

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



Utilização de tecnologias *low cost* para a produção,
colheita e secagem de biomassa microalgal:
comparação com as tecnologias convencionais

Patrícia Filomena Carramão Leitão

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

2015

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



Utilização de tecnologias *low cost* para a produção,
colheita e secagem de biomassa microalgal:
comparação com as tecnologias convencionais

Patrícia Filomena Carramão Leitão

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Trabalho realizado sob a supervisão de

Doutora Cristina Oliveira (Prof. Auxiliar da FCUL e Investigadora Auxiliar do LNEG)

Doutora Luísa Gouveia (Investigadora Auxiliar do LNEG)

2015

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade da produção, colheita e secagem da biomassa microalgal de *Neochloris oleoabundans* com recurso a tecnologias de baixo custo. Adicionalmente, estudou-se a viabilidade da biomassa produzida em reatores de colunas de bolhas, em manga de polietileno e num fotobioreator planar alveolar, como matéria-prima para a produção de biodiesel.

Foi estudada a influência do tipo de iluminação no crescimento da microalga, sendo que as lâmpadas LED's conduziram a uma economia de 54,8% de energia face à iluminação com lâmpadas fluorescentes. No método de recolha da biomassa, a eletrocoagulação originou poupanças energéticas máximas de 71,8% e de 79,8% para culturas não salinas e salinas, respetivamente, em comparação com a centrifugação (usada como único método de colheita). Para a secagem da biomassa, a utilização de um secador solar permitiu uma poupança de energia de 80%, comparativamente à estufa.

A biomassa microalgal que apresentou teores lipídicos mais elevados foi obtida em reatores de colunas de bolhas, com adição de 15 g/l de NaCl desde o início da cultura (lâmpadas fluorescentes) e 15 g/l de NaCl após escassez de nitratos (lâmpadas LED's), tendo como valores 0,434 g lípidos/l cultura e 0,253 g lípidos/l cultura, respetivamente.

A fração lipídica mostrou ser essencialmente constituída por ácidos gordos insaturados, em particular C16:0, C18:1 e C18:2 mas, nalgumas condições, também C18:0 e C18:3 em quantidades apreciáveis. No geral, os teores de ácido linolénico (C18:3) e o índice de iodo das diferentes culturas mostraram estar dentro das especificações da norma europeia EN 14214 (< 12% e 120 g I₂/100 g, respetivamente).

Palavras-chave: *Neochloris oleoabundans*, eletrocoagulação, secador solar, lâmpadas LED's.

Abstract

The goal of the present work was to evaluate the viability of low cost technologies to culturing, harvesting and dewatering the microalga *Neochloris oleoabundans* biomass to biodiesel production.

It has been analyzed the influence of the type of illumination on the microalgae growth, which lead to an energy economy of 54,8% when using LED's to illuminate the cultures, compared to the illumination with fluorescent bulbs. The electrocoagulation, as an innovative harvesting method has originated a maximum energetic saving of 71,8% and 79,8% for saline and non-saline cultures, respectively, in comparison with the centrifugation (used as the only harvesting method). Concerning the biomass drying, the use of a solar drier, has allowed an energy economy of 80% compared to the oven.

The microalgae biomass, which presented the highest lipid content was obtained in bubble column reactors with the addition of 15 g/l NaCl since the beginning of the culture (fluorescent bulbs) and 15 g/l of NaCl after the nitrate depletion (LED's bulbs), having as results 0,434 g lipids/l culture and 0,253 g lipids/l culture, respectively.

The lipid fraction, revealed to be essentially composed by unsaturated fatty acids, particularly C16:0, C18:1 and C18:2 but in some conditions, also C18:0 e C18:3 in appreciable quantities. In generally, the linolenic acid (C18:3) amount and the iodine value of de different cultures proved to be according to the specifications of the European Standard EN 14214 (< 12% and 120 g I₂/100 g, respectively).

Key-Words: *Neochloris oleoabundans*, electrocoagulation, solar drier, LED's bulbs.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de um conjunto de pessoas. Assim, gostaria de deixar o meu agradecimento:

Às minhas orientadoras, a Doutora Cristina Oliveira e a Doutora Luísa Gouveia, pela oportunidade da realização deste estágio na Unidade de Bioenergia do LNEG. Obrigada por me deixarem fazer o meu trabalho de uma forma autónoma, dando-me espaço para me aventurar, pelos conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa, pela paciência e pelo tempo dispendido.

À Graça Gomes e Natércia Santos pelos conselhos e ajuda prestada ao longo do trabalho laboratorial e pelos momentos de bolachas e gomas.

À Doutora Paula Passarinho por partilhar o seu conhecimento comigo e por me guiar no “bichinho” cromatógrafo iónico.

A todos os investigadores, estagiários, bolseiros e funcionários da Unidade de Bioenergia do LNEG, em especial aos colegas de gabinete e laboratório, pelo apoio, motivação e pelos bons momentos que passámos no LNEG.

Obviamente que não posso deixar de agradecer aos meus pais, aos meus manos Du e David, à Anita e à Ju, por me terem proporcionado afetos, por me terem dado estabilidade e apoiado no meu percurso académico e que roubou tempo perto de vós.

E por último e como não podia deixar de ser ao Gil, à pessoa mais importante da minha vida, pela coragem que me transmitiu ao longo deste tempo. Obrigado meu pequeno gigante pela partilha, cumplicidade e ternura.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Evolução dos biocombustíveis na União Europeia e em Portugal	2
1.2 Biodiesel: qualidade e propriedades.....	3
2. Microalgas para a produção de biodiesel	7
2.1 Definição de microalgas.....	7
2.2 Vantagens e inconvenientes das microalgas	7
2.3 Parâmetros de cultivo	8
2.3.1 Luz: lâmpadas LED's.....	9
2.3.2 Luz: lâmpadas fluorescentes	10
2.3.3 Temperatura	11
2.3.4 Nutrientes	11
2.3.5 pH.....	12
2.4 Salinidade	12
2.5 Sistemas de cultivo das microalgas.....	12
2.5.1 Fotobioreatores fechados.....	12
2.5.2 Tanques abertos.....	13
2.6 Colheita da biomassa das microalgas	14
2.6.1 Eletrocoagulação/Eletrofloculação.....	15
2.6.2 Centrifugação	16
2.7 Secagem de biomassa de microalgas	16
2.7.1 Estufa.....	17
2.7.2 Secador solar	17
3. Microalga: <i>Neochloris oleoabundans</i>	18
4. Materiais e métodos	19
4.1 Microalga: <i>Neochloris oleoabundans</i>	19
4.2 Meio de cultura	19
4.3 Crescimento da microalga.....	19

4.3.1 Reator de coluna de bolhas.....	19
4.3.2 Manga de plástico.....	20
4.3.3 Fotobioreator planar alveolar	21
4.4 Métodos.....	22
4.4.1 Avaliação do crescimento da cultura.....	22
4.4.2 Colheita da biomassa microalgal.....	23
4.4.2.1 Centrifugação	23
4.4.2.2 Eletrocoagulação	23
4.4.3 Secagem da biomassa microalgal.....	24
4.4.3.1 Estufa.....	24
4.4.3.2 Secador solar	25
4.4.4 Rutura celular e extração de lípidos da biomassa microalgal.....	25
4.4.5 Caracterização da fração lipídica	26
4.4.5.1 Composição em ácidos gordos	26
4.4.5.2 Índice de iodo	27
5. Resultados e discussão	28
5.1 Crescimento de <i>Neochloris oleoabundans</i>	28
5.1.1 Reator de colunas de bolhas: iluminação com lâmpadas fluorescentes	28
5.1.2 Reator de colunas de bolhas: iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED's	32
5.1.3 Reator de manga de polietileno: iluminação com lâmpadas fluorescentes	35
5.1.4 Fotobioreator planar alveolar: iluminação com lâmpadas fluorescentes.....	36
5.1.5 Consumos energéticos.....	37
5.2 Colheita de biomassa microalgal de <i>Neochloris oleoabundans</i>	38
5.2.1 Centrifugação vs eletrocoagulação e centrifugação	38
5.3 Secagem da biomassa microalgal de <i>Neochloris oleoabundans</i>	42
5.3.1 Secador solar vs estufa	42
5.4 Caracterização da fração lipídica da biomassa microalgal de <i>Neochloris oleoabundans</i> .	44
5.4.1 Composição em ácidos gordos	44
5.4.2 Índices de iodo	47
6. Conclusões	49

7. Referências.....	51
Anexo 1: Protocolo de meio <i>Brytol</i>	59
Anexo 2: Preparação das soluções padrão para o cromatógrafo iônico	61
Anexo 3: Preparação do eluente para o cromatógrafo iônico.....	62

Índice de figuras

Fig. 1 - Contributo das fontes de energia discriminando as fontes de energia renovável no consumo de energia final em Portugal em 2012 (DGEG 2014).....	1
Fig. 2- Tendência do consumo de biocombustíveis na União Europeia (U.E.-28) para o sector dos transportes (ktep) (EurObserv'ER, 2014)	3
Fig. 3 – Exemplo de fotobioreatores fechados. Da esquerda para a direita: FBR's planares, tubulares e de colunas.	13
Fig. 4 - Tanque aberto	14
Fig. 5 - <i>Neochloris oleoabundans</i> ao microscópio.....	18
Fig. 6 – Esquema da disposição das lâmpadas (a amarelo) relativamente ao reator de coluna de bolhas, em diferentes ensaios (A e B).	20
Fig. 7 – Manga de plástico de polietileno com cultura de <i>N. oleoabundans</i>	21
Fig. 8 – Fotobioreator planar alveolar com cultura de <i>N. oleoabundans</i> e a disposição das lâmpadas fluorescentes.....	21
Fig. 9 – Filtração de uma amostra de cultura, para determinação do peso seco.....	22
Fig. 10 – Biomassa de <i>N. oleoabundans</i> antes (A) e após (B) centrifugação.	23
Fig. 11 – Início da eletrocoagulação de <i>N. oleoabundans</i> e respetivo sistema de eletrocoagulação (figura da esquerda.) e <i>N. oleoabundans</i> após a eletrocoagulação (figura da direita).....	24
Fig. 12 – Biomassa de <i>N. oleoabundans</i> antes (figura da esquerda) e após (figura da direita) a secagem na estufa.....	24
Fig. 13 – Esquema (à esquerda) e foto (à direita) do secador solar SECMAD (adaptado de (Ferreira <i>et al.</i> , 2015)).....	25
Fig. 14 – Extração da fração lipídica presente na biomassa microalgal em Soxhlet (figura da esquerda) e evaporação do hexano no rotavapor (figura da direita).	26
Fig. 15 – Separação de fases no final do tratamento da amostra pelo método do trifluoreto de boro.	27
Fig. 16 – Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de <i>N. oleoabundans</i> , realizadas em reatores de colunas de bolhas, com 10 g/l de NaCl desde o início da cultura (●) e com 10 g/l de NaCl adicionada após escassez de nitratos (21º dia) (▲).	29
Fig. 17 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de <i>N. oleoabundans</i> , realizadas em reatores de colunas de bolhas, com diferentes concentrações iniciais de NaCl (g/l): 5 (■), 10 (●) e 15 (◆) e para 10g/l de NaCl adicionada ao 8º dia após inoculação (▲).	31
Fig. 18 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de <i>N. oleoabundans</i> iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED'S, realizadas em reatores de colunas de bolhas com 15 g/l de NaCl desde o início da cultura (▲ e X, respetivamente), com 15 g/l de NaCl adicionada após escassez de nitratos (8º dia) (■ e ●, respetivamente) e sem NaCl (◆ e +, respetivamente).	33
Fig. 19 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) de uma cultura de <i>N. oleoabundans</i> sem stress numa manga de plástico.....	35
Fig. 20 – Observação microscópica da cultura de <i>N. oleoabundans</i> obtida do fotobioreator planar alveolar onde se observa a presença de <i>Scenedesmus obliquus</i>	36
Fig. 21 - Crescimento (A) e variação de pH (B) de uma cultura de <i>N. oleoabundans</i> sem stress num fotobioreator planar alveolar.	37
Fig. 22 - Consumos energéticos diários das lâmpadas fluorescentes e LED's.....	38
Fig. 23 – Consumos energéticos, por amostra, nos equipamentos utilizados no processo de extração da fração lipídica.....	38
Fig. 24 – Cultura de <i>N. oleoabundans</i> antes (A) e após (B) o processo de EC em meio salino, para uma corrente de 0,3 A, durante 15 minutos.	39
Fig. 25 – Estimativa do consumo energético para diferentes cenários de colheita de microalgas salinas e não salinas, por metro cúbico de cultura.	42
Fig. 26 – Evolução da temperatura ambiente (●●●) e interior do secador solar (—), da radiação no plano horizontal (▲) e inclinado (■), durante o processo de secagem da biomassa microalgal.	43

Fig. 27 – Consumo energético no processo de secagem usando estufa e o secador solar..... 43
Fig. 28 - Composição dos principais ácidos gordos (%m/m) das culturas de *N. oleoabundans* em reatores de colunas, com 5 (▣), 10 (▤) e 15 (▥) g/l de NaCl desde o início da cultura. 45

Índice de tabelas

Tabela 1 - Metas de incorporação de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários em Portugal (Decreto-lei nº 6/2012).....	2
Tabela 2 - Propriedades e respetivos métodos de alguns parâmetros da qualidade de biodiesel pela norma EN 14214 (EN 14214, 2012).	6
Tabela 3 – Valores dos factores correspondentes a cada éster metílico. Nos ésteres metílicos saturados o x representa um algarismo não definido (adaptado de (EN 16300, 2013)).....	27
Tabela 4 - Influência da presença de NaCl no teor de lípidos produzidos pela microalga <i>N. oleoabundans</i> , em reatores de colunas de bolhas.....	30
Tabela 5 - Teor em lípidos das culturas de <i>N. oleoabundans</i> em reatores de colunas de bolhas, iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's.....	34
Tabela 6 – Eficiências de recuperação de biomassa por EC de culturas de <i>N. oleoabundans</i> com uma densidade de corrente de 25 mA/cm ² e após 30 minutos de repouso.....	40
Tabela 7 - Volumes e consumos energéticos de centrifugação e eletrocoagulação para diferentes cenários em culturas de <i>N. oleoabundans</i>	41
Tabela 8 - Poupança energética dos processos de centrifugação e eletrocoagulação para diferentes cenários em culturas de <i>N. oleoabundans</i>	41
Tabela 9 – Secagem em estufa.	42
Tabela 10 - Composição em ácidos gordos (% m/m) das culturas de <i>N. oleoabundans</i> , nos reatores de colunas de bolhas.....	44
Tabela 11 - Perfil de ácidos gordos de biomassa microalgal de <i>N. oleoabundans</i> proveniente do fotobioreator planar e do reator de manga de plástico, com secagem da biomassa em estufa e num secador solar.....	46
Tabela 12 - Perfil de ácidos gordos de culturas de <i>N. oleoabundans</i> iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's em reatores de colunas de bolhas.....	47
Tabela 13 – Índice de iodo das várias frações lipídicas extraídas da biomassa microalgal.	48

Símbolos e abreviaturas

C16:0 – Ácido palmítico

C18:1 – Ácido oleico

C18:2 – Ácido linoleico

C18:3 – Ácido linolénico

CH₄ – Metano

CO₂ – Dióxido de carbono

DC – *Direct current* (corrente contínua)

DGEG – Direção Geral de Energia e Geologia

DO – Densidade ótica

EC – Eletrocoagulação

FAME – *Fatty acid methyl ester* (Éster metílico de ácido gordo)

FBR – Fotobioreator

FCUL – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

FER – Fonte de energia renovável

g – Grama

h – Hora

GEE – Gases de efeito de estufa

ISP – Imposto sobre produtos petrolíferos

kWh – Quilowatt hora

ktep – Quilotonelada equivalente de petróleo

l – Litro

LCA – *Life Cycle Assessment* (avaliação do ciclo de vida)

LED – *Light-Emitting Diode* (Díodo emissor de luz)

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia

mA/cm² – Miliamperes por centímetro quadrado

máx. – Máximo

m³ – Metros cúbicos

mg – Miligrama

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

n.d. – Não detetado

N. oleoabundans – *Neochloris oleoabundans*

NO_x – Óxido de azoto

Rpm – Rotações por minuto

TAG – Triacilglicerol

tep – Tonelada equivalente de petróleo

U.E. – União Europeia

1. Introdução

A partir da 2ª Guerra Mundial os combustíveis fósseis contribuíram para melhorar a qualidade de vida e para o desenvolvimento a vários níveis, como nos transportes e na geração de eletricidade. Contudo, a preocupação com a escassez dos combustíveis fósseis, o acelerado aquecimento global provocado por estes, o aumento do preço do petróleo e o crescimento rápido da industrialização, tem levado a um crescente interesse em todo o mundo nas fontes de energia renováveis (FER). Segundo dados da Direção Geral de Energia e Geologia (DGEG), em 2012 a contribuição das FER no consumo de energia em Portugal foi de 24 %. Das FER, 55% teve origem na biomassa, 33 % foi da responsabilidade da hidroeletricidade, eólica e fotovoltaica e 7% dos biocombustíveis (Fig. 1) (DGEG, 2014).

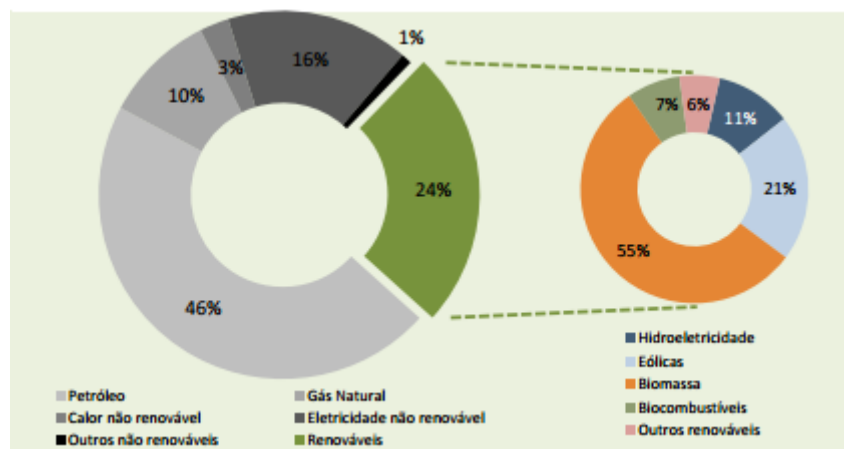


Fig. 1 - Contributo das fontes de energia discriminando as fontes de energia renovável no consumo de energia final em Portugal em 2012 (DGEG 2014).

Uma das alternativas para a redução da dependência do petróleo, reduzindo as emissões de gases de efeito de estufa (GEE), principalmente de CO₂ e CH₄ são os biocombustíveis (Dragone *et al.*, 2010). De acordo com a definição do Decreto-lei nº 62/2006, biocombustível é um “combustível líquido ou gasoso para transportes, produzido a partir de biomassa”, na qual biomassa é definida como sendo a “fração biodegradável de produtos e resíduos provenientes da agricultura (incluindo substâncias vegetais e animais), da silvicultura e das indústrias conexas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos”. Na União Europeia o principal biocombustível produzido tem sido o biodiesel (Bianchi-de-Aguiar e Pereira, 2010), o qual é definido segundo o mesmo Decreto-lei, como o “éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores *diesel*, para utilização como biocombustível”.

Vários estudos têm mostrado que a biomassa de microalgas pode ser uma fonte promissora de matéria-prima para a produção de biodiesel, particularmente se enquadrada num contexto de biorefinaria (Chisti, 2007; Dragone *et al.*, 2010). As microalgas têm imensas vantagens associadas, quando comparadas com as culturas oleaginosas tradicionalmente utilizadas para o mesmo fim, tais como: fixarem cerca de dez vezes mais CO₂, acumularem elevadas quantidades de lípidos, purificarem águas residuais e removerem CO₂ dos gases industriais através da biofixação reduzindo, desta forma, as emissões de GEE de uma empresa ou processo, enquanto produzem matéria-prima para biocombustíveis. Para além disso, as microalgas não necessitam de solos aráveis, a sua colheita não é sazonal e não necessitam de água potável para o seu desenvolvimento (Khan *et al.*, 2009; Mata *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2012).

1.1 Evolução dos biocombustíveis na União Europeia e em Portugal

A partir de 1997, devido à preocupação crescente com as alterações climáticas, a União Europeia (U.E.) estabeleceu o objetivo de aumentar o consumo de energia proveniente de fontes renováveis de 6%, valor desse ano, para 12% do consumo total de energia, até 2010 (European Commission, 1997).

Em 2003, a U.E. publicou a “Diretiva dos biocombustíveis” (Diretiva 2003/30/CE) devido ao facto de o sector dos transportes ser na altura, e ainda é, um sector preocupante relativamente ao consumo crescente de energia, ao uso de petróleo e consequentemente, das suas emissões de poluentes. Essa Diretiva foi transposta para a ordem jurídica nacional em 2006 (DL n° 62/2006), tendo como metas indicativas a incorporação de 2 % e 5,75 % de biocombustíveis no consumo total de toda a gasolina e gasóleo utilizados para efeitos de transporte, nos anos de 2005 e 2010, respetivamente. Esta legislação impulsionou o início da produção de biocombustíveis em Portugal, mais concretamente de biodiesel.

Com o mesmo objetivo foi ainda publicado, em 2006, o Decreto-lei n° 66/2006 que veio estabelecer a isenção parcial ou total do imposto sobre os produtos petrolíferos (ISP) nos biocombustíveis utilizados nos transportes, quando incorporados na gasolina e no gasóleo.

Devido às prioridades estabelecidas pelos diferentes estados membros, o cumprimento do objetivo estabelecido para 2010 pela diretiva de 2003, estava longe de ser cumprido. De tal forma que, em março de 2007, o Conselho Europeu estabeleceu os “Objetivos 3x20”, que consistiam na redução de emissões de GEE em 20%, no aumento do consumo de energia a partir de fontes renováveis para 20% e no aumento da eficiência energética diminuindo 20% o consumo total de energia, até 2020. Uma das metas era integrar 10% de fontes renováveis, principalmente de biocombustíveis (desde que produzidos de forma sustentável), no sector dos transportes também até 2020.

De modo a acompanhar a evolução da introdução de biocombustíveis no sector dos transportes, entre 2008 e 2009 foram publicados vários Decretos-lei e Portarias na legislação nacional.

Em 2009, para reforçar os “Objetivos 3 x 20”, mais concretamente estabelecer metas na utilização de biocombustíveis e nas emissões de GEE, a U.E. publicou a Diretiva 2009/28/EC, a qual destacava que para as metas de incorporação apenas são contabilizados os biocombustíveis produzidos de forma sustentável ou seja, que cumpram os requisitos relativos à redução da emissão de GEE e ao uso dos solos. Em termos de GEE, e até dezembro de 2016, devem contribuir com uma redução de pelo menos 35% dessas emissões, em comparação com o combustível fóssil que visam substituir. Ainda de acordo com esta diretiva, tal percentagem deverá aumentar para 50% a partir de 1 de janeiro de 2017. A 25 de outubro de 2010 os artigos 17° a 19° e os anexos III e V desta diretiva foram transpostos para a ordem jurídica nacional (DL n° 117/2010). O Decreto-lei n° 6/2012 veio estabelecer as percentagens de biocombustíveis, em teor energético, a incorporar nos combustíveis rodoviários, as quais estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Metas de incorporação de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários em Portugal (Decreto-lei n° 6/2012).

Anos	2013-2014	2015-2016	2017-2018	2019-2020
Incorporação de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários (%)	5,5	7,5	9,0	10,0

Desde o início da implementação da legislação dos biocombustíveis na U.E., em 2003, que o consumo de biocombustíveis foi aumentando, até cerca de 10 vezes o consumo inicial, em 2012. Entre 2012 e 2013 verificou-se uma queda de 6,8% no consumo dos biocombustíveis (Fig. 2),

acontecimento que poderá ter estado relacionado com a quebra do consumo de combustíveis neste último ano.

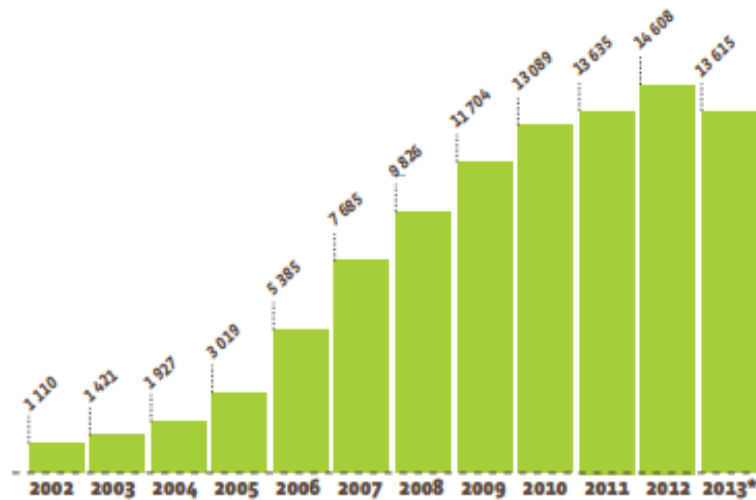


Fig. 2– Tendência do consumo de biocombustíveis na União Europeia (U.E.-28) para o sector dos transportes (ktep) (EurObserv'ER, 2014)

Dos biocombustíveis usados nos transportes na U.E., o biodiesel tem sido, como referido acima, o mais utilizado, sendo que em 2013 foram consumidos 273 582 tep, correspondendo a 79% do consumo total de biocombustíveis (EurObserv'ER, 2014).

A previsão para 2030, de acordo o EurObserv'ER 2014, relativamente à evolução dos biocombustíveis é uma grande incerteza. Isso ocorre porque em janeiro de 2014, a Comissão Europeia publicou um quadro de política energética para 2030, apenas sugerindo uma meta para esse ano de 27% de uso das energias renováveis nos transportes, mas não achou relevante impor tal meta.

1.2 Biodiesel: qualidade e propriedades

O biodiesel é uma bioenergia renovável limpa podendo ser produzido a partir de matérias-primas com elevado teor glicéridico tais como óleos vegetais, gorduras animais ou microalgas. A sua composição química resulta da combinação de uma pequena gama de moléculas, composta por ésteres de ácidos gordos de cadeia linear, maioritariamente C14, C16 e C18. Este biocombustível pode se utilizado no seu estado puro ou misturado em diferentes proporções com o gasóleo, sendo possível tal mistura devido às semelhanças nas características dos dois produtos combustíveis (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Bozbas, 2008). Desta forma, a mistura de biodiesel com gasóleo pode ser usada em motores de ignição por compressão sem a necessidade de muitas modificações (Leung *et al.*, 2010). A nomenclatura Bxx é utilizada para identificar a mistura, sendo o xx a percentagem de biodiesel presente. A título de exemplo uma mistura B80 contém 80% de biodiesel e 20% de gasóleo (Bozbas, 2008).

Dado que o biodiesel é produzido a partir de diversas matérias-primas, e de formas diferentes, foi necessário estabelecer uma padronização da qualidade deste biocombustível para garantir um adequado desempenho do motor aquando da sua utilização (Balat e Balat, 2010; Lin *et al.*, 2011). Atualmente, as propriedades e qualidades do biodiesel devem obedecer a determinadas especificações, sendo que a União Europeia se rege pela norma EN 14214 (Atadashi *et al.*, 2010). As propriedades físicas e químicas do biodiesel dependem basicamente do tipo de matéria-prima e da sua composição em ácidos gordos. De seguida, apresentam-se algumas propriedades a

considerar na qualidade do biodiesel, estando os limites de cada parâmetro indicados na Tabela 2:

- Viscosidade cinemática – indica a capacidade de fluir do biodiesel. Esta propriedade afeta o funcionamento do equipamento de injeção do combustível particularmente a baixas temperaturas, pois há um aumento da viscosidade afetando a fluidez do combustível. A viscosidade do biodiesel é 10 a 15 vezes maior do que a dos combustíveis fósseis devido à grande massa molecular e estrutura química do biodiesel (Atabani *et al.*, 2012).
- Densidade e densidade relativa – é o peso por unidade de volume. A densidade relativa é a densidade do componente em comparação à densidade da água. A densidade relativa do biodiesel é necessária para fazer conversões de massa para volume, calcular o fluxo e a viscosidade e para avaliar a homogeneidade dos tanques de biodiesel (Atabani *et al.*, 2012).
- Ponto de inflamação – é a temperatura à qual se inflama o biodiesel quando exposto a uma chama ou faísca, variando inversamente com sua volatilidade (Atabani *et al.*, 2012). O ponto de inflamação do biodiesel (mais do que 150°C) é maior do que o limite estabelecido para o *diesel* de origem fóssil (55 – 66°C), revelando que o biodiesel é mais seguro em termos de transporte, manuseamento e armazenamento (Sanford *et al.*, 2009).
- Glicerol total – indica a quantidade de triglicéridos que permanecem não convertidos em ésteres metílicos. O glicerol total é calculado a partir da quantidade de glicerol livre, monoglicéridos, diglicéridos e triglicéridos (Sanford *et al.*, 2009). Caso o biodiesel não cumpra os valores estabelecidos pela norma (Tabela 2) para o glicerol total, pode ocorrer coqueificação, causando a formação de depósitos em injetores, pistões e válvulas (Atabani *et al.*, 2012).
- Glicerol livre – indica a quantidade de glicerol que se encontra no biodiesel e depende principalmente do processo de purificação. O glicerol livre pode permanecer suspenso em gotículas ou em quantidades muito pequenas sendo dissolvido no biodiesel. Elevados valores de glicerol livre podem provocar problemas na injeção de combustível (Atabani *et al.*, 2012).
- Teor de cinza sulfatada – descreve a quantidade de contaminantes inorgânicos contidos numa amostra de biodiesel. Por outras palavras é o resíduo que fica depois de uma amostra de biodiesel ser carbonizada. Se não se cumprir o limite máximo do teor de cinza sulfatada poderá haver formação de depósitos no motor e desgaste em injetores, pistões e anéis. O biodiesel é inflamado e queimado sendo de seguido tratado com ácido sulfúrico para determinar a percentagem de cinza sulfatada nele presente (Atabani *et al.*, 2012; Leung *et al.*, 2010).
- Índice de acidez – mede os ácidos gordos livres contidos numa amostra de biocombustível. Um elevado índice de acidez pode causar corrosão no sistema de abastecimento de combustível de um motor (Atabani *et al.*, 2012).
- Teor de água – o biodiesel pode conter água em duas formas: dissolvida ou na forma de gotículas suspensas. Esta água presente no biocombustível causa geralmente problemas de corrosão dos componentes do sistema de combustível do motor, manifestando-se na forma de ferrugem. Caso a água se torne ácida com o tempo, a corrosão ácida resultante pode atacar os tanques de armazenamento de biocombustível. Também a contaminação da água com microrganismos (leveduras, fungos e bactérias) leva a que estes produzam lamas e lodos que podem causar entupimentos nos motores. Estes microrganismos ainda convertem o enxofre em ácido sulfúrico, corroendo desta forma os tanques metálicos onde o biodiesel é armazenado (Atabani *et al.*, 2012).
- Estabilidade de oxidação – é uma indicação do biodiesel relativamente ao grau de oxidação, da sua reatividade potencial com o ar e da sua necessidade de antioxidantes

(Sanford *et al.*, 2009). Devido à presença de cadeias de ácidos gordos insaturados no biodiesel leva a que ocorra oxidação em contacto com o ar (Atadashi *et al.*, 2010).

- Índice de cetano – dá a indicação da capacidade do biodiesel para autoinflamar depois de ser injetado. O número de cetano aumenta com o aumento do comprimento da cadeia dos ácidos gordos e com o aumento da saturação da matéria-prima usada (Atabani *et al.*, 2012). Um maior valor do índice de cetano está associado a uma melhor qualidade de ignição, ou seja, o tempo entre a ignição e a iniciação de injeção de biodiesel na câmara de combustão é mais curto. O biodiesel tem um índice de cetano maior do que o gasóleo convencional, resultando numa maior eficiência de combustão (Xue *et al.*, 2011).
- Resíduo carbonoso – indica a tendência de deposição de carbono presente no biodiesel depois da combustão (Sanford *et al.*, 2009).
- Corrosão à lâmina de cobre – indica a tendência de corrosão do biodiesel a peças de cobre, latão ou bronze (Sanford *et al.*, 2009). O biodiesel tem na sua constituição quantidades muito baixas de enxofre, componente presente no gasóleo e responsável pela sua corrosão. Contudo, a absorção de água e a presença de oxigénio contribuem para o aumento da corrosão do biodiesel (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).
- Ponto de turvação – é a temperatura a partir da qual se observa a formação de cristais quando o combustível é arrefecido. Desta forma, o desempenho do biodiesel fica comprometido em condições de temperaturas frias, estando este valor dependente da localização e estação do ano (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Atabani *et al.*, 2012).
- Índice de iodo – avalia o grau de insaturação do biodiesel. Ou seja, este valor é uma medida do grau de insaturação dos ácidos gordos constituintes do biodiesel e é dado em gramas de $I_2/100$ g de amostra (EN 14214, 2012). Um valor superior ao limite estabelecido para este parâmetro pela norma (EN 14214, 2012) levará a um maior potencial à degradação do biodiesel e a um baixo ponto de turvação (Rao *et al.*, 2010).
- Éster metílico do ácido linolénico – é um parâmetro que influencia a estabilidade à oxidação, ou seja, biodiesel rico em éster metílico de ácido linolénico tende a ter uma pobre estabilidade à oxidação. Este parâmetro indica o valor de éster metílico de ácido linolénico presente no biodiesel (Sokoto *et al.*, 2011).
- Ésteres metílicos polinsaturados – quanto maior é este parâmetro, menor é a estabilidade à oxidação do biodiesel e maiores são as emissões de NO_x . Este parâmetro indica o valor de ésteres metílicos polinsaturados presentes no biodiesel, ou seja, os que apresentam pelo menos quatro ligações duplas (Benjumea *et al.*, 2011; Sokoto *et al.*, 2011).

Tabela 2 - Propriedades e respetivos métodos de alguns parâmetros da qualidade de biodiesel pela norma EN 14214 (EN 14214, 2012).

Propriedade	Unidade	Limites		Método
		Mínimo	Máximo	
Conteúdo FAME	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Densidade a 15°C	kg/m ³	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade a 40°C	mm ² /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Ponto de inflamação	°C	101	-	EN ISO 2719 EN ISO 3679
Índice de cetano	-	51,0	-	EN ISO 5165
Corrosão à lâmina de cobre (3h a 50°C)	Classificação	Classe 1		EN ISO 2160
Estabilidade de oxidação, 110°C	horas	8,0	-	EN 15751 EN 14112
Índice de acidez	mg KOH/g	-	0,50	EN 14104
Índice de iodo	g iodo/100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Éster metílico do ácido linoléico	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Ésteres metílicos polinsaturados (≥ 4 ligações duplas)	% (m/m)	-	1,0	EN 15779
Ponto de turvação	-	-	Definido por cada país	EN 23015
Teor de metanol	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Teor de monoglicérido	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Teor de diglicérido	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Teor de triglicérido	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Glicerol livre	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Glicerol total	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Teor em água	mg/kg	-	500	EN ISSO 12937
Contaminação total	mg/kg	-	24	EN 12662
Teor de cinza sulfatada	% (m/m)	-	0,02	ISSO 3987
Teor de enxofre	mg/kg	-	10,0	EN ISSO 20846 EN ISSO 20884
Grupo de metais I (Na + K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Grupo de metais II (Ca + Mg)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Teor em fósforo	mg/kg	-	4,0	EN 14107 EN 16294

2. Microalgas para a produção de biodiesel

2.1 Definição de microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos procarióticos ou eucarióticos que conseguem crescer rapidamente e viver em condições rigorosas devido à sua estrutura unicelular ou multicelular simples (Mata *et al.* 2010). Estes microrganismos conseguem habitar em água doce, salgada ou salobra e podem ser autotróficos ou heterotróficos (John *et al.*, 2011). Possuem uma estrutura celular simples que está submersa num meio aquoso, tendo desta forma acesso a água, a CO₂ e a outros nutrientes para poder realizar o mecanismo fotossintético (John *et al.*, 2011).

Assim sendo, as microalgas são fundamentais para a vida na Terra, pois são a base da cadeia alimentar, contribuindo com cerca de metade do oxigénio produzido no planeta e consumindo uma parte de CO₂ presente na atmosfera (Chapman, 2010).

2.2 Vantagens e inconvenientes das microalgas

Atualmente, as microalgas representam uma forma renovável de produzir biocombustíveis, existindo muita investigação na área. Apesar de as microalgas terem impacto sobre o meio ambiente, esse impacto é muito menor do que as culturas convencionais, quando a questão é a produção de biocombustíveis.

As vantagens das microalgas em relação às culturas convencionais, cuja finalidade é a produção de biocombustíveis, são inúmeras:

- Adequação a uma variedade de climas (Clarens *et al.*, 2010) e de meios de cultura líquidos, podendo crescer por exemplo em águas residuais, águas salobras e águas salgadas (Schenk *et al.*, 2008);
- Utilização de áreas inadequadas para a agricultura, não competindo com terra arável usada para plantações para a alimentação (Rodolfi *et al.*, 2009) (Khan *et al.*, 2009);
- Quando cultivadas em águas residuais, as microalgas consomem o azoto e o fósforo, necessários para a sua cultura, funcionando como um pré-tratamento das águas residuais antes da aplicação da biorremediação¹ (Schenk *et al.*, 2008) (Rodolfi *et al.*, 2009) (Khan *et al.*, 2009);
- Conseguem crescer em fotobioreatores (FBR's) durante todo o ano (cultura não sazonal).
- Produzem maior produtividade de biomassa anual em FBR's verticais, em comparação com uma área horizontal usada para as culturas convencionais. Como a cultura é feita na vertical, consegue-se uma maior produção de biomassa por unidade de espaço horizontal utilizado (Khan *et al.*, 2009);
- As culturas podem ser induzidas para produzir uma elevada concentração de compostos para a produção de biocombustíveis (ex.: óleo, biomassa, amido) (Rodolfi *et al.*, 2009);
- Minimização do óxido nitroso libertado com a produção de biocombustíveis (Li *et al.*, 2008);

¹ A biorremediação é uma técnica que utiliza microrganismos para promover a degradação de poluentes com intenção de diminuir ou eliminar contaminantes ambientais (Silva, 2007).

- Produção de subprodutos e produtos com valor acrescentado, tais como: proteínas, polissacarídeos, pigmentos, fertilizantes, bio polímeros e alimentos para animais, resultando em menos resíduos e poluição (Khan *et al.*, 2009);
- Não necessitam de utilizar herbicidas ou pesticidas para a sua cultura (Rodolfi *et al.*, 2009);
- Uma viscosidade e densidade baixa e ainda um valor calórico elevado no biodiesel produzido (Miao e Wu, 2004);

Porém nem tudo são vantagens na produção de biodiesel a partir de biomassa microalgal. De seguida encontram-se as principais desvantagens das microalgas para produção de biocombustíveis:

- Baixa concentração da biomassa microalgal na cultura devido à limitação da penetração da luz que, em combinação com a pequena dimensão das células, leva a uma colheita relativamente cara (Li *et al.*, 2008);
- Elevado conteúdo em água nas microalgas colhidas obrigando a um consumo energético significativo para a sua secagem (Li *et al.*, 2008);
- Custos elevados em equipamentos e em cuidados para o cultivo de microalgas, em comparação com uma cultura de matéria-prima convencional (Li *et al.*, 2008);
- O biodiesel proveniente de microalgas contém muitos polinsaturados levando à instabilidade do biocombustível (Demirbas, 2011);
- Em sistemas de cultivo abertos há uma perda elevada de água por evaporação e há uma maior probabilidade de contaminações por espécies indesejadas (Khan *et al.*, 2009; Schenk *et al.*, 2008);

2.3 Parâmetros de cultivo

A otimização dos factores abióticos no cultivo de microalgas, de acordo com a finalidade da biomassa (ex.: produção de elevado teor em óleo para produção de biodiesel) é de grande complexidade, estando os diversos factores interrelacionados e podendo ser limitantes. Nestes parâmetros estão incluídos: a luz (qualidade, ciclo (luz/escuro) e intensidade), a temperatura, a concentração de nutrientes, o O₂, o pH, a salinidade, a densidade celular, a agitação da cultura, o tamanho das bolhas de gás e a sua distribuição, entre outros (Gouveia, 2011; Koc *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2010; Pulz, 2001; Schenk *et al.*, 2008).

A distribuição das bolhas de gás é um parâmetro importante na cultura de microalgas pois, permite a sua agitação. Esta mistura é necessária para prevenir a sedimentação das células das microalgas, assegurar que todas as células têm uma exposição média e uniforme à luz e aos nutrientes, facilitar a transferência de calor e evitar estratificação térmica e melhorar a troca de gás entre o meio de cultura e fase de ar (Wang *et al.*, 2012). Dependendo da escala e da escolha do sistema de cultura, a mistura pode ser realizada por arejamento, bombeamento, agitação mecânica ou uma combinação dos três mecanismos. É importante destacar que nem todas as microalgas toleram uma vigorosa agitação. As agitações mecânicas por exemplo, podem levar ao *stress* hidrodinâmico resultando num crescimento e atividade metabólica restritos. O nível ideal de turbulência (acima do qual pode ocorrer a morte celular) deve ser investigado, a fim de evitar a diminuição da produtividade (Mata *et al.* 2010; Barbosa 2003; Suh 2003).

A difusão do CO₂ do ar para o meio de cultura para substituir o CO₂ consumido pelas microalgas é muito lenta, mesmo quando a mistura é intensa. Desta forma, havendo limitação de CO₂ nas culturas das microalgas é necessário fornecer CO₂ para garantir um crescimento satisfatório das células. Pressões elevadas de CO₂ poderão conduzir a uma diminuição da taxa de crescimento

para as culturas que tenham sido adaptadas a uma baixa pressão parcial de CO₂ (Lee e Tay, 1991; Suh e Lee, 2003).

Relativamente à luz solar, esta é outro parâmetro de cultivo de grande importância. Por vezes, a luz solar pode ser demasiado forte para o cultivo de microalgas, sendo que as células das microalgas só precisam cerca 1/10 da luz solar direta (Yeh e Chung, 2009). Muitas vezes, independentemente da fonte de luz, devido a uma intensidade luminosa exagerada, as células das microalgas são incapazes de usar todos os fotões absorvidos para a realização da fotossíntese. Desta forma, este excesso de intensidade luminosa pode trazer consequências como a fotosaturação, a fotoinibição ou a foto oxidação (Koc *et al.*, 2010). Contudo, o excesso de luz também poderá induzir um aumento do conteúdo em óleo, bem como em pigmentos (Gouveia *et al.*, 1996). Porém se a intensidade luminosa for baixa, a fotossíntese será lenta, havendo uma redução da produção de biomassa. Para compensar este problema, altas intensidades luminosas ou elevadas temperaturas não são solução, pois podem inibir o crescimento de microalgas e danificar as células das mesmas (Koc *et al.*, 2010).

Segundo o estudo de (Chen *et al.*, 2011) quando se cultiva microalgas ao ar livre o rendimento em óleo usando a fonte de luz natural é entre 100 e 130 m⁻³ ha⁻¹. Em contraste, o rendimento em óleo pode chegar a 172 m⁻³ ha⁻¹ usando fontes de luz artificiais. Tal aumento deve-se à estabilidade e continuidade da fonte de luz artificial. Desta forma é cada vez mais comum haver culturas de microalgas usando fontes de iluminação artificiais, apesar de estas últimas acarretarem custos energéticos de iluminação. Duas das fontes de luz artificiais que se encontram em grande estudo e que foram estudadas neste trabalho são as lâmpadas fluorescentes e os LED's (*light emission diode*), que irão ser mencionadas de seguida.

2.3.1 Luz: lâmpadas LED's.

Os LED's, comparando com as lâmpadas fluorescentes têm: um maior tempo de vida, um menor consumo de energia, uma menor geração de calor, uma maior tolerância para ligar e desligar e ainda, conseguem reduzir o *stress* de iluminação excessiva na vida das microalgas (Chen *et al.*, 2011; Koc *et al.*, 2010). Cada cor dos LED's possui um espectro de luz estreito entre 20 e 30 nm, o qual pode ser combinado com as necessidades fotossintéticas das microalgas. Por exemplo, o comprimento de onda de adsorção do LED azul e do LED vermelho estão em torno dos 450 - 470 nm e 645 - 665 nm, respetivamente (Yeh e Chung, 2009).

(Wang *et al.*, 2007) estudaram vários LED's (branco, vermelho, amarelo, verde e azul) que correspondem aos comprimentos de onda de 380 - 760 nm, 620 - 645nm, 587 - 595 nm, 515 - 540 nm e 460 - 475 nm, respetivamente e diferentes intensidades luminosas (300, 750, 1500, 2250 e 3000 μmol m⁻² s⁻¹ respetivamente) para explorar os efeitos das fontes luminosas em culturas fotoautotróficas de *Spirulina platensis*. Os resultados revelam que o LED vermelho é o que consegue uma maior produção de biomassa e taxa de crescimento, para todas as intensidades luminosas testadas, indo ao encontro dos resultados de (Katsuda *et al.*, 2004). Estes resultados são lógicos uma vez que as bandas de absorção da clorofila a e b (662 nm e 642 nm, respetivamente) são muito próximas do comprimento de onda da luz vermelha (pico 659 nm) (Koc *et al.*, 2010). A taxa de crescimento celular obtida pela cultura iluminada com LED amarelo é maior do que a do LED verde. A principal razão destes resultados é a faixa do espectro de emissão do LED amarelo ter uma grande sobreposição com a luz vermelha, enquanto a banda do espectro da luz verde tem uma pequena sobreposição com a luz vermelha. Em contraste, o LED azul não tem qualquer sobreposição na banda de emissão com o LED vermelho, mostrando uma baixa eficiência no crescimento celular em todas as intensidades luminosas. Por outras palavras, as bandas de absorção da clorofila não estavam presentes nos comprimentos de onda da luz azul. A cultura iluminada com LED branco exibiu uma produção média de biomassa pois a luz branca é uma combinação de todos os comprimentos de onda, sendo muitos deles inapropriados para uma boa eficiência fotossintética (Schulze *et al.*, 2014).

O estudo de Yeh e Chung, (2009) mostra o efeito da intermitência de LED's vermelhos em diferentes culturas de microalgas (30 ml de cultura). O aspeto interessante que este estudo revelou é que se obtêm maiores taxas de crescimento das microalgas em luz intermitente do que apenas com luz contínua.

Abiusi *et al.* (2014) estudaram o cultivo da microalga marinha *Tetraselmis suecica* durante 9 dias. O estudo era constituído por quatro fotobioreatores planares de 2 litros, em que cada um era iluminado por um conjunto de LED's de uma cor (branco, vermelho, azul e verde). Os resultados obtidos demonstraram que a maior concentração foi da cultura iluminada por LED's brancos (1,65 g/l), seguindo a dos LED's vermelhos (1,58 g/l), a dos verdes (0,72 g/l) e por fim, a dos azuis (0,61 g/l). Relativamente à taxa de crescimento, calculada a partir do aumento do número de células, revelou-se que esta foi o dobro na cultura iluminada com luz vermelha (0,12 dia⁻¹), quando comparada com as culturas sujeitas à luz branca (0,07 dia⁻¹), azul e verde (0,06 dia⁻¹). No que diz respeito ao teor de lípidos, a cultura que produziu mais foi a que esteve sujeita à iluminação azul (21,8%), seguida da cultura iluminada com a cor branca (19%) e no mesmo patamar, as iluminadas por luz verde e vermelho (17,3%). Outro factor analisado foi a área de secção longitudinal celular, observando-se que esta área na cultura sob luz vermelha foi quase metade da área obtida pela cultura sob luz branca e cerca de 75% da cultura iluminada com luz verde ou azul. Este resultado mostra que o comprimento de onda da fonte luminosa tem também influência na morfologia das células, facto que já foi confirmado por vários autores (ex.: (Schulze *et al.*, 2014)

2.3.2 Luz: lâmpadas fluorescentes

As lâmpadas fluorescentes são geralmente fabricadas a partir de tubos longos de vidro contendo vapor de mercúrio a baixa pressão com uma pequena quantidade de um gás inerte (por exemplo árgon), sendo a maior parte da luz emitida na região do visível (400-700 nm) (Carvalho *et al.*, 2011).

(Koc *et al.*, 2010) testaram o crescimento da microalga *Chlorella kessleri* durante sete dias e com três fontes de iluminação (LED's vermelhos, LED's azuis e lâmpadas fluorescentes): (i) a intensidade de corrente foi mantida constante (2,6 mA); (ii) a intensidade luminosa foi constante (6030 lux). Em (i) a biomassa duplicou em 97 horas com o LED azul, em 41 horas com o LED vermelho e em 49 horas com as lâmpadas fluorescentes. Em (ii) a biomassa duplicou em 99 horas com o LED azul, em 96 horas com o LED vermelho e em 76 horas com lâmpadas fluorescentes. As células cultivadas com as lâmpadas fluorescentes eram menores do que as dos LED's azuis, mas equivalentes às dos LED's vermelhos (diâmetro médio 12 µm). O tamanho e forma das células das microalgas eram muito mais variadas, quando cultivadas sob a luz fluorescente do que sob o LED azul ou vermelho. Na primeira experiência, verificaram que com a luz fluorescente se obtinha uma produção de mais células do que com os LED's.

Este último resultado vai ao encontro do que foi obtido por Chen e Lee (2012), usando as microalgas *Spirulina platensis* e *Nannochloropsis oculata*. Estes autores testaram o cultivo das microalgas com luz natural, continuando a lâmpada fluorescente a produzir mais células. Relativamente ao pH, este era mais elevado nos fotobioreatores iluminados com lâmpadas fluorescentes e LED's vermelhos, indicando que as microalgas consumiam mais dióxido de carbono e cresciam mais rápido no que diz respeito ao número e tamanho de células e na quantidade de biomassa. Com este estudo conclui-se que os LED's vermelhos são mais eficazes para a realização da fotossíntese, sendo a concentração mássica celular de microalgas mais elevada (para as microalgas estudadas). Como foi mencionado anteriormente no subcapítulo dos LED's, tal deve-se ao facto de a fotossíntese necessitar de luz na vizinhança dos picos de absorção das clorofila a e b (662 nm e 642 nm, respetivamente), como é o caso da luz LED vermelha.

Comparando com os LED's, as lâmpadas fluorescentes podem permitir maiores produtividades de biomassa microalgal e apresentar uma maior estabilidade, mas tal depende da família da

microalga em questão (clorófitas, clorófitas ou rodófitas). As lâmpadas fluorescentes também podem permitir iluminar uma larga área e têm baixos custos de construção, no entanto, têm elevados consumos energéticos e custos operacionais. Relativamente aos consumos energéticos é de salientar que com a mesma intensidade de luz total, substituindo as lâmpadas fluorescentes por LED's há uma diminuição de 50% no consumo de energia elétrica. Principalmente devido ao consumo energético, o uso dos LED's é cada vez mais promissor. O aumento da eficiência fotossintética e da taxa de crescimento das microalgas a um custo menor será um passo importante para o desenvolvimento com sucesso da produção de microalgas (Chen *et al.*, 2011).

2.3.3 Temperatura

Depois da luz, a temperatura é o factor mais importante e limitativo para a cultura de microalgas. Os efeitos da temperatura para muitas espécies de microalgas em laboratório são bem estabelecidos, no entanto, a magnitude dos efeitos da temperatura em culturas exteriores ainda não está suficientemente conhecida. Muitas microalgas conseguem tolerar temperaturas 15°C abaixo do seu ideal de temperatura, mas caso se exceda a temperatura entre 2 a 4°C pode conduzir a uma perda da cultura (Mata *et al.* 2010). Conventi *et al.* (2009) estudaram o efeito do aumento da temperatura de 20°C para 25°C, na microalga *Nannochloropsis oculata*. O teor lipídico aumentou de 7,9% para 13,82% e a produtividade lipídica foi aproximadamente a mesma (≈ 10 mg/l/dia). Relativamente à taxa de crescimento esta diminuiu de $0,13 \text{ dia}^{-1}$ para $0,07 \text{ dia}^{-1}$. Os mesmos autores ainda testaram a *Chlorella vulgaris*, aumentando a temperatura de 25°C para 30°C. O teor lipídico diminuiu de 14,71% para 5,90%, acompanhado pela descida da produtividade lipídica (20 mg/l/dia para 8 mg/l/dia). A taxa de crescimento permaneceu inalterada nas duas temperaturas ($0,14 \text{ dia}^{-1}$). Com estes resultados pode-se concluir que a temperatura ideal para a produção de lípidos, taxa de crescimento e teor lipídico dependerá da microalga em causa.

2.3.4 Nutrientes

A disponibilidade dos nutrientes é um dos factores que controla os níveis de produtividade primária dos organismos fotossintéticos. Diferentes composições destes nutrientes são fornecidas às células na forma de CO₂, água e sais minerais em quantidades macro ou micro. Os macronutrientes são essenciais para o crescimento normal e neles estão incluídos: carbono, fósforo, hidrogénio, oxigénio, cálcio, magnésio, potássio de sódio, azoto e cloro. Consideram-se como micronutrientes o ferro, o boro, o cobre, entre outros e estão presentes no meio em quantidades micro, nano ou pico gramas por litro (Chen *et al.*, 2009; Dragone *et al.*, 2010).

Independentemente dos nutrientes em causa, a carência de alguns faz com que as microalgas tenham comportamentos diferentes no que diz respeito às suas reservas. Por exemplo, a carência de azoto leva a que as microalgas acumulem uma maior quantidade de lípidos, pigmentos e açúcares mas existe um menor crescimento da biomassa das microalgas. Tal é explicado porque, na ausência de azoto, não há produção de amido nas microalgas e consequentemente, não há crescimento das microalgas. Desta forma, o carbono fixado pela fotossíntese é conduzido para produzir ácidos gordos, levando a uma maior acumulação de lípidos. Sendo o amido a fonte de carbono e energia das células, quando há carência de azoto, irá esgotar-se conduzindo à redução da eficiência da fotossíntese e a uma menor produção de biomassa (Lam e Lee, 2012). A título de exemplo tem-se o caso da produção de *Neochloris oleabundans* com carência de azoto e sujeita a uma temperatura de 30°C, que atingiu um teor lipídico máximo de 56% e uma produtividade lipídica de 13,22 mg/l/dia, durante 6 dias. A mesma microalga sujeita à mesma temperatura e com a suficiente presença de azoto no meio de cultura, produziu um teor lipídico máximo de 23% e uma produtividade lipídica de 14,31 mg/l/dia, durante 9 dias. (Gouveia *et al.*, 2009).

2.3.5 pH

O pH ótimo para a maioria das espécies de microalgas cultivadas está entre 7 e 9. Contudo, há espécies que têm um pH ótimo mais na gama do ácido ou da base. A cultura de microalgas no intervalo de pH ótimo é crucial, pois caso contrário poderá ocorrer colapso na cultura devido ao rompimento de processos celulares por pH extremos. Ao mecanismo de controlo do pH deve ser integrado o sistema de arejamento, capaz de controlar eficientemente o pH da cultura (Wang *et al.*, 2012).

2.4 Salinidade

Tanto em sistemas abertos como em fechados, a salinidade pode afetar o crescimento e a composição celular das microalgas. Cada alga tem uma gama ótima de salinidade que pode aumentar durante condições de clima quente, devido à alta taxa de evaporação. A maneira mais fácil para controlar a salinidade é por adição de água doce ou salgada (Moheimani, 2005).

A adição de sais, nomeadamente cloreto de sódio à cultura de microalgas é uma forma de induzir *stress*, aumentando o teor lipídico. A título de exemplo tem-se o estudo de (Campenni *et al.*, 2013) que cultivaram autotroficamente *Chlorella protothecoides* com 10, 20 e 30 g/l de NaCl, após escassez de nitratos, produzindo 38,6%, 43,4% e 41,5% de teor lipídico.

2.5 Sistemas de cultivo das microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em três regimes diferentes de produção: (1) fotoautotrófico, onde a luz é usada como fonte de energia e o dióxido de carbono, como fonte de carbono (inorgânico); (2) heterotrófico, em que a cultura consegue crescer na ausência de luz e utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono e energia (glucose, glicerol, etanol) e (3) mixotrófico, onde o regime (1) e (2) são combinados (Mata *et al.*, 2010).

Os sistemas de cultivo das microalgas são: as lagoas abertas e os fotobioreatores fechados. Os fotobioreatores fechados são mais recentes e foram desenvolvidos para superar algumas das limitações das lagoas abertas, ou seja, permitir um melhoramento da cultura microalgal (Khan *et al.*, 2009) (Lam e Lee, 2012). Contudo, a otimização da cultura de uma espécie específica de microalga é uma realidade complexa que joga com diferentes parâmetros mencionados em 2.3 (Schenk *et al.*, 2008).

2.5.1 Fotobioreatores fechados

Os FBR's fechados são sistemas que apresentam inúmeras vantagens comparativamente às lagoas, tais como: permitem a cultura de uma só espécie de microalgas durante longos períodos, assegurando um baixo risco de contaminação; têm um *design* técnico flexível e conseguem altas taxas de produtividade de biomassa devido a pequenas perdas de CO₂ por evaporação e a um maior rigor no controlo dos parâmetros de crescimento (temperatura, pH, mistura, CO₂ e O₂). Consequentemente, ao produzirem altas produtividades de biomassa têm uma menor pegada ambiental (Brennan e Owende, 2010; Chisti, 2007; Pulz, 2001; Schenk *et al.*, 2008).

Porém, os custos associados a estes sistemas em termos de construção, operação e cultivo são mais elevados do que os das lagoas abertas, sendo compensados pela alta produtividade de biomassa, mas apenas para algumas espécies de microalgas e/ou de acordo com a aplicação final (Mata *et al.*, 2010; Schenk *et al.*, 2008).

Uma outra desvantagem dos FBR's é a foto inibição causada pelos altos níveis de oxigénio, dissolvidos na cultura, superiores aos valores de saturação do ar. Ou seja, altos níveis de oxigénio

dissolvidos em conjugação com luz solar intensa provoca danos foto oxidativos nas células das microalgas. Outras das limitações são: um grande aquecimento, bio incrustações de biomassa das microalgas às paredes do reator, dificuldade em ampliar a escala e deterioração do material usado na zona da incidência solar (Mata *et al.*, 2010).

Atualmente os principais tipos de fotobioreatores fechados são: os tubulares, os planares e os de colunas de bolhas (ou *airlifts*) (Fig. 3). Nos FBR's tubulares os tubos poderão estar alinhados horizontalmente, verticalmente, inclinados ou como uma hélice (Brennan e Owende, 2010; Chisti, 2007). Contudo, as duas configurações mais usadas por razões de distribuição de luz e concentração celular são os planares (horizontais ou verticais) e os tubulares (Brennan e Owende, 2010) (Posten, 2009).



Fig. 3 – Exemplo de fotobioreatores fechados. Da esquerda para a direita: FBR's planares, tubulares e de colunas.

http://algae-energy.co.uk/biofuel_production/pbrs/

<http://www.schott.com/english/news/press.html?NID=com4212>

<http://www.aqualgae.com/fotobio.html>

De uma forma geral, os fotobioreatores são constituídos por um conjunto de tubos de materiais translúcidos (ex.: plástico ou vidro) e cujo diâmetro deverá rondar os 10 cm ou menos. O diâmetro dos tubos (FBR's tubulares) ou o tamanho dos canais (FBR's planares) terá de ser pequeno, de modo a que haja penetração da luz em toda a cultura (Brennan e Owende, 2010; Chisti, 2007).

Nestes sistemas as culturas são agitadas com uma bomba ou outro fornecimento de ar, permitindo a troca de CO₂ e O₂ entre o meio líquido e o gás de arejamento, assim como o fornecimento de um mecanismo de mistura (Eriksen, 2008).

2.5.2 Tanques abertos

Os tanques abertos (Fig. 4) têm como principais características terem um circuito fechado, canais de recirculação em forma oval, geralmente entre 0,2 e 0,5 m de profundidade, e mistura e circulação auxiliadas por rodas de pás, sendo estas duas últimas características fundamentais para o crescimento das microalgas e para evitar a sedimentação das mesmas (Brennan e Owende, 2010) (Lam e Lee, 2012).



Fig. 4 - Tanque aberto

http://algae-energy.co.uk/biofuel_production/cultivation/

O nível de CO₂ necessário para o crescimento das algas é obtido pelo ar à superfície dos tanques podendo-se, porém, instalar arejadores submersos para uma melhor absorção de CO₂ (Brennan e Owende, 2010).

Apesar de os tanques abertos serem mais económicas no que diz respeito à produção de biomassa de microalgas a larga escala, possuem manutenção e limpeza fáceis e consomem menos energia, têm um maior risco de contaminação e menor controle dos parâmetros de cultivo em relação aos sistemas fechados (Brennan e Owende, 2010).

2.6 Colheita da biomassa das microalgas

Após a cultura das microalgas segue-se a fase de colheita das mesmas, onde se faz a separação da biomassa do seu meio de cultura (Lam e Lee, 2012).

A seleção do método mais adequado para a colheita das microalgas depende de vários factores, tais como: dimensão da cultura, espécie, densidade celular, condições de cultura em que as microalgas foram produzidas, produto final e seu valor comercial (Abdelaziz *et al.*, 2014).

São vários os processos para a colheita da biomassa: a eletrocoagulação/eletrofloculação, a centrifugação, a sedimentação por gravidade, a flotação, a filtração e a floculação

De seguida neste tópico apenas serão mencionadas, de uma forma breve, as técnicas que não foram usadas neste projeto. No subtópico seguinte serão descritas as técnicas usadas neste trabalho para a colheita de biomassa.

A sedimentação por gravidade é uma técnica que separa a cultura em dois sistemas de fases um líquido claro e um concentrado de alga (Uduman *et al.*, 2010). A velocidade de sedimentação está relacionada com a densidade e tamanho das células das microalgas (adequado para células > 70 μm). A colheita por sedimentação por gravidade natural pode ser realizada através de separadores de lamelas e tanques de sedimentação. A taxa de sedimentação e a separação microalgal podem ser aceleradas adicionando floculantes à colheita (Uduman *et al.*, 2010). Apesar de a sedimentação por gravidade ser o processo mais económico, possui uma baixa eficiência de recuperação de biomassa (Park *et al.*, 2011).

A flotação é um método físico-químico que facilita a separação (mistura sólida-líquida) através do borbulhamento de ar ou gás sobre a mesma. As moléculas gasosas ligam-se às partículas sólidas e desta forma as partículas são transportadas até à superfície do líquido onde são removidas (Uduman *et al.*, 2010). A eficiência deste método depende de factores como: a instabilidade das partículas em suspensão (menor instabilidade, maior contacto partícula-ar), o tamanho das partículas (partículas mais pequenas, mais instabilidade), a captura das bolhas de ar

ou gás pelas partículas sólidas, o pH e a força iônica (Abdelaziz *et al.*, 2014; Uduman *et al.*, 2010). Estes dois últimos factores devem ser otimizados antes de iniciar o processo. A adição de sais polieletrólitos e de alumínio ou ferro podem aumentar a eficiência do processo (Abdelaziz *et al.*, 2014).

A filtração é um processo físico que separa partículas sólidas que estão em suspensão num fluido, utilizando um filtro ou uma membrana onde os sólidos ficam retidos. As membranas têm como principais vantagens: a eficiência, a fiabilidade e a segurança na separação sólido-líquido. Contudo, relativamente à colheita de microalgas, a recuperação da biomassa pode ser insatisfatória, por ser um processo lento. Tal deve-se a uma progressiva incrustação das membranas, havendo uma redução do fluxo de permeação durante o processo de separação. Este problema é causado pela adsorção, pela concentração de compostos na superfície da membrana e, conseqüentemente, pelo entupimento dos poros da mesma. No entanto, algumas técnicas são aplicadas para que tal não aconteça, tais como: utilizar fluxo cruzado em vez de frontal, filtrar em altas velocidades e seleccionar um sistema que cause instabilidade próximo da superfície da membrana (Pires *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2008). Outro dos inconvenientes desta técnica é a possível quebra da parede celular das células microalgais durante o processo, tal como acontece com a centrifugação. Desta forma, para microalgas com estruturas frágeis é necessário seleccionar um sistema de bombagem adequado (Jaouen *et al.*, 1999; Rossignol *et al.*, 1999).

A floculação é um processo de agregação das células de microalgas devido à adição de um floculante no meio, que perturba a estabilidade das partículas, promovendo a sua separação (Suali e Sarbatly, 2012). Esta técnica é simples, rápida, com custos reduzidos e consegue atingir eficiências de colheita de biomassa superiores a 90%. No entanto, o seu uso é limitado devido às contaminações da biomassa das microalgas. Existem diferentes formas de conseguir a floculação como: a floculação química, a biofloculação e a eletrofloculação (Pires *et al.*, 2012). Como exemplos de floculantes têm-se: os sulfatos de alumínio e os cloretos de alumínio e de ferro (os mais usados), os polímeros orgânicos e os biofloculantes. Os polímeros orgânicos (ex.: amido) são compostos biodegradáveis e não tóxicos. Os biofloculantes são substâncias poliméricas produzidas por células vivas (bactérias, fungos, actinomicetes) com a vantagem de terem baixo custo e não provocarem contaminações por iões metálicos (Lam e Lee, 2012). Os floculantes químicos ($Al_2(SO_4)_3$; $AlCl_3$; $FeCl_3$) têm como principal desvantagem as contaminações dos iões metálicos. Por vezes é adicionada uma solução de hidróxido de sódio para aumentar o pH do meio, conduzindo à deposição rápida das células em suspensão (Pires *et al.*, 2012).

2.6.1 Eletrocoagulação/Eletrofloculação

A eletrocoagulação (EC) ou eletrofloculação é um processo que usa mecanismos químicos e físicos para separar a biomassa microalgal do seu meio de cultura. Para a EC funcionar são necessários dois eléctrodos reativos submersos numa suspensão microalgal sujeita a uma corrente eléctrica. Estes eléctrodos normalmente são de alumínio, pois são mais eficientes para a recuperação de biomassa microalgal do que os de ferro (Vandame *et al.*, 2011). Neste processo as microalgas, que apresentam carga negativa, são atraídas para o ânodo e quando se encontram nele perdem a sua carga ficando na forma de agregado de algas. Ainda durante o processo, há a libertação de iões metálicos pela oxidação eletrolítica do material do ânodo, que servem como agentes coagulantes (Matos *et al.*, 2013). Com a electrólise da água são geradas microbolhas de oxigénio e hidrogénio que sobem à superfície (flotação) trazendo consigo agregados de algas que são facilmente recolhidos (Poelman *et al.*, 1996). A biomassa algal pode então ser colhida à superfície (após a flotação) ou no fundo, quando já ocorreu a posterior sedimentação das algas coaguladas (Gao *et al.*, 2010; Poelman *et al.*, 1996; Uduman *et al.*, 2011).

Este processo apresenta várias vantagens, tais como: (1) baixo consumo energético e baixo custo de investimento, (2) não necessita da adição de químicos, (3) versátil, (4) seguro e (5) eficaz (Poelman *et al.*, 1996; Uduman *et al.*, 2011). Desta forma, devido às características (1) esta é uma

técnica que se destaca e distancia de uma forma positiva de técnicas como a centrifugação ou a sedimentação com floculantes (Poelman *et al.*, 1996). Contudo, existem desvantagens que entre elas se destacam: (1) a necessidade regular de substituir os elétrodos e (2) o risco da contaminação da biomassa por aumento dos íons metálicos do elétrodo, quando se usam correntes de elevada intensidade e/ou durante muito tempo (Uduman *et al.*, 2011). A eficiência da eletrocoagulação depende de vários factores tais como: dos elétrodos (material, design, distância entre eles, área submersa), a intensidade da corrente, o tempo de funcionamento, o pH, a temperatura, a condutividade da suspensão de microalgas e o tamanho das microalgas (Gao *et al.*, 2010; Uduman *et al.*, 2011).

Em relação à distância entre os elétrodos, quanto maior for essa distância menor é a quantidade de energia consumida, embora maior seja a duração do processo, até um determinado limite. Contudo, deverá encontrar-se um compromisso entre o consumo energético do processo e a duração do mesmo. Por exemplo, atingir 96% de eficiência de remoção em 75 minutos com um baixo consumo energético (0,3 kWh/m³) ou atingira mesma eficiência em menos tempo (45 minutos), mas gastando o dobro da energia (Poelman *et al.*, 1996).

Um dos factores que causa o aumento da eficiência da EC, segundo Gao *et al.* (2010); Uduman *et al.* (2011) é o teor de sal da suspensão microalgal, que conduz a uma maior condutividade da suspensão microalgal, conduzindo a uma menor necessidade de energia para o processo.

2.6.2 Centrifugação

A centrifugação é um dos métodos de colheita de recuperação de biomassa microalgal mais usado. Este processo utiliza a ação da força centrífuga para separar os sólidos em suspensão do líquido, havendo a deposição das partículas suspensas. Tal separação é baseada no tamanho das partículas e nas diferentes densidades dos componentes do meio (Uduman *et al.*, 2010).

A colheita de biomassa das microalgas por centrifugação é o processo mais usado em laboratório, pois não necessita de reagentes e é rápido e eficiente. Porém, este processo tem desvantagens significativas, como o elevado custo de equipamento e de consumo energético, aumentando os custos operacionais. Assim sendo, a centrifugação só é usada quando os produtos que se querem obter possuem um elevado valor (Knuckey *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2012). Adicionando a estes inconvenientes, uma possível danificação das estruturas celulares das microalgas (depende da espécie de microalga em causa) devido às forças gravitacionais e de tensão de corte (Grima *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2012).

Relativamente às microalgas salinas, estas aumentam a velocidade de corrosão dos materiais das centrífugas, daí o seu uso limitado na recolha de algas marinhas (Pires *et al.*, 2012; Uduman *et al.*, 2010).

2.7 Secagem de biomassa de microalgas

Após a colheita da biomassa das microalgas é muitas vezes necessário proceder à sua respetiva secagem. Dentro dos processos de secagem destacam-se a secagem usando secador solar, estufa ou liofilizador, sendo que este último não foi testado neste trabalho.

Comparativamente às culturas terrestres usadas para a produção de biocombustíveis, a secagem de biomassa de microalgas para a mesma finalidade é mais longa, dado estas conterem teores de água muito elevados. Sendo a presença de água um factor limitante para a realização de alguns processos, tais como a extração de lípidos e a transesterificação, é de extrema importância a sua remoção. Desta forma, a solução que se tem assumido para contornar este problema de longos períodos de secagem e conseqüentemente, significativos gastos energéticos, é o uso da energia

solar para a secagem da biomassa das microalgas. Contudo, é preciso ter em consideração que a secagem a partir do sol depende das condições climáticas (Lam e Lee, 2012).

Um estudo de análise de ciclo de vida (LCA) destacou que o uso de gás natural como combustível para a secagem de biomassa de microalgas consumia quase 69% da entrada total de energia, o que levou a um balanço energético negativo na produção de biocombustíveis de microalgas (Sander e Murthy, 2010). Assim sendo, este estudo incentiva à investigação mais intensa de secadores solares mais eficientes de modo a garantir a sustentabilidade da indústria de biocombustíveis de microalgas.

A liofilização é uma técnica de secagem que desidrata após congelamento das amostras. As amostras previamente congeladas são sujeitas a baixas pressões, cerca de 1 kPa e a temperaturas de - 40 °C. O congelamento tem a vantagem de tornar as paredes das células porosas devido à formação de cristais de gelo dentro da célula, o que também melhora a extração dos produtos intracelulares (Cañavate e Fernández-Díaz, 2001). Este processo de secagem apresenta custos muito elevados devido à grande quantidade de energia consumida e aos elevados custos de operação e manutenção (Morist *et al.*, 2001). As principais causas do consumo de energia são o congelamento das amostras, a sublimação, dessorção e condensação da água e do bombeamento a vácuo para manter uma pressão baixa. O custo global deste processamento é entre 4 a 8 vezes maior do que o obtido por secagem convencional. Por estas razões é que a liofilização é apenas utilizada em produtos de elevado valor comercial. Teoricamente, este elevado consumo de energia pode ser reduzido através da variação de algumas condições de operação, tais como a temperatura do condensador e a temperatura de superfície das amostras (Lee *et al.*, 2012).

2.7.1 Estufa

A secagem em estufa de biomassa microalgal é um processo que consiste num fluxo contínuo de ar quente que permite a evaporação da humidade da mesma (Ratti, 2001).

Relativamente ao tempo de secagem da biomassa dependerá da finalidade do produto. Segundo Guldhe *et al.* (2014), o processo de secagem de *Nannochloropsis* sp., que tinha como finalidade extrair os lípidos, demorou 12 horas na estufa e consumiu 6 kWh, enquanto no secador solar demorou 72 horas sem gastos energéticos.

2.7.2 Secador solar

Apesar de a secagem solar ter grandes benefícios em termos energéticos existem outros aspetos a considerar. Dado o elevado teor de humidade da biomassa e o longo tempo de operação, a secagem solar pode levar à decomposição da biomassa com perda de qualidade da mesma. Assim sendo, o uso da energia solar para secagem de biomassa da alga em escala industrial, só poderá ser feito quando houver um conhecimento aprofundando destes parâmetros e como os contornar (Lam e Lee, 2012). Para além da secagem solar exigir longos períodos de secagem, exige também largas superfícies de secagem. Apesar de tais contras, a secagem solar é provavelmente o método mais barato de secagem que tem sido usado (Prakash *et al.*, 2007).

3. Microalga: *Neochloris oleoabundans*

A *Neochloris oleoabundans* (Fig. 5) é uma microalga unicelular de água doce pertencente à classe *Chlorophyceae* e à família *Chlorococcaceae*.

Esta é uma microalga bastante interessante para a produção de biodiesel, dado o seu teor em lípidos, que pode variar entre 29 e 65% (Mata *et al.*, 2010), bem como o adequado perfil em ácidos gordos (Gouveia *et al.*, 2009). Revelou-se também como uma alga com potencial num conceito de biorefinaria (Ferreira *et al.*, 2015).

De acordo com os resultados de vários autores (ex., Gouveia *et al.* (2009) e Li *et al.* (2008)) conclui-se que a otimização entre o teor lipídico e a produtividade de biomassa de uma microalga, é uma tarefa de difícil conjugação.



Fig. 5 - *Neochloris oleoabundans* ao microscópio.

Vários são os factores de *stress* estudados para *N. oleoabundans* que permitem aumentar a sua produção de lípidos. Entre eles destaca-se o crescimento sob escassez de azoto, podendo haver um aumento de 50% no teor em lípidos, não ocorrendo nenhuma mudança significativa no perfil de ácidos gordos (Gouveia e Oliveira, 2009). Este estudo indica também que a *N. oleoabundans* é constituída principalmente por ácidos gordos insaturados ($\approx 65\%$), tendo também uma percentagem significativa de ácido palmítico (C 16:0 $\approx 20\%$). De entre os ácidos gordos insaturados contém 18% de ácido linolénico (C 18:3) e aproximadamente 2% de ácidos polinsaturados.

Segundo o estudo de Santos *et al.*, (2012), o cultivo de *N. oleoabundans* sob concentrações salinas e elevado pH, torna esta espécie de microalga rica em lípidos. Como não existe até ao momento uma única estratégia para maximizar a produtividade lipídica de *N. oleoabundans*, (Popovich *et al.*, 2012) sugerem o cultivo desta espécie em água do mar sob escassez de azoto. Contrariamente a Santos *et al.* (2012) e Arredondo-Vega *et al.* (1995) consideram que a salinidade do meio pode afetar a composição celular da espécie através do processo de osmorregulação. Arredondo-Vega *et al.* (1995) observou um menor teor lipídico de *N. oleoabundans* em meio marinho (18,9%) em comparação com o cultivo em água doce (36,5%).

4. Materiais e métodos

4.1 Microalga: *Neochloris oleoabundans*

No presente trabalho a microalga estudada foi a *Neochloris oleoabundans*. Antes da utilização da microalga em sistemas de cultivo, referidos mais à frente, as culturas estavam num “banco de algas”, em *erlenmeyers* contendo o meio apropriado (*Brystol*) (Anexo 1), tapados com rolhas de gaze e algodão. Os *erlenmeyers*, as rolhas e o meio *Brystol* foram esterilizados na autoclave a 120°C durante 20 minutos, antes da introdução da microalga.

4.2 Meio de cultura

Para o cultivo da microalga *N. oleoabundans* foi utilizado meio *Brystol* (Anexo 1). Este meio foi esterilizado na autoclave a 120°C durante 20 minutos, quando as culturas foram realizadas em reatores de coluna de bolhas de 1 litro. Nos casos em que a cultura foi realizada em manga de plástico polietileno (5 litros) ou em fotobioreator planar alveolar (35 litros), o meio não foi esterilizado.

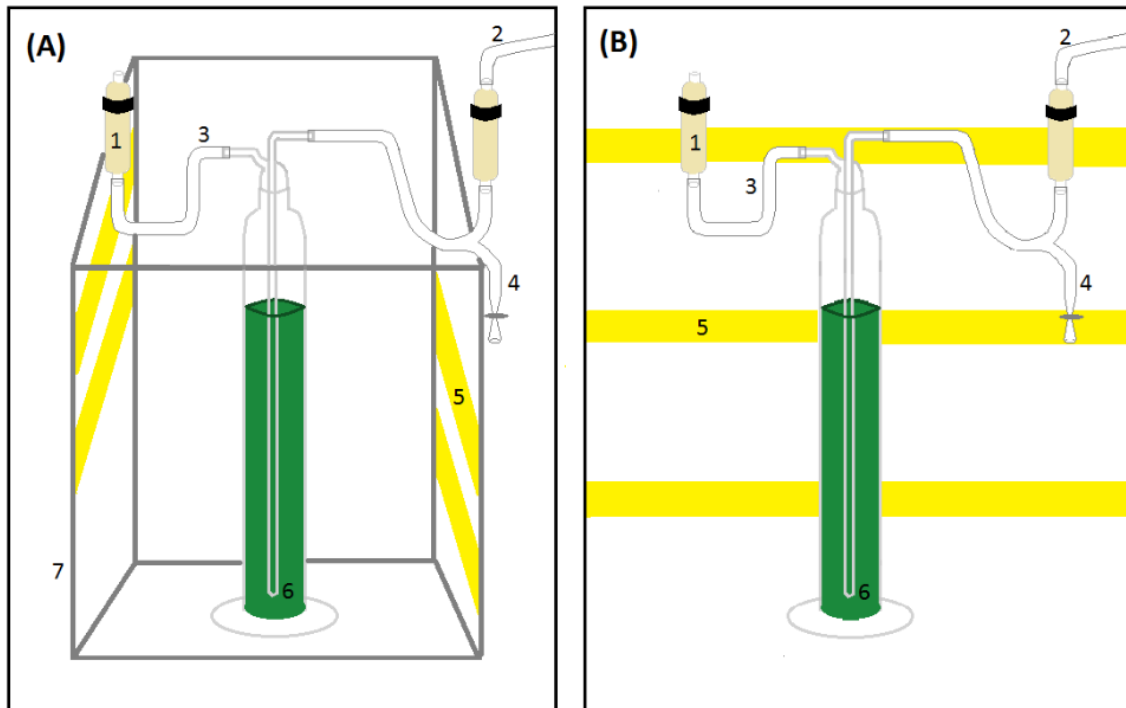
Nos ensaios em que se estudou o efeito da adição de cloreto de sódio desde o início da cultura, este foi dissolvido no meio antes de se proceder à sua esterilização em autoclave.

4.3 Crescimento da microalga

4.3.1 Reator de coluna de bolhas

(a) Efeito da salinidade do meio

Para o estudo da influência do NaCl no crescimento e teor lipídico da microalga *N. oleoabundans*, esta foi cultivada em reatores de coluna de bolhas, nos quais foram realizados ensaios em que se adicionou 5, 10 e 15 g de NaCl desde o início da cultura e outros em que apenas se acrescentou o NaCl (10 g/l), após escassez dos nitratos no meio de cultura. Nestas experiências as culturas foram iluminadas continuamente durante 24 horas, com uma intensidade luminosa de 2,37 klx (luxímetro Phywe) proveniente de quatro lâmpadas Philips fluorescentes TL-D 36 W/54-765 (Fig. 6 A). A temperatura foi mantida constante ($\approx 27^\circ\text{C}$).



1– Filtro com algodão esterilizado; 2 – Entrada de ar comprimido; 3 – Saída de ar comprimido; 4 – Saída para recolha de amostras; 5 – Lâmpadas; 6 – Difusão de ar comprimido; 7 – Aquário

Fig. 6 – Esquema da disposição das lâmpadas (a amarelo) relativamente ao reator de coluna de bolhas, em diferentes ensaios (A e B).

(b) Efeito do tipo de iluminação

A influência do tipo iluminação foi avaliada no crescimento e teor lipídico da microalga *N. oleoabundans*. Para tal foram utilizados seis reatores de coluna de bolhas, onde duas das culturas não foram sujeitas a *stress* salino, outras duas continham 15 g de NaCl desde o início da cultura e as restantes duas onde só se acrescentou 15 g de NaCl após escassez de nitratos. Três destes reatores (um de cada condição de cultura) foram iluminados por três lâmpadas Philips fluorescentes TL-D 36W/54-765 e os outros três foram iluminados por três lâmpadas Philips LED Master ledtube t8 19 W/865, sendo que ambos os tipos de lâmpadas emitiam cerca de 1,53 klx (luxímetro Phywe). Estas seis culturas tiveram a duração de 15 dias e foram iluminadas num dos lados dos reatores durante 24 horas por dia (Fig. 6 B). Estes ensaios foram realizados à temperatura ambiente, sem qualquer outro controle.

A agitação da cultura nos reatores de coluna de bolhas provinha da injeção de ar comprimido.

4.3.2 Manga de plástico

Outro sistema de cultivo utilizado foi a manga de polietileno (Fig. 7). Nestes ensaios, foram colocados na manga 5 litros de meio de cultura (anexo 1) e 150 ml de inóculo de *N. oleoabundans*, proveniente do crescimento em reator de coluna de bolhas. As mangas encontravam-se iluminadas durante 24 horas por dia por 4 lâmpadas Philips fluorescentes TL-D 36W/54-765, recebendo uma intensidade luminosa de cerca 2,35 klx (luxímetro Phywe). A agitação do meio de cultura era proveniente de ar comprimido que era injetado (controlado manualmente), sendo também este a fonte de CO₂. Os ensaios decorreram a uma temperatura de cerca de 25°C, devido ao ambiente controlado do laboratório em que se encontravam.



Fig. 7 – Manga de plástico de polietileno com cultura de *N. oleoabundans*.

4.3.3 Fotobioreator planar alveolar

O cultivo da microalga *N. oleoabundans* também foi testado num fotobioreator planar alveolar, de 35 litros de capacidade. O ensaio teve a duração de 16 dias e foi iluminada por 5 lâmpadas Philips fluorescentes TL-D 36W/54-765, apenas num dos lados do fotobioreator (Fig. 8), recebendo cerca de 3 klx de intensidade luminosa. A agitação do meio de cultura provinha de ar comprimido (controlado manualmente).



Fig. 8 – Fotobioreator planar alveolar com cultura de *N. oleoabundans* e a disposição das lâmpadas fluorescentes.

4.4 Métodos

4.4.1 Avaliação do crescimento da cultura

De modo a acompanhar o ciclo de vida da microalga, procedeu-se à recolha de amostras das culturas de *N. oleoabundans* nos diversos sistemas de cultivo, tendo-se analisado em cada amostra parâmetros como o pH (elétrodo inoLab level 1), a densidade ótica (DO), o peso seco e o teor de nitratos. Recolheu-se diariamente uma amostra de 5 ml de cada cultura. Em dias alternados, para além da análise do pH e da DO, foi também determinado o peso seco e os nitratos, recolhendo-se nestes dias cerca de 20 ml de amostra.

A medição da DO foi realizada a 540 nm num espectrofotómetro Hitachi U-2000. As amostras a analisar foram diluídas convenientemente para garantir que os valores da densidade ótica se encontravam dentro do intervalo 0,1 – 1.

Relativamente aos pesos secos usou-se filtros de membrana de vidro (VWR, glass microfibres filters 693) com 47 mm de diâmetro e com a capacidade de retenção de partículas de 1,2 µm. Os filtros foram secos, antes da sua utilização, numa estufa (Schutzart DIN 40050-IP20 Memmert), durante 4 horas a 80°C, sendo depois pesados. Após a filtração da amostra da microalga, de um volume de aproximadamente de 20 ml (Fig. 9), os filtros foram novamente secos na mesma estufa (80°C e 4 horas) e posteriormente pesados. Ambas as pesagens foram realizadas numa balança Mettler Toledo classic AB204-S.



Fig. 9 – Filtração de uma amostra de cultura, para determinação do peso seco.

Para determinar o teor de nitratos no meio de cultura, aproveitou-se o filtrado de cada peso seco, o qual foi analisado no cromatógrafo iónico Dionex ICS-100, após injeção de soluções padrão (Anexo 2). O cromatógrafo estava equipado com um supressor ASRS-Ultra II, uma pré-coluna AG14 A 4x50 mm, uma coluna IONPAC AS14 A 4x250 mm e um detetor de condutividade. O fluxo do eluente (Anexo 3) do cromatógrafo iónico era de 1 ml/min. Para as culturas com elevados teores de cloretos (superiores a 5 g / l) usou-se um filtro de prata (Dionex OnGuard II Ag number 057089) e de hidrogénio (Dionex OnGuard II H number 057085) para permitir a leitura dos nitratos.

4.4.2 Colheita da biomassa microalgal

4.4.2.1 Centrifugação

Em todas as experiências realizadas ao longo do trabalho foi utilizado como processo de recolha da biomassa microalgal a centrifugação.

A centrífuga usada foi uma Heraeus multifuge 3SR+ Thermo Scientific, tendo todas as amostras sido centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 minutos, a uma temperatura de 10° C (Fig. 10).

O consumo elétrico da centrífuga foi medido com um medidor de energia elétrica (Ecowatt chacon KGS01-01) durante o seu funcionamento, de modo a determinar o consumo efetivo.

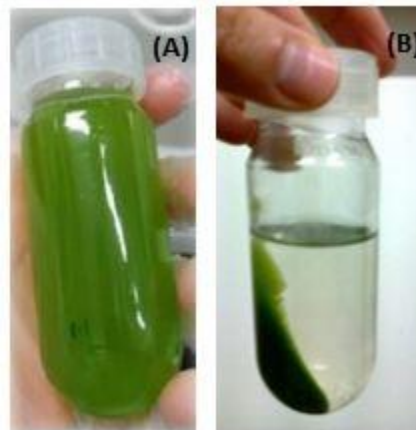


Fig. 10 – Biomassa de *N. oleoabundans* antes (A) e após (B) centrifugação.

4.4.2.2 Eletrocoagulação

Como método de recolha de biomassa foi também utilizada a eletrocoagulação (EC). No entanto, este processo foi apenas realizado numa das experiências, tendo a biomassa sido sujeita a centrifugação após a EC.

Neste processo de EC testou-se uma intensidade de corrente de 0,3 A e utilizaram-se dois elétrodos de alumínio com uma área mergulhada na solução de 12 cm². A espessura dos dois elétrodos era de 1 mm, colocados paralelamente um em relação ao outro e distanciados entre si de 1,2 cm. Estes encontravam-se ligados a uma fonte de alimentação externa de corrente contínua (DC), Mastech HY3005D. Os ensaios foram realizados em copos de vidro de 600 ml contendo aproximadamente 400 ml de cultura, mantida sob agitação constante a 100 rpm, numa placa de agitação (Heidolph) com um agitador magnético (Fig. 11).

Para determinar a eficiência da recuperação da biomassa microalgal foram recolhidas amostras de 1 ml abaixo da camada de microalgas floculada à superfície do copo, após 30 minutos da paragem do processo de EC. Cada uma destas amostras foi analisada no espectrofotómetro (Hitachi U-2000) a 540 nm, de modo a determinar a DO final, para comparação com a DO da cultura antes da EC. Desta forma, a eficiência da recuperação da biomassa microalgal é dada pela equação 1:

$$\eta_{\text{recuperação da biomassa microalgal}} = \frac{DO_i - DO_f}{DO_i} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

onde DO_i é a densidade ótica inicial (antes do processo de EC) e a DO_f é a densidade ótica final (30 minutos após paragem da EC).

Após a EC as microalgas formaram flocos à superfície (Fig. 11), tendo esta biomassa sido recolhida e posteriormente centrifugada e seca em estufa.

O consumo elétrico obtido pelo processo de EC foi medido com um medidor de energia elétrica (Ecowatt chacon KGS01-01) durante o seu funcionamento, de modo a determinar o consumo efetivo.

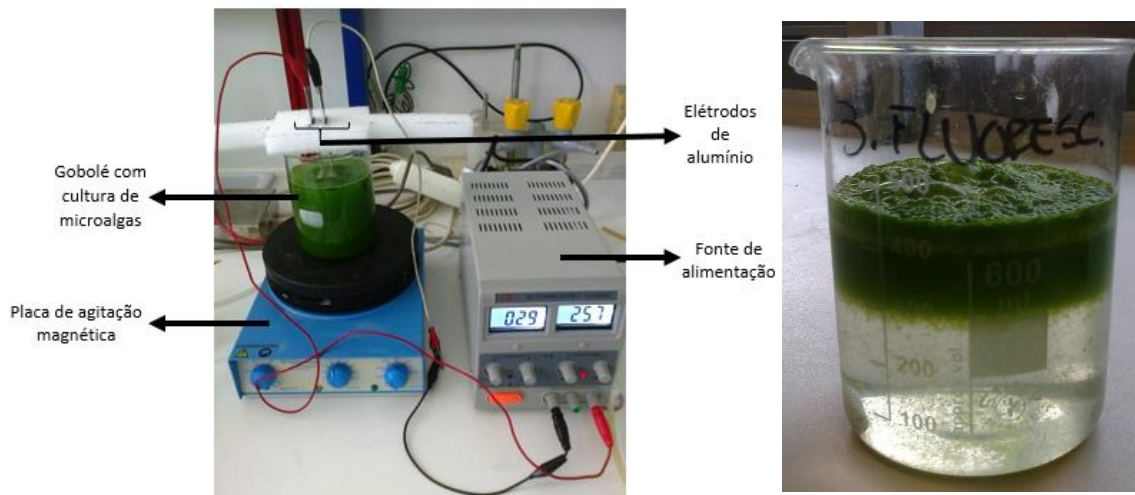


Fig. 11 – Início da eletrocoagulação de *N. oleoabundans* e respetivo sistema de eletrocoagulação (figura da esquerda.) e *N. oleoabundans* após a eletrocoagulação (figura da direita).

4.4.3 Secagem da biomassa microalgal

4.4.3.1 Estufa

Todas as culturas de *N. oleoabundans* dos sistemas de cultivo estudados (humidade $\approx 85\%$) foram secas em estufa (Schutzart DIN 40050-IP20 Memmert) a 70°C (Fig. 12), entre 4 a 8 horas. Como todos os equipamentos, a estufa foi sujeita à medição do seu consumo elétrico durante o processo de secagem da biomassa microalgal, com o medidor de energia Ecowatt chacon KGS01-01.

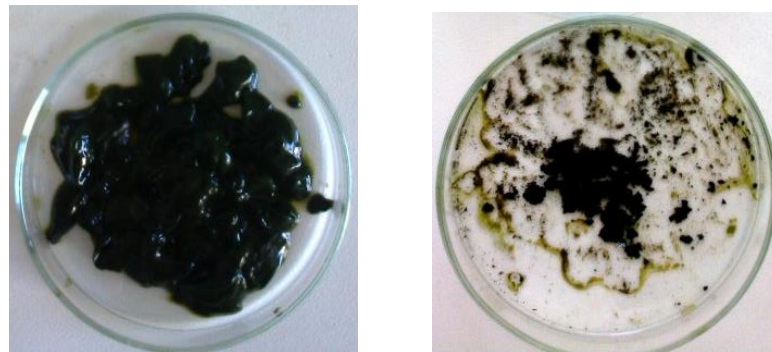


Fig. 12 – Biomassa de *N. oleoabundans* antes (figura da esquerda) e após (figura da direita) a secagem na estufa

4.4.3.2 Secador solar

A secagem da biomassa de *N. oleoabundans* foi também realizada num secador solar (SECMAD, LNEG) (Fig. 13), com um volume de 0,28 m³, uma área de coletor solar de 0,8 m² e a capacidade de secar 1 a 2 kg de biomassa diminuindo o teor de humidade de 85% para 5%, entre 3 a 4 horas. O secador solar pode ainda funcionar com uma ventoinha de 20 W de modo a forçar a ventilação do ar (Ferreira *et al.*, 2015). Neste trabalho optou-se por usar a ventoinha durante o processo de secagem.

Relativamente à temperatura da secagem, esta foi dependente das condições meteorológicas.

A biomassa usada neste tipo de secagem foi a proveniente da manga de plástico. Dividiu-se a biomassa em duas caixas de *Petri* em que cada uma tinha aproximadamente 4,2 g de biomassa húmida, sendo uma seca na estufa e outra no secador solar, simultaneamente.

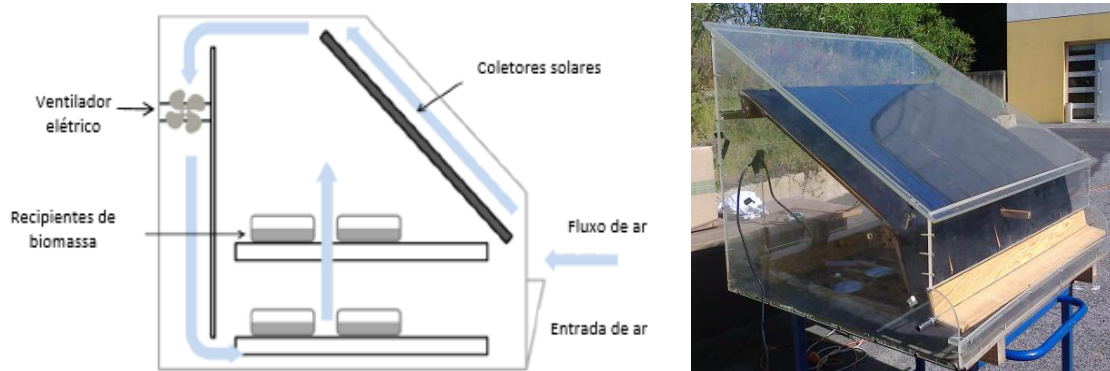


Fig. 13 – Esquema (à esquerda) e foto (à direita) do secador solar SECMAD (adaptado de (Ferreira *et al.*, 2015).

4.4.4 Rutura celular e extração de lípidos da biomassa microalgal

(a) Pré-tratamento de rutura celular

Após a secagem da biomassa, e de modo a provocar a rutura celular na mesma, esta foi sujeita a moagem no moinho de bolas (Retsch MM400) durante 3,5 minutos a uma velocidade de 25 s⁻¹, utilizando-se uma bola de 20 mm de diâmetro, em cada cápsula. Relativamente à quantidade de biomassa por moagem, esta foi de cerca 1 g (máximo de 0,5 g de biomassa em cada cápsula).

(b) Extração por solvente

Para extrair os lípidos da biomassa microalgal recorreu-se ao método *Soxhlet*. Neste processo utilizou-se entre 0,5 g a 1 g de biomassa microalgal previamente seca e moída e como solvente o n-hexano. A biomassa foi colocada dentro de um cartucho de extração, de celulose (Whatman), sendo este posteriormente introduzido num extrator *Soxhlet*, ao qual foi acoplado um balão de fundo redondo com n-hexano (≈ 170 ml). Este conjunto foi colocado numa manta de aquecimento, ligando a um refrigerante de bolas (Fig. 14).

A extração decorreu durante seis horas, tempo ao fim do qual o solvente contendo a fração lipídica foi filtrado (filtros Fisher Scientific com diâmetro de 110 mm) para um balão de evaporação, previamente tarado (balança Mettler Toledo Classic AB204-S). Este balão foi levado ao rotavapor (Buchi-R-200) a 235 mbar e 40°C para se proceder à evaporação do solvente (Fig. 14). O balão contendo a fração lipídica foi depois colocado durante 1 hora na estufa a 103°C, permitindo a

evaporação de vestígios de n-hexano, sendo por fim pesado (balança Mettler Toledo Classic AB204-S).



Fig. 14 – Extração da fração lipídica presente na biomassa microalgal em *Soxhlet* (figura da esquerda) e evaporação do hexano no rotavapor (figura da direita).

O teor de fração lipídica presente na biomassa microalgal foi determinado com base na equação 2:

$$\text{Teor de fração lipídica} = \frac{m_{\text{balão+fl}} - m_{\text{balão}}}{m_{\text{inicial de biomassa}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde $m_{\text{balão+fl}}$ é a massa do balão com a fração lipídica, $m_{\text{balão}}$ é a massa do balão e $m_{\text{inicial de biomassa}}$ é a massa da biomassa colocada dentro do cartucho, antes do início do *Soxhlet*.

Este processo também foi sujeito à medição dos consumos elétricos dos vários equipamentos envolvidos (estufa, manta de aquecimento, rotavapor e banho termostático), com o medidor de energia Ecowatt chacon KGS01-01.

4.4.5 Caracterização da fração lipídica

4.4.5.1 Composição em ácidos gordos

Para avaliar a composição em ácidos gordos das frações lipídicas obtidas por extração *Soxhlet*, estas tiveram de ser tratadas utilizando o método do trifluoreto de boro (ISO 5509, 2000), de modo a se obterem os correspondentes ésteres metílicos, os quais foram analisados por cromatografia em fase gasosa.

Para se preparar a amostra utilizando o método do trifluoreto de boro (BF₃), colocou-se uma pequena porção de fração lipídica num balão de destilação de 50 ml, ao qual se adicionou reguladores de ebulição e 4 ml de solução metanólica de NaOH (0,3 M). Colocou-se o balão num banho termostático a 80°C, durante 5 minutos, após o que se adicionou 5 ml de solução metanólica de trifluoreto de boro. Aguardou-se 3 minutos, juntando-se de seguida 3 ml de iso-octano. Retirou-se o balão de destilação do banho, acrescentou-se aproximadamente 40 ml de solução saturada de NaCl e agitou-se fortemente durante 15 segundos. Após a separação das fases (Fig. 15), transferiu-se a camada superior para um tubo de ensaio, fazendo-a passar por sulfato de sódio

anidro. A amostra foi posteriormente analisada por cromatografia em fase gasosa usando o cromatógrafo Varian CP-3800 GC. Este cromatógrafo estava equipado com uma coluna capilar de 30 m Supelcowax 10 (0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura) e o gás de arrasto foi o hélio, mantido a uma taxa constante de 1,2 ml/min. As temperaturas do injetor e do detetor foram mantidas constantes (250°C). A temperatura do forno foi programada para começar a 220°C durante 16 minutos, aumentando 20°C/minuto até aos 230°C e mantendo-se nesta temperatura durante 4 minutos.

A percentagem relativa de cada um dos ácidos gordos presentes nas amostras analisadas foi determinada com base nas áreas dos picos obtidos no cromatograma, de acordo com a norma EN 14103 (EN 14103, 2003). A identificação dos diferentes ácidos gordos foi feita por comparação com os resultados obtidos para uma solução padrão, analisada nas mesmas condições cromatográficas.



Fig. 15 – Separação de fases no final do tratamento da amostra pelo método do trifluoreto de boro.

4.4.5.2 Índice de iodo

O índice de iodo é um parâmetro que avalia o grau de insaturação de um óleo ou biodiesel. Embora a sua determinação possa ser feita experimentalmente segundo a norma europeia (EN 14111, 2003), neste trabalho apenas se efetuou o cálculo teórico, de acordo com a norma (EN 16300, 2013), dada a limitação de amostra disponível. Assim, o índice de iodo da fração lipídica extraída da biomassa de *N. oleoabundans* corresponde ao somatório das várias parcelas obtidas por multiplicação dos factores tabela dos para cada éster metílico de ácido gordo insaturado (Tabela 3) pela percentagem dos ésteres metílicos correspondentes, obtida por cromatografia gasosa.

Tabela 3 – Valores dos factores correspondentes a cada éster metílico. Nos ésteres metílicos saturados o x representa um algarismo não definido (adaptado de (EN 16300, 2013)).

	Éster metílico de ácidos gordos	Factor
Saturados	C 1x:0	0
Insaturados	Tetradecanoato de metilo C 14:1	1,056
	Hexadecanoato de metilo C 16:1	0,950
	Heptadecanoato de metilo C 17:1	0,899
	Octadecanoato de metilo C 18:1	0,860
	Octadecadienoato de metilo C 18:2	1,732
	Octadecatrienoato de metilo C 18:3	2,616
	Eicosenoato de metilo C 20:1	0,782
	Eicosadienoico de metilo C 20:2	1,574
	Eicosatrienoico de metilo C 20:3	2,376
	Docosenoato de metilo C 22:1	0,720
	Docosadienoico de metilo C 22:2	1,448
	Docosatrienoico de metilo C 22:3	2,184

5. Resultados e discussão

5.1 Crescimento de *Neochloris oleoabundans*

No presente trabalho, a microalga *Neochloris oleoabundans* foi cultivada em três diferentes fotobioreatores: colunas de bolhas em vidro (1 l), manga de polietileno (5 l) e reator planar alveolar (35 l).

O crescimento da biomassa foi avaliado em todos os sistemas de cultivo através da leitura da densidade ótica ($DO_{540\text{ nm}}$) e determinação do peso seco. Nos vários reatores também o teor em nitratos e o pH foram monitorizados ao longo do tempo. No final de cada ensaio foi avaliado o conteúdo em lípidos, dado ser este o parâmetro que se pretendia maximizar em todo o estudo, tendo em vista a posterior produção de biodiesel.

5.1.1 Reator de colunas de bolhas: iluminação com lâmpadas fluorescentes

(a) Influência da presença de NaCl

O objetivo da primeira experiência foi avaliar a influência da presença de NaCl no crescimento e no teor lipídico das culturas de *N. oleabundans* e qual a melhor estratégia para o fazer: no início da cultura ou após a escassez de nitratos. Usaram-se para este efeito reatores de coluna de bolhas e a experiência decorreu durante 28 dias.

Num dos reatores adicionou-se 10 g/l de NaCl no 21º dia de cultura, quando os nitratos se encontravam com um valor de 0,45 mg/l (Fig. 16 (B)), e no outro reator adicionou-se 10 g/l de NaCl desde o início da cultura, quando o valor de nitratos era ainda elevado.

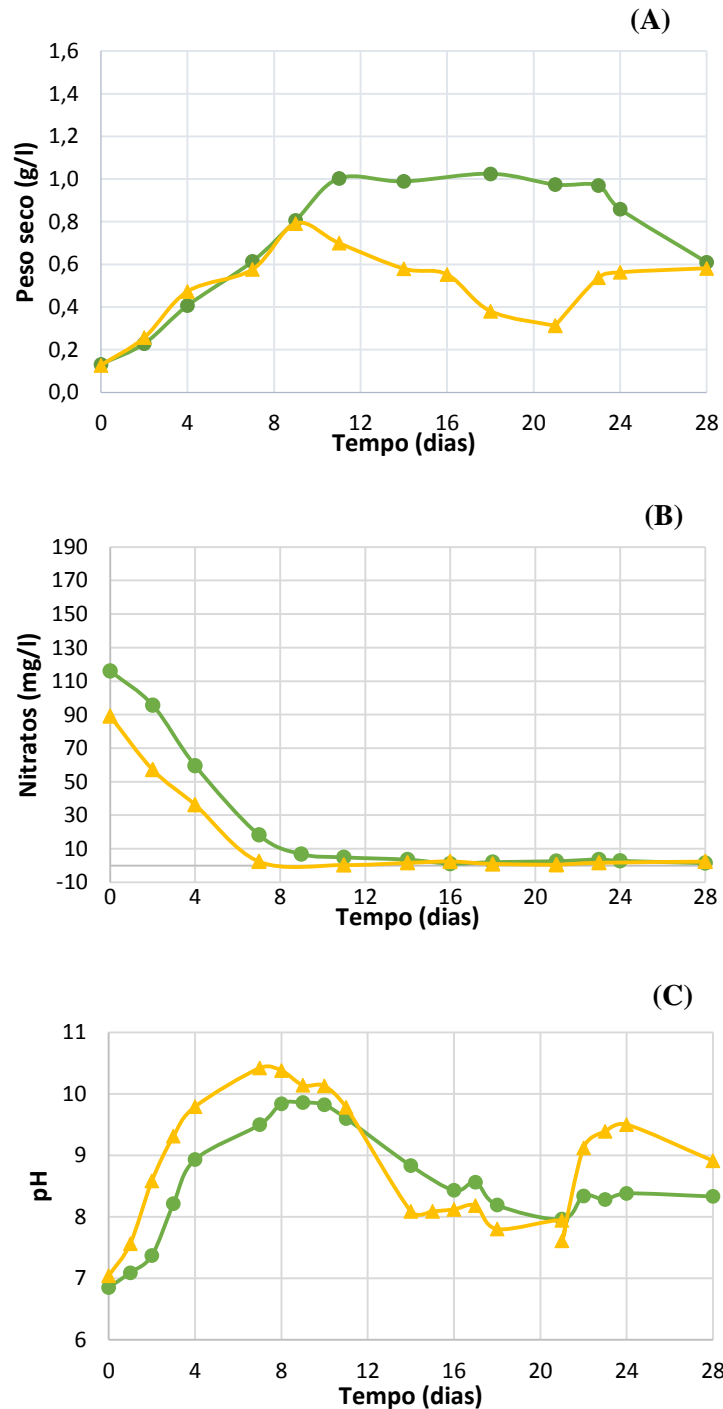


Fig. 16 – Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de *N. oleoabundans*, realizadas em reatores de colunas de bolhas, com 10 g/l de NaCl desde o início da cultura (●) e com 10 g/l de NaCl adicionada após escassez de nitratos (21º dia) (▲).

A Fig. 16 (A) mostra que na maior parte do tempo de cultura, o peso seco para o ensaio com adição de NaCl desde o início foi superior ao do ensaio em que o NaCl só foi adicionado após 21 dias de inoculação. Contudo, no último dia de cultivo os ensaios apresentaram valores de peso seco semelhantes. Relativamente ao peso seco máximo atingido na cultura com adição de NaCl ao 21º dia foi de 0,79 g/l, ao 9º dia após inoculação, altura em que teve início a morte da cultura. Na cultura com adição de NaCl no início, um peso seco máximo de 1,00 g/l foi atingido ao 11º dia, após o qual se observou uma fase estacionária de 12 dias (Fig. 16 (A)). A fase de morte celular teve início no 23º dia.

O crescimento das culturas foi também seguido pela $DO_{540\text{ nm}}$, tendo-se observado valores iniciais de aproximadamente 0,488, e valores finais de 1,240 (adição de NaCl ao 21º dia) e de 1,200 (adição de NaCl no início).

Ao longo da fase de crescimento observou-se uma alcalinização das culturas até valores de pH de 10,42 e 9,84 para a cultura sem e com NaCl desde o início, respetivamente (Fig. 16 (C)). Os valores de pH da cultura sem adição inicial de NaCl foram sempre superiores aos do outro ensaio, até ao 11º dia após inoculação. A partir daí, e até ao 21º dia, verificou-se o inverso, embora depois da adição de NaCl a situação se tenha novamente invertido.

A biomassa final obtida em cada um dos ensaios foi analisada em termos de teor em lípidos. Como se pode observar na Tabela 4, nos ensaios da 1ª experiência realizados nos reatores das colunas de bolhas, a cultura de *N. oleoabundans* em que se obteve um maior teor lipídico (0,179 g lípidos/l cultura) foi aquela em que a adição de 10 g/l de NaCl foi realizada no início da cultura.

Tabela 4 - Influência da presença de NaCl no teor de lípidos produzidos pela microalga *N. oleoabundans*, em reatores de colunas de bolhas.

	1ª Experiência		2ª Experiência			
	10 g/l NaCl após escassez de nitratos	10 g/l NaCl desde o início da cultura	10 g/l NaCl após escassez de nitratos	5 g/l NaCl desde o início da cultura	10 g/l NaCl desde o início da cultura	15 g/l NaCl desde o início da cultura
Teor lipídico (% m/m biomassa seca)	24,72	29,4	25,14	24,36	32,37	36,24
Teor lipídico (g lípidos/l cultura)	0,144	0,179	0,195	0,229	0,419	0,434

Assim, com base nestes resultados, selecionou-se como melhor estratégia para a obtenção de um maior teor de lípidos, a adição de NaCl logo no início da cultura.

De notar que alguns autores referem um comportamento inverso ao observado no presente trabalho ou seja, uma maior produção de lípidos quando a cultura é sujeita a limitação de azoto (Santos *et al.*, 2012).

(b) Influência da quantidade de NaCl

Na segunda experiência nos reatores de colunas de bolhas, com a duração de 15 dias, foi estudada a influência da quantidade de NaCl, tendo este sido adicionado no início da cultura. O estudo foi constituído por quatro culturas de *N. oleoabundans*, sendo dois ensaios repetição da primeira experiência (adição de 10 g/l de NaCl após redução dos nitratos e no início da cultura) e os restantes dois com 5 e 15 g/l de NaCl desde o início da cultura.

Como se pode observar na Fig. 17 (B), no reator em que se adicionou 10 g/l de NaCl apenas no 8º dia de cultura, a concentração de nitratos já tinha tido um decréscimo significativo, para valores de 15,34 mg/l.

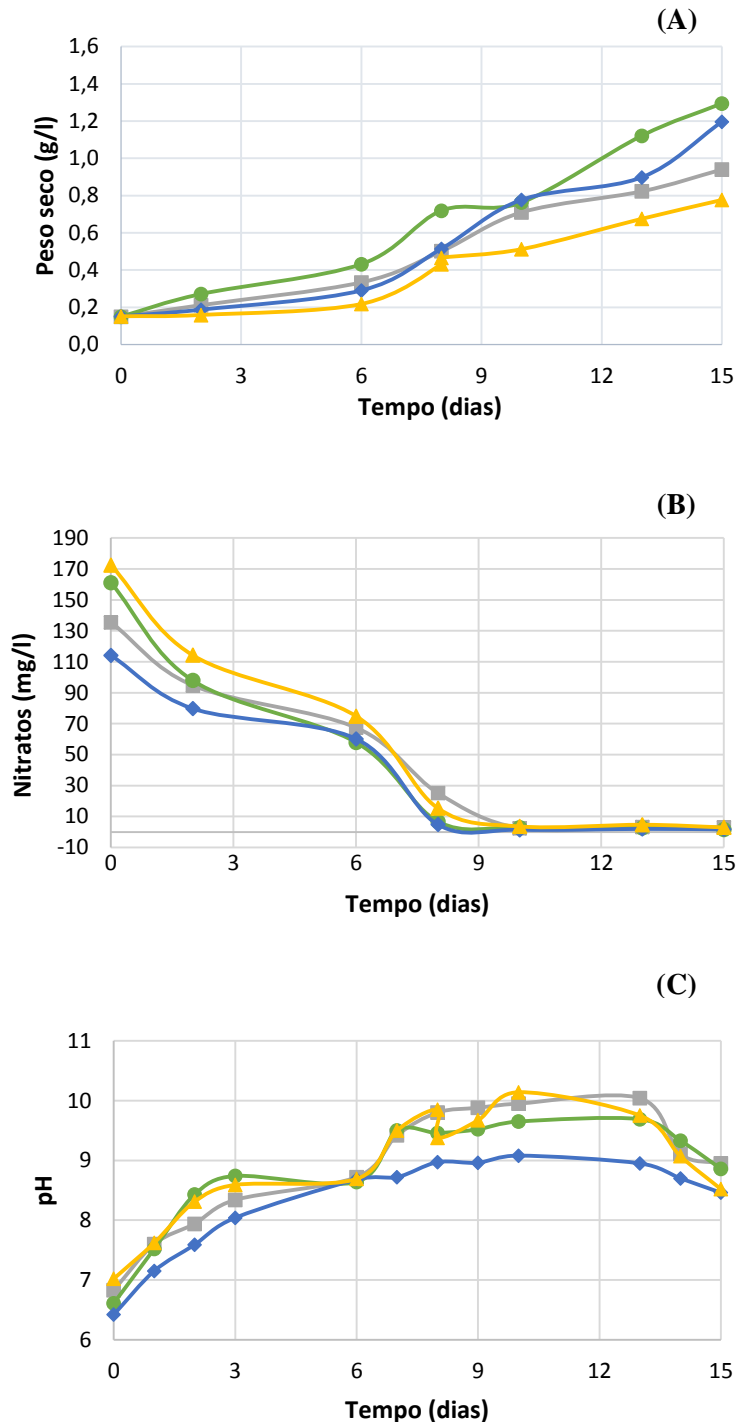


Fig. 17 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de *N. oleoabundans*, realizadas em reatores de colunas de bolhas, com diferentes concentrações iniciais de NaCl (g/l): 5 (■), 10 (●) e 15 (◆) e para 10g/l de NaCl adicionada ao 8º dia após inoculação (▲).

Na Fig. 17 (A) pode-se observar que entre os dias 3 e 6 os crescimentos de todas as culturas são pouco significativos. O motivo pelo qual tal aconteceu reside no facto de estes dias terem correspondido a um fim-de-semana e de ter havido uma falha no fornecimento de ar comprimido, o que limitou o crescimento das culturas pois não houve nem agitação do meio de cultura nem fornecimento de CO₂.

Analisando a mesma figura observa-se que o peso seco final mais elevado (1,30 g/l) corresponde à cultura com uma quantidade de NaCl inicial de 10 g/l. Já o menor peso seco final (0,78 g/l) foi obtido na cultura sem adição inicial de NaCl, o que veio confirmar os resultados da 1ª experiência ou seja, não ser vantajosa a adição de NaCl na fase em que já se verificou um decréscimo acentuado do teor de nitratos no meio de cultura. Nas culturas com 5 g/l de NaCl e 15 g/l de NaCl inicial obtiveram-se pesos secos finais de 0,94 g/l e de 1,20 g/l, respetivamente.

A DO_{540 nm} das quatro culturas foi monitorizada ao longo dos ensaios, sendo os valores iniciais de todas as culturas de aproximadamente 0,285. Os valores máximos de DO_{540 nm} em todas as culturas foram atingidos ao 15º dia após inoculação, com os valores que variaram entre os 1,833 para a cultura com 15 g/l de NaCl desde o início da cultura e 2,163 para a cultura com 10 g/l de NaCl após escassez de nitratos.

Pode-se observar pela Fig. 17 (C) que ao 6º dia, todas as culturas se encontravam com valores de pH muito próximos ($\approx 8,70$) devido à falha de ar comprimido ocorrida entre o 3º e o 6º dia e que não permitiu o crescimento das culturas. A partir desse dia observou-se uma alcalinização do meio associada ao crescimento da microalga, até ao 13º dia após inoculação, tendo-se registado depois uma diminuição do pH para valores finais de 8,95, 8,86 e 8,46 para as culturas com adição inicial de 5, 10 e 15 g/l de NaCl, respetivamente.

A biomassa final de cada uma das culturas foi analisada em termos de teor de lípidos (Tabela 4), tendo o valor mais elevado para este parâmetro (36,24 %) sido obtido no ensaio com adição inicial de 15 g/l de NaCl. Neste caso, foi atingido um teor de lípidos na cultura de 0,434 g lípidos/l cultura.

Comparando as culturas com 10 g/l de NaCl observa-se que o maior teor lipídico foi obtido pela que tinha NaCl desde o início da mesma (0,419 g lípidos/l cultura), indo ao encontro dos resultados da 1ª experiência (Tabela 4).

Vários autores (Gouveia e Oliveira, 2009; Kirrolia *et al.*, 2012) relatam que as algas produzem mais lípidos sob condições de *stress* ou ambientes desfavoráveis. Isto porque em condições ótimas de crescimento as algas sintetizam ácidos gordos, principalmente para esterificarem em glicerol, lípido principal da membrana que as constitui (responsável por 5 a 20% do peso seco da célula). No entanto, sob condições desfavoráveis, muitas microalgas alteram a sua biossíntese de lípidos (ácidos gordos de C10 a maior do que C20) para formar e acumular lípidos neutros (20 a 50% do seu peso seco), principalmente em forma de triacilglicerol (TAG). Estes servem essencialmente como reservas de carbono e energia que, depois de sintetizados, são depositados em densos corpos lipídicos localizados no citoplasma da célula.

Nas condições de *stress* estudadas no presente trabalho, que estiveram associadas à diferente concentração de sal presente no meio de cultura, as observações acima foram verificadas, uma vez que os melhores resultados em termos lipídicos foram obtidos para a cultura sujeita a maior *stress* ou seja, maior concentração inicial de NaCl (15 g/l). Assim, foi selecionada como melhor condição para o crescimento / produção de lípidos, a adição inicial ao meio de cultura de *N. oleobundans* de uma concentração de NaCl de 15 g/l.

5.1.2 Reator de colunas de bolhas: iluminação com lâmpadas fluorescentes e LED's

A terceira experiência realizada nos reatores de colunas de bolhas, com duração de 15 dias, foi constituída por seis reatores, tendo como principal objetivo comparar o crescimento de *N. oleobundans* na presença de dois tipos de iluminação: por lâmpadas fluorescentes e por LED's. Os ensaios, para cada tipo de lâmpada, foram realizados na presença de 15 g/l de NaCl adicionado no início da cultura e após escassez de nitratos e, ainda, na ausência de NaCl. Embora as condições de cultura já tivessem sido anteriormente otimizadas (secção 5.1.1), optou-se por realizar estes ensaios comparativos uma vez que o comportamento da cultura na presença de iluminação por

LED's poderia ser diferente do observado com as lâmpadas fluorescentes, além de que se pretendia que os ensaios fossem realizados todos com a mesma intensidade luminosa (1,52 klx).

Na figura 18 encontram-se os resultados obtidos nestes ensaios, quer em termos de crescimento da cultura quer da diminuição de nitratos e variação do pH ao longo do ensaio.

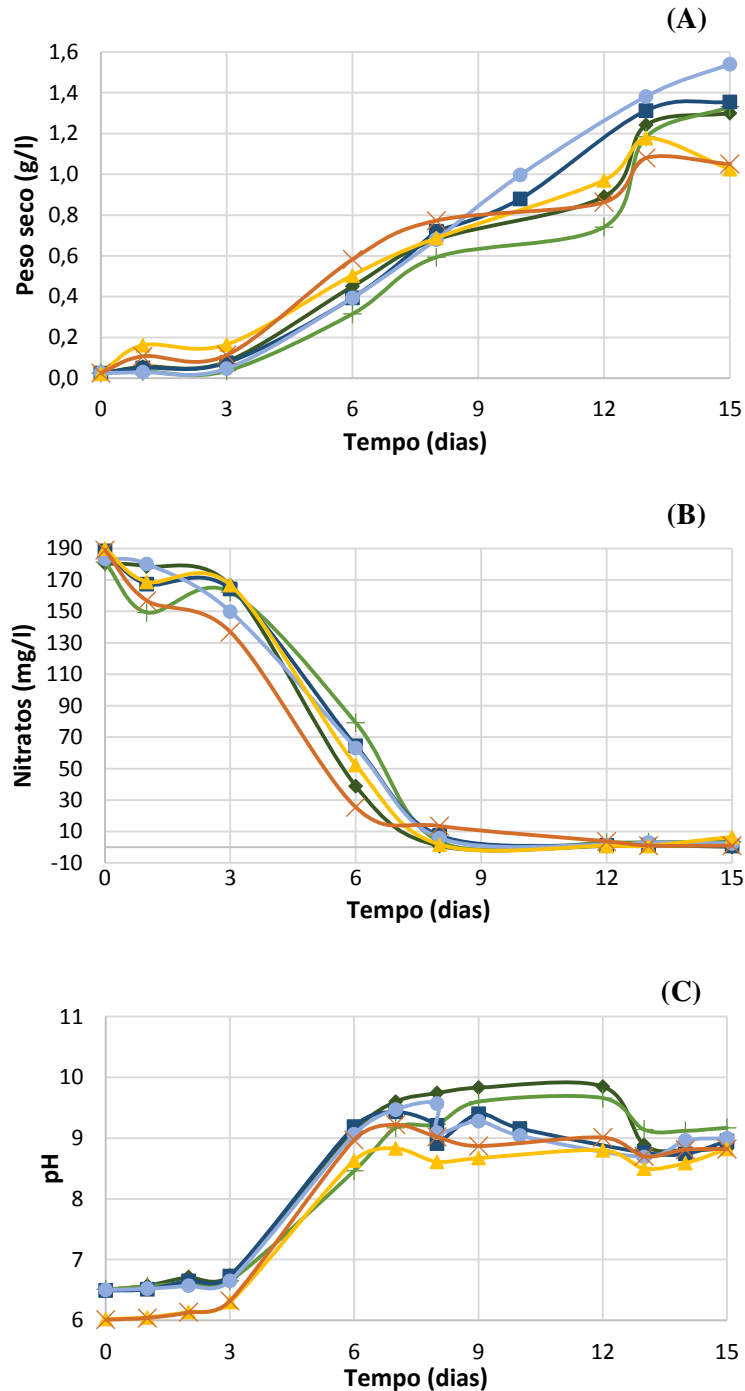


Fig. 18 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) em culturas de *N. oleoabundans* iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED'S, realizadas em reatores de colunas de bolhas com 15 g/l de NaCl desde o início da cultura (▲ e ×, respetivamente), com 15 g/l de NaCl adicionada após escassez de nitratos (8º dia) (■ e ●, respetivamente) e sem NaCl (◆ e +, respetivamente).

Como se pode observar (Fig. 18 (A)), nos primeiros sete dias de cultura os valores mais elevados de pesos secos foram obtidos nas culturas em que a adição de NaCl (15 g/l) foi realizada no início do ensaio. No entanto, os pesos secos finais mais elevados foram obtidos para as culturas com 15 g/l de NaCl adicionado após escassez dos nitratos, com valores de 1,54 g/l e 1,36 g/l na cultura iluminada por lâmpadas LED's e por lâmpadas fluorescentes, respetivamente. Já nas outras condições de cultura, os valores de biomassa final obtidos mostraram ser independentes do tipo de iluminação. Os menores valores de biomassa finais foram obtidos para as culturas com 15 g/l de NaCl desde o início do cultivo. Desta forma, em cada par de reatores com as mesmas características de cultura, sendo a única diferença o tipo de iluminação, constata-se que, em particular quando a adição de NaCl foi efetuada ao 8º dia após inoculação, os valores mais elevados de biomassa foram atingidos para as culturas iluminadas com lâmpadas LED's.

Os valores de DO_{540 nm} das seis culturas também foram monitorizados neste ensaio. A DO_{540 nm} inicial para todas as culturas era aproximadamente 0,038, sendo que os valores máximos atingidos variaram entre 5,430 na cultura sem *stress*, iluminada por lâmpadas LED's (14º dia) e 2,418 na cultura com 15 g/l de NaCl desde o início, iluminada com lâmpadas fluorescentes (13º dia).

Relativamente aos valores de pH, observa-se pela Fig. 18 (C) que todas as culturas começaram com valores cerca de 6,50, exceto as culturas que tinham NaCl desde o início do cultivo (valores de pH ≈ 6,00).

Em cada par de reatores com as mesmas características de cultura, sendo a única diferença entre si o tipo de iluminação, nota-se que as oscilações dos valores de pH ao longo do tempo do cultivo são semelhantes.

As biomassas obtidas no final de cada ensaio foram caracterizadas em termos de teor em lípidos (Tabela 5). Comparando o teor em lípidos presente nas culturas sem *stress* com o existente nas culturas com NaCl, observa-se que o mesmo é sempre menor nas primeiras, à semelhança do que já se tinha verificado nos ensaios anteriores.

Tabela 5 - Teor em lípidos das culturas de *N. oleoabundans* em reatores de colunas de bolhas, iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's.

	Lâmpadas Fluorescentes			Lâmpadas LED's		
	Sem <i>stress</i>	15 g/l NaCl após escassez de nitratos	15 g/l NaCl desde o início da cultura	Sem <i>stress</i>	15 g/l NaCl após escassez de nitratos	15 g/l NaCl desde o início da cultura
Teor lipídico (%m/m biomassa seca)	13,7	13,4	18,4	7,7	18,6	21,6
Teor lipídico (g lípidos/l cultura)	0,178	0,181	0,189	0,103	0,253	0,226

Comparando os teores lipídicos obtidos nos reatores observa-se que estes são mais elevados nas culturas iluminadas por lâmpadas LED's, exceto o da cultura que não estava sob *stress* (Tabela 5). No entanto, foi posteriormente verificado que esta última cultura estava a receber menos intensidade luminosa ao 6º dia de cultura, factor provavelmente responsável pelo baixo teor em lípidos obtido.

Outro dos aspetos que se observa na Tabela 5 é que nas culturas iluminadas por lâmpadas fluorescentes, o maior teor lipídico foi obtido para a cultura que tinha 15 g/l de NaCl desde o início (0,189 g lípidos/ l cultura). Porém, nas culturas iluminadas por lâmpadas LED's, o maior teor

lipídico (0,253 g lípidos/ l cultura) foi obtido para a cultura com adição de 15 g/l de NaCl após escassez de nitratos, tendo um teor lipídico um pouco mais elevado do que a de 15 g/l desde o início da cultura (0,226 g lípidos/ l cultura).

5.1.3 Reator de manga de polietileno: iluminação com lâmpadas fluorescentes

A cultura de *N. oleoabundans* em manga de polietileno tinha como principal objetivo estudar o ciclo de vida desta microalga neste sistema de cultivo, tendo o estudo decorrido durante 26 dias.

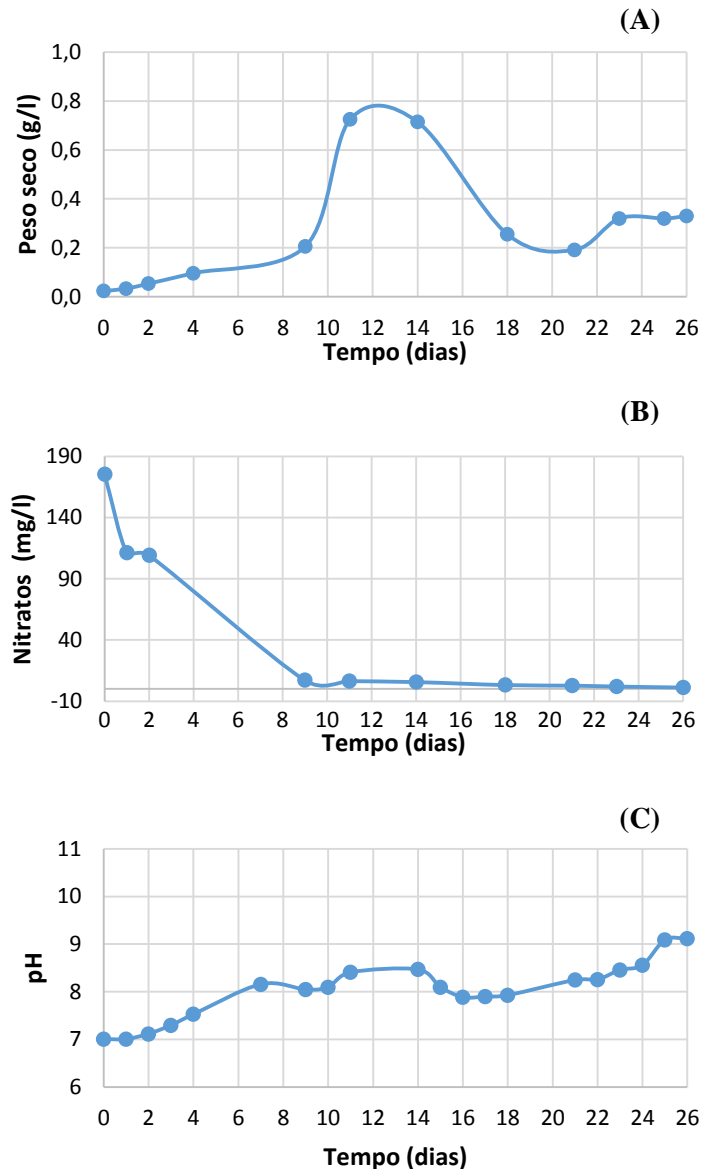


Fig. 19 - Crescimento (A), consumo de nitratos (B) e variação de pH (C) de uma cultura de *N. oleoabundans* sem stress numa manga de plástico.

Como se pode ver na Fig. 19 (A) a cultura foi iniciada com um peso seco de 0,02 g/l, o qual atingiu o seu máximo (0,73 g/l) ao 12º/13º dia após inoculação. Verificou-se depois um decréscimo acentuado do peso seco, obtendo-se um valor final de 0,33 g/l. Relativamente à concentração de nitratos, a cultura apresentava um valor inicial de 175,22 mg/l, tendo-se obtido um valor final de 1,13 mg/l (Fig. 19 (B)), com uma acentuada diminuição dos valores deste nutriente até ao 9º dia de cultura, a partir do qual a diminuição ocorreu a uma taxa menor.

Relativamente à $DO_{540\text{ nm}}$ desta cultura, iniciou-se o crescimento com um valor inicial de 0,125, tendo a cultura atingindo o seu máximo de $DO_{540\text{ nm}}$ ao 15º dia, com o valor 1,917. Relativamente aos valores de pH da cultura (Fig. 19 (C)) ocorreram algumas variações, sendo que o pH inicial foi de 7,01 e o pH final de 9,12.

Estes resultados não podem, no entanto, ser usados para caracterizar o crescimento da microalga *N. oleoabundans* em reator de manga de polietileno, uma vez que durante o ensaio se observou a formação de um biofilme na parede da manga, que impedia a passagem da luz por acumulação de biomassa. Embora se tenha, diariamente, tentado libertar o biofilme adsorvido à superfície da manga, a sua existência foi provavelmente responsável pelos baixos valores de peso seco verificados entre o 18º e 21º dia de cultura, devido a uma deficiente contabilização da biomassa presente na cultura (Fig. 19 (A)).

Além disso, verificou-se que esta cultura de *N. oleoabundans* se encontrava contaminada com outra microalga. As razões de tal contaminação estão associadas a este sistema de cultivo ter estado aberto num ambiente onde se encontravam outras culturas de microalgas nas proximidades. Foram ainda feitas outras tentativas de cultivo de *N. oleoabundans* em mangas de polietileno, mas as culturas foram sempre contaminadas por outras espécies.

A biomassa obtida no final do ensaio foi caracterizada em termos de teor em lípidos, sendo parte da biomassa seca na estufa e outra no secador solar. Atingiu-se o mesmo teor em lípidos (6,56 %) com o valor de 0,022 g lípidos/l cultura.

5.1.4 Fotobioreator planar alveolar: iluminação com lâmpadas fluorescentes

O crescimento de uma cultura de *N. oleoabundans* num fotobioreator planar alveolar, durante 16 dias e iluminada com lâmpadas fluorescentes, teve como principal objetivo estudar o ciclo de vida desta microalga, neste sistema de cultivo. Durante o crescimento da cultura observou-se a formação de um biofilme nas paredes do fotobioreator, sendo o mesmo removido regularmente, com a ajuda de um escovilhão devidamente desinfetado, de modo a não haver diminuição da intensidade luminosa na cultura. Este procedimento poderá ter contribuído para a contaminação da cultura de *N. oleoabundans* por outras espécies de microalgas (Fig. 20). Tal como nas mangas de polietileno, outras tentativas de cultivo de *N. oleoabundans* no fotobioreator planar alveolar foram realizadas, acabando as culturas por ficar sempre contaminadas por outras espécies de microalgas (ex: *Scenedesmus obliquus* e cianobactérias).



Fig. 20 – Observação microscópica da cultura de *N. oleoabundans* obtida do fotobioreator planar alveolar onde se observa a presença de *Scenedesmus obliquus*.

De qualquer forma, apesar das contaminações detetadas, encontra-se na Fig. 21 a evolução do crescimento e do pH da cultura de *N. oleoabundans*. Esta cultura tinha um peso seco inicial de

0,05 g/l atingindo o seu máximo (0,53 g/l) ao 10º dia após inoculação (Fig. 21 (A)). A DO inicial foi de 0,061, atingindo o seu máximo no último dia de cultura com o valor 1,602.

Em termos de pH, a cultura começou com um valor de 7,02, tendo atingido o valor máximo de 11,07 ao 10º dia de cultura (Fig. 21 (B)).

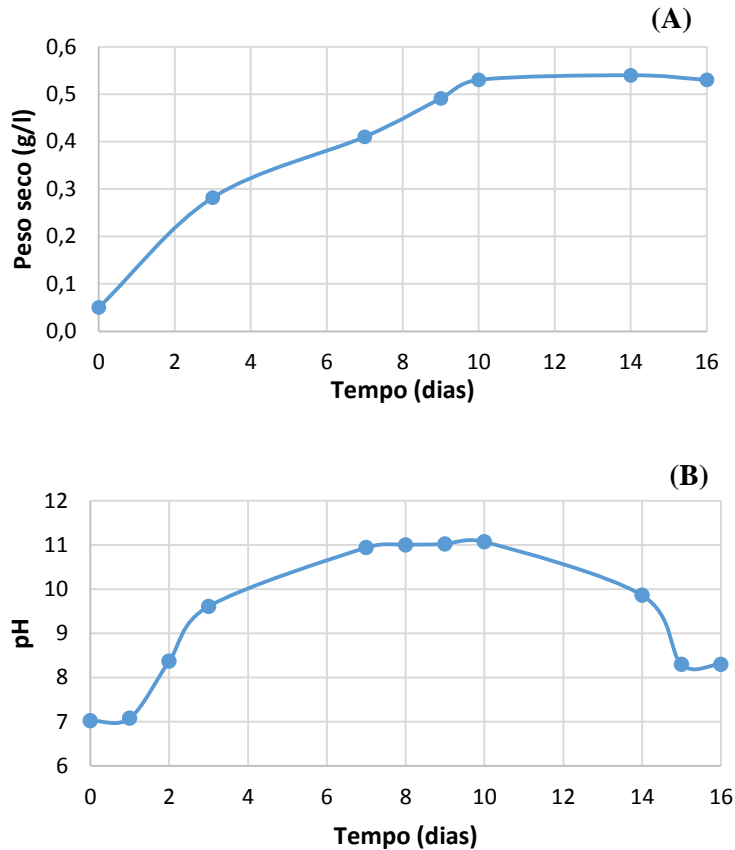


Fig. 21 - Crescimento (A) e variação de pH (B) de uma cultura de *N. oleoabundans* sem stress num fotobioreator planar alveolar.

No final do ensaio, a biomassa microalgal foi caracterizada em termos de teor em lípidos, obtendo-se um valor 6,09%, ou seja, 0,032 g lípidos/l cultura, semelhante ao encontrado para o cultivo em manga de polietileno.

5.1.5 Consumos energéticos

Os consumos energéticos, por dia, gastos em iluminação para as seis culturas (ensaios da secção 5.1.2), estando três delas iluminadas com três lâmpadas LED's e as restantes três iluminadas com três lâmpadas fluorescentes foram de 1,4 kWh/dia e de 3,1 kWh/dia, respetivamente, o que representa uma poupança energética de 54,8% por dia. (Fig. 22). Desta forma, os consumos energéticos no final do tempo de cultivo foram de 21 kWh para as lâmpadas LED's e de 46,5 kWh para as lâmpadas fluorescentes.

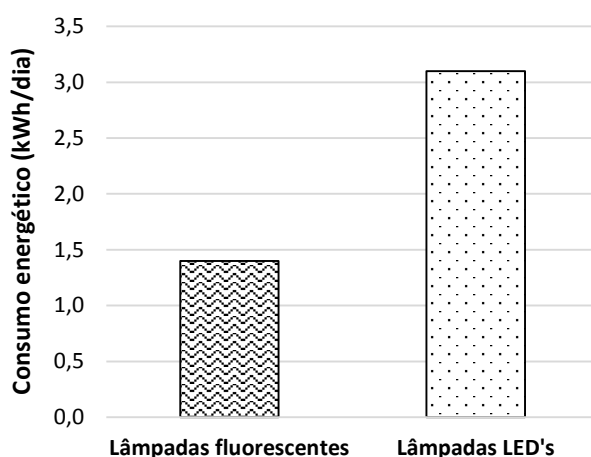


Fig. 22 - Consumos energéticos diários das lâmpadas fluorescentes e LED's.

A extração da fração lipídica presente na biomassa de *N. oleoabundans* envolveu, em todos os ensaios realizados, um consumo energético total, por amostra, de 1 kWh. Na Fig. 23 pode-se observar que o maior consumo energético foi proveniente da estufa utilizada no processo de secagem final do óleo (0,6 kWh), seguido da manta de aquecimento utilizada no processo de extração *Soxhlet* (0,35 kWh) e, por último, do sistema rotavapor/banho termostático usado para evaporação do solvente (0,05 kWh).

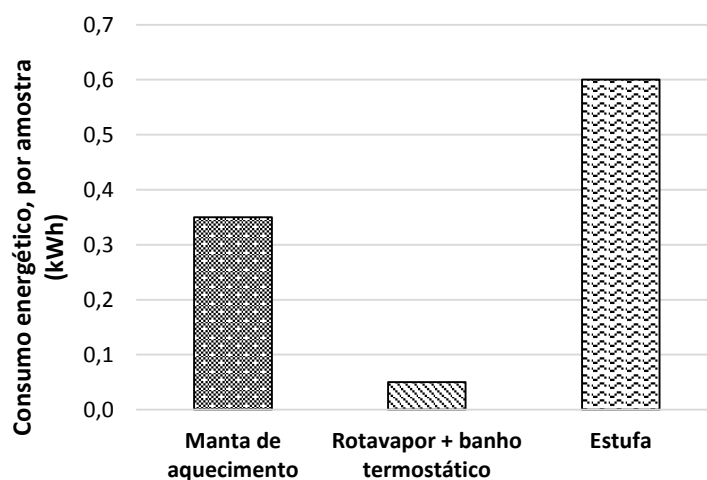


Fig. 23 – Consumos energéticos, por amostra, nos equipamentos utilizados no processo de extração da fração lipídica.

5.2 Colheita de biomassa microalgal de *Neochloris oleoabundans*

5.2.1 Centrifugação vs eletrocoagulação e centrifugação

Para a colheita da biomassa microalgal foi utilizado o processo de eletrocoagulação (EC), no qual a aplicação de uma corrente elétrica ao meio de cultura leva à formação de microbolhas de O₂ e H₂, que sobem até à superfície, arrastando consigo agregados de microalgas (flotação). Estes agregados, por sua vez, foram produzidos pela destabilização causada pelos íons alumínio, que funcionaram como floculante quando à superfície, e devido ao seu peso, caíam posteriormente (sedimentação). No processo de EC realizado no presente trabalho foi possível observar a

acumulação da biomassa à superfície da cultura, apresentando-se o meio bastante límpido, demonstrando uma boa eficiência de separação (Fig. 24).

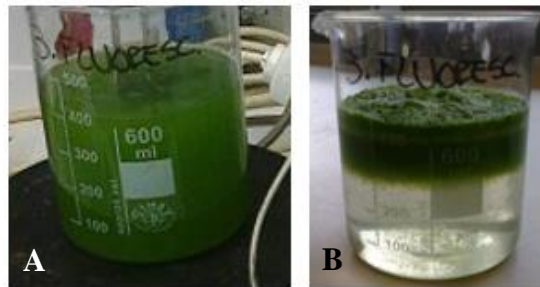


Fig. 24 – Cultura de *N. oleoabundans* antes (A) e após (B) o processo de EC em meio salino, para uma corrente de 0,3 A, durante 15 minutos.

Vários são os parâmetros operacionais da EC que influenciam a eficiência de recuperação de biomassa microalgal, tais como: a intensidade de corrente, o tempo de operação, o pH da solução, a área do eletrodo mergulhado vs volume de solução, a concentração microalgal, o tempo de sedimentação e a fase de crescimento da microalga. Outro dos factores que interfere com a eficiência da EC é a salinidade. A eficiência deste processo é superior em espécies de microalgas marinhas, pois a presença de NaCl aumenta a condutividade e, conseqüentemente leva a um menor consumo de energia elétrica da EC. Desta forma, conseguem-se melhores eficiências de recuperação de biomassa com culturas salinas, tais como a *Nannochloropsis* sp. (Matos *et al.*, 2013) ou a *Tetraselmis* sp. (Uduman *et al.*, 2011), do que com culturas de água doce (*Chlorella vulgaris*) (Matos *et al.*, 2013).

No presente estudo apenas as culturas de reatores de colunas de bolhas iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's, foram sujeitas a eletrocoagulação e posterior centrifugação. Neste caso, testou-se o efeito de dois tempos de operação, um para as culturas em meio salino (15 minutos) e outro para as culturas em água doce (45 minutos). Manteve-se constante a intensidade de corrente com o valor de 0,3 A e a área de eletrodo mergulhado de 12 cm² (densidade de corrente de 25 mA/cm²). Para minimizar o número de parâmetros em estudo, só se testou para todas as culturas sujeitas ao processo de EC o tempo de repouso de 30 minutos, apesar de se saber que quanto maior o tempo de repouso após a EC, maior é a eficiência do processo de separação.

Os resultados da Tabela 6 revelam que as culturas em água doce, iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's, precisaram de 45 minutos para atingir uma eficiência de cerca de 96,3% e 95,8%, respetivamente.

Tabela 6 – Eficiências de recuperação de biomassa por EC de culturas de *N. oleoabundans* com uma densidade de corrente de 25 mA/cm² e após 30 minutos de repouso.

Iluminação	<i>N. oleoabundans</i> sem NaCl na cultura		<i>N. oleoabundans</i> com 15 g/l de NaCl após escassez de nitratos na cultura		<i>N. oleoabundans</i> com 15 g/l de NaCl desde o início da cultura	
	Fluorescente	LED	Fluorescente	LED	Fluorescente	LED
Tempo de EC (min)	45		15		15	
Concentração microalgal (g/l)	1,30	1,33	1,36	1,36	1,03	1,05
pH	8,83	9,17	8,95	9,00	8,82	8,82
η_{EC} (%) 25 mA/cm ²	96,3	95,8	95,8	95,6	96,2	96,4

As culturas com adição de 15 g/l de NaCl após escassez de nitratos e desde o início atingiram eficiências de EC na ordem dos 96% apenas em 15 minutos (Tabela 6). Comparando as eficiências das culturas apresentadas na Tabela 6, observa-se que aquelas em que a adição de NaCl foi feita após escassez de nitratos apresentam eficiências de EC ligeiramente inferiores às observadas para as culturas em que a adição de NaCl foi realizada no início da cultura. Tal pode ser devido ao facto das culturas em que o sal esteve sempre presente desde o início possuírem uma menor concentração de biomassa.

O valor mais elevado para a eficiência de remoção (96,4 % em 15 min) foi obtido na cultura com 15 g/l de NaCl desde o início e iluminada com lâmpadas LED's, apesar de a diferença para os restantes valores não ser significativa (Tabela 6). Este resultado é melhor do que o referido no estudo de Matos *et al.* (2013), em que a eletrocoagulação de *Nannochloropsis sp.* (cultura em meio salino – 30 g/l de NaCl) durante 10 minutos, com uma densidade de corrente de 3,3 mA/cm², um tempo de sedimentação de 30 minutos e uma área de eléctrodo por volume de cultura de 30 cm²/l, permitiu obter uma eficiência de apenas 91,8%.

Após a eletrocoagulação seguiu-se um processo de centrifugação, havendo uma diminuição significativa do volume total de cultura a centrifugar devido à utilização do processo de EC. Os consumos energéticos finais máximos associados a estes dois processos de recolha de biomassa das culturas foram de 0,036 kWh numa cultura não salina e de 0,028 kWh numa cultura salina (Tabela 7). Esta diferença de consumos energéticos entre as culturas salinas e não salinas é devido ao tempo de EC, que é influenciado pela presença ou não de NaCl nas culturas. Ou seja, culturas salinas necessitam de menos tempo de EC do que as culturas não salinas, levando a menores consumos energéticos.

Tabela 7 - Volumes e consumos energéticos de centrifugação e eletrocoagulação para diferentes cenários em culturas de *N. oleoabundans*.

	Tipo de cultura	Não salina		Salina			
	Características da cultura	Sem <i>stress</i>		15 g/l de NaCl após escassez de nitratos		15 g/l de NaCl desde o início da cultura	
		Lâmpadas	Fluor.	LED	Fluor.	LED	Fluor.
Centrifugação	Volume centrifugado (l)	0,820	0,820	0,80	0,81	0,80	0,80
	Consumo centrifugação (kWh)	0,123	0,123	0,120	0,122	0,120	0,120
Centrifugação + EC	Volume eletrocoagulado (l)	0,82	0,82	0,80	0,81	0,80	0,80
	Consumo EC (kWh)	0,011	0,011	0,004	0,004	0,004	0,004
	Volume centrifugado (l)	0,160	0,170	0,140	0,140	0,150	0,160
	Consumo centrifugação (kWh)	0,024	0,026	0,021	0,021	0,023	0,024
	Consumo EC + Centrifugação (kWh)	0,035	0,036	0,025	0,025	0,026	0,028

Se apenas se tivesse aplicado como processo de colheita da biomassa microalgal a centrifugação, os consumos energéticos associados a este processo seriam muito mais elevados do que usando EC e centrifugação (Tabela 7), variando entre 0,120 kWh e 0,123 kWh, dependendo do volume de cultura a centrifugar.

Pode-se, portanto, concluir que a utilização do processo de EC antes da centrifugação resultou em diminuições energéticas máximas de 71,8% e 79,8 % em culturas não salinas e salinas, respetivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Poupança energética dos processos de centrifugação e eletrocoagulação para diferentes cenários em culturas de *N. oleoabundans*.

Tipo de cultura	Não salina		Salina			
	Sem <i>stress</i>		15 g/l de NaCl após escassez de nitratos		15 g/l de NaCl desde o início da cultura	
	Fluores.	LED	Fluores.	LED	Fluores.	LED
Poupança energética (%)	71,8	71,0	79,5	79,8	78,3	77,0

Na Figura 25 são apresentadas as variações dos consumos elétricos, por metro cúbico de uma cultura salina e uma não salina, em função do processo utilizado para a colheita das microalgas.

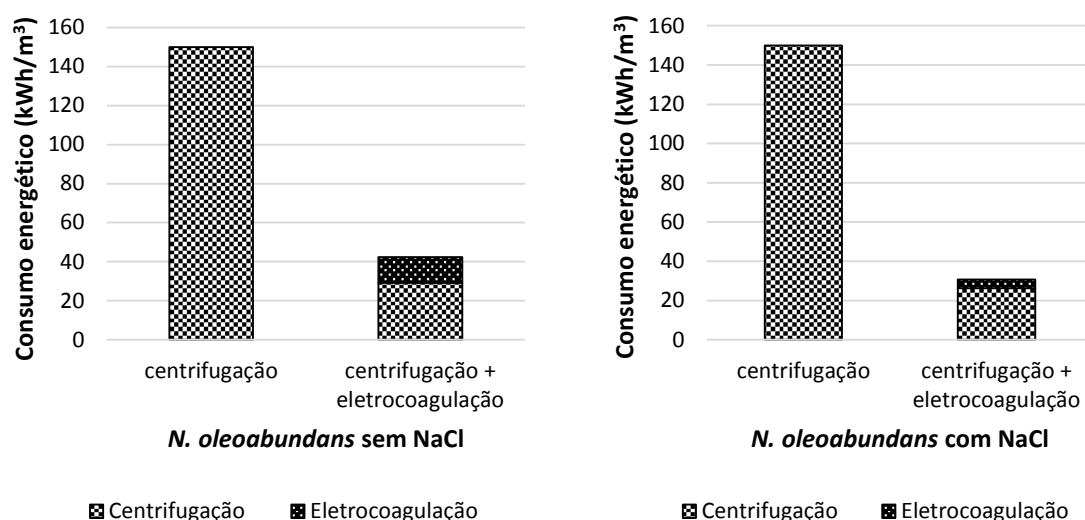


Fig. 25 – Estimativa do consumo energético para diferentes cenários de colheita de microalgas salinas e não salinas, por metro cúbico de cultura.

Os resultados obtidos neste estudo não têm um impacto positivo tão significativo como os obtidos por Matos *et al.* (2013) para a *Nannochloropsis* sp e por Ferreira *et al.* (2015) para a *Spirogyra* sp., que obtiveram uma diminuição energética de 92% e de 90%, respetivamente.

5.3 Secagem da biomassa microalgal de *Neochloris oleabundans*

5.3.1 Secador solar vs estufa

A biomassa microalgal obtida após centrifugação, com um teor de humidade de cerca de 85%, foi sujeita a secagem em estufa e em secador solar, de modo a se avaliar a influência do processo de secagem quer no consumo energético quer na qualidade da biomassa.

Os resultados obtidos (Tabela 9) mostram que, para a secagem da biomassa em estufa, se obtinha um peso constante da amostra após 4 h a 70°C, o que conduziu a um consumo energético de cerca de 0,3 kWh.

Tabela 9 – Secagem em estufa.

Tempo de secagem	Peso da biomassa após secagem (g)
3 h	0,57
4 h	0,71
5 h	0,71

Em comparação, na secagem da biomassa no secador solar atingiu-se um peso constante da amostra ao fim de 3 h. O consumo energético associado a este processo de secagem foi de 0,06 kWh devido ao auxílio de uma pequena ventoinha elétrica (DC) de 20 W.

Como se pode observar pela Fig. 26, o secador solar atingiu uma temperatura máxima de 55,3°C, aos 125 minutos e a temperatura média de secagem foi de 50,9°C. Relativamente ao exterior, a temperatura máxima foi de 31,5°C, aos 7 minutos e a temperatura média foi de 29°C.

No que diz respeito à radiação recebida, no plano horizontal a média foi de 572 W/m² e no plano inclinado foi de 670 W/m². Aos 165 minutos, a radiação no plano horizontal e no inclinado desceu, voltando a subir de seguida. Tal deveu-se à passagem de nuvens no momento das medições, efeito que também é visível na diminuição da temperatura no secador solar (Fig. 26).

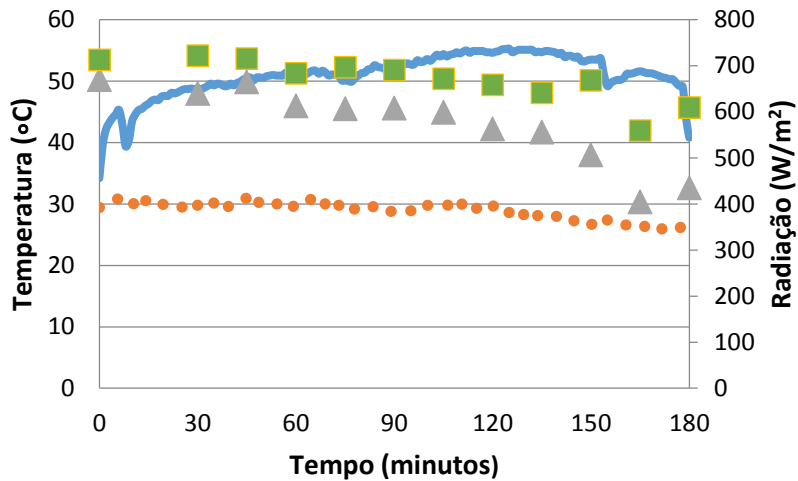


Fig. 26 – Evolução da temperatura ambiente (●●●) e interior do secador solar (—), da radiação no plano horizontal (▲) e inclinado (■), durante o processo de secagem da biomassa microalgal.

De um modo geral, observando a Fig. 27 pode-se concluir que a poupança de consumo energético usando o secador solar foi de 80%, dado que se obteve um consumo de 71,4 Wh/g de biomassa húmida para o caso da estufa e de 14,3 Wh/g de biomassa húmida, com o secador solar. Contudo, o consumo energético do secador solar pode ser nulo, caso não se use a ventoinha, tendo apenas como consequência uma secagem mais lenta.

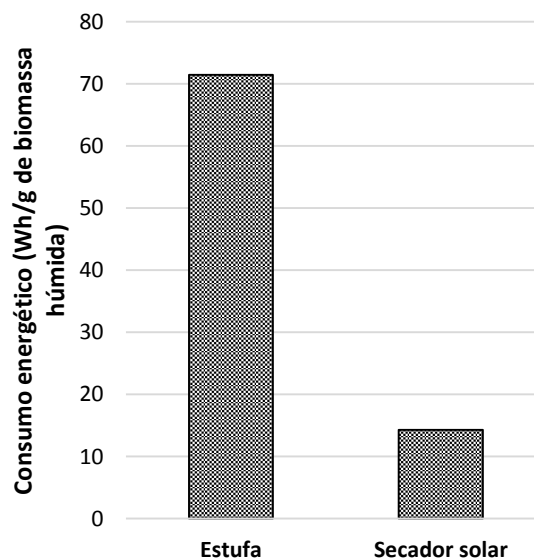


Fig. 27 – Consumo energético no processo de secagem usando estufa e o secador solar.

5.4 Caracterização da fração lipídica da biomassa microalgal de *Neochloris oleoabundans*

5.4.1 Composição em ácidos gordos

A composição em ácidos gordos das frações lipídicas extraídas da biomassa microalgal, produzida ao longo dos vários ensaios realizados neste trabalho, foi determinada por cromatografia em fase gasosa, e encontra-se apresentada nas Tabelas 10, 11 e 12.

Como se pode ver na Tabela 10 a composição das frações lipídicas provenientes dos ensaios relativos ao estudo da influência da presença de NaCl (1ª experiência), realizados nos reatores de colunas de bolhas (secção 5.1.1 (a)), apresenta um elevado teor de ácidos gordos insaturados (cerca de 63%), principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2). No entanto, a percentagem relativa destes ácidos gordos mostrou ser dependente do tempo de cultivo ao qual a salinidade do meio foi alterada, tendo um maior teor de C18:1 sido observado no ensaio em que se adicionou NaCl desde o início da cultura. Para ambos os ensaios, o teor de ácido linolénico (C18:3) encontra-se dentro das especificações da norma europeia de qualidade do biodiesel, EN 14214, que estabelece um limite de 12% para o éster metílico deste ácido gordo. Contrariamente ao obtido nestes ensaios, (Gouveia e Oliveira, 2009) observaram que o valor do ácido linolénico da cultura de *N. oleoabundans* (17,43 %) era superior ao limite estabelecido pela norma, o que provavelmente está associado às diferentes condições de cultura utilizadas.

Tabela 10 - Composição em ácidos gordos (%m/m) das culturas de *N. oleoabundans*, nos reatores de colunas de bolhas.

	Reatores de colunas de bolhas					
	1ª experiência		2ª experiência			
	10 g/l NaCl após escassez de nitratos	10 g/l NaCl desde o início	10 g/l NaCl após escassez de nitratos	5 g/l NaCl desde o início	10 g/l NaCl desde o início	15 g/l NaCl desde o início
C10:0	0,15	0,15	0,34	0,35	1,00	0,10
C12:0	0,32	0,34	0,07	0,02	0,02	0,01
C14:0	1,49	0,73	2,09	1,49	0,87	0,52
C16:0	23,43	26,01	25,31	20,33	18,39	19,35
C16:1	0,49	1,89	2,51	2,18	1,97	1,37
C17:0	0,57	0,79	1,99	1,34	0,94	0,60
C18:0	2,50	2,69	2,65	3,05	3,39	3,51
C18:1	38,91	48,63	38,45	50,41	54,02	57,77
C18:2	20,08	11,07	17,82	14,27	13,79	11,80
C18:3	4,31	1,16	4,10	3,15	2,48	1,85
C20:0	n.d.	0,07	n.d.	n.d.	n.d.	0,14
C22:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,09
C22:1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,10	0,03
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,29	n.d.
Outros	7,74	6,48	4,67	2,83	2,74	2,77
Saturados	28,47	30,77	32,45	26,57	24,91	24,33
Insaturados	63,79	62,75	62,88	70,02	72,35	72,83
Monoinsaturados	39,40	50,52	40,96	52,59	56,09	59,18

n.d. – não detetado

Nos ensaios em que se estudou a influência da quantidade de NaCl (2ª experiência), realizados nos reatores de colunas de bolhas (secção 5.1.1 (b)), verificou-se que a percentagem de ácido oleico C18:1, assim como do total de ácidos gordos insaturados, aumentou com o aumento da quantidade de NaCl presente no meio de cultivo (Tabela 10). Já a percentagem de ácidos gordos C16:1, C18:2 e C18:3 (Fig. 28), assim como o total de ácidos gordos saturados, diminuiu com o aumento da quantidade de NaCl adicionada às culturas. Uma vez mais, os valores para o ácido linolénico cumprem a especificação exigida para biodiesel.

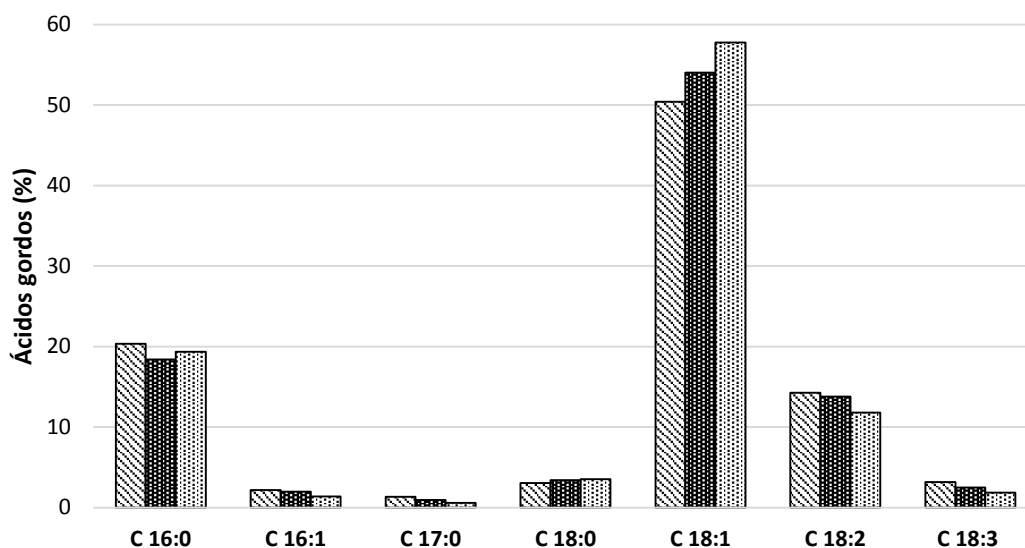


Fig. 28 - Composição dos principais ácidos gordos (%m/m) das culturas de *N. oleoabundans* em reatores de colunas, com 5 (▨), 10 (▧) e 15 (▩) g/l de NaCl desde o início da cultura.

Em relação aos ácidos gordos presentes na fração lipídica extraída da biomassa microalgal produzida no fotobioreator planar alveolar (secção 5.1.4), pode-se observar na Tabela 11 que a percentagem de ácidos gordos saturados foi de 34,43% e a de ácidos gordos insaturados de 59,99%, valores não muito diferentes dos obtidos nos ensaios realizados em reator de coluna de bolhas com 10 g/l de NaCl adicionado ao meio de cultura. Este facto é interessante, na medida em que a cultura proveniente do fotobioreator se encontrava contaminada com microalgas de outras espécies, o que poderia ter levado à alteração do perfil em ácidos gordos dos lípidos produzidos.

Como se pode constatar na Tabela 11, o processo utilizado para a secagem da biomassa microalgal proveniente da manga de polietileno (secção 5.1.3) não influenciou significativamente a composição em ácidos gordos da fração lipídica, o que abona a favor da utilização do processo de secagem renovável (secador solar) para o fim em vista. No entanto, o perfil de ácidos gordos obtido neste ensaio é diferente do observado quer para a cultura em fotobioreator planar quer em reator de coluna de bolhas, em particular no que diz respeito à percentagem de ácido oleico (C18:1) e ácido linolénico (C18:3) presente na fração lipídica microalgal. Na origem desta alteração dos valores dos ácidos gordos está certamente a contaminação da cultura, que ocorreu neste ensaio e que influenciou a predominância de uns ácidos gordos em relação aos outros devido às várias espécies de algas presentes no meio. De notar que nestas frações lipídicas a percentagem de ácido linolénico é superior à especificação da norma EN 14214, pelo que para se obter um biodiesel de qualidade relativamente a este parâmetro seria necessário utilizar uma mistura com outro óleo ou biodiesel que permitisse uma diminuição desse valor.

Tabela 11 - Perfil de ácidos gordos de biomassa microalgal de *N. oleoabundans* proveniente do fotobioreator planar e do reator de manga de plástico, com secagem da biomassa em estufa e num secador solar.

	FBR planar	Manga	
		Secador solar	Estufa
C10:0	1,71	n.d.	n.d.
C12:0	0,26	n.d.	n.d.
C14:0	1,17	3,63	1,46
C16:0	27,72	29,23	26,92
C16:1	5,87	4,39	4,30
C17:0	0,69	2,59	0,66
C18:0	2,87	1,58	0,88
C18:1	35,66	19,97	19,88
C18:2	12,01	10,36	12,08
C18:3	6,45	14,62	16,16
C20:0	n.d.	n.d.	n.d.
C22:0	n.d.	n.d.	n.d.
C22:1	n.d.	n.d.	n.d.
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.
Outros	5,58	13,63	17,66
Saturados	34,43	37,03	29,92
Insaturados	59,99	49,34	52,42
Monoinsaturados	41,53	24,36	24,18

n.d. – não detetado

Nos ensaios em que se realizou o estudo do efeito do tipo de iluminação (3ª experiência), em reatores de coluna de bolhas (secção 5.1.2), observa-se que, quer para a iluminação com lâmpadas fluorescentes quer com LED's, o perfil de ácidos gordos é semelhante para as condições sem *stress* e com *stress* salino após escassez de nitratos, havendo uma alteração significativa em particular da percentagem de ácido oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) quando o a adição de sal é realizada no início do processo. Pode-se ainda constatar neste estudo, que a composição em ácidos gordos depende do tipo de iluminação obtendo-se, no geral, valores mais elevados nas culturas iluminadas com lâmpadas fluorescentes (Tabela 12). O ácido oleico (C18:1) é o que se encontra em maior quantidade em todas as culturas, variando de 32,13% a 58,41%. Os ácidos gordos mais abundantes nas culturas que estão sob escassez de nitratos são o C16:0 e o C18:1, o que vai de encontro ao que foi obtido por Santos et al. (2012). Este resultado também ocorreu nos ensaios da primeira e segunda experiência dos reatores de colunas de bolhas.

Outra conclusão que se pode tirar relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados, e que também se concluiu com a 1ª experiência em reatores de coluna de bolhas, é que estes ácidos são produzidos em maior quantidade nos reatores contendo NaCl desde o início da cultura, em comparação com o obtido nos reatores de colunas de bolhas com NaCl após escassez de nitratos. Esta conclusão é válida tanto nas culturas iluminadas com lâmpadas fluorescentes como nas culturas cuja fonte de luz foram LED's (Tabela 12).

Comparativamente, as culturas sem NaCl e com 15 g de NaCl após escassez de nitratos apresentam os ácidos gordos monoinsaturados com valores muito próximos, tanto no caso das culturas iluminadas com lâmpadas fluorescentes como com LED's (Tabela 12).

Tabela 12 - Perfil de ácidos gordos de culturas de *N. oleabundans* iluminadas com lâmpadas fluorescentes e LED's em reatores de colunas de bolhas.

	Reatores de colunas de bolhas (3ª experiência)					
	Lâmpadas Fluorescentes			Lâmpadas LED's		
	Sem stress	15 g/l NaCl após escassez de nitratos	15 g/l NaCl desde o início	Sem stress	15 g/l NaCl após escassez de nitratos	15 g/l NaCl desde o início
C10:0	0,17	0,47	0,53	0,73	2,52	0,14
C12:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C14:0	0,38	0,27	0,26	0,62	0,23	0,19
C16:0	25,49	24,37	18,82	28,17	25,96	19,90
C16:1	0,65	0,60	0,04	0,52	0,97	0,41
C17:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C18:0	3,81	3,07	4,03	3,47	2,13	2,92
C18:1	38,16	39,14	58,41	34,72	32,13	49,41
C18:2	20,63	18,93	10,99	19,24	21,86	16,99
C18:3	4,75	5,69	2,27	5,06	6,25	3,74
C20:0	0,14	n.d.	0,17	0,29	0,08	0,07
C22:0	n.d.	0,08	0,11	n.d.	n.d.	n.d.
C22:1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Outros	5,82	7,39	4,38	7,18	7,87	6,22
Saturados	29,99	28,26	23,92	33,27	30,92	23,23
Insaturados	64,19	64,35	71,70	59,55	61,21	70,55
Monoinsaturados	38,81	39,73	58,45	35,25	33,10	49,82

n.d. – não detetado

5.4.2 Índices de iodo

Com base no perfil de ácidos gordos, foi determinado o índice de iodo para as várias frações lipídicas (Tabela 13). Os resultados mostram que, em todos os casos, o valor calculado para o índice de iodo se encontra de acordo com o estabelecido pela norma EN 14214 (120 g I₂/100 g). As variações observadas neste parâmetro (de 66 a 85 g I₂/100g) estão associadas com a diferente composição em ácidos gordos de algumas frações lipídicas, sendo que os valores mais elevados correspondem a um maior grau de insaturação dos ácidos gordos. Assim, tendo apenas em conta o valor do índice de iodo, pode-se dizer que a utilização de qualquer uma destas frações lipídicas iria permitir obter um biodiesel que não causasse problemas, nomeadamente relacionados com a degradação do biodiesel e com o seu ponto de turvação.

Tabela 13 – Índice de iodo das várias frações lipídicas extraídas da biomassa microalgal.

		Índice de iodo (g I ₂ /100 g)	
Fotobioreator planar alveolar		Sem <i>stress</i>	73,9
Manga	Estufa	Sem <i>stress</i>	85,2
	Secador solar	Sem <i>stress</i>	77,5
1ª Experiência das colunas de bolhas		10 g/l NaCl após escassez	80,0
		10 g/l NaCl desde o início	65,8
2ª Experiência das colunas de bolhas		10 g/l NaCl após escassez	77,0
		5 g/l NaCl desde o início	78,4
		10 g/l NaCl desde o início	78,8
		15 g/l NaCl desde o início	76,3
3ª Experiência das colunas de bolhas	Lâmpadas Fluorescentes	Sem <i>stress</i>	81,6
		15 g/l NaCl após escassez	81,9
		15 g/l NaCl desde o início	75,2
	Lâmpadas LED's	Sem <i>stress</i>	76,9
		15 g/l NaCl após escassez	82,8
		15 g/l NaCl desde o início	82,1
Valores estabelecidos pela norma EN 14214: 2012			120 (máx.)

Notas: Sem *stress*– cultura de *N. oleoabundans* sem *stress*

15 g/l NaCl após escassez – *N. oleoabundans* com 15 g de NaCl após escassez de nitratos

15 g/l NaCl desde o início – *N. oleoabundans* com 15 g de NaCl desde o início da cultura

10 g/l NaCl após escassez – *N. oleoabundans* com 10 g de NaCl após escassez de nitratos

10 g/l NaCl desde o início – *N. oleoabundans* com 10 g de NaCl desde o início da cultura

5 g/l NaCl desde o início – *N. oleoabundans* com 5 g de NaCl desde o início da cultura

máx. – máximo

6. Conclusões

Neste trabalho usaram-se técnicas não convencionais para a produção, colheita e secagem da biomassa microalgal, que revelaram impactos positivos em termos energéticos. Assim:

- a produção de biomassa em culturas iluminadas por lâmpadas LED's mostrou uma diminuição de 54,8% em energia, por comparação com as culturas iluminadas com lâmpadas fluorescentes;
- no processo de colheita da biomassa microalgal, a eletrocoagulação permitiu diminuições máximas de 71,8% e 79,8% de energia em culturas salinas e não salinas, respetivamente, comparativamente com o método convencional de centrifugação.
- a secagem da biomassa em secador solar apresentou uma poupança energética de 80%, por comparação com o método convencional de secagem em estufa. Outra das vantagens do processo de secagem solar é que este é rápido (3 horas com uso da ventoinha), para condições climáticas favoráveis, nomeadamente a presença de sol. Pode ainda, ter um consumo energético nulo, caso não se use ventoinha, tendo como consequência uma secagem mais lenta.

Após a produção, colheita e secagem da biomassa de *N. oleoabundans*, o seu teor lipídico foi avaliado, tendo-se obtido o valor mais elevado (0,434 g lípidos/l cultura) numa cultura em reator de coluna de bolhas em que foi feita adição de 15 g/l de NaCl no início da mesma, tendo o ensaio decorrido com iluminação com lâmpadas fluorescentes (2,37 klx) e uma temperatura de aproximadamente 27 °C.

As culturas de *N. oleoabundans* em reatores de colunas de bolhas iluminadas com lâmpadas fluorescentes com diferentes intensidades luminosas (1,53 e 2,37 klx) revelaram teores de lípidos mais elevados quando se adicionou NaCl desde o início à cultura. Nas culturas iluminadas por lâmpadas LED's (1,53 klx) o maior teor lipídico (0,253 g lípidos/l cultura) manifestou-se na cultura com adição de 15 g/l de NaCl após escassez de nitratos. Comparando os reatores de colunas de bolhas com iluminação por lâmpadas LED's e fluorescentes, observou-se que os teores lipídicos mais elevados foram os das culturas iluminadas por lâmpadas LED's, exceto o da cultura que não estava sob *stress*. Tal exceção pode ter sido devido ao facto desta cultura ter recebido menos intensidade luminosa até ao 6º dia de cultura. Também se observou que o teor de lípidos presente nas culturas sem *stress* era sempre menor do que o existente nas culturas com NaCl, sendo este resultado corroborado por inúmeros estudos publicados.

Este trabalho também permitiu concluir que maiores quantidades de NaCl no meio de cultura levaram a maiores teores lipídicos, tendo-se obtido 0,229 g lípidos/l cultura, 0,419 g lípidos/l cultura e 0,434 g lípidos/l cultura, para culturas em reatores de colunas de bolhas contendo, respetivamente, 5, 10 e 15 g/l de NaCl desde o início das mesmas

Nas culturas em reator de manga de polietileno e em fotobioreator planar alveolar sem *stress* aplicado, obtiveram-se teores de lípidos de 0,022 g lípidos/l cultura e 0,032 g lípidos/l cultura, respetivamente. No entanto, em ambas as culturas se verificaram contaminações.

As frações lipídicas obtidas nos diversos ensaios mostraram ser constituídas por elevado teor de ácidos gordos insaturados (> 49,34 %). No estudo da influência da presença de NaCl (1ª experiência), realizado nos reatores de colunas de bolhas, a percentagem relativa dos ácidos gordos maioritários (C18:1 e C18:2) mostrou ser dependente do tempo de cultivo ao qual a salinidade do meio foi alterada, tendo um maior teor de C18:1 sido observado no ensaio em que se adicionou NaCl desde o início da cultura. Verificou-se, também, que o aumento da quantidade de NaCl presente no meio (2ª experiência), entre 5 e 15 g/l, conduziu a um aumento da percentagem de C18:1 e do total de ácidos gordos insaturados. Pelo contrário, a percentagem de ácidos gordos C16:1, C18:2 e C18:3 e o total de ácidos gordos saturados diminuiu com o aumento da quantidade de NaCl adicionada às culturas.

Quando se estudou o efeito do tipo de iluminação (3ª experiência), em reatores de coluna de bolhas, observou-se que, quer para a iluminação com lâmpadas fluorescentes quer com LED's, o

perfil de ácidos gordos era semelhante para as condições sem *stress* e com *stress* salino após escassez de nitratos, havendo uma alteração significativa de C18:1 e de C18:2 quando a adição de sal era realizada no início do processo. Constatou-se, ainda, que a composição em ácidos gordos dependia do tipo de iluminação obtendo-se, no geral, valores mais elevados nas culturas iluminadas com lâmpadas fluorescentes.

Na biomassa microalgal produzida no fotobioreator planar alveolar observou-se que a percentagem de ácidos gordos saturados (34,43%) e a de ácidos gordos insaturados (59,99%) tiveram valores muito parecidos com os obtidos nos ensaios realizados em reator de coluna de bolhas com 10 g/l de NaCl adicionado ao meio de cultura.

O tipo de processo utilizado na secagem da biomassa mostrou não ter influencia significativa na composição em ácidos gordos da fração lipídica.

Por fim, verificou-se que para todos os ensaios realizados neste trabalho, os índices de iodo encontraram-se dentro da especificação da norma europeia de qualidade do biodiesel EN 14214 (120 g I₂/100 g). Relativamente aos teores de ácido linolénico (C18:3), a única cultura que não cumpriu o valor estabelecido pela norma EN 14214 (limite de 12%) foi a proveniente da manga de polietileno, cultura essa que se encontrava contaminada.

A microalga *Neochloris oleoabundans* mostrou ter potencial para a produção de biodiesel, e as tecnologias de baixo custo e baixo consumo energético, revelaram-se tecnicamente eficientes. Isto permitirá uma redução significativa do preço do biodiesel baseado em microalgas, bem como da pegada de carbono, com grande benefício para o ambiente.

7. Referências

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R., e Najafi, G. (2012). Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, *63*, 138–148. doi:10.1016/j.enconman.2012.02.027
- Abdelaziz, A. E. M., Leite, G. B., e Hallenbeck, P. C. (2014). Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels. *Environmental technology*, *34*(13-16), 1807–36. doi:10.1080/09593330.2013.831487
- Abiusi, F., Sampietro, G., Marturano, G., Biondi, N., Rodolfi, L., D'Ottavio, M., e Tredici, M. R. (2014). Growth, photosynthetic efficiency, and biochemical composition of *Tetraselmis suecica* F&M-M33 grown with LEDs of different colors. *Biotechnology and bioengineering*, *111*(5), 956–64. doi:10.1002/bit.25014
- Arredondo-Vega, B. O., Band-Schmidt, C. J., e Vazquez-Duhalt, R. (1995). Biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium. *Cytobios Journal*, 1995.
- Atabani, A. E., Silitonga, A. S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., e Mekhilef, S. (2012). A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(4), 2070–2093. doi:10.1016/j.rser.2012.01.003
- Atadashi, I. M., Aroua, M. K., e Aziz, A. A. (2010). High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(7), 1999–2008. doi:10.1016/j.rser.2010.03.020
- Balat, M., e Balat, H. (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, *87*(6), 1815–1835. doi:10.1016/j.apenergy.2010.01.012
- Barbosa, M. J. (2003). *Microalgal photobioreactors : scale - up and optimisation*.
- Benjumea, P., Agudelo, J. R., e Agudelo, A. F. (2011). Effect of the Degree of Unsaturation of Biodiesel Fuels on Engine Performance, Combustion Characteristics, and Emissions. *Energy & Fuels*, *25*(1), 77–85. doi:10.1021/ef101096x
- Bianchi-de-Aguiar, F., e Pereira, H. (2010). Biocombustíveis em Portugal que futuro? *Galp Energia*.
- Bozbas, K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *12*(2), 542–552. doi:10.1016/j.rser.2005.06.001
- Brennan, L., e Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(2), 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009
- Campenni, L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, A. C., Aires-Barros, M. R., Palavra, A. M., e Gouveia, L. (2013). Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga

- Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1383–93. doi:10.1007/s00253-012-4570-6
- Cañavate, J. P., e Fernández-Díaz, C. (2001). Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream *Sparus aurata* / larvae. *Aquaculture*, 257–269.
- Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., e Malcata, F. X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1275–88. doi:10.1007/s00253-010-3047-8
- Chapman, R. L. (2010). Algae: the world's most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 5–12. doi:10.1007/s11027-010-9255-9
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., e Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource technology*, 102(1), 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chen, P., Min, M., Chen, Y., Wang, L., Li, Y., Chen, Q., Wang, C., Wan, Y., Wang, X., Cheng, Y., Deng, S., Hennessy, K., Lin, X., Liu, Y., Wang, Y., Martinez, B., e Ruan, R. (2009). Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2(4). doi:10.3965/j.issn.1934-6344.2009.04.001-030
- Chen, Y., e Lee, M. (2012). Double-power double-heterostucture light-emitting diodes in microalgae, *Spirulina platensis* and *Nannochloropsis oculata*, cultures. *Journal of Marine Science and Technology*, 20(2), 233–236.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Clarens, A. F., Resurreccion, E. P., White, M. A., e Colosi, L. M. (2010). Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environmental science & technology*, 44(5), 1813–9. doi:10.1021/es902838n
- Commission, E. (1997). Communication from the Commission ENERGY FOR THE FUTURE : RENEWABLE SOURCES OF ENERGY White Paper for a Community Strategy and Action Plan., (97).
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., e Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146–1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006
- Demirbas, A. (2011). Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*, 88(10), 3541–3547. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.050
- DGEG. (2014). Estatísticas renováveis nº 118.

- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A. A., e Teixeira, J. A. (2010). Third generation biofuels from microalgae. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1355–1366.
- EN 14103. (2003). Fat and oil derivatives — Fatty Acid Methyl Esters (FAME) — Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents.
- EN 14111. (2003). Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of iodine value. *European Standard*, 77581.
- EN 14214. (2012). Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for biodiesel engines - Requirements and test methods (EN14214). *European Standard*.
- EN 16300. (2013). Automotive fuels — Determination of iodine value in fatty acid methyl esters (FAME) — Calculation method from gas chromatographic data. *European Standard*.
- Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology letters*, 30(9), 1525–36. doi:10.1007/s10529-008-9740-3
- EurObserv'ER. (2014). Biofuels Barometer.
- Ferreira, A. F., Pacheco, R., Pinto, T., Nobre, B. P., Loureiro, D., Moura, P., Gouveia, L., e Silva, C. M. (2015). The production of pigments & hydrogen through a *Spirogyra* sp. biorefinery. *Energy Conversion and Management*, 89, 789–797. doi:10.1016/j.enconman.2014.10.040
- Gao, S., Du, M., Tian, J., Yang, J., Yang, J., Ma, F., e Nan, J. (2010). Effects of chloride ions on electro-coagulation-flotation process with aluminum electrodes for algae removal. *Journal of hazardous materials*, 182(1-3), 827–34. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.06.114
- Gouveia, L. (2011). *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*.
- Gouveia, L., Marques, A. E., da Silva, T. L., e Reis, A. (2009). *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(6), 821–6. doi:10.1007/s10295-009-0559-2
- Gouveia, L., e Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(2), 269–74. doi:10.1007/s10295-008-0495-6
- Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., e Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology*, 57.
- Grima, E. M., Fernández, F. G. A., Medina, A. R., e Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites : process options and economics. *Biotechnology advances*, 20, 491–515.
- Guldhe, A., Singh, B., Rawat, I., Ramluckan, K., e Bux, F. (2014). Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. *Fuel*, 128, 46–52. doi:10.1016/j.fuel.2014.02.059
- ISO 5509. (2000). Animal and vegetable fats and oils— Preparation of methyl esters of fatty acids. *European Standard*.

- Jaouen, P., Vandanjon, L., e Quéméneur, F. (1999). The shear stress of microalgal cell suspensions (*Tetraselmis suecica*) in tangential flow filtration systems: the role of pumps. *Bioresource technology*, 68, 149–154.
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., e Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology*, 102(1), 186–93. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.139
- Katsuda, T., Lababpour, A., Shimahara, K., e Katoh, S. (2004). Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(1), 81–86. doi:10.1016/j.enzmictec.2004.03.016
- Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S., e Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(9), 2361–2372. doi:10.1016/j.rser.2009.04.005
- Kirrolia, A., Bishnoi, N., e Singh, R. (2012). Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*.
- Knuckey, R. M., Brown, M. R., Robert, R., e Frampton, D. M. F. (2006). Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, 35(3), 300–313. doi:10.1016/j.aquaeng.2006.04.001
- Koc, C., Anderson, G. A., e Kommareddy, A. (2010). Use of Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED) and Fluorescent Lamps to Grow Microalgae in a Photobioreactor. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, (January).
- Lam, M. K., e Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology advances*, 30(3), 673–90. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.008
- Lee, A. K., Lewis, D. M., e Ashman, P. J. (2008). Microbial flocculation, a potentially low-cost harvesting technique for marine microalgae for the production of biodiesel. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 559–567. doi:10.1007/s10811-008-9391-8
- Lee, A., Lewis, D., e Ashman, P. (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, Y. K., e Tay, H. S. (1991). High CO₂ partial pressure depresses productivity and bioenergetic growth yield of *Chlorella pyrenoidosa* culture. *Journal of Applied Phycology*, 9, 95–101.
- Leung, D. Y. C., Wu, X., e Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. doi:10.1016/j.apenergy.2009.10.006
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., e Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 629–36. doi:10.1007/s00253-008-1681-1

- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C., e Calero, N. (2008). Biocatalysts and bioreactor design. *Biotechnology Progress*, 26(3), 6. doi:10.1016/j.tibtech.2007.12.002
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., e Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*, 24(4), 815–20. doi:10.1021/bp070371k
- Lin, L., Cunshan, Z., Vittayapadung, S., Xiangqian, S., e Mingdong, D. (2011). Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy*, 88(4), 1020–1031. doi:10.1016/j.apenergy.2010.09.029
- Mata, T., Martins, A., e Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Matos, C. T., Santos, M., Nobre, B. P., e Gouveia, L. (2013). Nannochloropsis sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for biodiesel and pigment production. *Bioresource technology*, 134, 219–26. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.034
- Miao, X., e Wu, Q. (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of biotechnology*, 110(1), 85–93. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.01.013
- Moheimani, N. R. (2005). The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation.
- Morist, A., Montesinos, J. L., e Cusido, J. A. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food., 37, 535–547.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., e Shilton, a N. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water research*, 45(20), 6637–49. doi:10.1016/j.watres.2011.09.042
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., e Simões, M. (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3043–3053. doi:10.1016/j.rser.2012.02.055
- Poelman, E., Pauw, N. De, e Jeurissen, B. (1996). Potential of electrolytic flocculation for recovery of micro-algae., 19, 1–10.
- Popovich, C. a, Damiani, C., Constenla, D., Martínez, A. M., Freije, H., Giovanardi, M., Pancaldi, S., e Leonardi, P. I. (2012). *Neochloris oleoabundans* grown in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource technology*, 114, 287–93. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.121
- Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 165–177. doi:10.1002/elsc.200900003
- Prakash, J., Pushparaj, B., Carlozzi, P., Torzillo, G., Montaini, E., e Materassi, R. (2007). Microalgal Biomass Drying By a Simple Solar Device*. *International Journal of Solar Energy*, 18(4), 303–311. doi:10.1080/01425919708914325

- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., e Legrand, J. (2009). Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource technology*, 100(23), 5988–95. doi:10.1016/j.biortech.2009.06.004
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(3), 287–293. doi:10.1007/s002530100702
- Rao, P. V., Clarke, S., Brown, R., e Wu, K.-S. (2010). Influence of iodine value on combustion and NO_x emission characteristics of a DI diesel engine. *Engineers Australia*.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods : a review., 49, 311–319.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., e Tredici, M. R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100–12. doi:10.1002/bit.22033
- Rossi, N., Derouiniot-Chaplain, M., Jaouen, P., Legentilhomme, P., e Petit, I. (2008). *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: fouling phenomenon with limiting and critical flux. *Bioresource technology*, 99(14), 6162–7. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.023
- Rossignol, N., Vandanjon, L., Jaouen, P., e Que, F. (1999). Membrane technology for the continuous separation microalgae / culture medium : compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration., 20, 191–208.
- Sander, K., e Murthy, G. S. (2010). Life cycle analysis of algae biodiesel. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 15(7), 704–714. doi:10.1007/s11367-010-0194-1
- Sanford, S. D., White, J. M., Shah, P. S., Wee, C., Valverde, M. A., Meier, G. R., Avenue, S. B., Box, P. O., e Sanford, S. (2009). Feedstock and Biodiesel Characteristics Report., 1–136.
- Santos, a M., Janssen, M., Lamers, P. P., Evers, W. a C., e Wijffels, R. H. (2012). Growth of oil accumulating microalga *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. *Bioresource technology*, 104, 593–9. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.084
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., e Hankamer, B. (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, 1(1), 20–43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8
- Schulze, P. S. C., Barreira, L. a, Pereira, H. G. C., Perales, J. a, e Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in biotechnology*, 32(8), 422–30. doi:10.1016/j.tibtech.2014.06.001
- Silva, S. (2007). *Susana Aurora Pimenta da Silva*.
- Sokoto, M. A., Hassan, L. G., Dangoggo, S. M., Ahmad, H. G., e Uba, A. (2011). Influence of fatty acid methyl esters on fuel properties of biodiesel produced from the seeds Oil of *Curcubita pepo*. *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 19, 81–86.
- Suali, E., e Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. doi:10.1016/j.rser.2012.03.047

- Suh, I. S., e Lee, C. G. (2003). Photobioreactor Engineering: Design and Performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.
- Uduman, N., Bourniquel, V., Danquah, M. K., e Hoadley, A. F. a. (2011). A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal*, 174(1), 249–257. doi:10.1016/j.cej.2011.09.012
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., e Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2(1), 012701. doi:10.1063/1.3294480
- Vandame et al. (2011). Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae., 108(10), 2320–2329. doi:10.1002/bit.23199/abstract
- Wang, B., Lan, C. Q., e Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology advances*, 30(4), 904–12. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.019
- Wang, C. Y., Fu, C. C., e Liu, Y. C. (2007). Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1), 21–25. doi:10.1016/j.bej.2007.03.004
- Xue, J., Grift, T. E., e Hansen, A. C. (2011). Effect of biodiesel on engine performances and emissions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(2), 1098–1116. doi:10.1016/j.rser.2010.11.016
- Yeh, N., e Chung, J.-P. (2009). High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(8), 2175–2180. doi:10.1016/j.rser.2009.01.027

Anexo 1: Protocolo de meio *Brystol*

Materiais:

- 1 Vidro de relógio
- 1 Espátula
- 1 Litro de água *millipore*
- 1 Pipeta automática
- 1 Ponta de pipeta automática
- 1 Copo de vidro de dois litros
- 1 Barra magnética
- 1 Placa de agitação
- 1 Vareta
- 1 *Erlenmeyer* de dois litros
- Autoclave
- Papel de alumínio
- Gaze
- Algodão cardado

Reagentes:

- 250 mg/l de nitrato de sódio (NaNO_3)
- 75 mg/l de hidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4)
- 33 mg/l de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 75 mg/l de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 175 mg/l de dihidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4
- 25 mg/l de cloreto de sódio NaCl
- 60 mg/l de sal de ferro do ácido etilenodiaminatetracético (EDTA-Fe)
- 1 ml de elemento traço Chu concentrado (dez vezes)

Preparação do meio *Brystol*:

1. Pesar um dos reagentes, com o auxílio de uma espátula, para um vidro de relógio. No caso de se tratar do elemento traço medi-lo com uma pipeta automática.
2. Colocar o reagente dentro de um copo de vidro de 2 litros.
3. Limpar a espátula para proceder à pesagem do próximo reagente.
4. Repete-se os pontos 1, 2 e 3 até terminar a pesagem de todos os reagentes.
4. Juntar ao copo de vidro, um litro de água *millipore* e agitar com uma vareta.

6. Colocar uma barra magnética no copo e colocar a agitar, numa placa de agitação, até solubilizar os reagentes.

7. Caso o meio seja para ser implementado em colunas de bolhas este deve ser esterilizado na autoclave. Para tal,

- a. Transferir o meio *Brytol* do copo de vidro para um *Erlenmeyer* de dois litros.
- b. Fazer uma rolha de gaze e algodão do tamanho da abertura do *Erlenmeyer*.
- c. Colocar a rolha no *Erlenmeyer* e tapá-la com papel de alumínio
- d. Colocar o *Erlenmeyer* na autoclave durante 20 minutos, a 120°C.
- e. Retirar o *Erlenmeyer* do autoclave só quando este último se encontrar a 90°C.

Anexo 2: Preparação das soluções padrão para o cromatógrafo iónico

Material, reagentes e padrões utilizados:

- Balões volumétricos de 250 ml, 100 ml, 50 ml, 25 ml e 20 ml.

- Água *millipore*

- Cloreto de sódio (NaCl)

- Nitrito de sódio (NaNO₂)

- Nitrato de sódio (NaNO₃)

- Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄)

- Sulfato de sódio (Na₂SO₄)

Padrões

Preparação das misturas padrão:

As misturas padrão a injetar no cromatógrafo preparam-se a partir de soluções mãe com concentração de 1 g/l em anião, de acordo com a tabela abaixo:

Concentração (mg/l)	Volume de solução mãe (µl)	Volume total (ml)
0,1	25	250
0,2	50	250
0,5	50	100
1	100	100
3	150	50
5	250	50
8	400	50
10	250	25
15	300	20
20	500	25
25	625	25
30	750	25

Preparação das soluções mãe (1 g/l em anião):

Dilui-se 10 ml de cada uma da solução mãe para um volume total de 100 ml.

Anexo 3: Preparação do eluente para o cromatógrafo iónico

Materiais e reagentes para a preparação da solução concentrada de eluente:

- Balão volumétrico de 1 litro
- Na₂CO₃ (PM= 106 g/mol)
- NaHCO₃ (PM= 84 g/mol)
- 1 Litro de água *millipore*

Preparação da solução concentrada de eluente:

1. Dissolver 84,8 g de Na₂CO₃ e 8,4 g de NaHCO₃ (PM=84 g/mol) em água.
2. Completar com água *millipore* até perfazer um litro.

Materiais e reagentes para a preparação do eluente:

- Solução concentrada de eluente (0,8 M Na₂CO₃/ 0,1 M NaHCO₃)
- 2 Litros de água *millipore*
- 2 Filtros *Pall Corporation* (47 mm de diâmetro, 0,2 µm de porosidade)
- 2 *Kitasatos*
- 1 Balão volumétrico de 2 litros

Preparação do eluente (8 mM Na₂CO₃/ 1 mM NaHCO₃):

1. Filtrar cerca de 2 litros de água *millipore* usando um filtro *Pall Corporation* para dentro de um *kitasato*, sob vácuo.
1. Fazer uma diluição 1:100 (10 ml/l) da solução concentrada de eluente. Neste caso, num balão volumétrico de 2 litros usar-se 20 ml de solução concentrada de eluente e completar-se o restante volume com água *millipore* filtrada (ponto 1).
3. De seguida filtrar-se, sob vácuo, o eluente por filtros *Pall Corporation* de membrana de polipropileno hidrófilo de 47 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade.
3. Após a filtração, desgaseificar o eluente em banho de ultra sons Selecta UltraSons durante 15 minutos.
4. Colocar o eluente no cromatógrafo iónico.