropsis microalgal oil*, Catalysis Today, 167, 148-153, doi: 10.1016/j.cattod.2010.11.058.

Carvalho, A. P., Meireles, L. A. e Malcata F. X. (2006) *Microalga Reactors: A review of enclosed system designs and performances*, Biotechnology Progress, 22, 1490-1506, doi:10.1021/bp060065r.

Chen, Y.-H., Huang, B. Y., Chiang, T. H. e Tang, T. C. (2012) *Fuel properties of microalgae (Chlorella protothecoides) oil biodiesel and its blends with petroleum diesel*, Fuel, 94, 270-273 doi:10.1016/j.fuel.2011.11.031.

Chisti, Y., (2007) *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances, 25, 294-306, doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

Chisti, Y., Moo-Young, M. (1986) *Disruption of microbial cells for intracellular products*, Enzyme and Microbial Technology, 8, 194-204.

- Demirbas, A. (2005) *Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods*, Progress in Energy and Combustion Science, 31, 466-487, ISSN 0360-1285, doi:10.1016/j.pecs.2005.09.001.
- Ehimen, E. A., Sun, Z. F. e Carrington, C. G. (2010) *Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids*, Fuel, 89, 677-684, doi: 10.1016/j.fuel.2009.10.011.
- Encinar, J. M., González, J.F., Pardal, A., Martínez, G. (2010) *Transesterification of rapeseed oil with methanol on the presence of various co-solvents*, Third Internacional Symposium on Energy from Biomass and Waste, Venice, Italy; 8-11 November 2010
- Ferreira, A. F., Ribeiro, L. A., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., Nobre, B. P., Palavra, A. M. F., da Silva, P. P., Gouveia, L. (2013) *A Biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga – Energy and CO2 emission and economic analyses*, Bioresource Technology, 138, 235-244, ISSN 0960-8524, doi:10.1016/j.biortech.2013.03.168
- Gerpen, J. V. (2005) *Biodiesel processing and production*, Fuel Processing Technology, 86, 1097-1107, doi:10.1016/j.fuproc.2004.11.005
- Gong, Y. e Jiang, M. (2011) *Biodiesel production with microalgae as a feedstock: from strains to biodiesel*, Biotechnology Letters, 33, 1269-1284, doi:10.1007/s10529-011-0574-z
- Goodall, B., Chandra, P., Kadam, K., Czartoski, T. (2011) *Next Generation algae extraction and fractionation technology*, Algal Biomass Organization; 17 August 2011
- Gouveia, L. e Oliveira, A. C. (2008) *Microalgae as a raw material for biofuels production*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, doi:10.1007/s10295-008-0495-6
- Gouveia, Luisa Microalgae as a Feedstock for Biofuels. - 2011. - ISBN 978-3-642-17996-9 e-ISBN 978-3-642-17997-6. doi: 10.1007/978-3-642-17997-6.
- Griffiths, M. J., Dicks, R. G., Richardson, C. e Harrison, S. T. L. (2011) *Advantages and Challenges of Microalgae as a Source of Oil for Biodiesel*, Biodiesel – Feedstocks and Processing Technologies, 9, 177-200, doi:10.5772/30085.
- Grima, E. M., Belarbi, E.-H., Fernández, F.G. A. Medina, A. R., Chisti, Y., (2003) *Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics*, Biotechnology Advances, 20, 491-515.
- Halim, R., Danquah, M. K. e Webley, P. A. (2012) *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review*, Biotechnology Advances, 30, 709-732, doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- Johnson, M. B. e Wen, Z. (2009) *Production of Biodiesel Fuel from the Microalga Schizothyrium limacinum by Direct Transesterification of Algal Biomass*, Energy Fuels, 23, 5179-5183, doi: 10.1021/ef900704h.

- Leung, D. Y. C., Wu, X. e Leung, M. K. H. (2010) *A review on biodiesel production using catalyzed transesterification*, Applied Energy, 87(4), 1083-1095, doi:10.1016/j.apenergy.2009.10.006.
- Magueijo, V. F., Fernandes, M. C., Matos, H. A., Nunes, C. P., Calau, J. P., Carneiro, J., Oliveira, F. (2010) *Medidas de Eficiência Energética Aplicáveis à Indústria Portuguesa: Um Enquadramento Tecnológico Sucinto*, Plano Nacional de Acção para a Eficiência Energética (PNAEE)
- Marques, A.E., Miranda, J.R., Batista, A.P., Gouveia, L., (2011) *Microalgae Biotechnological Applications: Nutrition, Health and Environment*, Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy, 1-60, ISBN: 978-1-61324-625-2.
- 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, doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Matos, C. T., Santos, M., Nobre, B. P., Gouveia, L. (2013) *Nannochloropsis sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for Biodiesel and Pigment production*, Bioresource Technology, 134, 219-226.
- Mendes-Pinto, M. M., Raposo, M. F. J., Bowen, J., Young, A. J., Morais, R. (2001) *Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of Haematococcus pluvialis: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability*, Journal of Applied Phycology, 13,19-24.
- Milledge, J. J. e Heaven, S. (2011) *Disc Stack Centrifugation Separation and Cell Disruption of Microalgae: A Technical Note*, Environment and Natural Resources Research, 1, 17-24 doi:10.5539/enrr.v1n1p17.
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C. e Gouveia L. (2012) *Pre-treatment optimization of Scenedesmus obliquus microalga for bioethanol production*, Bioresource Technology, 104, 342-348, doi:10.1016/j.biortech.2011.10.059.
- Mittelbach, M., Tritthart, P., Junek, H. (1985) *Diesel fuel derived from vegetable oils, II: emission tests using rape oil methyl ester*, 4, 207-215. - ISSN 0167-5826, doi: 10.1016/0167-5826(85)90017-8.
- Moozami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Egtesadi, R. e Nejad, A. S. (2012) *Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of Nannochloropsis*, Biomass and Bioenergy, 39, 449-453, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.01.046.
- Morrison R. e R. Boyd (1973) *Química Orgânica - Vol. 9*. - Fundação Calouste Gulbenkian.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D. V., Carvalho, G. C. e Nascimento, M. A. (2012) *Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria*, Bioenergy Resources, 6(1), 1-13, doi:10.1007/s12155-012-9222-2.

- Nigam, P. S. e Singh, A. (2011) *Production of liquid biofuels from renewable resources*, Progress in Energy and Combustion Science, 37, 52-68, doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003.
- Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragan, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., Mendes, R. L., Sovová, H., Palavra, A. F., Gouveia, L. (2013) *A biorefinery from Nannochloropsis sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass*, Bioresource Technology, 135, 128-136, doi:10.1016/j.biortech.2012.11.084.
- Parawira, W. (2010) *Biodiesel production from Jatropha curcas: A review*, Scientific Research and Essays, 5(14), 1796-1808, ISSN 1992-2248.
- Patil, P. D., Gude, V. G., Mannarswamy, A, Cooke, P., Nirmalakhandan, N., Lammers, P. e Deng, S. (2012) *Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions*, Fuel, 97, 822-831, doi:10.1016/j.fuel.2012.02.037.
- Ramos, L. P., Kucek, K. T., Domingos, A. K., Wilhelm, H. M. (2003) *Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil*, Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Edição 31 – Julho/Dezembro 2003
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. e Tredici, M. R. (2008) *Microalgae for oil: Strain Selection, Induction of a lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor*, Biotechnology and Bioengineering, 102(1), 100-112, doi: 10.1002/bit.22033.
- Sathish, A. e Sims, R. C. (2012) *Biodiesel from mixed culture algae via a wet Lipid Extraction Procedure*, Bioresource Technology, 118, 643-647, doi:10.1016/j.biortech.2012.05.118
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O. e Hankamer, B. (2008) *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production*, Bioenergy Resources, 1, 20-43, doi:10.1007/s.12155-008-9008-8
- Shibasaki-Kitakawa, N., Honda, H., Kuribayashi, H., Toda, T., Fukumura, T., Yonemoto, T. (2007) *Biodiesel production using anionic ion-exchange resin as heterogeneous catalyst*, Bioresource Technology, 98, 416-421, ISSN 0960-8524, doi:10.1016/j.biortech.2005.12.010.
- Taberner, A., Martín del Valle, E. M. e Galán, M. A. (2012) *Evaluating the industrial potencial of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics*, Biochemical Engineering Journal, 103, 104-115, doi:10.1016/j.bej.2011.11.006.
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M. e Hoadley, A. (2010) *Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels*, Journal of Renewable and Sustainable Energy, 2(1), doi:10.1063/1.3294480.

Veillette, M., Chamoumi, M., Nikiema, J., Faucheux, M. e Heitz, M. (2012) *Production of biodiesel from microalgae*, *Advances in Chemical Engineering*, 10, 245-260, ISBN 978-953-51-0392-9; doi:10.5772/31368.

Vijayaraghavan, K. e Hemanathan, K. (2009) *Biodiesel Production from Freshwater Algae*, *Energy Fuels*, 23, 5448-5453, doi:10.1021/ef9006033.

Wahlen, B. D., Willis, R. M. e Seefeldt, L. C. (2011) *Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures*, *Bioresources Technology*, 102, 2724-2730, doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.026.

Wiyarno, B., Yunus, R. M. e Mel, M. (2011) *Extraction of Algae Oil from Nannochloropsis sp.: A Study of Soxhlet and Ultrasonic-Assisted Extractions*, *Journal of Applied Sciences*, 11 (21), 3607-3612; ISSN 1812-5654, doi: 10.3923/jas.2011.3607.3612.

Normas e Diretivas

Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009

EN 14103 (2003) Fat and oil derivatives — Fatty Acid Methyl Esters (FAME) — Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents

EN 14105 (2011) Fat and oil derivatives - Fatty Acid Methyl Esters (FAME) - Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents

EN 14111 (2003) Fat and oil derivatives - Fatty Acid methyl Esters (FAME) - Determination of iodine value

EN 14214 (2012) Fatty acid methyl ester (FAME) for diesel engine - requirements and test methods

EN ISO 5509 (2001) Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids

EN ISO 660 (2009) Óleos e gorduras animais e vegetais Determinação do índice de acidez e da acidez

NP 903 (1972) Norma Portuguesa : gorduras e óleos comestíveis : determinação do índice de acidez e da acidez

NP EN ISO 3961 (2003) Óleos e gorduras de origem animal e vegetal: determinação do índice de iodo

Sites visitados

DGEG - Direcção Geral de Energia e Geologia. - 5 de Janeiro de 2013 - www.dgeg.pt.

IEA - Internacional Energy Agency - 12 de Janeiro de 2013 - <http://www.iea.org>

U.S. Department of Energy Biodiesel Vehicle Emissions - 18 de Janeiro de 2013 - <http://www.afdc.energy.gov>

Renewable Fuels Association - 15 de Janeiro de 2013 - <http://www.ethanolrfa.org/>

6. Anexos

Tabela 6.1 – Tabela de Reagentes

Nome	PM	Fórmula Química	Pureza	Outras Características	Marca	Utilização
Ácido acético	60,05	C ₂ H ₄ O ₂	99,80%	-	Fluka	II/CP
Ácido bórico	61,83	H ₃ BO ₃	99,80%	-	Riedel-deHäen	MC
Ácido clorídrico	36,46	HCl	0,1 N	Solução padrão	Riedel-deHäen	IA
Ácido Sulfúrico	98,08	H ₂ SO ₄	puro	95-97%	Merck	CA
Amido	166,14	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	-	-	Merck	II
C19:0 Nonadecanoato de metilo	312,53	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Padrão analítico	-	Fluka	GC
Ciclo-Hexano	84,16	C ₆ H ₁₂	-	-	Merck	II
Cloreto de Cobalto hexahidratado	237,93	CoCl ₂ .6H ₂ O	99%	-	Merck	MC
Cloreto de Ferro III hexahidratado	270,3	FeCl ₃ .6H ₂ O	99%	-	Merck	MC
Cloreto de Manganês Tetrahidratado	197,91	MnCl ₂ .4H ₂ O	99%	-	Riedel-deHäen	MC
Cloreto de sódio	58,44	NaCl	99,97%	-	Fisher Scientific	EM
Cloreto de Zinco	136,9	ZnCl ₂	99%	-	Merck	MC
Clorofórmio	134,36	CHCl ₃	p.a.	-	Lab-Scan	CA
Etanol	46,07	C ₂ H ₆ O	p.a.	-	Panreac	IA/CA
Éter de petróleo 60/80 °C		(CH ₃) ₃ COCH ₃	-	-	Merck	CP
Éter dietílico	74,12	C ₄ H ₁₀ O	p.a.	-	AGA	IA/CP
Hidrogenofosfato de potássio	174,2	K ₂ HPO ₄	-	-	Merck	MC
Hidróxido de Potássio	56,11	KOH	puro	86-87,8%	Absolve	IA
Hidróxido de Sódio	40	NaOH	puro	98-98,7%	Absolve	EM
Iodeto de potássio	166	KI	99,50%	-	Panreac	II
Iodo	126,9	I ₂	99,80%		Riedel-deHäen	CP
Iso-octano		C ₈ H ₁₈	p.a.	-	Panreac	EM
Metanol	32,04	CH ₃ OH	p.a.	-	Sigma-Aldrich	CA
n-Heptano	100,21	C ₇ H ₁₆	puro	~ 99%	Merck	GC
n-Hexano	86,18	C ₆ H ₁₄	p.a.	-	Carlo Erba Reagents	Ext
Nitrato de Potássio	101,1	K ₂ HPO ₄	99%	-	Panreac	MC
Reagente de Wijs		-	-	0,2 N	Riedel-deHäen	II
Sulfato de sódio anidro	142,04	NaSO ₄	p.a.	-		EM
Tiosulfato de sódio	248,18	Na ₂ S ₂ O ₃	0,1 N	Solução padrão	Fixanal	II
Trifluoreto de Boro	131,89	BF ₃	13-15%	Solução metanólica	Riedel-deHäen	EM
		Na ₂ EDTA				MC

MC	Meio de Crescimento
EM	Ésteres Metílicos
II	Índice de Iodo
Ext	Extração por Solvente
GC	Cromatografia Gasosa
CA	Catálise Ácida
IA	Índice de Acidez
CP	Cromatografia Preparativa