

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



Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp.: otimização dos processos de pré-tratamento e conversão

Ricardo Jorge Falcão Marques

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

2013

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



Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp.: otimização dos processos de pré-tratamento e conversão

Ricardo Jorge Falcão Marques

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Trabalho realizado sob a supervisão de

Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva (LNEG)

Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino (FCUL)

2013

Agradecimentos

A realização da presente Dissertação de Mestrado só foi possível devido ao apoio e contributo de diversas pessoas ao longo de todo um ano de trabalho pelo que gostaria de deixar aqui umas poucas, mas sentidas, palavras de agradecimento:

à Professora Doutora Ana Cristina Oliveira por ter aceite a realização do meu trabalho conducente à Dissertação de Mestrado na Unidade de Bioenergia do LNEG, pela orientação científica, sempre presente simpatia e por todo o auxílio ao longo do trabalho experimental e de revisão da dissertação. As palavras estão cá todas mas elas são, de facto, insuficientes para lhe dizer o quão grato estou por ter realizado o trabalho sobre a sua supervisão.

à Doutora Luísa Gouveia, por ter aceite supervisionar o trabalho, pela grande ajuda na revisão da dissertação, respectivas sugestões e por ter me chamado sempre à atenção a necessidade de se colocar as ideias de forma simples, objectiva e coerente.

à Doutora Paula Passarinho pela imensa ajuda na realização dos trabalhos experimentais necessários à determinação dos teores de açúcares totais, proteína e minerais.

à Natércia de Sousa e à Graça Conceição por terem evitado que eu cometesse (mais) disparates no laboratório, pela ajuda em geral e pelos cházzinhos e pelas bolachinhas.

ao Diogo Neves, Ana Tropecêlo, Joana Silva, Doutora Ana Paula Batista, Catarina Marques, Diana Simões, Luca Campenni, Carina Fernandes e Cecília Bustos pelas respectivas contribuições em pequenos pontos do trabalho experimental e pelos vários dedos de conversa. A vossa ajuda e companhia, aliadas à natureza do trabalho em si, contribuíram imenso para aquela que foi, de longe, a fase mais interessante do meu percurso académico.

por último e não menos importante, aos meus pais, António Marques e Isabel Falcão, por me terem suportado ao longo de todos estes anos de formação académica e por terem tido, sempre e essencialmente, uma enorme paciência para comigo. Tenho tudo o que preciso para avançar em frente da forma como eu quero e agradeço-vos por isso.

Abstract

In the present study the suitability of microalgae *Scenedesmus obliquus* and *Nannochloropsis* sp. feedstock for biodiesel production was evaluated.

Some pre-treatments for cell rupture of microalgal dry biomass were studied, in particular mechanical (coffee grinder and bead mill), in order to extract the lipid fraction. The results showed that *Nannochloropsis* sp. and *Scenedesmus obliquus* had an approximate lipid content of 35 g/100g ps and 17 g/100g ps, respectively, and that there was no need for a particular pre-treatment for the *Scenedesmus obliquus* while for *Nannochloropsis* sp. it was necessary a relatively aggressive grinding.

The lipid fraction of *Scenedesmus obliquus* had an acid value of 8 mgKOH/g and a fatty acid composition dominated by palmitic acid (23%), oleic (37%) and linoleic (14%). For *Nannochloropsis* sp., the extracted lipids had an acid value of 82 mg KOH/g and the main fatty acids were palmitic acid (33%), palmitoleic (36%) and oleic (20%). In both cases, it was determined that the lipidic fractions had an unsaponifiable matter content above 95%.

The direct transesterification process was also studied for both microalgae and, due to the high acid value, the influence of the volume of methanol, the acid catalyst concentration and reaction time for the *Scenedesmus obliquus* was evaluated in order to produce FAME. The results showed that it is possible to produce approximately 40 g/100g ps and 18g/100g ps fatty acid methyl esters from *Nannochloropsis* sp. and the *Scenedesmus obliquus*, respectively.

In order to evaluate the potential for recovery of residual biomass the total lipids, total sugars, protein and minerals content was determined. The results for the *Scenedesmus obliquus* were 32 g/100g ps, 34 g/100g ps, 18 g/100g ps and 6g/100g ps, respectively, and for the *Nannochloropsis* sp. 51 g/100g ps, 18 g/100g ps, 8 g/100g ps and 7 g/100g ps, respectively.

Keywords: *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis* sp., cell disruption, direct transesterification, biodiesel

Resumo

No presente trabalho avaliou-se a adequabilidade das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp. como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Estudaram-se alguns pré-tratamentos para a rutura celular da biomassa microalgal seca, nomeadamente mecânicos (moinho de café e de bolas), tendo em vista a extracção da fracção lipídica. Os resultados mostraram que a *Nannochloropsis* sp. e a *Scenedesmus obliquus* tinham teores aproximados de 35g/100g ps e 17g/100g ps, respectivamente, não sendo necessário nenhum pré-tratamento em particular para a *Scenedesmus obliquus* enquanto que para a *Nannochloropsis* sp. foi preciso uma moagem relativamente agressiva. A fracção lipídica da *Scenedesmus obliquus* apresentou um índice de acidez de 8 mgKOH/g e uma composição em ácidos gordos dominada pelo ácido palmítico (23%), oleico (37%) e linoleico (14%). Para a *Nannochloropsis* sp., determinou-se um índice de acidez de 82 mgKOH/g e como principais ácidos gordos o ácido palmítico (32,7%), o palmitoleico (36%) e o oleico (20,4%). Em ambos os casos, determinou-se um teor de matéria saponificável superior a 95%.

Estudou-se também o processo de transesterificação directa para as duas microalgas e, face ao elevado índice de acidez, a influência do volume de metanol, da concentração do catalisador ácido e do tempo de reacção para a *Scenedesmus obliquus*, na produção de ésteres metílicos de ácidos gordos.

Os resultados mostraram que é possível produzir ésteres metílicos na ordem de 40 g/100g ps e 18 g/100g ps a partir da *Nannochloropsis* sp. e da *Scenedesmus obliquus*, respectivamente.

De modo a avaliar o potencial de valorização da biomassa residual, determinou-se o teor de lípidos totais, açúcares totais, proteína e minerais. Os resultados para a *Scenedesmus obliquus* foram 32 g/100g ps, 34 g/100g ps, 18 g/100g ps e 6 g/100g ps, respectivamente, e para a *Nannochloropsis* sp. foram 51 g/100g ps, 18 g/100g ps, 8 g/100g ps e 7 g/100g ps, respectivamente.

Palavras-chave: *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis* sp., rutura celular, transesterificação directa, biodiesel.

Lista de abreviaturas

FAME – *Fatty acid methyl ester*

GEE – Gases de efeito de estufa

MTep – Milhões de toneladas equivalentes de petróleo

MeOH - Metanol

Nanno. – *Nannochloropsis* sp.

ps – Peso seco

S. obliquus – *Scenedesmus obliquus*

UE – União Europeia

Índice

Agradecimentos.....	III
Abstract	IV
Keywords:	IV
Resumo.....	V
Palavras-chave:.....	V
Lista de abreviaturas.....	VI
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XII
1. Introdução.....	1
1.1 Modelo actual de consumo de energia: Papel dos biocombustíveis.....	1
1.1.1 Contexto histórico - União Europeia e Portugal.....	2
1.2 Biodiesel.....	5
1.2.1 Transesterificação.....	6
1.2.2 Qualidade do biodiesel	10
1.3 Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel.....	12
1.3.1 Definição	12
1.3.2 Biomassa microalgal	13
1.3.3 Método de produção convencional.....	14
1.3.4 Transesterificação directa.....	19
1.3.5 Valorização da biomassa microalgal após extracção do óleo.....	20
1.4 Microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Nannochloropsis</i> sp.....	20
2. Materiais e métodos.....	22
2.1 Matéria-prima.....	22
2.2 Reagentes	22
As lista dos reagentes utilizados ao longo dos diversos trabalhos pode ser vista na tabela 2.1.	22
2.3 Equipamentos e materiais.....	23

2.4	Caracterização da biomassa microalgal.....	25
2.4.1	Teor de lípidos.....	25
2.4.2	Teores de açúcares totais.....	30
2.4.3	Teor de proteína.....	32
2.4.4	Teor de minerais.....	33
2.5	Caracterização da fracção lipídica.....	35
2.5.1	Índice de acidez.....	35
2.5.2	Perfil e composição em ácidos gordos - transmetilação.....	36
2.6	Produção de biodiesel - Transesterificação directa.....	37
2.7	Métodos cromatográficos.....	38
	Cromatografia em fase gasosa.....	38
2.7.1	38
2.7.2	Cromatografia preparativa.....	40
3.	Discussão de resultados.....	42
3.1	Teor de lípidos.....	42
3.1.1	Influência do pré-tratamento de rutura celular.....	42
3.1.2	Caracterização da fracção lipídica – índice de acidez e composição em ácidos gordos.....	45
3.2	Produção de biodiesel - Transesterificação directa.....	47
3.2.1	Influência do volume de metanol, da concentração de catalizador e do tempo de reacção.....	49
3.3	Caracterização das microalgas em termos de composição.....	53
3.3.1	Lípidos totais.....	53
3.4	Teor de açúcares totais.....	54
3.5	Teor de proteína.....	55
3.6	Teor de minerais.....	57
4.	Conclusão.....	57
5.	Trabalho futuro.....	58
6.	Referências.....	59
	Anexo 1.....	XI

Anexo 2 XIII
Anexo 3 XIV

Índice de figuras

Figura 1.1 -	Consumo energia primária mundial em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (British Petroleum, 2013).	1
Figura 1.2 -	Consumo energia final no sector dos transportes da União Europeia em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Eurostat, 2013).	4
Figura 1.3 -	Consumo biocombustíveis no sector dos transportes da União Europeia em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (EuroObserv'ER, 2013).	4
Figura 1.4 -	Molécula de triglicérido.	6
Figura 1.5 -	Reacções transesterificação glicéridos.	7
Figura 1.6 -	Produção de sabão e água a partir da reacção entre ácidos gordos livres e hidróxido de potássio (Leung <i>et al.</i> , 2010).	8
Figura 1.7 -	Produção de diglicéridos e ácidos gordos livres a partir da reacção de hidrólise de triglicéridos (Leung <i>et al.</i> , 2010).	8
Figura 1.8 -	Reacção de esterificação dos ácidos gordos livres com um álcool na presença de um catalizador ácido (Liu, 1994).	8
Figura 1.9 -	Método de produção de biodiesel convencional (adaptado de Gallagher (2011)).	14
Figura 1.10 -	Cultivo de microalgas em <i>Raceway ponds</i> (Retirado de www.http://algae-energy.co.uk/).	15
Figura 1.11 -	Tipos de fotobioreactores fechados mais utilizados, flat plate (A), em coluna (b) e tubular (C) (Retirado de www.http://algae-energy.co.uk/ , http://www.niot.res.in/ e www.chempuretech.com).	15
Figura 1.12 -	Processos rutura celular (adaptado de Lee <i>et al.</i> , 2012).	17
Figura 2.1 -	Biomassa microalgal seca: <i>Scenedesmus obliquus</i> (esquerda) e <i>Nannochloropsis</i> sp. (direita).	22

Figura 2.2 -	<i>Scenedesmus obliquus</i> após moagem em almofariz (esquerda) e <i>Scenedesmus obliquus</i> após moagem no moinho de café (direita).	26
Figura 2.3 -	Cápsula do moinho de bolas, após a moagem de <i>Scenedesmus obliquus</i> durante 3:50min com 8 bolas de 10mm de diâmetro.	27
Figura 2.4 -	Extracção de lípidos pela técnica de Soxhlet.	28
Figura 2.5 -	Filtração da solução do balão de destilação utilizado na extracção (direita) para o balão destinado à remoção do solvente e consequente determinação do conteúdo em lípidos (esquerda).	29
Figura 2.6 -	<i>Nannochloropsis</i> sp. (esquerda) e <i>Scenedesmus obliquus</i> (direita) após hidrólise ácida simples.	30
Figura 2.7 -	<i>Nannochloropsis</i> sp. antes (esquerda) e após aquecimento na mufla (direita).	34
Figura 3.1 -	Teor de lípidos da <i>Scenedesmus obliquus</i> (■) e da <i>Nannochloropsis</i> sp. (▣) em função dos pré-tratamentos físicos: almofariz (A), moinho de café (MC), moinho de café mais moinho de bolas para 1 esfera de 20 mm (MC+MB1(20MM)), 2 esferas de 15 mm de diâmetro (MC+MB2(15mm)) e 8 esferas de 10 mm (MC+MB3(10mm)) com um tempo de moagem de 3:50min, 25Hz de frequência de vibração e 0,5g de biomassa moída. Os resultados com desvio padrão representam a média de dois ensaios independentes.	44
Figura 3.2 -	Influência do volume de metanol na produção de ésteres metílicos a partir da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> (g/100g ps), após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 3:15h; 1,1% (v/v) H ₂ SO ₄ e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	50
Figura 3.3 -	Influência da concentração de catalizador H ₂ SO ₄ % (v/v) na produção de ésteres metílicos a partir da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> (g/100g ps), após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 3:15h; 2,25 mL de metanol e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	51
Figura 3.4 -	Influência do tempo de reacção no teor de ésteres metílicos obtido a partir da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> , após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 2,25 mL de metanol; 1,1% H ₂ SO ₄ e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	52
Figura 3.5 -	(A) da esquerda para a direita: monooleína, dioleína e trioleína; (B) da esquerda para a direita: amostra de um processo de transesterificação directa e fracção lipídica extraída da biomassa de <i>Scenedesmus obliquus</i> .	53
Figura 3.6 -	Teor de lípidos da <i>Scenedesmus obliquus</i> (■) e da <i>Nannochloropsis</i> sp. (▣) em função dos solventes utilizados no processo de extracção, hexano e etanol. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	54
Figura 3.7 -	Composição (% m/m) da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp. em termos de teores de lípidos totais (extracção com etanol), açúcares totais, proteína e minerais. N.I.-fracção não identificada.	58

Índice de tabelas

Tabela 1.1 -	Catalizadores e valores da razão molar, concentração do catalizador, temperatura e tempo de reacção tipicamente utilizados (Marchetti <i>et al.</i> , 2007).	7
Tabela 1.2 -	Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de catalizadores (Atadashi <i>et al.</i> , 2012).	9
Tabela 1.3 -	Limites legais estabelecidos pela norma EN 14214:2012.	10
Tabela 1.4 -	Teor de lípidos e taxa de produtividade de lípidos de algumas microalgas em função das condições de cultura e dos métodos de determinação do teor de lípidos.	16
Tabela 2.1 -	Lista de reagentes, respectivas purezas e marcas.	23
Tabela 2.2 -	Lista de equipamentos, materiais e respectivas marcas.	24
Tabela 2.3 -	Condições base dos pré-tratamentos utilizados para a rutura da parede celular.	27
Tabela 3.1 -	Teor de lípidos após pré-tratamento da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp. com hidrólise ácida (4N).	43
Tabela 3.2 -	Teor de lípidos da <i>Nannochloropsis</i> sp. em função dos pré-tratamento físicos moinho de café mais moinho de bolas para 8 esferas de 10 mm (MC+MB8(10mm)) com tempos de moagem de 30 minutos e 20 minutos.	45
Tabela 3.3 -	Índice de acidez das fracções lipídicas extraídas, com hexano, da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp.. Os resultados da <i>Scenedesmus obliquus</i> representam a média de dois ensaios independentes.	45
Tabela 3.4 -	Composição em ácidos gordos da fracção lipídica extraída da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp..	46
Tabela 3.5 -	Ésteres metílicos produzidos a partir das microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Nannochloropsis</i> sp. através do processo de transesterificação directa (Condições: 100 mg de biomassa, tempo de reacção de 6h, 4 mL de metanol, 1,2% de ácido sulfúrico, 55°C e 200 rpm). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	48
Tabela 3.6 -	Ésteres metílicos produzidos a partir das microalgas <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Nannochloropsis</i> sp. através do processo de transesterificação directa (Condições: 100 mg de biomassa, tempo de reacção de 24h, 4 mL de metanol, 1,2% de ácido sulfúrico, 55°C e 200 rpm). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	49

Tabela 3.7 -	Teor de açúcares totais da <i>Scenedesmus obliquus</i> em função da hidrólise ácida simples e da hidrólise ácida quantitativa. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.	55
Tabela 3.8 -	Teor de açúcares totais da <i>Nannochloropsis</i> sp. em função da hidrólise ácida simples e da hidrólise ácida quantitativa. O resultado para a hidrólise ácida simples representa a média de dois ensaios independentes.	55
Tabela 3.9 -	Teor de proteína da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp. determinado através do método de Kjeldahl. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.	56
Tabela 3.10 -	Teores de minerais da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp. determinados por análise gravimétrica.	57
Tabela 3.11 -	Teor de minerais da <i>Scenedesmus obliquus</i> e da <i>Nannochloropsis</i> sp. em função dos minerais presentes nas águas de lavagem.	57

1. Introdução

1.1 Modelo actual de consumo de energia: Papel dos biocombustíveis

A procura e o respectivo desenvolvimento de tecnologias capazes de reduzir a actual dependência dos combustíveis fósseis, como matéria-prima para a produção de energia, constitui um dos maiores desafios das sociedades modernas. A utilização de combustíveis fósseis de uma forma tão generalizada foi uma das principais razões para o grande desenvolvimento económico e o respectivo aumento da qualidade de vida nos países industrializados, nos últimos séculos. Tanto a utilização de carvão, como a utilização do petróleo à escala industrial, iniciadas no século 18 e 20, respectivamente, revolucionaram os sistemas económicos ao cimentar a utilização de tecnologias que ajudaram a criar o estilo e a qualidade de vida que se tem hoje em dia.

No entanto, apesar de existirem incertezas relativamente à forma como o petróleo estará disponível como recurso nas próximas décadas, a utilização de petróleo a longo prazo, um pouco à semelhança dos restantes combustíveis fósseis (Mohr, 2011; Rutlege, 2011), não representa uma opção viável (Owen *et al.*, 2010). O petróleo é um recurso finito, extraído maioritariamente em regiões do planeta propensas a instabilidade de natureza política e a sua utilização como matéria-prima está relacionada com diversos problemas ambientais como, por exemplo, a emissão de gases que causam o efeito de estufa (IPCC, 2007).

A acrescentar aos problemas associados à elevada dependência do petróleo, o consumo de energia primária a nível mundial tem vindo a crescer de forma bastante significativa nas últimas décadas (Fig. 1.1) devido, em grande parte, às economias emergentes, como a China.

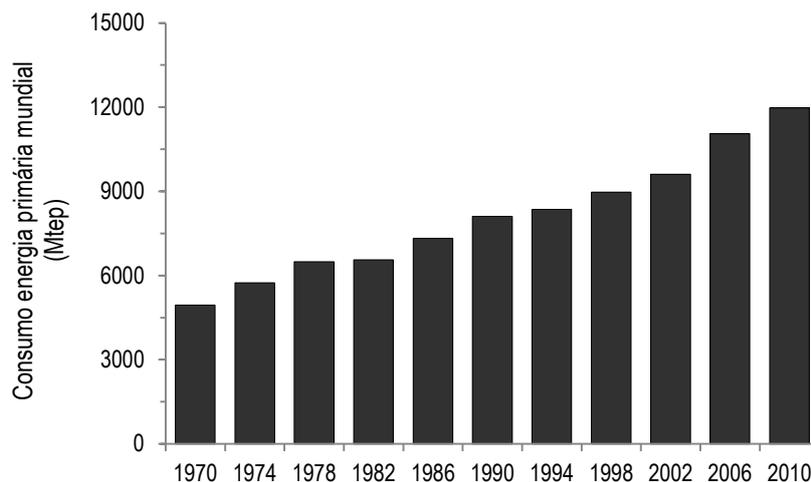


Fig. 1.1 – Consumo energia primária mundial em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (British Petroleum, 2013).

A grande maioria das previsões indica um aumento do consumo nas próximas décadas em função do desenvolvimento das indústrias das economias emergentes e do respectivo aumento de qualidade de vida das populações. Actualmente, estima-se que cerca de 87% da energia consumida no mundo seja proveniente da utilização de combustíveis fósseis, com o petróleo a contribuir para aproximadamente 33% do consumo total (British Petroleum, 2013).

1.1.1 Contexto histórico - União Europeia e Portugal

Em 1997, face ao contexto do sector energético na altura, dominado por legislação regida essencialmente pelos interesses económicos, e à preocupação crescente com as alterações climáticas, a União Europeia (UE) estabeleceu o objectivo de aumentar, de uma forma geral, o consumo de energia a partir de fontes renováveis de 6%, valor do consumo da altura, para 12% do consumo total de energia, até 2010.

Tendo em conta que o sector dos transportes era, e continua a ser, um sector bastante importante no que diz respeito ao consumo de energia, utilização de petróleo e respectivas emissões, em 2003 a UE publicou a directiva 2003/30/EC com vista à implementação de um valor mínimo de 5,75% do consumo total de energia a partir de biocombustíveis e outros combustíveis renováveis em detrimento da gasolina e do gasóleo, até ao final de 2010.

Em 2003, este sector consumiu cerca de 352 milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Mtep), aproximadamente 30% do consumo total de energia final da UE (Eurostat, 2013). A directiva referida, 2003/30/EC, foi transposta para a legislação portuguesa em 2006 (Decreto-Lei nº 62/2006), ano em que teve início a produção de biocombustíveis (biodiesel) em Portugal, criando mecanismos para promover a colocação no mercado de quotas mínimas de biocombustíveis.

Uma vez que o cumprimento dos objectivos estabelecidos para 2010 parecia bastante improvável, devido às prioridades políticas em vigor na altura nos diversos estados membros, em 2007 a UE lançou a primeira política comum para a energia a nível europeu. Os seus objectivos principais consistem em assegurar, até 2020, o aumento do consumo de energia a partir de fontes de energias renováveis para 20% do consumo total, o aumento da eficiência energética com vista à redução de cerca de 20% do consumo total, a redução de emissões de gases que provocam o aumento do efeito de estufa em pelo menos 20%, o consumo de energia por parte do sector dos transportes de pelo menos 10% a partir de biocombustíveis e outros combustíveis renováveis, e a criação do respectivo desenvolvimento de tecnologias capazes de aumentar a sustentabilidade do sector energético e a sua competitividade.

De modo a reforçar esta política comum, em 2009 a UE publicou a directiva 2009/28/EC com o objectivo de, entre outros, estabelecer metas no que dizia respeito à utilização de biocombustíveis e às respectivas emissões de gases com efeito de estufa. A directiva estabeleceu que 10% da energia consumida no sector dos transportes tem que ser proveniente de fontes renováveis, que a produção de biocombustíveis a considerar para essa meta deve ser sustentável, que a implementação de biocombustíveis deve contribuir com uma redução de pelo menos 35% das emissões de gases causadores do efeito de estufa (GEE), em comparação com o combustível fóssil que visam substituir, e que essa redução deve passar a 50% a partir de 1 de Janeiro de 2017.

Entretanto, em Portugal, de 2006 a 2009, foram publicados Decretos-Lei (nº 66/2006, nº 206/2008 e nº 49/2009) com vista à definição das quotas mínimas de incorporação obrigatória de biocombustíveis em gasóleo rodoviário e ao estabelecimento da isenção parcial ou total do imposto sobre produtos petrolíferos nos biocombustíveis. O Decreto-Lei nº 117/2010, de 25 de Outubro, transpôs para a ordem jurídica nacional, nomeadamente, os artigos 17º a 19º e os anexos III e V da directiva Europeia 2009/28/EC.

O último desenvolvimento a nível da comunidade Europeia deu-se em Outubro de 2012, quando a UE lançou uma proposta para uma directiva com o objectivo de limitar a utilização de biocombustíveis provenientes de culturas alimentares a 5% do valor total do consumo de combustíveis.

Neste momento, o sector dos transportes continua a contribuir com cerca de 30% para o consumo total de energia final a nível europeu e sensivelmente 20% das emissões de CO₂, sendo que 96% das necessidades energéticas do sector são satisfeitas através da utilização de petróleo, com os biocombustíveis a representar os restantes 4% (Eurostat, 2013). Nas figuras 1.2 e 1.3 são apresentados, respectivamente, os consumos de energia final e de biocombustíveis, no sector dos transportes da UE a partir de 2002.

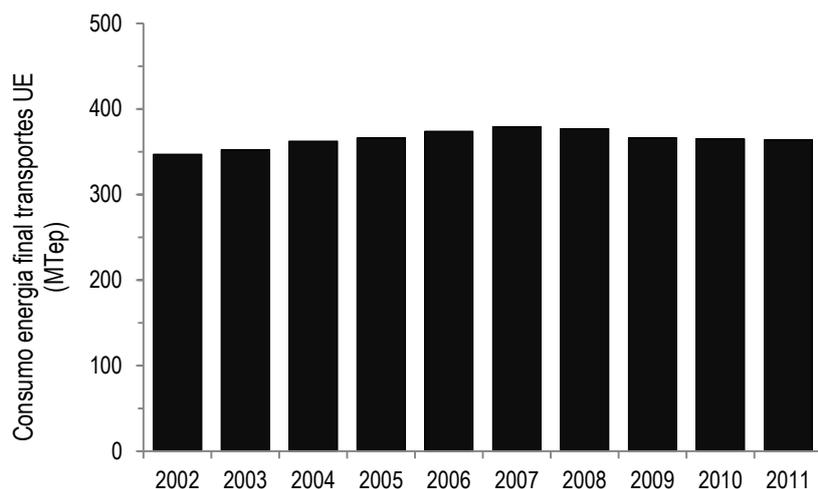


Fig. 1.2 – Consumo energia final no sector dos transportes da União Europeia em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (Eurostat, 2013).

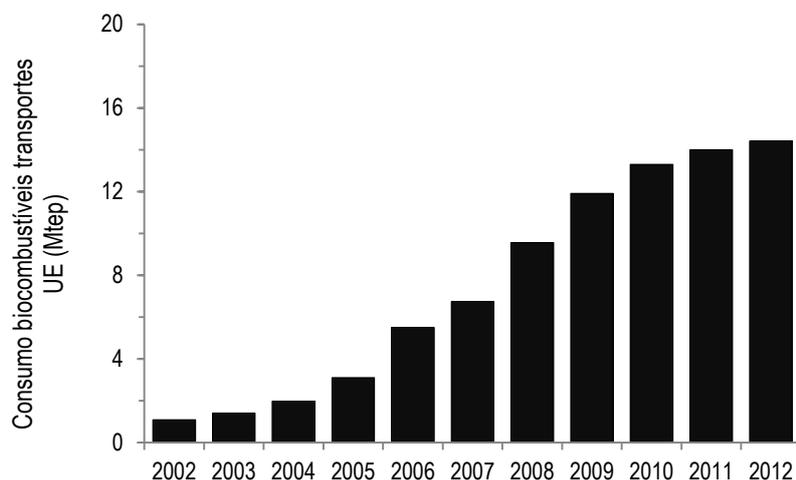


Fig. 1.3 – Consumo biocombustíveis no sector dos transportes da União Europeia em milhões de toneladas equivalentes de petróleo (EuroObserv'ER, 2013).

Como se pode verificar, fruto do contexto legislativo e da iniciativa crescente na área, o consumo de biocombustíveis tem vindo a aumentar, tendo-se verificado de 2003 para 2012 um aumento do consumo de cerca de 10 vezes o consumo inicial. Dos biocombustíveis utilizados na UE, o biodiesel é o que apresenta uma maior expressão, com um consumo estimado em 2012 de 11 Mtep, correspondendo a 79,1% do consumo total de biocombustíveis (EuroObserv'ER, 2013). O respectivo consumo em Portugal foi de 284 mil toneladas equivalentes de petróleo (EuroObserv'ER, 2013).

De uma forma geral, e partindo do princípio de que não se está a utilizar biocombustíveis produzidos apenas a partir de culturas alimentares, as grandes vantagens associadas à produção e utilização de biocombustíveis são: redução da dependência energética, sustentabilidade inerente ao processo,

redução de emissões de GEE através do ciclo neutro de CO₂ e o desenvolvimento económico das regiões envolvidas no desenvolvimento do biocombustível.

1.2 Biodiesel

De acordo com a definição providenciada pela *American Society for Testing and Materials*, o biodiesel é um combustível composto por mono alquil ésteres de ácidos gordos de cadeia longa, produzidos a partir de óleos vegetais ou de gorduras animais (Hoekman *et al.*, 2012). Os ésteres são compostos orgânicos com a fórmula química geral R'COOR, com o grupo funcional COOR, onde R pode representar um grupo alquilo ou arilo (derivados de hidrocarbonetos aromáticos) e R' pode representar hidrogénio ou então um grupo alquilo ou arilo (Chang, 2005).

Por sua vez, os ácidos gordos são compostos constituídos por um grupo carboxílico (-COOH) hidrofílico ligado a uma cadeia de hidrocarboneto hidrofóbica (Nelson e Cox, 2004). Estes compostos são, geralmente, denominados através de nomenclaturas em função do número de átomos de carbono presente na cadeia carbonada, o número de duplas ligações existentes na cadeia e, por vezes, a posição das duplas ligações (Nelson e Cox, 2004). Para além destas nomenclaturas de acordo com a composição química, existem os nomes triviais e os nomes sistemáticos dados pela União Internacional de Química Pura e Aplicada.

A maioria dos ácidos gordos tem entre 12 e 24 átomos de carbono na cadeia e um número par de átomos de carbono (Nelson e Cox, 2004). Os ácidos gordos sem ligações duplas são chamados de ácidos gordos saturados, enquanto que os ácidos gordos com pelo menos uma ligação dupla são chamados de ácidos gordos insaturados (Nelson e Cox, 2004). Os ácidos gordos com pelo menos quatro duplas ligações são apelidados de ácidos gordos poliinsaturados.

O biodiesel pode ser produzido a partir de qualquer matéria-prima que contenha glicéridos, ácidos gordos livres, fosfolípidos e glicolípidos e (MacDougall *et al.*, 2011). No entanto, os glicéridos são os compostos mais utilizados devido ao sua composição em termos dos ácidos gordos e ausência de fósforo e enxofre, elementos esses que interferem no processo de produção e na qualidade do biodiesel (Halim *et al.*, 2012; MacDougall *et al.*, 2011).

Os glicéridos são ésteres constituídos por ácidos gordos e uma molécula de glicerol (1,2,3-propanetriol) designados de acordo com o número de ácidos gordos presentes na sua constituição - tri, di e mono (Halim *et al.*, 2012).

A molécula de triglicérido pode ser vista na figura 1.4.

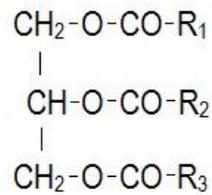


Fig. 1.4 – Molécula de triglicérido.

A polaridade destes lípidos é determinada em função do radical que se encontra ligado aos ácidos gordos. Se esse composto não tiver carga, como é o caso do glicerol, tem-se um glicérido, um lípido neutro. Se o ácido gordo estiver ligado a um radical com carga, como por exemplo um complexo glicerol-fosfato, tem-se um fosfolípido, um lípido polar (Halim *et al.*, 2012).

A razão pela qual não se utilizam os óleos vegetais e as gorduras animais de forma directa num motor de combustão deve-se ao facto destas matérias-primas serem muito viscosas (Ma e Hanna, 1999). No entanto, existem várias formas de reduzir esta viscosidade - misturando os óleos em gasóleo, através de microemulsões com solventes, por pirólise e por transesterificação (Ma e Hanna, 1999).

1.2.1 Transesterificação

O processo mais utilizado actualmente para a produção de biodiesel é o de transesterificação (Leung *et al.*, 2010), nome que se dá à reacção de troca de um grupo alquilo ligado a um oxigénio, um grupo alcóxido, de um éster com o grupo alcóxido (ex: -OCH₃) de um álcool.

Dado que o álcool mais utilizado actualmente no processo de transesterificação é o metanol (MeOH) (Leung *et al.*, 2010), quando se fala em biodiesel, de certa forma, está-se a falar de ésteres metílicos de ácidos gordos, ou *fatty acid methyl esters* (FAME), utilizando a denominação utilizada a nível internacional.

A razão para o metanol ser o álcool mais utilizado deve-se ao simples facto de ser mais barato e de possuir propriedades físicas e químicas superiores aos restantes álcoois (Ma e Hanna, 1999). Os outros álcoois que se podem utilizar incluem o etanol, o propanol, o butanol e o pentanol (Leung *et al.*, 2010).

No caso da transesterificação dos glicéridos, o processo é constituído essencialmente por três reacções químicas reversíveis sequenciais (Fig. 1.5), nas quais os triglicéridos são convertidos em diglicéridos e estes em monoglicéridos, com obtenção de uma mole de FAME em cada uma das reacções (Leung *et al.*, 2010).

Uma vez que estas reacções são reversíveis é necessário adicionar uma quantidade excessiva de álcool, de modo a desviar o equilíbrio da reacção no sentido da produção de FAME.

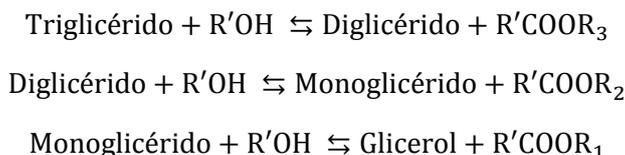


Fig. 1.5 – Reacções transesterificação glicéridos.

A transesterificação geralmente é realizada na presença de um catalizador sendo que este é classificado de acordo com a fase em que se encontra em relação aos reagentes presentes na reacção - homogéneo ou heterogéneo – e com o grupo funcional – ácido ou básico (Chouhan e Sarma, 2011).

Os catalizadores mais utilizados a nível industrial são os catalizadores homogéneos alcalinos hidróxido de potássio e o hidróxido de sódio, devido ao seu baixo custo (Atadashi *et al.*, 2012). As vantagens associadas à utilização destes catalizadores em relação aos catalizadores homogéneos ácidos estão relacionadas com os menores tempos de reacção, o menor consumo de energia e as menores quantidades de álcool utilizadas (Marchetti *et al.*, 2007).

Na tabela 1.1 apresenta-se, com base em dados recolhidos da literatura (Marchetti *et al.*, 2007) os catalizadores mais utilizados e os valores aproximados para os parâmetros mais importantes para a reacção de transesterificação em função do tipo de catalizador homogéneo utilizada nas diversas matérias primas.

Tabela 1.1 – Catalizadores e valores da razão molar, concentração do catalizador, temperatura e tempo de reacção tipicamente utilizados (Marchetti *et al.*, 2007).

Catalizadores e parâmetros	Catalizador homogéneo básico	Catalizador homogéneo ácido
Catalizadores	NaOH, KOH, CH ₃ ONa, CH ₃ OK	H ₂ SO ₄ , HCl
Razão molar	6:1 MeOH:Óleo	30:1 MeOH:Óleo
Catalizador	0,5-1 % m/m	0,5 – 1 % mol
Temperatura	25-120 °C	55-80 °C
Tempo	1-2 h	>24 h

No entanto, a utilização de catalizadores homogéneos alcalinos no processo de transesterificação em amostras com ácidos gordos livres resulta na reacção de saponificação, diminuindo a quantidade de catalisador disponível para a reacção de transesterificação, como se pode ver no exemplo da figura 1.6.

Uma das formas utilizadas para contrabalançar este problema é a simples adição de mais catalizador, de modo a compensar as respectivas perdas (Leung *et al.*, 2010).

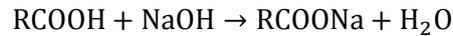


Fig. 1.6 – Produção de sabão e água a partir da reacção entre ácidos gordos livres e hidróxido de potássio (Leung *et al.*, 2010).

Todavia, para amostras com um conteúdo de ácidos gordos livres relativamente elevado este método torna-se ineficaz na medida em que a formação de sabão dificulta de forma significativa a separação entre o biodiesel e o glicerol, resulta na formação de emulsões no processo final de lavagem/purificação do biodiesel (Huang *et al.*, 2010), e conduz a uma elevada perda em rendimento mássico. Os valores máximos recomendados por diversos autores para o índice de acidez do óleo, um indicador do conteúdo em ácidos gordos livres, rondam os 2 mgKOH/g óleo (Lam *et al.*, 2010; Atadashi *et al.*, 2012). O outro problema da catálise básica reside no facto da presença de água no meio de reacção (independentemente do tipo de catálise utilizada) favorecer a hidrólise dos glicéridos com a respectiva produção de ácidos gordos livres (Fig 1.7). Com esta catálise, isto resulta na consequente produção de sabão.

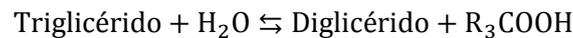


Fig. 1.7 – Produção de diglicéridos e ácidos gordos livres a partir da reacção de hidrólise de triglicéridos (Leung *et al.*, 2010).

De modo a ultrapassar este problema, geralmente faz-se um pré-tratamento às amostras para remover a água. Este pré-tratamento pode ser efectuado através de um simples processo de secagem, utilizando uma estufa por exemplo, ou através da utilização de um reagente sicativo (Liu, 1994).

A principal vantagem da catálise ácida em relação à catálise básica é o facto de não apresentar o problema da produção de sabões, ao esterificar os ácidos gordos livres com o álcool (Fig. 1.8), permitindo o seu aproveitamento para a produção de biodiesel (Liu, 1994). Tal como nas reacções de transesterificação, é necessário adicionar uma quantidade de álcool superior à estequiométrica, de modo a desviar o equilíbrio da reacção no sentido da esterificação.

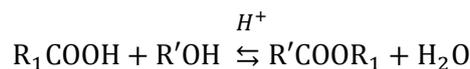


Fig. 1.8 – Reacção de esterificação dos ácidos gordos livres com um álcool na presença de um catalizador ácido (Liu, 1994).

A catálise ácida tem sido, de resto, o método mais utilizado para baixar o conteúdo em ácidos gordos antes de se realizar uma catálise básica. Os outros métodos incluem a destilação a vapor, extracção através de álcool, utilização de iodo como catalizador e a adição de glicerol, a temperaturas relativamente altas e na presença de um catalizador, de modo a esterificar os ácidos gordos (Leung *et al.*, 2010).

Em relação aos catalizadores heterogéneos, a utilização deste tipo de catalizadores, um desenvolvimento relativamente recente, tem sido apontada como capaz de resolver alguns dos problemas associados aos catalizadores homogéneos (Atadashi *et al.*, 2012). Os catalizadores heterogéneos podem ser divididos em enzimas, isto é, biocatalizadores, e, à semelhança dos homogéneos, em catalizadores básicos e ácidos (Chouhan e Sarma, 2011). De uma forma geral, as vantagens e as desvantagens dos diferentes tipos de catalizadores podem ser resumidas da forma como se encontra na tabela 1.2

Tabela 1.2 – Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de catalizadores (Atadashi *et al.*, 2012).

Tipo de catalizador	Vantagens	Desvantagens
Catalizadores homogéneos - Alcalinos	Menos corrosivos Elevadas velocidades de reacção	Produção de sabões Formação de emulsões Consumo de energia e água elevados Produção de águas residuais elevada Custo de purificação elevado Limitado a matérias-primas com baixos conteúdos em ácidos gordos livres Não reciclável
Catalizadores homogéneos - Ácidos	Não produzem sabão Podem ser utilizados para esterificação e transesterificação de forma simultânea	Mais resíduos resultantes da neutralização Dificuldade de reciclagem Custo de purificação elevado Consumo de energia elevado Baixa velocidade de reacção
Catalizadores heterogéneos sólidos - Alcalinos e ácidos	Facilmente recicláveis Menor dificuldade de separação do meio de reacção Glicerol de alta pureza Menos produção de águas residuais Não prejudicial ao ambiente	Efeitos de lixiviação Preparação do catalizador complicada e dispendiosa Tempos de reacção relativamente lentos
Catalizadores heterogéneos - Enzimas	Não produzem sabões Facilmente separáveis do meio Glicerol de alta pureza Não prejudiciais ao ambiente Recuperação simples glicerol	Inibição na presença de água Custos elevados

Para além dos desenvolvimentos na área dos catalizadores, nos últimos anos têm surgido métodos baseados na utilização de micro-ondas e ultra-sons com o propósito de assistir no processo de transesterificação. Estes métodos oferecem vantagens ao nível da eficiência da reacção, consumo de energia, tempo de reacção e impacto ambiental em relação à transesterificação aquecida por métodos convencionais (Lam *et al.*, 2010).

Após a realização do processo de transesterificação, a separação entre os produtos e os restantes reagentes presentes no meio de reacção é feita, geralmente, por centrifugação ou separação *overnight*, obtendo-se duas fases: uma composta por biodiesel e lípidos não transesterificados e outra composta por glicerol, álcool e catalisador. A fase orgânica é depois purificada para remoção de contaminantes (glicerol, álcool, catalisador). Este processo pode ser realizado através de uma lavagem com água, uma lavagem a seco e por extracção utilizando uma membrana (Leung *et al.*, 2010).

1.2.2 Qualidade do biodiesel

A qualidade do biodiesel é fortemente influenciada pela estrutura dos ácidos gordos e do álcool utilizado no processo de transesterificação (Knothe, 2005). Para que um biodiesel possa ser utilizado nos veículos automóveis sem provocar danos na viatura é obrigatória a avaliação da sua qualidade, através da determinação de diversos parâmetros relacionados com a sua composição. A norma europeia EN 14214:2012 especifica os parâmetros a analisar e os limites a cumprir (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 –Limites legais estabelecidos pela norma EN 14214:2012.

Parâmetro	Unidade	Limites legais
Teor de ésteres metílicos	% (m/m)	>96,5
Éster metílico do ácido linolénico	% (m/m)	<12,0
Ésteres metílicos poliinsaturados	% (m/m)	<1
Teor em metanol	% (m/m)	<0,2
Teor em monoglicéridos	% (m/m)	<0,80
Teor em diglicéridos	% (m/m)	0,20
Teor em triglicéridos	% (m/m)	<0,20
Glicerol livre	% (m/m)	<0,02
Glicerol total	% (m/m)	<0,25
Metais grupo I (Na+K)	mg/kg	<5,0
Metais grupo II (Ca+Mg)	mg/kg	<5,0
Índice de iodo	g iodo/100g	<120

Teor de água	mg/kg	<500
Índice de iodo	% (m/m)	<120
Teor de cinzas sulfatadas	% (m/m)	<0,02
Corrosão da lâmina de cobre (3h a 50°C)	-	Classe 1
Resíduo carbonoso (em 10% do resíduo da destilação)	% (m/m)	<0,30
Contaminação total	mg/kg	<24
Teor de cinzas sulfatadas	% (m/m)	<0,02
Ponto de inflamação	°C	>101
Resíduo carbonoso	% (m/m)	<0,3
Estabilidade à oxidação a 110°C	h	>8,0
Índice de cetano	-	>51,0
Índice de acidez	mg KOH/g	<0,50
Viscosidade a 40°C	mm ² /s	3,5-5,0
Massa volúmica a 15°C	kg/m ³	860-900
Teor de Fósforo	mg/kg	<4,0
Teor em enxofre	mg/kg	<10,0
CFPP (Temperatura limite de filtrabilidade)	°C	A definir por cada país

De uma forma resumida, o número de cetano, um indicador da qualidade de ignição, o calor de combustão, o ponto de fusão e a viscosidade dos ácidos gordos aumentam com o tamanho da cadeia de hidrocarboneto e com o grau de saturação, ao passo que as emissões de NO_x diminuem (Knothe, 2005). Já a estabilidade à oxidação encontra-se dependente do número de duplas ligações (quanto mais, pior) e da sua posição (Knothe, 2003). As propriedades de frio, indicadas pelo *cloud point* e *pour point*, pioram com o aumento do grau de saturação dos ácidos gordos (Knothe, 2005). Em relação ao álcool utilizado no processo de transesterificação, quando comparado com metanol, o etanol, por exemplo, melhora as propriedades de lubrificidade enquanto que o isobutanol melhora as propriedades de frio (Knothe, 2005).

Como se pode constatar pela literatura (Leung *et al.*, 2010) existe uma vasta gama de óleos/gorduras que tem sido objecto de estudo tendo em vista a produção de biodiesel. Para além das culturas tradicionais, como a soja, a colza, a palma ou o girassol, outras matérias-primas não alimentares como a *Jatropha curcas*, a mamona ou o cardo, resíduos como as gorduras animais ou os óleos alimentares usados, as microalgas também têm mostrado um elevado potencial como fonte de glicéridos (Chisti, 2007).

1.3 Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel

1.3.1 Definição

O termo alga serve para definir um conjunto bastante heterogêneo de plantas sem folhas, caules, raízes, sem tecido vascular, com clorofila *a* como um dos seus pigmentos fotossintéticos sem uma cobertura estéril de células à volta das células reprodutivas (Lee, 2008). A definição também inclui um outro conjunto de seres vivos procariontes que, em termos evolutivos, se encontra mais próximo das bactérias do que das restantes algas, as cianobactérias (Lee, 2008).

As algas estão praticamente omnipresentes em quase todos os habitats aquáticos (água doce, água salgada ou água salobra) e são fundamentais para a vida na Terra, pois são a base da cadeia alimentar, contribuem com cerca de metade do oxigénio produzido no planeta e consomem uma boa parte do CO₂ presente na atmosfera (Chapman, 2013).

Os critérios principais utilizados para classificar espécies de algas são baseados nos tipos de pigmentos presentes na espécie, na natureza química dos seus produtos, na estrutura do cloroplasto, na estrutura e na composição química da sua parede celular, na estrutura dos seus flagelos e na presença de características especiais, caso existam (Metting Jr, 1996).

De acordo com esse tipo de critérios, as algas podem ser divididas nos seguintes filos (Lee, 2008):

- *Cyanophyta*, também conhecida por cianobactérias
- *Glaucophyta*
- *Rhodophyta* ou alga vermelha
- *Chlorophyta* ou alga verde
- *Euglenophyta*
- *Dinophyta* ou dinoflagelados
- *Cryptophyta* ou alga dourada-castanha
- *Heterokontophyta*
- *Prymnesiophyta*

No que diz respeito às classificações de macroalga e de microalga, a distinção é feita de acordo com a morfologia e o respectivo tamanho da espécie. Geralmente, as microalgas são microorganismos unicelulares enquanto que as macroalgas são compostas por organismos multicelulares (John *et al.*, 2011).

De uma forma geral, as grandes vantagens associadas à utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis em relação a outro tipo de culturas energéticas, como por exemplo a soja para produzir biodiesel e a cana de açúcar para produzir bioetanol, são:

- Possibilidade de cultivar em terrenos não adequados para culturas alimentares (Hu *et al.*, 2008).
- Possibilidade de cultivar em água doce, salgada e salobra (Hu *et al.*, 2008).
- Possibilidade de tratar efluentes (Park *et al.*, 2011).
- Taxas de produção de lípidos por unidade de área superior (Chisti, 2007).
- Taxa de produção de hidratos de carbono por unidade de área superior (Chen *et al.*, 2013).
- Maior capacidade de captura de CO₂ e produção de O₂, fruto das maiores taxas de crescimento e da eficiência fotossintética superior (Shenck *et al.*, 2008).
- Produção não sazonal com a possibilidade de colheita diária (Hu *et al.*, 2008).
- Maior facilidade de manuseamento (Gouveia, 2011).
- Não utilização de herbicidas e pesticidas na cultura (Singh e Ahluwalia, 2013).
- Possibilidade de aproveitar produtos secundários como, por exemplo, proteína e pigmentos (Hu *et al.*, 2008).

1.3.2 Biomassa microalgal

Os propósitos económicos de produção de biomassa microalgal têm-se alterado ao longo das últimas décadas. Após a fase inicial de produção de SCP (single cell protein), com o objectivo de alimentar um mundo carente de alimentos e posterior utilização como suplemento de alimentação humana, a produção de biomassa microalgal começou a ser feita em tendo em vista a obtenção de compostos de química fina, “alimentos dietéticos”, compostos terapêuticos, em aquacultura e recentemente o seu uso como vetor energético. Só em 1978, com o início do programa de investigação "Aquatic Species Program" nos EUA, é que a utilização de microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel começou a ter alguma visibilidade.

Actualmente, impulsionado em parte pelo desenvolvimento na área dos biocombustíveis, as microalgas estão a ser estudadas/produzidas para a diversos fins como “nutracêuticos” ou “alimentos funcionais” (ex: carotenóides, antioxidantes, ácidos gordos polinsaturados, polissacáridos, vitaminas, fitoesteróis, minerais ou outros aditivos alimentares); cosméticos; biomateriais; moléculas bioactivas com aplicações em agricultura, medicina, tratamento de esgotos; biosorção de metais pesados; biofertilização e condicionador de solos para a agricultura, biomassa algal para alimentação animal e humana; algas fixadoras de CO₂ para obviar o problemático efeito de estufa e bioenergia (Gouveia, 2011; Gouveia *et al.*, 2010).

1.3.3 Método de produção convencional

Actualmente, apesar de toda a investigação realizada nas últimas décadas com o objectivo de utilizar algas como matéria-prima para a produção de biodiesel, ainda não existe nenhum método de produção estabelecido à escala industrial para fins comerciais (Lam e Lee, 2012). O processo de produção mais convencional utilizado hoje em dia a nível laboratorial pode ser descrito através da seguinte figura:

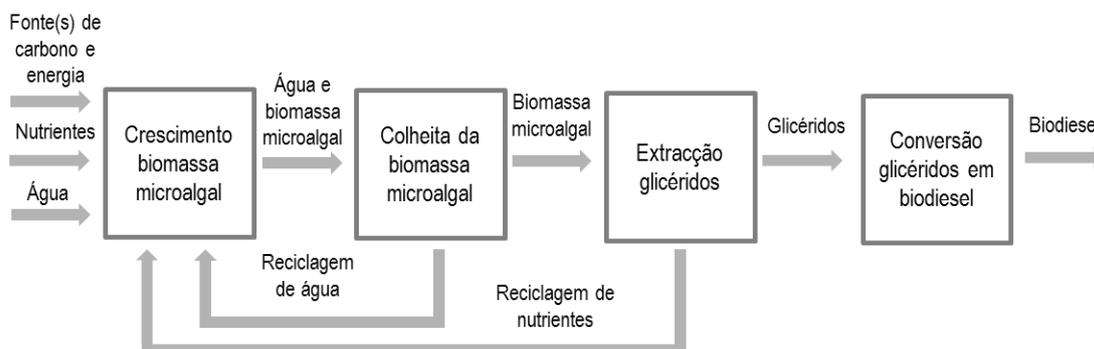


Fig. 1.9 – Método de produção mais convencional (adaptado de Gallagher (2011)).

1.3.3.1 Crescimento da biomassa microalgal

a) Sistemas de cultivo

As microalgas podem ser cultivadas segundo os regimes fototrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico em função da espécie que se pretende cultivar e do respectivo metabolismo (Chen *et al.*, 2011). O cultivo em regime fototrófico utiliza luz como fonte de energia e dióxido de carbono como fonte de carbono, enquanto que o regime heterotrófico dispensa a utilização de luz e utiliza compostos orgânicos como fonte de energia e fonte de carbono (Chen *et al.*, 2011). Tanto o regime mixotrófico como o regime fotoheterotrófico consistem em regimes onde se utiliza luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono (Chen *et al.*, 2011). A diferença entre estes dois regimes reside no facto das espécies fotoheterotróficas necessitarem de luz como fonte de energia para utilizarem os açúcares como fonte de carbono ao passo que as espécies mixotróficas podem alternar entre a utilização de luz e compostos orgânicos como fonte de energia (Chen *et al.*, 2011). O cultivo pode ser realizado essencialmente em dois tipos de sistemas - lagoas fotossintéticas, como por exemplo do tipo *raceway* (Fig.1.8) e fotobioreactores fechados (Fig. 1.9) (Ugwu *et al.*, 2008).



Fig. 1.10 – Cultivo de microalgas em *Raceway ponds* ([www.http://algae-energy.co.uk/](http://algae-energy.co.uk/)).



Fig. 1.11 – Tipos de fotobioreactores fechados mais utilizados, *flat plate* (A) ([www.http://algae-energy.co.uk/](http://algae-energy.co.uk/)), em coluna (B) (<http://www.niot.res.in/>) e tubular (C) (www.chempuretech.com).

Cada um dos sistemas têm vantagens e desvantagens (Ugwu *et al.*, 2008), e devem ser utilizados consoante a finalidade da biomassa que se pretende produzir.

b) Teor de lípidos e taxas de produtividade

Grande parte da investigação realizada nesta área tem sido direccionada para a identificação e caracterização de espécies com elevadas taxas de produtividade em glicéridos e para a avaliação dos factores ambientais que influenciam a sua produção. A produção de lípidos por parte das algas e a respectiva composição em ácidos gordos depende do seu perfil genético e das condições de cultivo (Hu *et al.*, 2008).

De uma forma geral, quando as microalgas são cultivadas num meio ideal para o crescimento, a maioria dos ácidos gordos sintetizados são utilizados para a formação de fosfolípidos e glicolípidos para as estruturas das membranas celulares (Hu *et al.*, 2008).

De modo a potenciar o aumento do teor de glicéridos, a cultura deve ser sujeita a stress nomeadamente nutricional (carência sobretudo de N), luminoso (intensidade e frequência da radiação incidente), de temperatura, de salinidade, de concentração de O₂, de CO₂ e de pH (Chisti, 2007; Hu *et al.*, 2008;

Gouveia e Oliveira, 2009; Gouveia *et al.*, 2009). Os resultados mostram que o teor total de lípidos de uma alga verde sob stress, por exemplo, pode aumentar de cerca de 26%, em média, para 46% do seu peso seco, essencialmente à custa da síntese adicional de glicéridos (Hu *et al.*, 2008).

Porém, apesar do aumento do conteúdo em glicéridos, a imposição de stress sobre a célula muitas das vezes não se traduz numa maior taxa de produtividade de lípidos, uma vez que este aumento é efectuado em detrimento do crescimento e da divisão celular (Halim *et al.*, 2012). Os resultados obtidos por Rodolfi *et al.* (2009) são um bom exemplo deste efeito.

Na tabela 1.4 apresenta-se o teor de lípidos, em termos de peso seco (ps), e a taxa de produtividade de algumas microalgas publicados na literatura em função das diferentes condições de cultura utilizadas e dos métodos de determinação do teor de lípidos.

Tabela 1.4 – Teor de lípidos e taxa de produtividade de lípidos de algumas microalgas em função das condições de cultura e dos métodos de determinação do teor de lípidos.

Microalga	Regime	Teor de lípidos (g/100g ps)	Taxa de produtividade de lípidos (mg/L/dia)	Referência
<i>Nannochloropsis</i> sp. F&M-M26	Fototrófico	29,6	61	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Neochloris oleabundans</i> UTEX #1185	Fototrófico	29,0	26	Gouveia e Oliveira (2009)
<i>Prophyridium cruentum</i>	Fototrófico	9,5	35	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 710	Fototrófico seguido de heterotrófico	49,4	11800	Xiong <i>et al.</i> (2010)
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	Heterotrófico	58,2 – 73,3	740 - 1710	Liang <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 249	Heterotrófico	14,1 – 21,3	120 - 190	Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i> UTEX 249	Mixotrófico	15,9 – 19,7	230 - 270	Heredia-Arroyo <i>et al.</i> (2010)

1.3.3.2 Colheita da biomassa microalgal

Após a fase de cultivo das algas, é necessário colher a biomassa e remover a água, uma vez que a sua presença interfere com os processos tradicionais de extração e de transesterificação (Halim *et al.*, 2012; Leung *et al.*, 2010). Esta é uma das fases com maiores custos envolvidos devido ao facto das algas serem cultivadas num meio aquoso, terem pequenas dimensões, e encontrarem-se em concentrações relativamente baixas (Uduman *et al.*, 2010). As técnicas tradicionais mais usadas na colheita da biomassa têm sido a sedimentação por gravidade, floculação, flotação, filtração e centrifugação (Chen *et al.*, 2011).

1.3.3.3 Extracção lípidos

a) Rutura celular

A quebra da parede celular da alga é bastante importante e nalguns casos, indispensável, para o processo de extração de lípidos visto que a parede celular funciona como uma barreira física entre os lípidos que se pretendem extrair e o solvente, ou mistura de solventes. Apesar das estruturas e das respectivas composições químicas das paredes celulares poderem variar de espécie para espécie, a grande maioria das paredes são compostas por estruturas com três camadas compostas por celulose, ácido urónico, proteína, manose, xilana ou então por estruturas com três camadas compostas por alginato e glicoproteínas (Lee *et al.*, 2012).

Existem essencialmente dois tipos de processos que se podem aplicar à biomassa de forma individual ou em conjunto: processos mecânicos e processos não mecânicos (físicos, químicos e enzimáticos) (Lee *et al.*, 2012). A figura seguinte (Fig. 1.12) apresenta os processos mais utilizados actualmente.

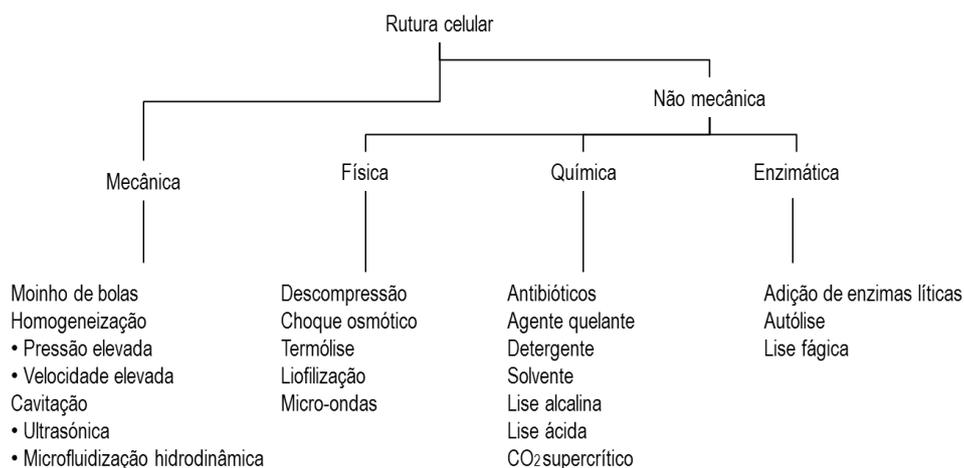


Fig. 1.12 – Processos rutura celular (adaptado de Lee *et al.*, 2012)

Apesar de existirem processos (ex: ultra-sons e a homogeneização a alta pressão) que devem ser efectuados antes do processo de secagem da biomassa (Halim *et al.*, 2012), a rutura celular geralmente é efectuada num pré-tratamento após a secagem da biomassa, ou então em simultâneo com a extracção dos lípidos, dependendo da resistência da parede.

Os processos mais utilizados costumam ser os mecânicos dado que são menos sensíveis à espécie de alga utilizada e não existe risco de contaminação que possa comprometer a qualidade do produto final, ao contrário dos processos químicos e enzimáticos. Há no entanto que ter sempre em conta a economia do processo, o gasto energético e a conservação da qualidade da biomassa final (Lee *et al.*, 2012).

b) Processos de extracção

Um pouco à semelhança das restantes tecnologias envolvidas na produção de biodiesel a partir de algas, actualmente não existe nenhum método de referência no que diz respeito à extracção e respectiva determinação do teor de lípidos (Griffiths *et al.*, 2010).

O processo de extracção tradicional é essencialmente composto por dois passos: extracção dos lípidos da biomassa através da utilização de um solvente e separação entre o solvente e os lípidos extraídos, sendo de extrema importância a selecção do solvente mais adequado para o fim em vista. Para o caso de se querer extrair lípidos neutros, como acontece no caso da produção de biodiesel, deve-se utilizar um solvente com polaridade neutra, como por exemplo, o hexano ou o clorofórmio. Caso o interesse seja extrair lípidos polares, deve-se escolher um solvente polar, como por exemplo o etanol ou o metanol (Halim *et al.*, 2012).

Após o processo de extracção, é necessário realizar a separação da biomassa da solução composta pelos lípidos e pelo solvente, através de filtração, e a remoção do solvente, por destilação, evaporação em vácuo ou adsorção em fase sólida (Halim *et al.*, 2012).

- **Extracção assistida, sub-crítica e supercrítica**

Tal como no caso da transesterificação, nos últimos anos têm surgido métodos baseados em extracção assistida por micro-ondas e ultrasons com o objectivo de acelerar o processo de extracção (Halim *et al.*, 2012). Estes processos combinam o processo de extracção e o de quebra da parede celular num só passo (Halim *et al.*, 2012), evitando-se assim o pré-tratamento de rutura celular acima referido.

Segundo alguns trabalhos (Balasubramanian *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2013), e ao contrário do que acontece no caso dos ultra-sons, quando se utiliza micro-ondas, o perfil dos ácidos gordos extraídos pode ser diferente em relação ao perfil obtido através de processos tradicionais.

Para além dos métodos assistidos, também se tem estudado a utilização de sistemas que utilizam altas temperaturas e pressões, isto é, a extracção subcrítica (Halim *et al.*, 2012) e a extracção supercrítica (Halim *et al.*, 2012; Nobre *et al.*, 2013).

1.3.3.4 Conversão dos lípidos

Após o processo de extracção dos lípidos, dado que a fracção extraída é composta, geralmente, essencialmente por glicéridos, o processo de conversão em biodiesel é em tudo idêntico à forma como se convertem os óleos vegetais e as gorduras animais (secção 1.2).

1.3.4 Transesterificação directa

A transesterificação directa, também conhecida por transesterificação *in situ*, consiste num processo onde se realiza a reacção de transesterificação directamente sobre a biomassa, não sendo necessário proceder ao passo de extracção de lípidos (McNichol *et al.*, 2012).

Este processo apresenta diversas vantagens em relação ao método convencional, na medida em que se tem mais precisão, usa-se menos reagentes, consumo-se menos energia, utiliza-se menos tempo e obtem-se extracções mais completas dos ácidos gordos (McNichol *et al.*, 2012).

Na transesterificação directa da biomassa microalgal, geralmente tem-se utilizado catalizadores ácidos, devido aos conteúdos em ácidos gordos livres relativamente elevados (Ehimen *et al.*, 2010).

No que diz respeito a comparações com o processo de transesterificação tradicional, a conversão directa utiliza, geralmente, quantidades superiores de álcool e de catalisador, e valores de temperatura e tempo de reacção relativamente semelhantes.

Tal como tem acontecido nos processos de extracção e transesterificação utilizados no método tradicional, também se tem estudado a utilização de micro-ondas e ultra-sons como uma forma de melhorar o processo de transesterificação directa. À semelhança das restantes matérias-primas a que estas técnicas têm sido aplicadas (Motasemi e Ani, 2012; Veljković *et al.*, 2012), de uma forma geral, os resultados obtidos até à data indicam que a utilização de micro-ondas permite reduzir o tempo de reacção e a temperatura a que as reacções geralmente são realizadas (Koberg *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2011), e que com a utilização de ultra-sons é possível reduzir os tempos de reacção e as quantidades de álcool necessárias (Koberg *et al.*, 2011; Ehimen *et al.*, 2012).

1.3.5 Valorização da biomassa microalgal após extracção do óleo

Após a extracção da fracção lípida com vista à produção de biodiesel, a biomassa residual ainda tem valor energético e/ou nutricional. Daí a possibilidade do seu aproveitamento para alimentação animal, como fertilizante, condicionador de solos, produção de hidrogénio, biogás e/ou bioetanol.

A produção de biohidrogénio e biogás, após a extracção dos lípidos, também constitui uma mais-valia do ponto de vista de valorização energética desta matéria-prima. O biohidrogénio pode ser obtido através da fermentação no escuro, da biomassa residual e usando bactérias (Ferreira *et al.*, 2012; Nobre *et al.*, 2013; Batista *et al.*, 2014), enquanto o biogás pode ser produzido, a partir da biomassa residual, por digestão anaeróbia (Ehimen *et al.*, 2009; 2011).

A composição em amido e açúcares das microalgas, aliado ao facto das microalgas possuírem pouca hemicelulose e nenhuma lignina (Chen *et al.*, 2013), torna-as atractivas do ponto de vista da produção de etanol por via fermentativa, ao contrário dos materiais lenhocelulósicos (Lam e Lee, 2012).

1.4 Microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp.

As espécies de microalgas do género *Scenedesmus*, pertencentes à classe *Chlorophyceae* do filo *Chlorophyta*, são microalgas bastante comuns em ambientes de água doce, relativamente fáceis de cultivar e, como tal, têm sido bastante utilizadas em diversos estudos de cariz bioquímico e fisiológico (An *et al.*, 1999).

A *Scenedesmus obliquus* (*S. obliquus*), em particular, dada a sua versatilidade, tem sido objecto de estudo de diversos trabalhos ao longo dos últimos anos direccionados para a limpeza de águas residuais (Martínez *et al.*, 2000; Gurbuz *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2009; Hodaifa *et al.*, 2009 e 2010), e na área dos biocombustíveis, nomeadamente de biodiesel (Gouveia e Oliveira, 2009; Mandal e Mallick, 2009; Ho *et al.*, 2010; Balasubramanian *et al.*, 2011; Kaewkannetra *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Gouveia *et al.* 2012; El-Sheekh *et al.*, 2013; Mandal *et al.*, 2013), bioetanol (Miranda *et al.*, 2012a e 2012b; Ho *et al.*, 2012), biogás (Mussnug *et al.*, 2010; Zamalloa *et al.*, 2012) e biohidrogénio (Batista *et al.*, 2014).

Quanto às espécies de microalgas do género *Nannochloropsis*, pertencentes à classe *Eustigmatophyceae* do filo *Heterokontophyta*, os estudos realizados até à data, de uma forma geral, têm sido bastante focados na valorização das elevadas quantidades de triglicéridos presentes nestas microalgas (Giorno *et al.*, 2013).

No caso da *Nannochloropsis* sp. (*Nanno.*), os estudos têm sido essencialmente focados na área da nutrição, tendo em vista o aproveitamento dos ácidos gordos ω -3 (Zittelli *et al.*, 1999; Nitsan *et al.*,

1999), biodiesel (Gouveia e Oliveira, 2009; Rodolfi *et al.*, 2009; Doan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Moazami *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2011; Bondioli *et al.*, 2012; Gouveia *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Moazami *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Olmstead *et al.*, 2013; Wahidin *et al.*, 2013; Gouveia *et al.* (submetido), pigmentos (Lubián *et al.*, 2000) e na integração dos processos de produção de biodiesel ou extracção de pigmentos com o aproveitamento da biomassa residual para a produção de biohidrogénio, através de um conceito de biorefinaria (Nobre *et al.*, 2013).

Para além destes estudos dedicados à área de produção, também existe um artigo publicado na área da análise económica (Ferreira *et al.*, 2013).

O objectivo deste trabalho foi a avaliação da adequabilidade de cada uma das microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel e a avaliação do potencial de valorização da biomassa residual.

2. Materiais e métodos

2.1 Matéria-prima

As microalgas utilizadas nestes estudos, *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp., foram adquiridas através da algoteca da Universidade de Coimbra (Portugal) e da algoteca SERI (EUA), respectivamente.

Embora o crescimento das microalgas não tenha sido objecto de estudo neste trabalho, as composições dos meios de cultura utilizados para a *S. obliquus*, o meio de cultura Bristol, e para a *Nanno.*, um meio de cultura GPM modificado, assim como os equipamentos, encontram-se no anexo 1. De notar que a *S. obliquus* é uma alga de água doce enquanto que a *Nanno.* é de água salgada, razão pela qual neste último caso o meio utilizado era composto por 75% de água do mar filtrada (filtro GF/C com 1,2 µm porosidade) e 25% de água desionizada.

Ambas as microalgas utilizadas no presente estudo foram cultivadas em regime fototrófico e colhidas em fase final de crescimento.

Após a colheita da biomassa e centrifugação, a biomassa húmida foi seca em estufa a 70°C, até peso constante, e armazenada a -18°C, tendo sido esta a matéria-prima utilizada nos diferentes ensaios realizados no decorrer do trabalho (Fig. 2.1).



Fig. 2.1 – Biomassa microalgal seca: *Scenedesmus obliquus* (esquerda) e *Nannochloropsis* sp. (direita).

2.2 Reagentes

As lista dos reagentes utilizados ao longo dos diversos trabalhos pode ser vista na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Lista de reagentes, respectivas purezas e marcas.

Reagente	Pureza	Marca
Ácido acético	99,8 %	Fluka
Ácido clorídrico 37%	min 37 %	Riedel-de Haën
Ácido sulfúrico	95-97 %	Merck
Ácido sulfúrico 2N	95-97 %	Sigma-Sldrich
Cloreto de sódio	99,5 %	Panreac
Clorofórmio	99,0 %	Lab-Scan
Dioléina em piridina	99,9 %	Supelco
Etanol	99,9 %	Carlos Erba
Éter etílico	99,5 %	Absolve
Éter petróleo	99,9 %	Absolve
Fenol	P.a.	Merck
Glucose anidra	99,5 %	Pronalab
Hidróxido de potássio	86 %	Absolve
Hexano	98,5 %	Carlos Erba
Iso-Octano	99,0 %	Panreac
Metanol	99,8 %	Fluka
Monoléina em piridina	99,4 %	Supelco
Sulfato de sódio anidro	99,0 %	Merck
Trioléina	99,9 %	Supelco

2.3 Equipamentos e materiais

As listas dos equipamentos utilizados ao longo dos diversos trabalhos pode ser vista na tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Lista de equipamentos, materiais e respectivas marcas.

Equipamento ou material	Marca e modelo
Aparelho de destilação	Büchi, Distillation Unit K-350
Aparelho de digestão	Büchi, Digestion Unit K-424
Autoclave	Newclave, HL-36AC
Balança de precisão	Mettler Toledo, AB204-S
Banho termostático	P-Selecta, Precistern
Banho termostático	Büchi, Heating Bath B-490
Cartucho celulose	VWR
Cromatógrafo	Dionex, ICS-1000
Cromatógrafo	Varian, 3800
Bomba de vácuo	Büchi, V-500
Centrifugadora	Hitashi-Koki, Himac CT15-E
Controlador bomba de vácuo	Büchi, V-800
Espectrofotômetro	Hitachi, U-200
Estufa	Memmert
Filtro de polipropileno	Pall, Acrodisc GHP
Filtro de celulose	Ederol
Incubadora	Lab-Line, Environ-Shaker
Manta de aquecimento Soxhlet	P-Selecta
Moinho de bolas	Retsch, MM400
Moinho de café	Moulinex
Mufla	Heraeus
Papel indicador pH	Merck
Placa cromatografia	Merck
Purificador de água	Millipore, Elix S Progard 2
Rotavapor	Büchi, R-200

2.4 Caracterização da biomassa microalgal

2.4.1 Teor de lípidos

Antes de se proceder à determinação do teor de lípidos da biomassa microalgal, a biomassa foi sujeita a diferentes tipos de pré-tratamentos de modo a definir o mais eficiente em termos de rutura/enfraquecimento da parede celular.

2.4.1.1 Pré-tratamentos para a rutura da parede celular

À excepção da hidrólise ácida, um processo químico, foram utilizados essencialmente pré-tratamentos mecânicos para quebrar a parede celular das microalgas, com especial ênfase para o moinho de bolas, com o objectivo de estudar a eficácia destes métodos tendo em vista a recuperação dos lípidos presentes no interior das células. Os pré-tratamentos utilizados na biomassa foram: moagem em almofariz, moagem em moinho de café, moagem com um moinho de bolas e hidrólise ácida.

a) Hidrólise ácida

Tendo em conta que este tipo de método é particularmente agressivo, antes de se iniciar o estudo da influência dos pré-tratamentos na rutura da parede celular das microalgas e consequente extracção de lípidos, sujeitou-se a biomassa microalgal a uma hidrólise ácida com o propósito de obter uma extracção total dos lípidos das duas microalgas. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 0,5 g de biomassa, em duplicado, para dentro de um frasco erlenmeyer de 100 mL.
2. Adicionou-se 20 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico 4 N (preparada a partir de uma solução aquosa de ácido clorídrico 37%).
3. Tapou-se o erlenmeyer com um vidro de relógio e aqueceu-se o meio de reacção durante uma hora e meia através da colocação do erlenmeyer sobre uma placa de aquecimento, a aproximadamente 200°C.
4. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, filtrou-se a amostra, com o auxílio de um funil e um filtro (Celulose, Ederol) , para dentro de um erlenmeyer de 500 mL e lavou-se a amostra com água até o valor do pH da água de lavagem, lido através de um papel indicador de pH, ficar neutro (incolor).
5. Deixou-se o filtro, com a biomassa, a secar à temperatura ambiente durante a noite.

b) Almofariz e moinho de café

A moagem das amostras em almofariz não seguiu nenhum procedimento em particular. Uma vez que esta moagem foi realizada simplesmente com o propósito de estudar uma amostra com o menor pré-tratamento possível, moeu-se de forma cuidada cada amostra, com o intuito de racionar a biomassa disponível, até esta apresentar uma granulometria relativamente reduzida e um aspecto relativamente homogêneo (Fig. 2.2).

À semelhança da moagem em almofariz, a moagem em moinho de café foi realizada tendo somente em atenção a granulometria e a quantidade de biomassa disponível. Colocou-se a biomassa no moinho de café, até encher cerca de 1/3 do reservatório, e moeu-se a biomassa durante cerca de 20 seg, até a biomassa apresentar um aspecto relativamente homogêneo e com baixa granulometria (Fig. 2.2).



Fig. 2.2 – *Scenedesmus obliquus* após moagem em almofariz (esquerda) e *Scenedesmus obliquus* após moagem no moinho de café (direita).

c) Moinho de bolas

A moagem através do moinho de bolas foi realizada tendo em consideração os seguintes 5 parâmetros: quantidade de esferas utilizadas, diâmetro das esferas utilizadas, tempo de moagem, quantidade de biomassa utilizada e frequência de vibração do moinho. À exceção da quantidade de biomassa utilizada, cerca de 0,5 g por moagem, e da frequência de vibração, 25 Hz, os valores dos restantes parâmetros foram variando de forma a avaliar as respectivas influências no processo de extração dos lípidos.

As condições base dos pré-tratamentos utilizados e as respectivas designações encontram-se na tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Condições base dos pré-tratamentos utilizados para a rutura da parede celular.

Pré-tratamento	Designação
Somente almofariz	A
Somente moinho de café	MC
Moinho de café e moinho de bolas com 1 esfera de 20 mm de diâmetro	MC + MB 1 (20mm)
Moinho de café e moinho de bolas com 2 esferas de 15 mm de diâmetro	MC + MB 2 (15mm)
Moinho de café e moinho de bolas com 8 esfera de 10 mm de diâmetro	MC + MB 8 (10mm)



Fig. 2.3 – Cápsula do moinho de bolas, após a moagem de *Scenedesmus obliquus* durante 3:50min com 8 bolas de 10 mm de diâmetro.

2.4.1.2 Extracção e quantificação dos lípidos

O procedimento utilizado em todas extracções Soxhlet, salvo os ensaios onde se utilizou a hidrólise ácida como pré-tratamento, foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 0,5 g de amostra moída para dentro do cartucho de extracção.
2. Colocou-se um bocado de algodão dentro do cartucho e dobrou-se as pontas do cartucho de modo a ter a certeza de que não saia biomassa durante o processo de extracção.
3. Transferiu-se, aproximadamente, 160 mL de solvente para dentro do balão de destilação.
4. Colocou-se o cartucho com a biomassa dentro do extractor.
5. Fez-se a montagem do equipamento, composto pelas mantas de aquecimento, balão de destilação, extractor de Soxhlet, condensador e circuito de água, dentro da hotte, como se encontra na figura 2.4.
6. Ligou-se o sistema de ventilação e abriu-se o circuito de água.

7. Ligou-se o sistema de aquecimento e estabeleceu-se a potência adequada.
8. Ao fim de 6 horas de extracção, desligou-se o sistema de aquecimento, seguido do sistema de ventilação e arrefecimento aproximadamente 25 min depois.

No caso dos ensaios onde se realizou a hidrólise ácida como pré-tratamento, colocou-se o filtro seco com a biomassa directamente dentro do cartucho de extracção.



Fig. 2.4 – Extracção de lípidos pela técnica de Soxhlet.

Após o processo de extracção, filtrou-se a solução, composta pelo solvente e os lípidos, do balão de destilação, utilizado no processo de extracção, para um balão de 100 mL previamente tarado (103°C, 45 min), de modo a remover possíveis vestígios de biomassa provenientes do cartucho de extracção (Fig. 2.5).



Fig. 2.5 – Filtração da solução do balão de destilação utilizado na extracção (direita) para o balão destinado à remoção do solvente e consequente determinação do conteúdo em lípidos (esquerda).

Depois deste processo, o balão contendo a mistura filtrada foi colocado no evaporador rotativo a baixa pressão (235 mbar para hexano, 185 mbar para etanol) com um banho termoestático a 40°C e iniciou-se a destilação do solvente.

De seguida, retirou-se o balão do aparelho de destilação e colocou-se na estufa, a 103°C, durante uma hora, de forma a remover os últimos traços de solvente. Após este processo, colocou-se o balão num excicador a arrefecer até à temperatura ambiente e de seguida pesou-se e determinou-se o teor de lípidos através da seguinte expressão:

$$\text{Teor de lípidos (g/100g ps)} = \frac{m_{\text{balão mais lípidos}} - m_{\text{balão}}}{m_{\text{microalga}}} \quad (1)$$

onde $m_{\text{balão e lípidos}}$ representa a massa do balão mais a massa dos lípidos extraídos, $m_{\text{balão}}$ a massa do balão e $m_{\text{microalga}}$ a massa de microalga utilizada no processo de extracção.

2.4.2 Teores de açúcares totais

2.4.2.1 Pré-tratamentos para ruptura celular

À semelhança dos estudos efectuados para a determinação do teor de lípidos, utilizaram-se pré-tratamentos destinados à quebra da parede celular tendo em vista a extracção e quantificação efectiva dos açúcares presentes na microalga. Apesar das diferenças ao nível dos reagentes e dos procedimentos, ambos os pré-tratamentos utilizados foram hidrólise ácida. Estes métodos foram seleccionados em função dos resultados obtidos em trabalhos realizados no LNEG dedicados ao estudo da *Scenedesmus obliquus* como matéria-prima para a produção de bioetanol (Miranda *et al.*, 2012a).

No primeiro pré-tratamento utilizado, designado neste trabalho por hidrólise ácida simples, seguiu-se o seguinte procedimento:

1. Pesou-se 0,5 g de biomassa moída somente no moinho de café para dentro de um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico (2N).
2. Colocou-se uma rolha de algodão, gaze e alumínio em cada uma das amostras, de forma a evitar a entrada de condensado proveniente da autoclave no tubo de ensaio.
3. Colocou-se a amostra na autoclave durante 30 min a 120°C.
4. Agitou-se a amostra em vortex.
5. Filtrou-se a amostra utilizando um filtro com 3 mm de diâmetro e 0.45 µm de porosidade (Acrodisc GHP, Pall).



Fig. 2.6 – *Nannochloropsis* sp. (esquerda) e *Scenedesmus obliquus* (direita) após hidrólise ácida simples.

Relativamente ao segundo pré-tratamento utilizado, designado por hidrólise ácida quantitativa agressiva, um processo amplamente utilizado para degradação de material lenhocelulósico (Hoebler *et al.*, 1989), foi seguido o seguinte procedimento:

1. Pesou-se cerca de 0,5 g de biomassa moída somente no moinho de café para dentro de um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico com uma concentração de 72% (m/m) à amostra.
2. Colocou-se o tubo de ensaio num banho termostático a 30°C durante uma hora.
3. Retirou-se o tubo do banho e transferiu-se o conteúdo para um frasco rolhado de 250 mL.
4. Adicionou-se 139 mL de água *Millipore*, para uma concentração de ácido sulfúrico de 4% (m/m).
5. Agitou-se a amostra.
6. Fechou-se o frasco e levou-se à autoclave durante uma hora a 120°C.
7. Retirou-se uma amostra do frasco e filtrou-se com o auxílio de um filtro com 3mm de diâmetro e 0.45 µm de porosidade (Acrodisc GHP, Pall).

2.4.2.2 Determinação colorimétrica dos açúcares totais

A determinação colorimétrica do teor de açúcares totais da biomassa microalgal foi baseada no método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Neste método, a amostra é atacada com ácido sulfúrico, que provoca a hidrólise dos polissacáridos em monossacáridos, os quais reagem com o fenol levando ao aparecimento de uma cor alaranjada na solução. Deste modo, é possível fazer a quantificação do açúcar presente na amostra por meio indireto, por comparação com uma recta de calibração determinada em função de diferentes soluções com concentrações de glucose conhecidas através de análise espectrofotométrica.

O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Preparou-se uma solução aquosa de fenol com uma relação 5% (peso/volume), isto é, diluiu-se 5 g de fenol em 100 mL de água *Millipore*.
2. Preparou-se uma solução padrão de açúcar com uma concentração de 0,1 g/L.
3. Fizeram-se seis diluições a partir da solução padrão de açúcar preparada no ponto 2, com concentrações entre 0,01 g/L e 0,08 g/L, de forma a construir a recta de calibração.
4. Diluíram-se, em água *Millipore*, as amostras pré-tratadas, de modo a obter valores para a concentração de açúcares semelhantes aos valores utilizados na recta de calibração.
5. Transferiu-se 1 mL de cada solução padrão e de cada amostra para um tubo de ensaio.
6. Adicionou-se 1 mL da solução de fenol.

7. Adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e agitou-se no vortex de forma a homogeneizar.
8. Deixou-se a reacção a ocorrer durante 10min, à temperatura ambiente, e depois colocaram-se os tubos de ensaio dentro de um banho de água fria de modo a arrefecer.
9. Fez-se a leitura da absorvância de cada uma das amostras num espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 490 nm, contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água *Millipore*.

Em cada um destas análises, fez-se sempre o processo em duplicado.

2.4.3 Teor de proteína

O teor de proteína foi determinado através do método de Kjeldahl. Este método permite a determinação do azoto total, em amostras com matéria orgânica, de uma forma relativamente exacta e precisa. Uma vez que as proteínas têm azoto na sua constituição, utilizou-se este método de modo a quantificar, de forma indirecta, o conteúdo total de proteína. O método utilizado pode ser dividido nas seguintes fases: digestão (produção iões de amónio a partir do azoto presente nas amostras), destilação (transferência dos iões de amónio para um recipiente com uma solução mista de indicadores através da produção de amónia) e análise volumétrica dos iões de amónio presentes na solução mista de indicadores. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se 200 mg de amostra para dentro de um barquinho de pesagem.
2. Transferiu-se a amostra para dentro de um tubo de digestão com água *Millipore*.
3. Adicionou-se 50 mL de reagente de digestão, uma solução composta por ácido sulfúrico, óxido de mercúrio e sulfato de potássio (Anexo 3) e iniciou-se o processo de digestão. Para além das amostras, fez-se um ensaio em branco.
4. Deixou-se decorrer o processo de digestão durante cerca de quatro horas, até a amostra adquirir uma cor amarelo palha.
5. Após este processo, adicionou-se cerca de 100 mL de água *Millipore* e 5 gotas de fenolftéina a cada uma das amostras e iniciou-se o processo de destilação.
6. Colocaram-se as amostras digeridas na unidade de destilação e adicionou-se aproximadamente 50 mL de um reagente, composto por hidróxido de sódio e tiosulfato de sódio (Anexo 3), de modo a neutralizar a acidez do ácido sulfúrico ainda presente na amostra.
7. A seguir a este passo, iniciou-se o processo de destilação para dentro de um erlenmeyer com 50 mL de ácido bórico com uma solução mista de indicadores (Anexo 3).

8. Para finalizar, titulou-se esta solução com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,02 N (Anexo 3).

A determinação do conteúdo em proteína da amostra foi realizada através da utilização das seguintes expressões:

$$\text{Azoto (g/100g ps)} = \frac{(V_a - V_b) \times N_{\text{tit}} \times 0,014}{m_{\text{microalga}}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Proteína (g/100g ps)} = \text{Azoto} \times \text{FCAP} \quad (3)$$

onde V_A e V_B representam, respectivamente, o volume de titulante necessário para titular a amostra e o o branco, N_{tit} a concentração da solução aquosa de ácido sulfúrico titulante, $m_{\text{microalga}}$ a massa de microalga utilizada e FCAP, o factor de conversão do conteúdo em azoto em conteúdo de proteína. O valor utilizado para o FCAP foi 6,25 g/g azoto total.

2.4.4 Teor de minerais

2.4.4.1 Análise gravimétrica

O teor de cinzas ou minerais consiste na quantidade de massa da amostra que não é volatilizada a uma temperatura de 550 °C. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 0,5 g de amostra, em duplicado, para dentro de um cadinho previamente tarados a 550°C.
2. Colocaram-se as amostras na mufla e ligou-se a 550°C
3. Esperou-se que a temperatura chega-se ao valor referido e deixou-se as amostras durante uma hora dentro da mufla.
4. Desligou-se a mufla, deixou-se arrefecer as amostras e de seguida tiraram-se os cadinhos para dentro de um excicador.
5. Após arrefecimento à temperatura ambiente, pesaram-se os cadinhos contendo os minerais.



Fig. 2.7 – *Nannochloropsis* sp. antes (esquerda) e após aquecimento na mufla (direita).

A expressão utilizada para determinar o teor de minerais foi o seguinte:

$$\text{Minerais (g/100g ps)} = \frac{m_{\text{cadinho mais minerais}} - m_{\text{cadinhos}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde m_{biomassa} representa a massa inicial de biomassa, m_{cadinho} a massa do cadinho e $m_{\text{cadinho mais minerais}}$ a massa do cadinho mais a massa dos minerais após a passagem pela mufla.

2.4.4.2 Análise da água de lavagem

Para além da análise quantitativa, após o aquecimento da biomassa em mufla, realizou-se ainda uma análise cromatográfica dos aniões cloreto, nitrato, fosfato e sulfato presentes na água de lavagem das microalgas. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 50 mg de cada uma das biomassas, em duplicado, para dentro de um gobelé de 50 mL e adicionou-se 10mL de água *Millipore*.
2. Colocou-se uma barra magnética dentro do gobelé deixou-se a agitar a solução durante 15min.
3. Centrifugou-se as amostras.
4. Transferiram-se as amostras centrifugadas, menos a parte da biomassa concentrada, para dentro de um tubo de ensaio e filtrou-se o resto da biomassa com um filtro com 3mm de diâmetro e 0.45 μ m de porosidade (Acrodisc GHP, Pall).
5. Diluíram-se as amostras em água numa razão de 1:3.
6. Injectou-se a amostra no cromatógrafo.

A determinação de cloreto, nitrato, fosfato e sulfato foi realizada num cromatógrafo Dionex ICS – 1000, equipado com supressor ASRS – ULTRA II, pré-coluna AG14 A 4 x 50 mm, coluna IONPAC AS14 A, 4 x 250 mm e detetor de condutividade, e com um volume de injeção fixo de 25 µL. O eluente usado consistiu numa solução de carbonato de sódio 8 mM com bicarbonato de sódio 1 mM, previamente filtrada por filtros de polipropileno hidrofílico de 47 mm de diâmetro e 0,2 mm de poro (Pall Sciences) e desgaseificada por ultra-sons (P-Selecta ULTRASONS-H) durante 15 min. A análise das amostras realizou-se com um fluxo de eluente de 1 mL.min⁻¹.

Foram preparadas soluções de calibração para cada um dos compostos a analisar, usadas como padrões externos, na gama de 0,5 e 30 mg.L⁻¹.

2.5 Caracterização da fracção lipídica

2.5.1 Índice de acidez

O índice de acidez de um óleo é um bom indicador da quantidade de ácidos gordos livres presentes no óleo. A determinação foi feita segundo a norma NP EN ISO 660:2002, e baseia-se numa titulação ácido-base. O procedimento utilizado foi realizado da seguinte forma:

1. Preparou-se uma solução etanólica de hidróxido de potássio 0,1 N, dissolvendo 70 mg de KOH em 100 mL de etanol.
2. Preparou-se uma outra solução, uma mistura dissolvente, constituída por volumes iguais de etanol e éter etílico, neutralizada com a solução etanólica de hidróxido de potássio, na presença de 2 gotas de fenolftaleína.
3. Pesou-se cerca de 200 mg de óleo, em duplicado, para frascos ernlenmeyer.
4. Adicionou-se, com proveta, 50 mL da mistura dissolvente e 5 gotas de fenolftaleína às amostras.
5. Agitaram-se as soluções de forma a homogeneizar.
6. Titularam-se as soluções com a solução etanólica de hidróxido de potássio.
7. Titulou-se 5 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 N com a solução etanólica de hidróxido de potássio, para aferir a solução titulante.

A determinação do índice de acidez foi feita através da seguinte expressão:

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g)} = \frac{V_{\text{tit}} \times N_{\text{KOH}} \times 56,11}{m_{\text{óleo}}} \quad (5)$$

Onde V_{tit} representa o volume de solução etanólica de hidróxido de potássio titulante, N_{KOH} a respectiva normalidade da solução e $m_{\text{óleo}}$ a massa do óleo.

A normalidade da solução etanólica foi determinada a partir da seguinte equação:

$$N_{\text{KOH}} = \frac{V_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}}}{V_{\text{KOH}}} \quad (6)$$

Onde V_{HCl} representa o volume de solução aquosa de ácido clorídrico utilizado na titulação (5 mL), N_{HCl} a normalidade da solução de ácido clorídrico (0,1 N) e V_{KOH} o volume de solução etanólica de hidróxido de potássio necessária para titular.

2.5.2 Perfil e composição em ácidos gordos - transmetilação

Para a avaliação por cromatografia em fase gasosa, do perfil e composição em ácidos gordos de uma amostra de óleo, é necessário converter os glicéridos e os ácidos gordos livres presentes na amostra em ésteres metílicos. O método utilizado para transterificar os lípidos extraídos das microalgas foi realizado de acordo com a norma europeia EN ISO 5509:2000. Esta norma tem como princípio a adição de uma solução metanólica de hidróxido de sódio com vista à saponificação dos glicéridos e ácidos gordos livres, seguida de adição de uma solução metanólica de trifluoreto de boro com vista à esterificação dos sabões com consequente formação de ésteres metílicos. O procedimento foi realizado da seguinte forma:

1. Adicionou-se 4 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio 0,5 M ao balão contendo os lípidos extraídos da biomassa (secção 2.3.1.2) e agitou-se de forma ligeira de modo a diluir os lípidos na solução metanólica.
2. Deixou-se em repouso, durante 45min, de forma a efectuar-se uma melhor diluição.
3. Transferiu-se a solução para um outro balão (adequado à montagem de refluxo utilizada).
4. Colocou-se 5 reguladores de ebulição.
5. Ligou-se o balão à parte inferior de um condensador e colocou-se o balão em contacto com um banho termostático a 80°C.
6. Deixou-se a solução a 80°C durante aproximadamente 10min, agitando de forma leve a solução até não se verem gotas de matéria gorda.
7. Adicionou-se, através do condensador, 5 mL de solução metanólica de trifluoreto de boro (15%) e prosseguiu-se a ebulição durante 3 minutos.
8. Adicionou-se, através do condensador, 3 mL de iso-octano.

9. Retirou-se o balão do banho e adicionou-se 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio através do condensador, criando duas fases.
10. Agitou-se levemente e de seguida adicionou-se mais 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio para um total de 20 mL.
11. Tapou-se a solução e agitou-se fortemente a solução durante pelo menos 15 segundos.
12. Adicionou-se mais solução saturada de cloreto de sódio até a solução ficar ao nível do pescoço do balão, de modo a facilitar a remoção da fase superior.
13. Transferiu-se a maior quantidade possível da camada superior, composta por iso-octano e ésteres metílicos, através do auxílio de uma micropipeta, para um frasco passando por uma pipeta de pasteur com algodão e sulfato de sódio anidro, com o propósito de eliminar vestígios de água.

A amostra foi armazenada a 5°C para posterior análise cromatográfica (secção 2.7)

Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

2.6 Produção de biodiesel - Transesterificação directa

O procedimento utilizado na transesterificação directa foi adaptado do procedimento utilizado por Whalen *et al.* (2011). Uma vez que este método já tinha sido realizado com sucesso no LNEG (Gouveia *et al.*, submit), decidiu-se seguir este método para este trabalho. O procedimento utilizado em todos os ensaios experimentais foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 100 mg de alga, em duplicado, para um frasco de 20 mL.
2. Adicionou-se o volume de catalizador, ácido sulfúrico, seguido de metanol, nas quantidades pretendidas.
3. Fechou-se o frasco com uma tampa de alumínio com um septo de borracha, com o auxílio de um encapsulador.
4. Colocou-se o frasco numa incubadora durante o período de tempo pretendido, a uma temperatura de 55°C e a uma velocidade de agitação de 200 rpm.
5. Retirou-se o frasco da incubadora e adicionou-se 5 mL de água à solução anterior de modo a parar a reacção.
6. Adicionou-se 2 mL de clorofórmio à solução e colocou-se uma tampa sobre o frasco.
7. Agitou-se o frasco, de modo a permitir a homogeneização das duas fases e a transferência dos ésteres metílicos para a fase orgânica, e depois deixou-se em repouso.
8. Após a separação bem delineada das duas fases, transferiu-se a fase inferior, a fase orgânica, com o auxílio de uma micropipeta, para um frasco passando por uma pipeta de pasteur, com

algodão e sulfato de sódio anidro no seu interior, de modo a filtrar possíveis restos de biomassa e a remover vestígios de água.

9. Depois de transferir a quantidade máxima/possível de fase orgânica, repetiu-se os passos de 6 a 8 mais duas vezes, para um total de 6 mL de clorofórmio utilizado na recolha dos ésteres metílicos.
10. De seguida, transferiu-se um volume conhecido da fase orgânica recolhida, tipicamente 3,5 mL, para um outro frasco e evaporou-se o clorofórmio presente na solução através da utilização de um banho termostático a 80°C, dentro de uma hotte.
11. Depois de evaporar o clorofórmio, passou-se na amostra um jacto de azoto de modo a evaporar possíveis vestígios de solvente.
12. Guardou-se a amostra para posterior análise por cromatografia em fase gasosa (secção 2.7).

2.7 Métodos cromatográficos

2.7.1 Cromatografia em fase gasosa

O teor de ésteres metílicos, para além de outros parâmetros, determina a qualidade de um biodiesel, sendo que a norma Europeia EN 14214:2012 define os limites exigidos e os métodos de ensaio para os diversos parâmetros. O método utilizado para determinar este conteúdo está definido na norma EN 14103:2003.

Para determinação do perfil e composição em ácidos gordos da fracção lipídica da biomassa microalgal (secção 2.4.1), analisaram-se as amostras obtidas após conversão do óleo em ésteres metílicos (secção 2.5.2) de acordo com seguinte procedimento:

1. Pesou-se 15mg de padrão interno (ácido nonadecanóico), para um tubo rolhado.
2. Adicionou-se 1,5 mL da amostra obtida após o processo de transesterificação, diluída em iso-octano.
3. Utilizou-se o vortex para homogeneizar a amostra.
4. Utilizou-se o injector automático do cromatógrafo para injectar 1µL da amostra

A identificação do conteúdo em ésteres metílicos foi feita em função dos respectivos tempos de retenção.

Após a análise cromatográfica, nas condições acima descritas, determinou-se a percentagem mássica de cada um dos picos identificados no cromatograma, pela seguinte equação:

$$\text{Éster metílico \% (m/m)} = \frac{A_i}{\sum A - A_{PI}} \times 100 \quad (7)$$

Onde $\sum A$ representa a área total dos picos dos ésteres metílicos, A_{PI} a área do pico correspondente ao padrão interno e A_i a área do pico cuja percentagem se pretende calcular.

O teor de matéria saponificável, sob a forma de ésteres metílicos, no óleo microalgal determinou-se da seguinte forma:

$$\text{Éster metílico (g/100g óleo)} = \frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} \times m_{PI} \times \frac{V_{iso}}{V_{A1}} \times 100 \quad (8)$$

Onde m_{PI} representa a massa do padrão interno, V_{ISO} o volume total de iso-octano utilizado no processo de separação e recolha dos ésteres metílicos (3 mL), V_{A1} o volume retirado da solução composta por iso-octano e ésteres metílicos obtida após o processo de separação de fases e $m_{óleo}$, a massa de óleo utilizada no processo de transesterificação.

Para a análise cromatográfica dos ésteres metílicos produzidos a partir do processo de transesterificação directa (secção 2.5), o procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Adicionou-se 1,5 mL de uma solução de heptano com padrão interno (ácido nonadecanóico) com uma concentração de 10mg/mL ao frasco da amostra.
2. Agitou-se a solução no vortex.
3. Transferiu-se uma pequena amostra desta nova solução para um vial.
4. Utilizou-se o injector automático do cromatógrafo para injectar 1 μ L da amostra.

A expressão utilizada para determinar a quantidade de ésteres metílicos que se conseguem produzir a partir da biomassa foi a seguinte:

$$\text{Éster metílico (g/100g ps)} = \frac{\frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} \times m_{PI} \times \frac{V_{Clo}}{V_{A2}}}{m_{microalga}} \times 100 \quad (9)$$

Onde m_{PI} representa a massa do padrão interno, V_{Clo} o volume de clorofórmio utilizado no recolha dos ésteres metílicos (6 mL), V_{A2} o volume da solução composta por clorofórmio e ésteres metílicos recolhido após o processo de transesterificação e $m_{microalga}$, a massa de microalga utilizada no processo de extracção.

As análises cromatográfica foram efectuadas num cromatógrafo Varian 3800, de fase gasosa, equipado com um injetor automático, um detetor de ionização à chama (FID) e uma coluna capilar (Supelcowax 10, com 30 m de comprimento, um diâmetro interno de 0,32 mm, e 0,25 μ m de espessura de filme). As condições de análise foram:

-Temperatura da coluna - 200°C

-Temperatura do injetor - 250°C

-Temperatura do detetor - 250°C

2.7.2 Cromatografia preparativa

De forma a realizar a análise qualitativa da fracção lipídica extraída e da fase orgânica obtida após transesterificação directa, realizou-se uma cromatografia em placa. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Começou-se por colocar um eluente, constituído por éter de petróleo (60-80°C) (85 mL), éter etílico (15 mL) e ácido acético (1 mL), numa tina de vidro e deixou-se a saturar durante aproximadamente 2 horas.
2. Delimitaram-se, na placa de cromatografia (Merck), os locais de colocação das diversas amostras e colocou-se, com o auxílio de uma micropipeta, as amostras e cada uma das soluções padrão, compostas por triglicéridos, diglicéridos e monoglicéridos, nos respectivos lugares.
3. Passou-se um jacto de azoto sobre a placa até a placa ficar relativamente seca e colocou-se dentro da tina.
4. Esperou-se sensivelmente uma hora para que o eluente arrastasse as soluções padrão e as amostras ao longo da placa.

5. Retirou-se a placa da tina e, depois de evaporado o solvente nela presente, colocou-se numa tina saturada com iodo para revelação.

3. Discussão de resultados

3.1 Teor de lípidos

O teor de lípidos foi determinado através da quantificação gravimétrica dos lípidos extraídos com hexano numa extracção Soxhlet (secção 2.4.1.2), após a biomassa ter sido sujeita a diferentes pré-tratamentos para rutura da parede celular (secção 2.4.1.1).

3.1.1 Influência do pré-tratamento de rutura celular

a) Pré-tratamento químico

Os trabalhos realizados até à data com a *S. obliquus* mostraram que a parede celular da microalga era constituída por uma multicamada com posta por uma camada interior constituída por celulose, envolta numa matriz hemicelulósica, e uma camada exterior, composta por três sub-camadas com esporopolenina (Shelef e Soeder, 1978), o que a torna particularmente resistente (Wiltshire *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2012a).

Antes de se iniciar o estudo da influência dos pré-tratamentos mecânicos (almofariz, moinho de café e moinho de bolas) na rutura da parede celular da microalga e consequente extracção de lípidos, sujeitou-se a biomassa microalgal a um pré-tratamento químico, com ácido clorídrico (secção 2.4.1.1). Dado que este método é particularmente agressivo, este ensaio foi realizado com o propósito de obter uma extracção total dos lípidos.

Embora os resultados referidos na literatura (Nobre *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, submetido) não indicassem que este pré-tratamento fosse necessário para extrair de forma efectiva os lípidos presentes na biomassa da microalga *Nanno.*, também se realizou uma extracção após este pré-tratamento com o mesmo objectivo.

Os resultados obtidos (Tabela 3.1) mostram que o teor de lípidos neutros da *Nanno.* é superior ao da *S. obliquus*. Apesar do pré-tratamento utilizado ter sido diferente dos que se encontram indicados na literatura, o que pode ter influenciado a quantidade de lípidos extraídos, o valor determinado para a *S. obliquus* é semelhante ao que se encontra referido por Gouveia e Oliveira (2009) e Gouveia *et al.* (2012) ao passo que no caso da *Nanno.* o teor de lípidos determinado é superior ao determinado por Gouveia e Oliveira (2009) e inferior ao determinado por Nobre *et al.* (2013), Matos *et al.* (2013) e Gouveia *et al.* (submetido), teores esses à volta de 40 g/100g ps.

Os resultados apresentados por estes estudos são particularmente relevantes para a presente discussão visto que os trabalhos foram desenvolvidos no mesmo laboratório utilizando as mesmas microalgas, os mesmos bioreactores, meios de cultivo idênticos e as mesmas metodologias no processo de extracção e quantificação dos lípidos.

No que diz respeito a outros resultados publicados na literatura para a *S. obliquus* (Mandal e Mallick, 2009; Ho *et al.*, 2010; Kaewkannetra *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2013) e para a *Nanno.* (Li *et al.*, 2011; Moazami *et al.*, 2012; Bondioli *et al.*, 2012; Olmstead *et al.*, 2013), os teores de lípidos determinados no presente trabalho encontram-se dentro dos intervalos de teores indicados, ou seja, entre 8-40 g/100g ps e entre 12-70 g/100g ps, para a *S. obliquus* e a *Nanno.*, respectivamente.

Tabela 3.1 – Teor de lípidos após pré-tratamento da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp. com hidrólise ácida (4N).

Microalga	Teor de lípidos (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	17,5
<i>Nannochloropsis</i> sp.	34,1

b) Pré-tratamentos mecânicos

Estudou-se a influência do pré-tratamento no moinho de café (MC) e no moinho de bolas (MB), neste último caso com prévia moagem no moinho de café para homogeneização da amostra. Os ensaios de extracção foram realizados, em duplicado, para a biomassa moída em almofariz (A), o equivalente ao menor pré-tratamento necessário para homogeneização da amostra, para a biomassa moída em moinho de café (MC) e para a biomassa moída primeiro em moinho de café e depois no moinho de bolas para 1 bola de 20 mm (MC+MB1(20mm)), 2 bolas de 15 mm (MC+MB2(15mm)) e 8 bolas de 10 mm (MC+MB8(10mm)), de acordo com as restantes condições especificadas na secção 2.4.1.1 (0,5 g de biomassa durante 3:50min a uma frequência de vibração de 25Hz).

Os resultados obtidos (Fig. 3.1) mostram que para a *S. obliquus* a extracção de lípidos é praticamente independentemente do pré-tratamento utilizado. Os resultados mostram ainda que no caso da *Nanno.*, para qualquer um dos pré-tratamentos utilizados, as quantidades de lípidos extraídas foram inferiores à quantidade obtida após pré-tratamento ácido, sendo os melhores pré-tratamentos os obtidos com MB após MC. O valor máximo conseguido foi de $26,5 \pm 0,5$ g/100g ps (MC+MB8(10mm)).

Este resultado foi inferior aos determinados por Nobre *et al.* (2013) e Gouveia *et al.* (submetido) para o mesmo pré-tratamento, podendo a diferença se dever ao facto da colheita ter sido efectuada para diferentes tempos de cultura.

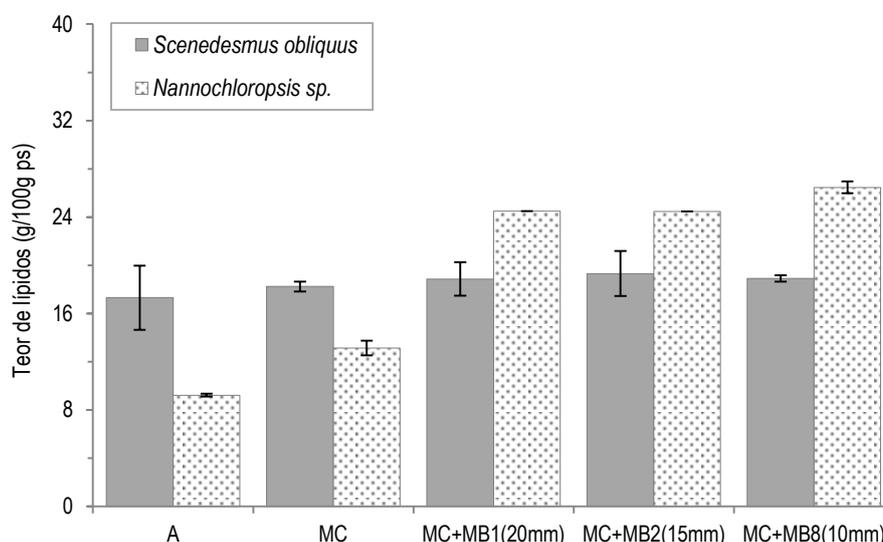


Fig. 3.1 – Teor de lípidos da *Scenedesmus obliquus* (■) e da *Nannochloropsis* sp. (▨) em função dos pré-tratamentos físicos: almofariz (A), moinho de café (MC), moinho de café mais moinho de bolas para 1 esfera de 20 mm (MC+MB1(20MM)), 2 esferas de 15 mm de diâmetro (MC+MB2(15mm)) e 8 esferas de 10 mm (MC+MB3(10mm)) com um tempo de moagem de 3:50min, 25Hz de frequência de vibração e 0,5g de biomassa moída. Os resultados com desvio padrão representam a média de dois ensaios independentes.

Como os resultados obtidos para os teores de lípidos da *Nanno.* em função dos pré-tratamentos físicos ficaram abaixo do teores determinado após o pré-tratamento ácido, realizou-se mais um ensaio para uma moagem no moinho de bolas durante 30 min, mantendo as restantes condições especificadas no pré-tratamento MC+MB8(10mm), de modo a estudar a influência do tempo de moagem. O resultado obtido (Tabela 3.2) indica que, como seria de esperar, o tempo de moagem tem influência na quantidade de lípidos que se consegue extrair.

Realizou-se ainda um ensaio para um tempo de moagem inferior de modo a iniciar o processo de optimização, 20min, tendo-se obtido um resultado para o teor de lípidos (Tabela 3.2) bastante semelhante ao obtido anteriormente.

Tabela 3.2 – Teor de lípidos da *Nannochloropsis* sp. em função dos pré-tratamento físicos moinho de café mais moinho de bolas para 8 esferas de 10 mm (MC+MB8(10mm)) com tempos de moagem de 30 minutos e 20 minutos.

Pré-tratamento	Teor de lípidos <i>Nannochloropsis</i> sp. (g/100 g ps)
MC+MB8(10mm) – 30 min de moagem	35,1
MC+MB8(10mm) – 20 min de moagem	35,7

Embora estes resultados sugerissem que o processo de pré-tratamento de ruptura celular para a biomassa da microalga *Nanno.* deveria ser mais otimizado, a quantidade de biomassa disponível não o permitiu.

3.1.2 Caracterização da fracção lipídica – índice de acidez e composição em ácidos gordos

Tendo em conta que a utilização de catalizadores homogéneos alcalinos, para a produção de biodiesel, em amostras com ácidos gordos livres resulta na produção de sabão (1.2.1), com a respectiva menor conversão de glicéridos em ésteres metílicos, foram determinados os índices de acidez (secção 2.5.1) de cada uma das fracções lipídicas extraídas pela técnica de Soxhlet, de modo a avaliar o tipo de catálise mais adequada ao processo de transesterificação.

Os resultados obtidos para as fracções lipídicas extraídas, com hexano, da biomassa das duas microalgas (Tabela 3.3) são superiores aos vários valores recomendados, cerca de 2 mgKOH/g óleo (Lam *et al.*, 2010; Atadashi *et al.*, 2012), para uma catálise básica eficiente. Como tal, para estas fracções lipídicas, deve-se realizar um pré-tratamento de modo a reduzir o conteúdo em ácidos gordos livres antes de se utilizar uma catálise básica.

Tabela 3.3 – Índice de acidez das fracções lipídicas extraídas, com hexano, da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp.. Os resultados da *Scenedesmus obliquus* representam a média de dois ensaios independentes.

Microalga	Índice de acidez (mg KOH/g)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	81,5 ± 4,0
<i>Nannochloropsis</i> sp.	7,8

As fracções lipídicas foram ainda caracterizadas em termos de composição em ácidos gordos, através da análise (secção 2.7) das amostras transesterificadas segundo o método descrito na secção 2.5.2. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição em ácidos gordos da fracção lipídica extraída da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp..

Ácido gordo	<i>Scenedesmus obliquus</i> % (m/m)	<i>Nannochloropsis</i> sp. % (m/m)
Mirístico (C14:0)	0,5	3,6
Palmítico (C16:0)	23,0	32,7
Palmitoleico (C16:1)	0,5	36,0
Esteárico (C18:0)	2,0	0,9
Oleico (C18:1)	37,3	20,4
Linoleico (C18:2)	13,6	0,1
Linolénico (C18:3)	9,1	0,8
Araquídico (C20:4)	Não detectado	1,2
Eicosapentaenóico (C20:5)	Não detectado	2,8
Saturados	25,5	37,2
Insaturados	60,5	61,3
Monoinsaturados	37,8	56,4

Estabelecendo comparações, é possível verificar que as composições determinadas são diferentes, com a *S. obliquus* a apresentar uma composição dominada essencialmente por ácido oleico (37,3%), ácido palmítico (23,0%), ácido linoleico (13,6%) e ácido linolénico (9,1%) ao passo que a *Nanno.* apresenta uma composição dominada sobretudo por ácido palmitoleico (36,0%), ácido palmítico (32,7%) e ácido oleico (20,4%).

Este estudo mostra também que o biodiesel produzido a partir destas microalgas é composto maioritariamente por ácidos gordos saturados e monoinsaturados, com teores à volta de 63% e 94% para a *S. obliquus* e para a *Nanno.*, respectivamente.

Embora os ácidos gordos dominantes na *S. obliquus* sejam os mesmos, as composições quantitativas são relativamente diferentes das referidas por Gouveia e Oliveira (2009), o que se deve, muito provavelmente, à diferente fase de colheita da biomassa.

Estes resultados são bastante semelhantes em termos dos ácidos gordos dominantes, C16 e C18, referidos por outros autores para a *S. obliquus* (Wiltshire *et al.*, 2000; Kaewkannetra *et al.*, 2012; Mandal e Mallick, 2009; Ho *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012).

A composição determinada para a *Nanno.* é bastante semelhante à referida por Nobre *et al.* (2013) e por Matos *et al.* (2013). Isto significa que a altura da colheita, apesar de ter influência na resistência da parede celular, não tem influência ao nível do conteúdo em ácidos gordos.

À semelhança da *S. obliquus*, a *Nanno.* estudada apresenta os mesmos ácidos gordos dominantes (C16 e C18) que os referidos por Li *et al.* (2011), Pal *et al.* (2011), Moazami *et al.* (2012), Bondioli *et al.* (2012) e Olmstead *et al.* (2013). Para além disso, a presença de ácidos gordos poliinsaturados, ácido araquídico (C20:4) e ácido eicosapentaenóico (C20:5), é consistente com o que se encontra publicado (Nitsan *et al.*, 1999; Zittelli *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2011; Bondioli *et al.*, 2012).

No que diz respeito à análise da composição em termos dos limites estabelecidos para os diversos parâmetros pela norma EN 14214 (Tabela 1.3), ambas as amostras apresentam um conteúdo inferior a 12% (m/m) em termos de ácido linolénico (C18:3), o limite máximo especificado. A *S. obliquus* também cumpre o limite máximo imposto para o teor em ácidos gordos poliinsaturados (≥ 4 duplas ligações) de 1% (m/m), enquanto que para a *Nanno.* esse limite não é cumprido pois os teores de ácidos araquídico e eicosapentaenóico são superiores a 1%.

Em relação aos teores de ésteres metílicos obtidos a partir das fracções lipídicas da biomassa *S. obliquus* e *Nanno.*, obtiveram-se valores de 95,1% e 98,0%, respectivamente. Estes valores correspondem à matéria saponificável presente na fracção lipídica extraída com hexano e como tal, mostram a viabilidade de utilização desta matéria-prima para a produção de biodiesel.

3.2 Produção de biodiesel - Transesterificação directa

Actualmente, a produção de biodiesel utilizando microalgas como matéria-prima é realizada, essencialmente, através da extracção dos lípidos presentes na biomassa e respectiva transesterificação (secção 1.3.3). Uma vez que esta forma de produção de biodiesel apresenta diversas desvantagens em relação ao processo de transesterificação directa (secção 1.3.4), neste trabalho, estudou-se este último processo.

As condições a nível das quantidades de reagentes utilizados e do tempo de reacção dos primeiros ensaios foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos por Gouveia *et al.* (submetido), que mostram que para a *Nanno.*, as condições ideais para a transesterificação directa de 100 mg de microalga são 6 horas de tempo de reacção, 4 mL de metanol e um volume de catalizador (H_2SO_4) de 1,2% (v/v), em relação ao volume de metanol, neste caso 48 μ L.

Uma vez que ainda não se tinha realizado este tipo de estudo no LNEG para a *S. obliquus*, realizou-se um ensaio de transesterificação directa de acordo com as condições referidas para as duas microalgas, segundo o método descrito em 2.6.

Os resultados obtidos (Tabela 3.5) mostram que a quantidade de ésteres metílicos produzidos a partir da *Nanno.* foram inferiores ao valor de cerca de 40g/100g ps obtido por Gouveia *et al.* (submetido). Os resultados mostram ainda que, para estas condições, é possível produzir aproximadamente a mesma quantidade de ésteres metílicos a partir das duas microalgas.

Tabela 3.5 – Ésteres metílicos produzidos a partir das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp. através do processo de transesterificação directa (Condições: 100 mg de biomassa, tempo de reacção de 6h, 4 mL de metanol, 1,2% de ácido sulfúrico, 55°C e 200 rpm). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Microalga	Ésteres metílicos (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	19,9 ± 2,4
<i>Nannochloropsis</i> sp.	17,8 ± 0,8

De forma a determinar se seria possível produzir mais ésteres metílicos a partir destas duas biomassas através do processo de transesterificação directa, realizou-se um ensaio, em duplicado, para um tempo de reacção de 24h, mantendo as quantidades de biomassa e reagentes utilizadas anteriormente (100 mg biomassa, 4 mL de metanol e 48 µL de ácido sulfúrico).

Como seria de esperar, no caso da *Nanno.*, os resultados (Tabela 3.6) mostram que é possível produzir mais ésteres metílicos com o aumento do tempo de reacção, enquanto que para a *S. obliquus* a quantidade de ésteres metílicos produzidos foi relativamente semelhante.

No que diz respeito a comparações entre este processo e o processo convencional (extracção da fracção lipídica seguida de transesterificação – secção 3.1) os resultados para *S. obliquus* mostram que é possível produzir sensivelmente a mesma quantidade de FAME através dos dois processos.

Para a *Nanno.*, os resultados demonstram que, para as condições utilizadas, o processo de transesterificação directa permite a produção de mais ésteres metílicos do que o processo composto por extracção com hexano e respectiva transesterificação (secção 3.1).

Estes resultados sugerem que se pode ter utilizado fosfolípidos para a produção de FAME, tal como se encontra reportado por Whalen *et al.* (2011). No entanto, é preciso ter em atenção que só se experimentou hexano como solvente para extrair a fracção lipídica neutra, especialmente se se tiver

em atenção que esta diferença potencial em termos de produção de FAME traduz-se em cerca de 7g/100g ps. O artigo publicado por Mandal *et al.* (2013) é um bom exemplo da influência do tipo de solvente com polaridade neutra na quantidade de lípidos extraídos.

À semelhança do publicado por Griffiths *et al.* (2010), estes resultados sugerem ainda que, uma vez que a determinação destes valores está somente dependente da quantidade de ésteres metílicos produzidos, este método pode servir como método de quantificação do potencial de produção de FAME.

Tabela 3.6 – Ésteres metílicos produzidos a partir das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp. através do processo de transesterificação directa (Condições: 100 mg de biomassa, tempo de reacção de 24h, 4 mL de metanol, 1,2% de ácido sulfúrico, 55°C e 200 rpm). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Microalga	Ésteres metílicos (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	17,3 ± 0,1
<i>Nannochloropsis</i> sp.	42,0 ± 1,1

3.2.1 Influência do volume de metanol, da concentração de catalizador e do tempo de reacção

Apesar do processo de transesterificação directa também ser afectado pela temperatura, pelo teor de humidade da biomassa, pela intensidade de agitação do meio e pelo tipo de co-solvente utilizado e a forma como este é aplicado na fase de recolha dos ésteres metílicos do meio de reacção (Ehimen *et al.*, 2010), decidi-se estudar neste trabalho os efeitos da razão molar metanol:lípidos, da concentração de catalizador e do tempo de reacção. Este estudo foi efectuado apenas para a biomassa da microalga *S. obliquus*, tendo em conta que já havia referência a este tipo de estudo para a *Nanno*. (Gouveia *et al.*, 2013) e, além disso, a fracção lipídica obtida da biomassa da *S. obliquus* apresentava um elevado teor de ácidos gordos livres, muito superior ao da fracção lipídica de *Nanno*. estudada, o que tornava interessante o estudo da influência da catálise ácida neste processo.

As gamas de valores utilizados neste estudo foram escolhidas em função dos resultados obtidos por Gouveia *et al.* (submetido).

a) Estudo da influência do volume de metanol

Para este estudo, utilizaram-se volumes de metanol compreendidos entre 0,5 mL e 4 mL, para uma concentração de catalizador de 1,1% (v/v), 100 mg de biomassa e um tempo de reacção de 3:15h.

Como se pode observar na figura 3.2, para as condições utilizadas, é possível obter entre $10,7 \pm 0,8$ g/100g ps e $17,6 \pm 0,9$ g/100g ps de ésteres metílicos. A produção de ésteres metílicos aumenta de forma notória sobretudo entre 0,5 mL e 1,21 mL de metanol. Para valores superiores a 1,21 mL, a produção mantém-se relativamente constante e à volta do valor máximo teórico, cerca de 18g/100g ps.

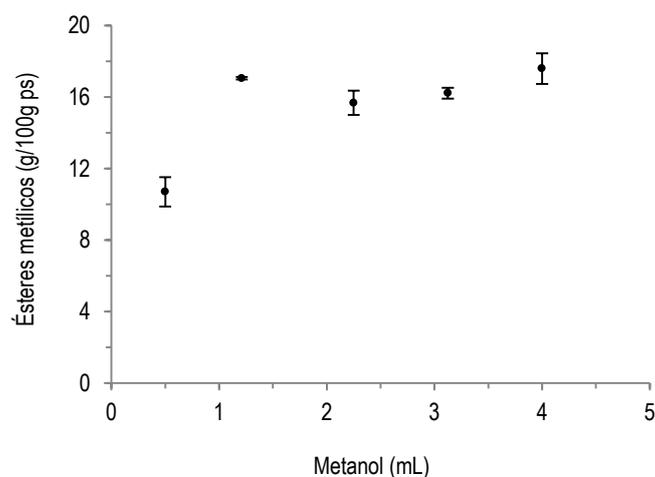


Fig. 3.2 – Influência do volume de metanol na produção de ésteres metílicos a partir da biomassa de *Scenedesmus obliquus* (g/100g ps), após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 3:15h; 1,1% (v/v) H₂SO₄ e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

b) Estudo da influência da concentração de catalizador

De forma a realizar este estudo, utilizaram-se concentrações de ácido sulfúrico entre 0,3% (v/v) e 1,7% (v/v), para um volume de metanol de 2,25 mL, 100 mg de biomassa e um tempo de reacção de 3:15h.

Os resultados (Fig 3.3) mostram que a quantidade de ésteres aumenta com o aumento da quantidade de catalizador, obtendo-se um máximo de $16,5 \pm 1,0$ g/100g ps de ésteres metílicos. Os resultados mostram ainda que, entre 0,3% e 0,5%, e entre 0,75% e 1,7%, a quantidade de ésteres metílicos produzidos mantém-se relativamente constante, cerca de 13g/100g ps e 16 g/100g ps, respectivamente.

Este perfil é concordante com o obtido por Gouveia *et al.* (submetido).

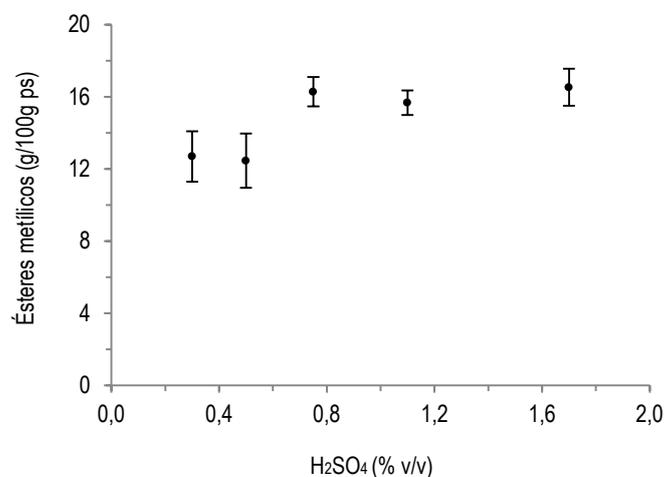


Fig. 3.3 – Influência da concentração de catalizador H₂SO₄ %(v/v) na produção de ésteres metílicos a partir da biomassa de *Scenedesmus obliquus* (g/100g ps), após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 3:15h; 2,25 mL de metanol e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

c) Estudo da influência do tempo de reacção

Em relação a este estudo, variou-se o tempo de reacção entre meia hora e seis horas, para um volume de metanol de 2,25 mL, uma concentração de catalizador de 1,1% (v/v) e 100 mg de biomassa.

Os resultados obtidos (Fig. 3.4) demonstram que o tempo de reacção tem um efeito semelhante ao aumento da quantidade de metanol, nas condições utilizadas, com valores para os ésteres metílicos compreendidos entre $10,3 \pm 1,3$ g/100g ps e $18,1 \pm 0,2$ g/100g ps, verificando-se um aumento mais acentuado no teor de ésteres entre 0,5h e 1,6h. Ao fim de 6 h de reacção, o valor atingido é próximo do valor máximo teórico.

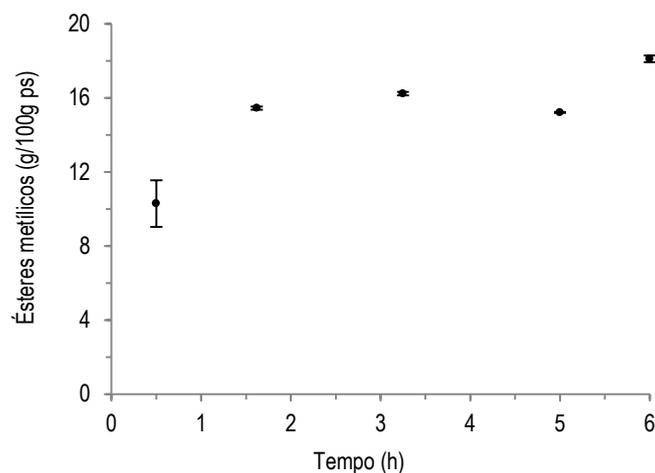


Fig. 3.4 – Influência do tempo de reacção no teor de ésteres metílicos obtido a partir da biomassa de *Scenedesmus obliquus*, após pré-tratamento em moinho de café (Condições: 55°C; 200 rpm; 2,25 mL de metanol; 1,1% H₂SO₄ e 100 mg de biomassa). Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

De modo a avaliar de forma qualitativa a composição de uma das amostras de fracção lipídica sujeita a transesterificação directa, antes de se ter atingido o equilíbrio da reacção, com a composição da fracção lipídica presente na biomassa, realizou-se uma análise por cromatografia de placa destas duas amostras.

Os resultados mostram que a fracção lipídica extraída da biomassa de *S. obliquus* (Fig. 3.5 (B)) possui mono, di e triglicéridos na sua composição, para além de uma pequena porção de lípidos não identificados. Os resultados mostram ainda que para o caso da transesterificação directa (Fig. 3.5 (B)) se obtém uma grande mancha correspondente, muito provavelmente, aos ésteres metílicos, e umas manchas mais pequenas na zona correspondente aos mono e diglicéridos indicando que, para este ensaio, ainda não se encontravam convertidos todos os glicéridos em ésteres metílicos.

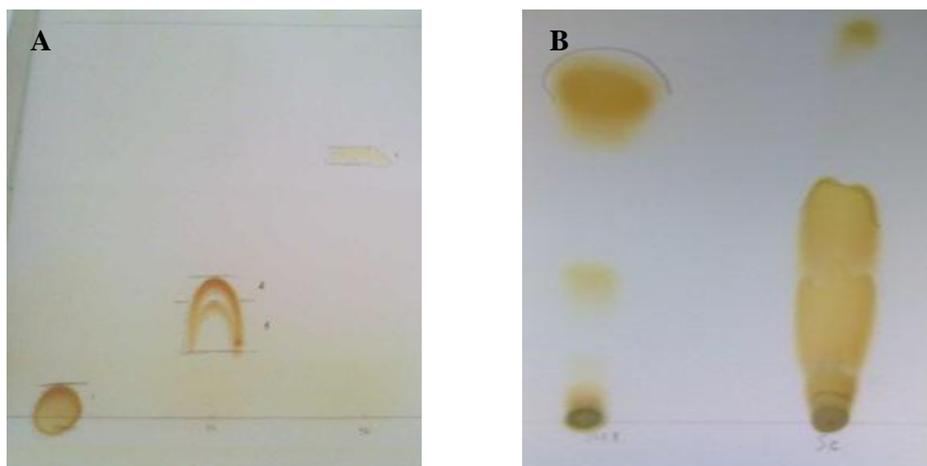


Fig. 3.5 – (A) da esquerda para a direita: monooleína, dioleína e trioleína; (B) da esquerda para a direita: amostra de um processo de transesterificação directa e fracção lipídica extraída da biomassa de *Scenedesmus obliquus*.

3.3 Caracterização das microalgas em termos de composição

De modo a avaliar o potencial de valorização da biomassa residual, as biomassas das microalgas *S. obliquus* e *Nanno.* foram caracterizadas em termos de lípidos totais, açúcares totais, proteína e minerais,

3.3.1 Lípidos totais

Como se encontra referido na secção 1.3.3.3, o solvente utilizado no processo de extracção influencia o tipo de lípidos extraídos. Visto que o solvente até aqui utilizado, hexano, permite extrair essencialmente lípidos neutros, a contabilização dos lípidos totais foi realizada através da extracção Soxhlet com etanol, um solvente que, para além dos lípidos neutros, extrai os lípidos polares, como por exemplo os fosfolípidos e os glicolípidos presentes nas microalgas.

Os pré-tratamentos utilizados, moagem em MC e moagem em MC+MB, durante 20 min com 8 esferas de 10 mm de diâmetro, para a *S. obliquus* e a *Nanno.*, respectivamente, foram escolhidos de acordo com os melhores resultados obtidos para as extracções com hexano.

Os resultados (Fig. 3.6) mostram que a quantidade de lípidos extraída com etanol para cada uma das microalgas foi, como seria de esperar, superior à quantidade de lípidos extraídos com hexano. Estes resultados indicam que, para além de se terem extraídos lípidos polares, também se extraíram lípidos neutros. O teor de lípidos determinado para a *Nanno.* ($51,2 \pm 0,3$ g/100g ps) é semelhante ao referido por Nobre *et al.* (2013).

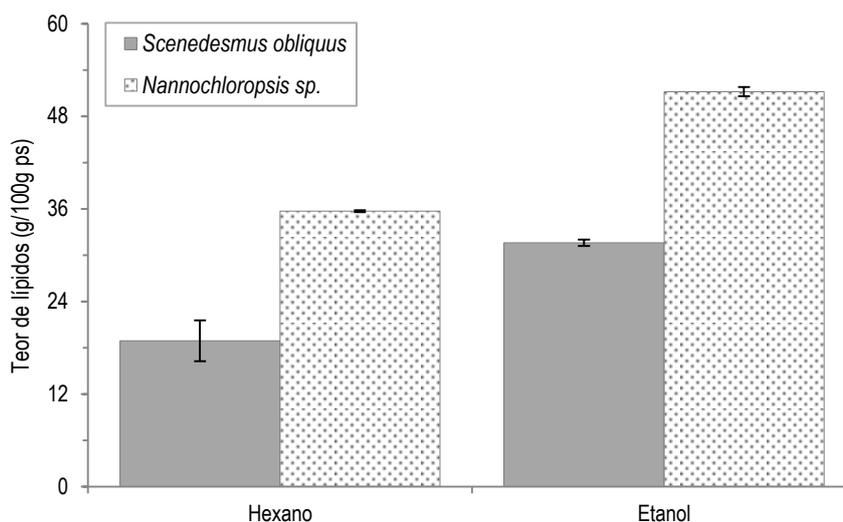


Fig. 3.6 – Teor de lípidos da *Scenedesmus obliquus* (■) e da *Nannochloropsis* sp. (▨) em função dos solventes utilizados no processo de extracção, hexano e etanol. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

3.4 Teor de açúcares totais

Os pré-tratamentos utilizados para as duas microalgas (secção 2.4.2.1) foram seleccionados de acordo com os resultados obtidos por Miranda *et al.* (2012a) que mostram a hidrólise com ácido sulfúrico 2N, a uma temperatura de 120°C durante 30 min, designada neste trabalho por hidrólise ácida simples, como o melhor método para a rutura celular e respectiva extracção de açúcares.

Para além deste pré-tratamento, utilizou-se uma hidrólise ácida mais agressiva (Hoebler *et al.*, 1989), designada neste trabalho de hidrólise ácida quantitativa, utilizada em material lenhocelulósico, de modo a garantir a hidrólise total da biomassa e como tal, servir como pré-tratamento de referência.

Desta forma, foi possível avaliar se a hidrólise ácida simples era adequada para estas duas microalgas, tendo em conta as respectivas alturas de colheita das biomassas e a sua influência na resistência da parede celular.

Após a realização dos respectivos pré-tratamentos, a determinação colorimétrica do teor de açúcares totais (secção 2.4.2.2) foi feita através do método proposto por Dubois *et al.* (1956) a um comprimento de onda de 490nm. A recta de calibração obtida para a resposta colorimétrica em função da concentração de glucose, utilizada no processo de determinação dos teores de açúcares totais equivalente, encontra-se no anexo 2.

Os resultados obtidos (Tabela 3.6 e Tabela 3.7) para as duas microalgas mostram que não existe diferença na influência das duas hidrólises estudadas na quantidade de açúcares extraídos.

Tabela 3.7 – Teor de açúcares totais da *Scenedesmus obliquus* em função da hidrólise ácida simples e da hidrólise ácida quantitativa. Os resultados representam a média de dois ensaios independentes.

Pré-tratamento	Teor de açúcares totais <i>Scenedesmus obliquus</i> (g/100g ps)
Hidrólise ácida simples	33,6 ± 1,1
Hidrólise ácida quantitativa	32,8 ± 1,0

Tabela 3.8 – Teor de açúcares totais da *Nannochloropsis* sp. em função da hidrólise ácida simples e da hidrólise ácida quantitativa. O resultado para a hidrólise ácida simples representa a média de dois ensaios independentes.

Pré-tratamento	Teor de açúcares totais <i>Nannochloropsis</i> sp. (g/100g ps)
Hidrólise ácida simples	17,5 ± 0,6
Hidrólise ácida quantitativa	18,7

Os valores obtidos para cada microalga são semelhantes aos publicados por Miranda *et al.* (2012) e Gouveia *et al.* (2012) para a *S. obliquus* e com os resultados publicados por Li *et al.* (2011) e Gouveia *et al.* (2012) para a *Nanno.*.

A comparação destes resultados com os obtidos para a extracções das fracções lipídicas e respectivas transesterificações (3.1) ou com os obtidos para a transesterificação directa (3.2) mostram que a *Scenedesmus obliquus* é uma alga relativamente bivalente, isto é, apresenta um potencial relativamente semelhante para a produção de biodiesel e bioetanol ao passo que a *Nannochloropsis* sp. é uma alga mais adequada para biodiesel.

3.5 Teor de proteína

A determinação do teor de proteína foi realizada através do método de Kjeldahl, descrito na secção 2.4.3. Os resultados obtidos para este parâmetro (Tabela 3.6) mostram que a *S. obliquus* tem um teor de proteína cerca de duas vezes superior à *Nanno.*. Os resultados para a *S. obliquus* são consistentes com os resultados publicados por Gouveia *et al.* (2012).

Tabela 3.9 – Teor de proteína da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp. determinado através do método de Kjeldahl. Os resultados representam a média de, pelo menos, dois ensaios independentes.

Microalga	Teor de proteína (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	18,3 ± 0,1
<i>Nannochloropsis</i> sp.	8,6 ± 0,3

No entanto, é necessário ter em atenção que estes resultados foram obtidos utilizando um factor de conversão do conteúdo em azoto em conteúdo de proteína (FCAP) de 6,25 g/g azoto total, tal como se encontra indicado na secção 2.6. Embora este valor seja bastante utilizado para calcular o conteúdo em diversas matérias primas (Mariotti *et al.*, 2008), do mesmo modo que foi realizado no presente estudo, tudo indica que a utilização deste valor para as microalgas resulta numa determinação incorrecta do conteúdo em proteína.

A utilização deste valor geralmente assume que todas as proteínas têm uma constituição em azoto de 16% e que todo o azoto determinado está associado a proteínas. Estas presunções resultam numa determinação incorrecta do verdadeiro conteúdo em proteína devido ao facto do conteúdo em azoto variar de proteína para proteína, de acordo com a sua composição em aminoácidos, e devido ao facto de alguns compostos presentes nas microalgas como, por exemplo, o ADN e os pigmentos, terem azoto na sua constituição (Lourenço *et al.*, 2004).

Nos últimos anos têm-se realizado estudos com o propósito de determinar factores de conversão mais adequados às diversas espécies microalgais, através da comparação entre o conteúdo de proteína determinado por métodos colorimétricos como, por exemplo, o método de Lowry, e o conteúdo em azoto total determinado, por exemplo, através do método de Dumas e do método de Kjeldahl (Lourenço *et al.*, 2004; López *et al.*, 2010; Safi *et al.*, 2013; Gerde *et al.*, 2013). Os resultados destes estudos mostram que, para as espécies estudadas até à data, o valor para o FCAP pode variar entre 3,64 e 6,34 g/g azoto total. O estudo realizado por Lourenço *et al.* (2004) mostra ainda que, como seria de esperar, o factor de conversão depende da fase de crescimento da microalga.

No que diz respeito ao teor de proteína obtido para as microalgas do presente trabalho, o estudo realizado por Gerde *et al.* (2013) é especialmente relevante para a discussão, uma vez que este estudo determinou alguns valores para o FCAP em função do processo utilizado para extrair a proteína e da presença de lípidos na biomassa de *Nannochloropsis* spp., uma espécie de microalga bastante semelhante à *Nannochloropsis* sp.. Os valores apresentados encontram-se compreendidos entre 2,29 e 4,70 g/g azoto total.

No presente trabalho, optou-se por utilizar 6,25 g/g azoto total dado não ainda não existir uma forma bem estabelecida de determinar um número FCAP que tenha em conta os diversos factores que afectam este número, como o método utilizado na extracção para a determinação colorimétrica do conteúdo em proteína e a fase de crescimento da microalga.

3.6 Teor de minerais

As duas microalgas foram ainda caracterizadas em termos de teores de minerais através do método descrito na secção 2.4.4.1. Os resultados obtidos (Tabela 3.10) são bastante inferiores aos publicados na literatura para as duas microalgas, cultivadas em meios de cultura idênticos (Gouveia *et al.*, 2012).

Tabela 3.10 – Teores de minerais da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp. determinados por análise gravimétrica.

Microalga	Teor de minerais (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	6,3 ± 0,1
<i>Nannochloropsis</i> sp.	6,7 ± 0,2

De modo a testar se havia razões para crer que esta discrepância não estava correcta, decidiu-se comparar os resultados desta análise com os obtidos em termos de aniões cloreto, nitrato, fosfato e sulfato, presentes na água de lavagem, avaliados através da análise por cromatografia iónica (secção 2.4.4.2), tendo em consideração as concentrações dos nutrientes utilizados nos meios de cultura.

Os resultados obtidos (Tabela 3.11) não entram em contradição com os resultados do método gravimétrico. No entanto, a interpretação destes valores deve ter em consideração que não há a garantia que se tenham transferido todos os minerais presentes na microalga para a água de lavagem. De facto, os valores determinados são inferiores à quantidade de nutrientes dos meios de cultura e, como tal, indicam que não houve uma transferência total dos minerais para o solvente.

Tabela 3.11 – Teor de minerais da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp. em função dos minerais presentes nas águas de lavagem.

Microalga	Teor de minerais (g/100g ps)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,9 ± 0,02
<i>Nannochloropsis</i> sp.	3,4 ± 0,15

Em resumo, as microalgas estudadas, *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp., apresentam as composições que se encontram na figura seguinte (Fig 3.7):

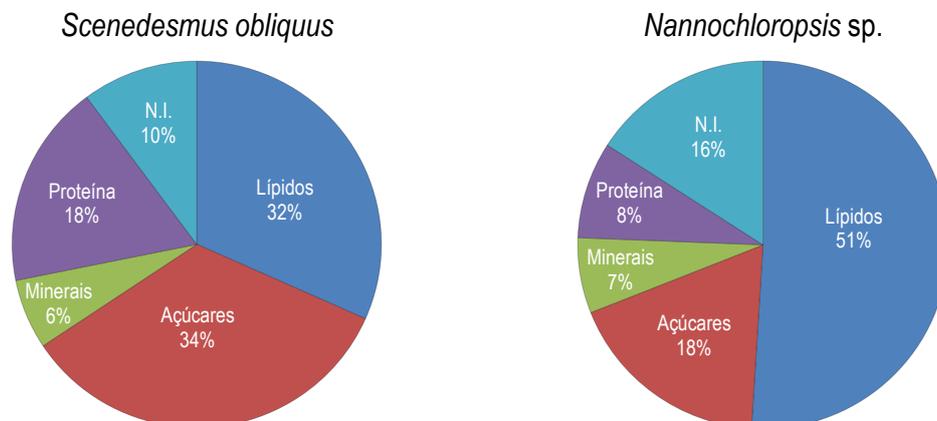


Fig. 3.7 – Composição (% m/m) da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp. em termos de teores de lípidos totais (extração com etanol), açúcares totais, proteína e minerais. N.I.-fracção não identificada.

Estes resultados mostram que, à semelhança do reportado noutros estudos (Picardo *et al.*, 2013) não se caracterizou as microalgas por inteiro.

Os resultados obtidos em função dos tipos análises efectuadas indicam que, provavelmente, uma quantidade significativa das fracções não identificadas possa ser atribuída a compostos lipídicos. Esta interpretação provém essencialmente do facto de não se ter testado a utilização de mais solventes, ou combinação de solventes, tendo em vista a maior recuperação possível do conteúdo em lípidos. Os resultados publicados por McNichol *et al.* (2012) e Mandal *et al.* (2013) são um bom exemplo da influência do solvente utilizado na quantidade de lípidos extraídos.

No que diz respeito ao enquadramento dos resultados obtidos para a composição das duas microalgas em relação aos diversos valores apresentados na literatura em termos deste tipo de caracterização (Picardo *et al.*, 2013), a julgar estritamente pelos resultados obtidos para o processo de determinação do teor de lípidos extraídos com solvente, (secção 3.1), teores de açúcares totais (secção 3.4) e pelos teores de proteína (secção 3.5), ambas as espécies estudadas apresentam teores relativamente interessantes quando comparadas com boa parte dos valores publicados para as outras espécies.

Isto coloca as duas microalgas numa posição de relevo tendo em vista a produção de biodiesel com aproveitamento da biomassa residual após aproveitamento da fracção lipídica para a produção de biodiesel.

4. Conclusão

O presente trabalho teve como principal objectivo a avaliação da adequabilidade das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis* sp. como matéria-prima para a produção de biodiesel. Essa avaliação foi feita através do estudo da optimização do processo de rutura celular e da caracterização da fracção lipídica em termos de índice de acidez e composição em ácidos gordos. Estudou-se ainda o processo de transesterificação directa para ambas as biomassas microalgais. Foram determinados os teores de lípidos totais, açúcares totais, proteína e minerais de modo a avaliar o potencial de valorização da biomassa residual.

Os resultados obtidos para as extracções com hexano em função dos diversos pré-tratamentos utilizados mostram que, para as condições de cultivo e fase de colheita da biomassa, a *Nannochloropsis* sp. apresenta um teor de lípidos neutros superior à *Scenedesmus obliquus*, com teores na ordem dos 35/100g ps e 17g/100g ps, respectivamente.

Ambas as microalgas apresentam um índice de acidez adequado para a produção de biodiesel. No que diz respeito à composição em ácidos gordos, a *Nannochloropsis* sp. mostrou um teor elevado em ácidos gordos poliinsaturados, sendo necessário fazer misturas com outros óleos ou recorrer a um processo de hidrogenação de forma a cumprir o limite legal definido pela norma EN 14214.

Os resultados mostram ainda que não é necessário qualquer pré-tratamento tendo em vista a rutura celular da *Scenedesmus obliquus* ao passo que no caso da *Nannochloropsis* sp. é necessário um pré-tratamento mecânico relativamente agressivo.

Na transesterificação directa os melhores resultados obtidos, indicam que, para 100 mg de biomassa, um tempo de reacção de 24h, volume de metanol de 4 mL e uma concentração de catalizador de 1,2% (v/v), é possível produzir ésteres metílicos na ordem de 40 g/100g ps e 18 g/100g ps para a *Nannochloropsis* sp. e a *Scenedesmus obliquus*, respectivamente. Estes valores indicam que o processo de Transesterificação utilizado permite a conversão completa da matéria saponificável presente na biomassa.

Os resultados mostram que a Transesterificação directa tem enorme potencial para a produção de biodiesel, e apesar de não se ter quantificado os gastos de solvente, tempo e energia, este método apresenta vantagens em relação ao método convencional. Com a Transesterificação directa reduzem-se etapas do processo, nomeadamente a extracção dos lípidos e a evaporação do solvente, com consequente diminuição dos custos energéticos e de tempo.

Em relação ao teor de açúcares totais, os resultados mostram que a *Scenedesmus obliquus* tem um teor aproximado de 33g/100g ps e que a *Nannochloropsis* sp. tem um teor aproximado de 18g/100g ps.

Isto significa que, para além da produção de biodiesel, ambas as microalgas têm potencial para produção de bioetanol ou biohidrogenio, apresentando a *Scenedesmus obliquus* uma maior versatilidade.

Quanto à restante composição da biomassa, os teores de proteína determinados, cerca de 18g/100g ps para a *Scenedesmus obliquus* e 9g/100g ps para a *Nannochloropsis* sp., indicam que existe potencial em termos de aproveitamento desta biomassa, após os processos de valorização energética, como fonte de nutrientes, especialmente no caso da *Scenedesmus obliquus*.

Em conclusão, ambas as algas têm potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel e de outros biocombustíveis (bioetanol, biogás, biohidrogénio) assim como outros composto de valor como fonte de nutrientes para fertilização e condicionador de solos, ou alimentação animal, num conceito de biorefinaria

5. Trabalho futuro

- Necessário otimizar o processo de transesterificação directa, de modo a reduzir os custos associados (energia e reagentes) e redução do tempo necessário aos processos, através de, por exemplo, um trabalho baseado num método de superfície de resposta.
- Desenvolvimento de técnicas mais eficazes de quantificação de teor de lípidos. O mesmo se pode dizer para o restante conteúdo da biomassa (açúcares, proteína e minerais).

6. Referências

- An, S.S., T. Friedl e E. Hegewald, 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons, *Plant Biology* 1:418-428, doi: 10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x.
- Araujo, G.S., L.J.B.L. Matos, J.O. Fernandes, S.J.M. Cartaxo, L.R.B. Gonçalves, F.A.N. Fernandes e W.R.L. Farias, 2013. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method, *Ultrasonics Sonochemistry* 20:95-98, doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.027.
- Atadashi, I.M., M.K. Aroua, A.R.A. Aziz e N.M.N. Sulaiman, 2012. The effects of catalysts in biodiesel production: a review, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19:14-26, doi: 10.1016/j.jiec.2012.07.009.
- Balasubramanian, S., J.D. Allen, A. Kanitkar e D. Boldor, 2011. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization, *Bioresource Technology* 102:3396-3403, doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.119.
- Batista, A.P., P. Moura, P.A.S.S. Marques, J. Ortigueira, L. Alves e L. Gouveia, 2014. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*, *Fuel* 117A:537-543, doi: 10.1016/j.fuel.2013.09.077.
- Bondioli, P., L.D. Bella, G. Rivolta, G.C. Zittelli, N. Bassi, L. Rodolfi, D. Casini, M. Prussi, D. Chiamonti e M.R. Tredici, 2012. Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis* sp. F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33, *Bioresource Technology* 114:567-572, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.123.
- British Petroleum, 2013. <http://www.bp.com/en/global/corporate/about-bp/statistical-review-of-world-energy-2013.html> [Acedido em Agosto]
- Chang, R., 2005. *Chemistry*, 8th ed. (tradução Portuguesa), McGraw-Hill, Lisboa.
- Chapman, R.L., 2013. Algae: the world's most important “plants” – an introduction, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18:5-12, doi: 10.1007/s11027-010-9255-9.
- Chen, C.-Y., K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee e J.-S. Chang, 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresource Technology* 102:71-81, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.159.

- Chen, C.-Y., X.-Q. Zhao, H.-W. Yen, S.-H. Ho, C.-L. Cheng, D.-J. Lee, F.-W. Bai e J.-S. Chang, 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production, *Biochemical Engineering Journal* 78:1-10, doi: 10.1016/j.bej.2013.03.006.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25:294-307, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Chouhan, A.P.S. e A.K. Sarma, 2011. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: a comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15:4378-4399, doi: 10.1016/j.rser.2011.07.112.
- Doan, T.T.Y., B. Sivaloganathan e J.P. Obbard, 2011. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock, *Biomass and Bioenergy* 35:2534-2544, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.02.021.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers e F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 28:350-356 , doi: 10.1021/ac60111a017.
- Ehimen, E.A., S. Connaughton, Z. Sun e G.C. Carrington, 2009. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass 1:371-381, *Global Change Biology*, doi: 10.1111/j.1757-1707.2009.01029.x.
- Ehimen, E.A., Z.F. Sun e G.C. Carrington, 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids, *Fuel* 89:677-684, doi: 10.1016/j.fuel.2009.10.011.
- Ehimen, E.A., Z.F. Sun e G.C. Carrington, 2012. Use of ultrasound and co-solvents to improve the in-situ transesterification of microalgae biomass, *Procedia Environmental Sciences* 15:47-55, doi: 10.1016/j.proenv.2012.05.009.
- Ehimen, E.A., Z.F. Sun, C.G. Carrington, E.J. Birch e J.J. Eaton-Rye, 2011. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process, *Applied Energy* 88:3454-3463, doi: 10.1016/j.apenergy.2010.10.020.
- El-Sheekh, M., A.E.-F. Abomohra e D. Hanelt, 2013. Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29:915-922, doi: 10.1007/s11274-012-1248-2.
- EuroObserv'ER, 2013. <http://www.eurobserv-er.org/> [Acedido em Agosto]
- Eurostat, 2013. <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/energy/data/database> [Acedido em Agosto]

- Ferreira, A.F., A.C. Marques, A.P. Batista, P.A.S.S. Marques, L. Gouveia e C.M. Silva, 2012. Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. – Yield, energy and CO₂ analysis including fermentative biomass recovery, *International Journal of Hydrogen Energy* 37:179-190, doi: 10.1016/j.ijhydene.2011.09.056.
- Ferreira, A.F., L.A. Ribeiro, A.P. Batista, P.A.S.S. Marques, B.P. Nobre, A.M.F. Palavra, P.P. da Silva, L. Gouveia e C. Silva, 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – energy and CO₂ emission and economic analyses, *Bioresource Technology* 138:235-244, doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.168.
- Gallagher, B.J., 2011. The economics of producing biodiesel from algae, *Renewable Energy* 36:158-162, doi: 10.1016/j.renene.2010.06.016.
- Gerde, J.A., T. Wang, L. Yao, S. Jung, L.A. Johnson e B. Lamsal, 2013. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass, *Algal Research* 2:145-153, doi: 10.1016/j.algal.2013.02.001.
- Giorno, F., R. Mazzei e L. Giorno, 2013. Purification of triacylglycerols for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalgae by membrane technology, *Bioresource Technology* 140:172-178, doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.073.
- Gouveia, L. e A.C. Oliveira, 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:269-274, doi: 10.1007/s10295-008-0495-6.
- Gouveia, L., 2011. *Microalgae as a feedstock for biofuels*. Springer, Berlin.
- Gouveia, L., A.E. Marques, J.M. Sousa, P. Moura e N.M. Bandarra, 2010. Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients, *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 7:21-37, doi: 10.1616/1476-2137.15884.
- Gouveia, L., A.P. Batista, B.P. Nobre, P.A.S.S. Marques, P. Moura, L. Alves, P.C. Passarinho, A.C. Oliveira, F. Villalobos, B.E. Barragán e A.M.F. Palavra, 2012. Exploring *Scenedesmus obliquus* and *Nannochloropsis* sp. potential as a sustainable raw material for biofuels and high added value compounds, In: Livro de actas do 1º Congresso Iberoamericano Sobre Biorrefinarias, 1-CIAB, Los Cabos, Baja California, México, Outubro 24-26, 2012, p 701-707, ISBN 976-607-441-200-0.
- Gouveia, L., Janelas, J., Torpecelo, A., Oliveira, C (2013). Direct biodiesel production by in situ transesterification of *Nannochloropsis* sp. Biomass. *Fuel* (submetido).

- Griffiths, M.J., R.P. van Hille e S.T.L. Harrison, 2010. Selection of direct transesterification as the preferred method for assay of fatty acid content of microalgae, *Lipids* 45:1053-1060, doi: 10.1007/s11745-010-3468-2.
- Gurbuz, F., H. Ciftci e A. Akcil, 2009. Biodegradation of cyanide containing effluents by *Scenedesmus obliquus*, *Journal of Hazardous Materials* 162:74-79, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.008.
- Halim, R., M.K. Danquah e P.A. Webley, 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnology Advances* 30:709-732, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- Heredia-Arroyo, T., W. Wei e B. Hu, 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162:1978-1995, doi: 10.1007/s12010-010-8974-4.
- Ho, S.-H., C.-Y. Chen e J.-S. Chang, 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N, *Bioresource Technology* 113:244-252, doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.133.
- Ho, S.-H., W.-M. Chen e J.-S. Chang, 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production, *Bioresource Technology* 101:8725-8730, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.112.
- Hodaifa, G., M.E. Martínez e S. Sánchez, 2009. Daily doses of light in relation to the growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:1550-1558, doi: 10.1002/jctb.2219.
- Hodaifa, G., M.E. Martínez e S. Sánchez, 2010. Influence of temperature on growth of *Scenedesmus obliquus* in diluted olive mill wastewater as culture medium, *Engineering in Life Sciences* 10:257-264, doi: 10.1002/elsc.201000005.
- Hoebler, C., J.L. Barry, A. David e J. Delort-Laval, 1989. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37:360-367, doi: 10.1021/jf00086a020.
- Hoekman, S.K., A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros e M. Natarajan, 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:143-169, doi: 10.1016/j.rser.2011.07.143.

- Hu, Q., M., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert e A. Darzins, 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *The Plant Journal* 54:621-639, doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.
- Huang, G., F. Chen, D. Wei, X. Zhang e G. Chen, 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology, *Applied Energy* 87:38-46, doi: 10.1016/j.apenergy.2009.06.016.
- IPCC, 2007. Climate change 2007 – The physical science basis, http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg1_report_the_physical_science_basis.htm
- John, R.P., G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri e A.P. Pandey, 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol, *Bioresource Technology* 102:186-193, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.139.
- Kaewkannetra, P., P. Enmak e T. Chiu, 2012. The effects of CO₂ and salinity on the cultivation of *Scenedesmus obliquus* for biodiesel production, *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17:591-597, doi: 10.1007/s12257-011-0533-5.
- Knothe, G. e R.O. Dunn, 2003. Dependence of oil stability index of fatty compounds on their structure and concentration and presence of metals 80:1021-1026, doi: 10.1007/s11746-003-0814-x.
- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters, *Fuel Processing Technology* 86:1059-1070, doi: 10.1016/j.fuproc.2004.11.002.
- Koberg, M., M. Cohen, A. Ben-Amotz e A. Gedanken, 2011. Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation, *Bioresource Technology* 102:4265-4269, doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.004.
- Lam, M.K. e K.T. Lee, 2012. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances* 30:673-690, doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.11.008.
- Lam, M.K., K.T. Lee e A.R. Mohamed, 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review, *Biotechnology Advances* 28:500-518, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.03.002.
- Lee, A.K., D.M. Lewis e P.J. Ashman, 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements, *Biomass and Bioenergy* 46:89-101, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*, 4th ed., Cambridge Press University, New York.
- Lee, R.E., 2008. *Phycology*, 4th ed., Cambridge Press University, New York.

- Leung, D.Y.C., X. Wu e M.K.H. Leung, 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, *Applied Energy* 87:1083-1095, doi: 10.1016/j.apenergy.2009.10.006.
- Li, Y., S. Lian, D. Tong, R. Song, W. Yang, Y. Fan, R. Qing e C. Hu, 2011. One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg-Zr catalyst, *Applied Energy* 88:3313-3317, doi: 10.1016/j.apenergy.2010.12.057.
- Liang, Y., N. Sarkany, Y. Cui e J.W. Blackburn, 2010. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation 101:6745-6750, doi: 10.1016/j.biortech.2010.03.087.
- Liu, C., T. Liu, W. Zhang, X. Chen e J. Wang, 2012. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion, *Bioresource Technology* 111:208-214, doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.033.
- Liu, K.-S., 1994. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71:1179-1187, doi: 10.1007/BF02540534.
- López, C.V.G., M.d.C.C. García, F.G.A. Fernández, C.S. Bustos, Y. Chisti e J.M.F. Sevilla, 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresource Technology* 101:7587-7591, doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.077.
- Lourenço, S.O., E. Barbarino, P.L. Lavín, U.M.L. Marquez e E. Aidar, 2004. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors, *European Journal of Phycology* 39:17-32, doi: 10.1080/0967026032000157156.
- Lubián, L.M., O. Montero, I. Moreno-Garrido, I.E. Huertas, C. Sobrino, M. González-del Valle e G. Parés, 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments, *Journal of Applied Phycology* 12:249-255, doi: 10.1023/A:1008170915932.
- Ma, F. e M.A. Hanna, 1999. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology* 70:1-15, doi: 10.1016/S0960-8524(99)00025-5.
- MacDougall, K.M., J. McNichol, P.J. McGinn, S.J.B. O'Leary e J.E. Melanson, 2011. Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:2609-2616, doi: 10.1007/s00216-011-5376-6.

- Mandal, S. e N. Mallick, 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology* 84:281-291, doi: 10.1007/s00253-009-1935-6.
- Mandal, S., R. Patnaik, A.K. Singh e N. Mallick, 2013. Comparative assessment of various lipid extraction protocols and optimization of transesterification process for microalgal biodiesel production, *Environmental Technology* 34:2009-2018, doi: 10.1080/09593330.2013.827730.
- Marchetti, J.M., V.U. Miguel e A.F. Errazu, 2007. Possible methods for biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 11:1300-1311, doi: 10.1016/j.rser.2005.08.006.
- Mariotti, F., D. Tomé e P.P. Mirand, 2008. Converting nitrogen into protein – beyond 6,25 and Jones' Factors, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:177-184, doi: 10.1080/10408390701279749.
- Martínez, M.E., S. Sánchez, J.M. Jiménez, F. El Yousfi e L. Muñoz, 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology* 73:263-272, doi: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2.
- Matos, C.T., M. Santos, B.P. Nobre e L. Gouveia, 2013. *Nannochloropsis* sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for biodiesel and pigment production, *Bioresource Technology* 134:219-226; doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.034.
- McNichol, J., K.M. MacDougall, J.E. Melanson e P.J. McGinn, 2012. Suitability of Soxhlet extraction to quantify microalgal fatty acids as determined by comparison with in situ transesterification, *Lipids* 47:195-207, doi: 10.1007/s11745-011-3624-3.
- Metting Jr, F.B., 1996. Biodiversity and application of microalgae, *Journal of Industrial Microbiology* 17:477-489, doi: 10.1007/BF01574779.
- Miranda, J.R., P.C. Passarinho e L. Gouveia, 2012a. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production, *Bioresource Technology* 104:342-348, doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.059.
- Miranda, J.R., P.C. Passarinho e L. Gouveia, 2012b. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production, *Applied Microbiology and Biotechnology* 96:555-564, doi: 10.1007/s00253-012-4338-z.
- Moazami, N., A. Ashori, R. Ranjbar, M. Tangestani, R. Eghtesadi e A.S. Nejad, 2012. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*, *Biomass and Bioenergy* 39:449-453, doi: 10.1016/j.biombioe.2012.01.046.

- Moazami, N., R. Ranjbar, A. Ashori, M. Tangestani e A.S. Nejad, 2011. Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island, *Biomass and Bioenergy* 35:1935-1939, doi: 10.1016/j.biombioe.2011.01.039.
- Mohr, S.H. e G.M. Evans, 2011. Long term forecasting of natural gas production, *Energy Policy* 39:5550-5560, doi: 10.1016/j.enpol.2011.04.066.
- Monteiro, C.M., P.M.L. Castro e F.X. Malcata, 2009. Use of the microalga *Scenedesmus obliquus* to remove cadmium cations from aqueous solutions, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:1573-1578, doi: 10.1007/s11274-009-0046-y.
- Motasemi, F. e F.N. Ani, 2012. A review on microwave-assisted production of biodiesel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:4719-4733, doi: 10.1016/j.rser.2012.03.069.
- Mussnug, J.H., V. Klassen, A. Schlüter e O. Kruse, 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *Journal of Biotechnology* 150:51-56, doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.030.
- Nelson, D.L. and M.M. Cox, 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W.H. Freeman.
- Nitsan, Z., S. Mokady e A. Sukenik, 1999. Enrichment of poultry products with ω 3 fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and mantur oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:5127-5132, doi: 10.1021/jf981361p.
- Nobre, B.P., F. Villalobos, B.E. Barragán, A.C. Oliveira, A.P. Batista, P.A.S.S. Marques, R.L. Mendes, H. Sovová, A.F. Palavra e L. Gouveia, 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.
- Olmstead, I.L.D., D.R.A. Hill, D.A. Dias, N.S. Jayasinghe, D.L. Callahan, S.E. Kentish, P.J. Scales e G.J.O. Martin, 2013. A quantitative analysis of microalgal lipids for optimization of biodiesel and omega-3 production, *Biotechnology and Bioengineering* 110:2096-2104, doi: 10.1002/bit.24844.
- Owen, N.A., O.R. Inderwildi e D.A. King, 2010. The status of conventional world oil reserves—Hype or cause for concern?, *Energy Policy* 38:4743-4749, doi: 10.1016/j.enpol.2010.02.026.
- Pal, D., I. Khozin-Goldbert, Z. Cohen e S. Boussiba, 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp., *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:1429-1441, doi: 10.1007/s00253-011-3170-1.
- Park, J.B.K., R.J. Craggs e A.N. Shilton, 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, *Bioresource Technology* 102:35-42, doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.158.

- Patil, P.D., V.G. Gude, A. Mannarswamy, P. Cooke, S. Munson-McGee, N. Nirmalakhandan, P. Lammers e S. Deng, 2011. Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology, *Bioresource Technology* 102:1399-1405, doi: 10.1016/j.biortech.2010.09.046.
- Picardo, M.C., J.L. de Medeiros, J.G.M. Monteiro, R.M. Chaloub, M. Giordano e O.d.Q.F. Araújo, 2013. A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications, *Clean Technologies and Environmental Policy* 15:275-291, doi: 10.1007/s10098-012-0508-z.
- Rodolfi, L., G.C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini e M.R. Tredici, 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering* 102:100-112, doi: 10.1002/bit.22033.
- Rutledge, D., 2011. Estimating long-term world coal production with logit and probit transforms, *International Journal of Coal Geology* 85:23-33, doi: 10.1016/j.coal.2010.10.012.
- Safi, C., M. Charton, O. Pignolet, F. Silvestre, C. Vaca-Garcia e P.-Y. Pontalier, 2013. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors, *Journal of Applied Phycology* 25:523-529, doi: 10.1007/s10811-012-9886-1.
- Shenk, P.M., S.R. Thomas-Hall, E. Stephens, U.C. Marx, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse e B. Hankamer, 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *BioEnergy Research* 1:20-43, doi: 10.1007/s12155-008-9008-8.
- Singh, U.B. e A.S. Ahluwalia, 2013. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18:73-95, doi: 10.1007/s11027-012-9393-3.
- Uduman, N., Y. Qi, M.K. Danquah, G.M. Forde e A. Hoadley, 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels, *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, doi: 10.1063/1.3294480.
- Ugwu, C.U., H. Aoyagi e H. Uchiyama, 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresource Technology* 99:4021-4028, doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.046.
- Veljković, V.B., J.M. Avramović e O.S. Stamenković, 2012. Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: state of the art and the perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:1193-1209, doi: 10.1016/j.rser.2011.11.022.

- Wahidin, S., A. Idris e S.R.M. Shaleh, 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp., *Bioresource Technology* 129:7-11, doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.032.
- Whalen, B.D., R.M. Willis e L.C. Seefeldt, 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae cyanobacteria and wild mixed-cultures, *Bioresource Technology* 102:2724-2730, doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.026.
- Wiltshire, K.H., M. Boersma, A. Möller e H. Buhtz, 2000. Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae), *Aquatic Ecology* 34:119-126, doi: 10.1023/A:1009911418606.
- Xiong, W., C. Gao, D. Yan, C. Wu e Q. Wu, 2010. Double CO₂ fixation in photosynthesis – fermentation model enhances algal lipid synthesis for biodiesel production, *Bioresource Technology* 101:2287-2293, doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.041.
- Zamalloa, C., N. Boon e W. Verstraete, 2012. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions, *Applied Energy* 92:733-738, doi: 10.1016/j.apenergy.2011.08.017.
- Zitelli, G.C., F. Lavista, A. Bastianini, L. Rodolfi, M. Vincenzini e M.R. Tredici, 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors, *Journal of Biotechnology* 70:299-312, doi: 10.1016/S0168-1656(99)00082-6.

Anexo 1

Tabela A.1 – Composição do meio de cultura utilizado para a *Scenedesmus obliquus* (meio Bristol).

Nutriente	Concentração no meio Bristol
Nitrato de sódio	250 mg/L
Dihidrogenofosfato de potássio	175 mg/L
Hidrogenofosfato de potássio	75 mg/L
Sulfato de magnésio heptahidratado	75 mg/L
Sal de ferro do ácido etilenodiaminatetracético	60 mg/L
Cloreto de cálcio dihidratado	33 mg/L
Cloreto de sódio	25 mg/L
Ácido bórico	2,86 mg/L
Sulfato de manganésio tetrahidratado	2,03 mg/L
Sulfato de zinco heptahidratado	220 µ/L
Sulfato de cobalto heptahidratado	90 µ/L
Molibdato de sódio	60 µ/L
Sulfato de cobre	50 µ/L

Esta biomassa (*S. obliquus*) foi cultivada numa lagoa fotossintética do tipo raceway com volume de 4500 L e área útil de 40 m² composta por cimento revestido por lona.

Tabela A.2 – Composição do meio de cultura utilizado para a *Nannochloropsis* sp. (meio GPM modificado).

Nutriente	Concentração no meio GPM modificado
Nitrato de potássio	200 mg/L
Fosfato dipotássico	38 mg/L
Ácido bórico	34 mg/L
Na ₂ EDTA	30 mg/L
Cloreto de manganês (II) tetrahidratado	4,30 mg/L
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	1,45 mg/L
Cloreto de zinco	0,30 mg/L
Cloreto de cobalto (II) hexahidratado	0,13 mg/L

Esta biomassa (*Nanno.*) foi cultivada em sacos de polietileno de 10 L, agitados por ar a uma temperatura constante de 25°C e sobre uma intensidade luminosa de 25,7μmol/μEinsteins.

Anexo 2

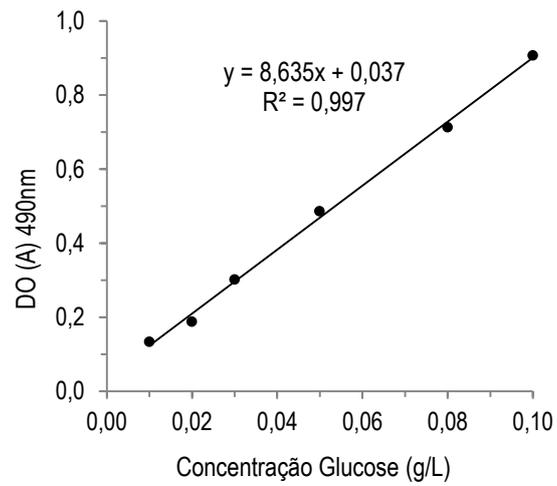


Fig. A.1 – Recta de calibração utilizada para a determinação do teor de açúcares totais da *Scenedesmus obliquus* e da *Nannochloropsis* sp..

Anexo 3

As soluções utilizadas e os métodos utilizados para a determinação do teor de azoto total foram baseados nos *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* encontrando-se as soluções já preparadas.

- Reagente de digestão (134 g K_2SO_4 + 650 mL água + 200 mL H_2SO_4 . + 2g HgO/25 mL H_2SO_4 6N. Solução diluída a 1 L.)
- Reagente de hidróxido de sódio-tiosulfato de sódio (500 g NaOH + 25 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O/L$)
- Solução indicadora mista (vermelho de metilo 200 mg/100mL EtOH + azul de metileno 100 mg/50mL EtOH)
- Solução indicadora de ácido bórico (20 g H_3BO_3 + 10 mL solução indicadora mista, diluir a 1L)
- Solução titulante padrão de H_2SO_4 0.02 N (0.54 mL/L) ou 0.1 N (2.66 mL/L).