



# Produção de biocombustível a partir de biomassa microalgal produzida no tratamento de uma água residual

ANA CATARINA PINTO RIBEIRO

outubro de 2024

**PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL A PARTIR DE  
BIOMASSA MICROALGAL PRODUZIDA NO  
TRATAMENTO DE UMA ÁGUA RESIDUAL**

**Ana Catarina Pinto Ribeiro**

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Energias Sustentáveis**

**Orientador: Professora Doutora Nídia de Sá Caetano**

**Júri:**

Presidente:

Olga dos Remédios Sobral Castro, Professor Adjunto  
ISEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto

Vogais:

Marlene Alexandra Silva Lopes, Investigador Júnior

Escola de Engenharia da Universidade do Minho

Nídia de Sá Caetano, Professor Coordenador

ISEP, Instituto Superior de Engenharia do Porto



# Resumo

As microalgas são organismos fotossintéticos capazes de sobreviver em condições climáticas extremas e adaptar-se a diferentes metabolismos consoante o ambiente onde se inserem. No contexto deste trabalho, a sua importância passa pela capacidade de fixação de CO<sub>2</sub> e composição elevada de lípidos, fundamental para a utilização da biomassa como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel.

A presente dissertação teve como objetivo estudar a capacidade de crescimento microalgal em meio com água residual doméstica, sem tratamento, para posterior utilização na produção de biodiesel, como forma de reduzir o consumo de nutrientes caros e realizar simultaneamente o tratamento de uma água residual doméstica. A *Chlorella vulgaris* foi cultivada com diferentes quantidades de meio BBM e água residual, tendo-se verificado que a substituição de parte do meio BBM por água residual recolhida no interior do tanque de arejamento resultava numa maior produção de microalgas.

A biomassa liofilizada dos ensaios de crescimento foi utilizada em dois métodos diferentes de extração lipídica, com adaptações para comparação do rendimento de extração, tendo sido obtidos resultados de 10 a 22% de lípidos na biomassa seca, valores dentro da gama expectável no cultivo com estas condições. Nas condições utilizadas, o método mais eficaz foi o de Matyash em que é usado metanol e MTBE como solventes de extração.

A produção de biodiesel foi realizada segundo diferentes protocolos de transesterificação direta (ácida ou alcalina), com ou sem utilização de co-solvente (hexano), tendo resultado num rendimento de produção de biodiesel na ordem dos 6,4 g biodiesel / 100 g biomassa seca.

Dados os resultados obtidos, foi possível produzir biodiesel, mas concluiu-se que o processo é moroso e beneficiaria de otimizações para ser no futuro aplicado à escala industrial. O procedimento testado neste trabalho de utilizar biomassa liofilizada diretamente para a produção de biodiesel, eliminando a necessidade de extração de lípidos, poderá ser útil para esse fim.

Outras dificuldades observadas durante o trabalho devem ser avaliadas no futuro quanto ao impacto no processo, destacando-se o efeito do arejamento das culturas nos ensaios de crescimento, a avaliação da composição das águas residuais no que diz respeito a nutrientes de interesse e outros fatores que possam afetar a taxa de crescimento e a composição das microalgas.

**Palavras-chave:** Microalgas, *Chlorella vulgaris*, tratamento de águas residuais, lípidos, biodiesel.



# Abstract

Microalgae are photosynthetic organisms that are able to survive in extreme climatic conditions and adapt to different metabolisms depending on their environment. In the context of this work, their importance lies in their ability to fix CO<sub>2</sub> and their high lipid composition, which is fundamental for using their biomass as a raw material for the production of biofuels, such as biodiesel.

The aim of this thesis was to study the growth capacity of microalgae in a medium containing untreated domestic wastewater, for subsequent use in biodiesel production, as a way to reduce the consumption of expensive nutrients and simultaneously carry out the treatment of domestic wastewater. *Chlorella vulgaris* was cultivated with different amounts of BBM medium and wastewater, and it was found that replacing part of the BBM medium with wastewater collected inside the aeration tank resulted in greater microalgal productivity.

Lyophilized biomass from the growth trials was used in two different lipid extraction methods, with adaptations to compare extraction yield, and results of 10 to 22% lipids in dry biomass were obtained, values within the range expected in cultivation under these conditions. Under the conditions used, the most effective method was that of Matyash that uses methanol and MTBE as extraction solvents.

Biodiesel production was carried out using different direct transesterification protocols (acid or alkaline), with and without the use of co-solvent (hexane), resulting in biodiesel production yield of approximately 6.4 g biodiesel / 100 g dry biomass.

Given the results obtained, it was possible to achieve biodiesel production, however, it was concluded that the process is time-consuming and would benefit from optimization if it were to be applied on an industrial scale in the future. The procedure tested in this work of using lyophilized biomass directly for biodiesel production, thus eliminating the need for lipid extraction, could be useful for this purpose.

Other difficulties observed during the work should be evaluated in the future for their impact on the process, such as the effect of aeration of the cultures on the growth experiments, the characterization of the effluent composition in terms of nutrients of interest and other factors that could affect the growth rate and composition of the microalgae.

**Keywords:** Microalgae, *Chlorella vulgaris*, wastewater treatment, lipids, biodiesel.



# Agradecimentos

Antes de mais, gostava de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Nídia Caetano por ter acreditado nas minhas capacidades para desenvolver esta dissertação.

Não posso deixar de endereçar um agradecimento à Priscila por sempre se mostrar disponível para me ajudar, mesmo quando estava cheia de trabalho, e à Bruna, por me ter ajudado em algumas experiências e por me ter facultado os resultados de outras. Agradeço também às técnicas do LT pela ajuda no trabalho de laboratório, pela sua simpatia e boa disposição.

Quero agradecer também à minha família, especialmente aos meus pais, irmã e cunhado, a possibilidade que me deram ao longo dos anos e por todo o apoio dado ao longo destes meses.

Agradeço também agradecer aos meus amigos – Rosa, Cristina, Sónia, Inês, Rita e Tiago – pelo apoio e preocupação ao longo destes meses.

Por fim, mas não menos importante, um obrigado ao Rúben, pelo carinho e o apoio, paciência e ajuda fundamental que me deu em todas as fases deste processo. Sem ti seria difícil conseguir desbloquear e ultrapassar algumas dificuldades.

Obrigada a todos.



# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
1.1	Enquadramento	1
1.1.1	Integração da Dissertação nas Atividades dos Centros de I&D de Suporte	2
1.2	Objetivos e Motivação	2
1.3	Estrutura	3
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>5</b>
2.1	Questões Ambientais	5
2.2	Microalgas	6
2.2.1	Características das Microalgas	6
2.2.2	Aplicações das Microalgas	7
2.2.3	Biomassa	8
2.2.4	Lípidos e Ácidos Gordos	9
2.2.5	Cultivo - Biorreatores, Metabolismo e Condições de Cultivo	11
2.3	Caracterização da <i>Chlorella vulgaris</i>	14
2.4	Biocombustíveis	15
2.4.1	Biodiesel	16
2.5	Águas Residuais	20
2.5.1	Algas e o Tratamento de Águas Residuais	21
<b>3</b>	<b>Materiais e Métodos</b>	<b>23</b>
3.1	Preparação de Materiais	24
3.1.1	Meio de cultivo BBM	24
3.1.2	Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> Usada Como Inóculo	25
3.1.3	Águas residuais	26
3.1.4	Caracterização das Águas Residuais - Análises de CQO, TOC, IC, TC e TN	27
3.2	Ensaio de Crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> em Águas Residuais	28
3.2.1	Ensaio 1 - Cultivo com Água Residual à Entrada do Tanque de Arejamento	29
3.2.2	Ensaio 2 - Cultivo com Água Residual no Interior do Tanque de Arejamento	31
3.2.3	Ensaio 3 - Cultivo com Água do Interior do Tanque de Arejamento	33
3.3	Extração de Lípidos e Quantificação por Gravimetria	35
3.3.1	Método de Extração de Bligh e Dyer (B&D adaptado)	35
3.3.2	Método de Extração de Matyash adaptado	35
3.4	Produção de Biodiesel	36
3.4.1	Método 1 - Transesterificação Direta pelo Método de Torres <i>et al.</i> (2017)	36
3.4.2	Método 2 - Transesterificação Direta pelo Método de Marthimani <i>et al.</i> (2024)	37
3.4.3	Método 3 - Transesterificação Direta pelo Método de Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015)	37
<b>4</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>39</b>

4.1	Análises Complementares.....	39
4.1.1	CQO .....	39
4.1.2	TOC, IC, TC e TN .....	41
4.2	Avaliação do Crescimento Microalgal .....	41
4.2.1	Ensaio 1 - Cultivo com Água Residual à Entrada do Tanque de Arejamento... ..	42
4.2.2	Ensaio 2 - Água Dentro do Tanque de Arejamento .....	44
4.2.3	Ensaio 3 - Cultura com Água Do Interior do Tanque de Arejamento .....	47
4.3	Determinação da Quantidade de Lípidos .....	49
4.4	Produção de Biodiesel - Transesterificação Direta .....	54
<b>5</b>	<b>Conclusão e Trabalhos Futuros .....</b>	<b>61</b>
5.1	Conclusão .....	61
5.2	Sugestões para Trabalhos Futuros .....	62
	<b>Referências.....</b>	<b>65</b>
	Apêndice A - Valores de CQO .....	71
	Apêndice B - Valores de DO dos ensaios .....	74
	Apêndice B.1 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 1.A, respetivamente. ....	74
	Apêndice B.2 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 1.B, respetivamente.....	75
	Apêndice B.3 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 2. A, respetivamente.....	75
	Apêndice B.4 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 2. B, respetivamente.....	76
	Apêndice B.5-Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 3, respetivamente. ....	77
	Apêndice C - Tabelas de extração de lípidos por gravimetria .....	78
	Apêndice C.1-Tabelas de extração por B&D adaptado. ....	78
	Apêndice C.2-Tabelas de extração por Matyash <i>et al.</i> (2018) adaptado. ....	78
	Apêndice C.2-Tabelas de extração por Matyash <i>et al.</i> (2018) adaptado (continuação). ....	79
	Apêndice D - Transesterificação Direta .....	80
	Apêndice D.1 - Valores da tentativa 1 de produção de biodiesel por transesterificação direta. ....	80
	Apêndice D.2 - Valores da tentativa 2 de produção de biodiesel por transesterificação direta. ....	81
	Apêndice D.3 - Valores da tentativa 3 de produção de biodiesel por transesterificação direta. ....	82

# Lista de Figuras

Figura 1 – Aplicações das microalgas (Oliveira, 2009; Dolganyuk <i>et al.</i> , 2020; Hussain <i>et al.</i> , 2021). .....	7
Figura 2 - Esquema representativo de alguns dos nutrientes presentes na <i>Chlorella vulgaris</i> passíveis de serem usados para produzir compostos de valor.....	8
Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos gordos do tipo MUFA, PUFA e SFA. Retirado de Díaz-Puertas <i>et al.</i> (2023).....	10
Figura 4 - Representação dos diferentes tipos de biorreatores. (Adaptado de Ali <i>et al.</i> 2022). 11	
Figura 5 - Reatores tipo <i>raceway</i> (à esquerda) e FBR tubular (à direita). Retirado de Oliveira (2009). .....	12
Figura 6 - Diferentes fases do crescimento microalgal. Retirado de Pina <i>et al.</i> (2021).....	13
Figura 7 – Imagem de microscópio de <i>Chlorella vulgaris</i> , com ampliação de 400x (Brzychczyk, Kowalczyk and Gielzecki, 2016). .....	14
Figura 8 - Transesterificação dos triglicerídeos (TAG). Adaptado de (Mata, Martins and Caetano, 2010).....	18
Figura 9 - Diferentes formas em que os macronutrientes são encontrados. Adaptado de (Mondal <i>et al.</i> , 2022; Su <i>et al.</i> , 2023).....	21
Figura 10 - Composição do meio BBM. Retirado de Oliveira (2009). .....	24
Figura 11 - Soluções distintas de BBM. ....	25
Figura 12 - Inoculação de <i>Chlorella vulgaris</i> para uso nos ensaios de crescimento. ....	26
Figura 13 - Amostras de água à entrada do tanque de arejamento (à esquerda) e no decantador secundário (à direita) cedidas pela SimDouro.....	26
Figura 14 - Crescimento das culturas de microalgas dos dois aquários de inoculação. ....	29
Figura 15 - Matrazes do ensaio 1 no primeiro dia. ....	30
Figura 16 - Recolha de amostras para leitura de DO, com fatores de diluição de 1 (sem diluição) e 5.....	31
Figura 17 - Matrazes do ensaio 2 (2.A) no primeiro dia de cultivo.....	32
Figura 18 – Observação de problemas de crescimento em alguns matrazes ( <i>stress</i> ), comparativamente.....	32
Figura 19 - Culturas (controlo, 20%, 30% e 40%) no primeiro dia do ensaio 2.B. ....	33
Figura 20 - Matrazes do ensaio 3. ....	34
Figura 21 - Gráfico do crescimento microalgas ao longo do ensaio 1.A. ....	42
Figura 22 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo da segunda fase do ensaio 1 (1.B). ...	43
Figura 23 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo da primeira fase do ensaio 2 (2.A). ...	44
Figura 24 - Matrazes, em duplicado, das culturas de 80 %, 85 % e 90 % (da esquerda para a direita).....	45
Figura 25 - Representação gráfica do crescimento ao longo da segunda fase do ensaio 2 (2.B). .....	46
Figura 26 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo do ensaio 3.....	47
Figura 27 Comparação entre o matraz com problemas (à esquerda) e outro matraz da mesma condição. ....	48

Figura 28 - Gráfico do crescimento das microalgas, após adição de BBM.....	49
Figura 29 - Separação das fases (à esquerda) e secagem de solventes (à direita) recorrendo ao método B&D adaptado. ....	50
Figura 30 - Diferentes fases do material após as etapas do Matyash <i>et al.</i> (2008). ....	50
Figura 31 - Cadinhos com material extraído na tentativa 4 após a evaporação do solvente. ...	53
Figura 32 - Amostras após as etapas I, II, III e IV do processo 1.....	55
Figura 33 - Biodiesel resultante do primeiro ensaio. ....	55

# Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição de pigmentos dos diferentes Filos e alguns dos seus produtos de armazenamento. Adaptado de Oliveira (2009). .....	6
Tabela 2 - Diferentes gerações de biocombustíveis, a origem da MP e alguns exemplos, assim como os possíveis biocombustíveis que podem originar. ....	15
Tabela 3 - Etapas, breve descrição e métodos da produção de biodiesel a partir das microalgas. ....	16
Tabela 4 - Principais diferenças da transesterificação com catalisador (Ma and Hanna, 1999). ....	19
Tabela 5 - Composição do meio no ensaio 1 (1.A e 1.B). ....	29
Tabela 6 - Composição do meio do ensaio 2.A. ....	31
Tabela 7 - Matrizes do ensaio 2.B. ....	33
Tabela 8 - Composição do meio do ensaio 3. ....	34
Tabela 9 - Valores de CQO obtidos em três determinações feitas para as diferentes águas residuais. ....	39
Tabela 10 - Valores obtidos na medição TOC, IC, TC e NT. ....	41
Tabela 11 - Valores de lípidos extraídos, segundo o método escolhido e a biomassa utilizada. ....	52
Tabela 12 - Quantidade de biomassa utilizada em cada amostra. ....	54
Tabela 13 – Rendimento de biodiesel no primeiro ensaio de produção de biodiesel, após a etapa VII. ....	55
Tabela 14 - Condições utilizadas na tentativa 2 de transesterificação direta. ....	56
Tabela 15 – Rendimento em biodiesel para as condições utilizadas na tentativa 3 de transesterificação pelo processo 2 do método de Torres <i>et al.</i> (2017). ....	58



# Abreviaturas e Símbolos

## Lista de Abreviaturas

<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BBM</b>	<i>Bold Basal Medium</i>
<b>CF</b>	Combustíveis Fósseis
<b>COD</b>	Carência química de oxigênio
<b>FBR</b>	Fotobiorreator
<b>FD</b>	Fator de Diluição
<b>FFA</b>	Ácidos gordos livres
<b>GEE</b>	Gases com efeito de estufa
<b>JM</b>	<i>Jaworski Medium</i>
<b>MUFA</b>	Ácidos gordos monoinsaturados
<b>PUFA</b>	Ácidos gordos polinsaturados
<b>RWP</b>	Lagos/reservatórios <i>raceway</i>
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SFA</b>	Ácidos gordos saturados
<b>TAG</b>	Triglicerídeos
<b>RPM</b>	Rotações por minuto

## Lista de Símbolos

$\lambda$	Comprimento de onda
$\mu\text{m}$	Micrómetro



# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento

Com o aumento dos problemas desencadeados pelo aquecimento global, é fundamental desenvolver e implementar técnicas cada vez mais eficientes e sustentáveis, considerando em especial os aspetos ambientais e os económicos (Barata, 2016).

Atualmente, duas das áreas com maior necessidade de alterações e melhoria de funcionamento passam pelo setor de produção de combustíveis e ainda, o tratamento de um bem fundamental à vida, a água.

Outra questão importante a ter em conta é a necessidade de implementação de comportamentos que contribuam para a neutralidade carbónica, próximo desta neutralidade ou, idealmente, com capacidade de utilização deste gás de efeito de estufa (GEE) para utilização em diversos fins. A forma mais interessante para a redução destas emissões trata-se da utilização de diferentes fontes de energia, funcionando tanto em conjunto como em separado, assim como a utilização de técnicas capazes de absorver e reduzir as emissões de diferentes poluentes, o mais importante deles sendo o CO<sub>2</sub>.

Em Portugal, a legislação relativa à utilização de biocombustíveis tem vindo a alterar-se, com atribuições de bonificação na produção de biocombustíveis e biogás, e nas regras relativas à matéria-prima utilizada. Assim, a produção e implementação de biocombustíveis tem aumentado significativamente, especialmente com a utilização de óleo alimentar usado (*Biocombustíveis em Portugal*, 2023).

As microalgas constituem uma das matérias-primas com maior capacidade de utilização em diferentes mercados, como produção de biocombustíveis e outros compostos de alto valor e podem também ser utilizadas para o tratamento de águas residuais devido à sua capacidade de biorremediação (Pôjo, 2016; Ali *et al.*, 2022).

Apesar de existirem biorrefinarias em Portugal, a implementação conjunta de microalgas na produção de biocombustíveis e tratamento de águas residuais é reduzida, sendo interessante avaliar a capacidade de implementação mais elevada destes tipos de indústria.

Dada a agenda estabelecida pelo ONU, o trabalho realizado no decorrer desta dissertação pode responder a alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis (ODS), tais como o objetivo 6 (água potável e saneamento para todos), já que se pretende fazer o tratamento das águas residuais através do cultivo das microalgas e o objetivo 7 (energias renováveis e acessíveis), uma vez que é feita a produção de biodiesel através de microalgas cultivadas com águas residuais, não usando solo arável e não usadas para fins alimentares.

### 1.1.1 Integração da Dissertação nas Atividades dos Centros de I&D de Suporte

O tema desta dissertação enquadra-se no âmbito das atividades de I&D do LEPABE/ALiCE e do CIETI desenvolvidas pela Prof<sup>a</sup>. Nídia Caetano, a orientadora desta dissertação, e que é membro integrado do LEPABE - Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente Biotecnologia e Energia, financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC): LEPABE, UIDB/00511/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/00511/2020) e UIDP/00511/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/00511/2020) e ALiCE, LA/P/0045/2020 (DOI: 10.54499/LA/P/0045/2020) e colaboradora do CIETI – Centro de Inovação em Engenharia e Tecnologia Industrial, financiado por fundos nacionais através da FCT/MCTES (PIDDAC): CIETI, UIDB/04730/2020 (DOI: 10.54499/UIDB/04730/2020) and UIDP/04730/2020 (DOI: 10.54499/UIDP/04730/2020).



## 1.2 Objetivos e Motivação

O objetivo deste trabalho passa por avaliar a possibilidade de utilizar águas residuais como fonte de nutrientes no cultivo de microalgas, assim como a determinar as condições destas águas que permitem um crescimento pelo menos comparável com o crescimento num meio como o *Bold Basal Medium* (BBM).

Este trabalho vem no seguimento da elevada necessidade energética e da necessidade de diversificação de fontes renováveis de energia, potenciando a transformação de compostos presentes nas águas residuais em produtos energéticos importantes para tentar minimizar a crise energética que se avizinha, como alternativa à necessidade de tratamentos com perda inevitável de recursos (nutrientes) e consumo energético.

No âmbito deste trabalho, foi possível consolidar, experimentalmente, alguns dos conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Energias Renováveis 1, lecionada no Instituto Superior de Engenharia do Porto, no decorrer do Mestrado de Energias Sustentáveis.

Com a realização deste trabalho, pretendia-se também aumentar o contacto com o trabalho laboratorial e relembrar os seus desafios, assim como investigar melhor a importância de juntar diversas áreas da ciência e engenharia, nomeadamente a área da energia, e a engenharia química e biológica, no desenvolvimento de algo fundamental para o futuro do planeta.

### **1.3 Estrutura**

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos, incluindo o presente, e ainda três anexos.

No presente capítulo (1. Introdução), encontra-se uma breve explicação do enquadramento do tema, assim como os objetivos e motivação da realização desta dissertação.

O segundo capítulo (2. Revisão Bibliográfica), apresenta uma revisão da literatura dos temas fundamentais para a realização deste trabalho, sendo estes: as questões ambientais atuais, as características e componentes das microalgas, a caracterização da *Chlorella vulgaris*, as características mais importantes dos biocombustíveis, especialmente o biodiesel e as características das águas residuais e o seu tratamento com microalgas.

No terceiro capítulo (3. Materiais e Métodos), é elaborada uma descrição detalhada dos materiais e procedimentos realizados, com base em conhecimentos adquiridos no capítulo anterior.

No capítulo seguinte (4. Resultados e discussão), foram expostos os resultados obtidos na realização dos procedimentos anteriores e feita uma explicação das possíveis causas e explicações para os resultados.

Por fim, no capítulo cinco (5. Conclusão e trabalhos futuros) foram sintetizadas as conclusões retiradas do presente trabalho e apresentadas algumas propostas para a sua continuidade.

Apêndice A contém os valores obtidos na análise de Carência Química de Oxigénio (CQO) da água residual, o Anexo B os valores de densidade ótica obtidos na monitorização dos diferentes ensaios de crescimento microalgal e o Anexo C contém os resultados relativos à extração de lípidos e, por fim, o Apêndice D contém os valores dos processos de transesterificação direta.



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Questões Ambientais

Com o aumento da população mundial e a industrialização massiva, as necessidades energéticas aumentam. Paralelamente, aumentam os problemas ambientais, como a poluição atmosférica, a contaminação dos sistemas aquáticos e a nitrificação dos solos. Uma das maiores fontes de poluição é a queima dos combustíveis fósseis (CF) que correspondem a cerca de 75% das emissões antropogénicas, com emissões alarmantes de gases com efeito de estufa (GEE), principalmente CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, para a atmosfera. Os setores da indústria e dos transportes são dos que mais consomem energia, combustíveis e água, gerando uma pegada ambiental excessiva (Pôjo, 2016; Azarpour *et al.*, 2022; Rame, Purwanto e Sudarno, 2023).

O uso cada vez mais elevado de água doce para o consumo humano e indústria é outro problema ambiental preocupante. Os processos industriais são cada vez mais intensivos e produtores de resíduos, originando uma quantidade elevada de águas residuais, com grandes quantidades de metais pesados e elementos tóxicos, e que carecem de tratamentos caros e difíceis.

De forma a minimizar estas dificuldades de tratamento de águas residuais, existem cada vez mais estudos e tecnologias a serem desenvolvidos para aumentar a eficiência das estações de tratamento de águas residuais e diminuir o seu custo operacional (Hussain *et al.*, 2021; Ahmad *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2022).

Conjugando as necessidades de aumentar a produção de energia, de usar energia proveniente de fontes renováveis e de melhorar o tratamento de águas residuais, surgiu um recurso alternativo: as microalgas (Marella *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2021).

## 2.2 Microalgas

### 2.2.1 Características das Microalgas

As microalgas são organismos fotossintéticos unicelulares capazes de crescer em diferentes sistemas aquáticos, como os oceanos, rios e lagos. São capazes de sobreviver em condições extremas, com disponibilidade reduzida de nutrientes e a baixas temperaturas e podem ser encontradas em praticamente qualquer parte do planeta (Pôjo, 2016; Cunha, 2020).

Estes organismos são uma das formas mais antigas de vida e podem ser classificados segundo diferentes aspetos, como morfológicos e citológicos, o tipo de pigmentos, os constituintes da parede celular e os sistemas de crescimento. De acordo com Oliveira (2009) e Cunha (2020), as microalgas dividem-se em quatro grandes Filos que se distinguem maioritariamente pelos pigmentos que possuem, resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de pigmentos dos diferentes Filos e alguns dos seus produtos de armazenamento. Adaptado de Oliveira (2009).

Filos	Pigmentos Fotossintéticos	Produtos de armazenamento
<i>Rhodophyta</i> (algas vermelhas)	Clorofila -a e -d, ficobilinas e carotenoides	Amido
<i>Phaeophyta</i> (algas castanhas)	Clorofila -a e -c e carotenoides	Laminarina e óleos
<i>Chlorophyta</i> (algas verdes)	Clorofila -a e -b e carotenoides	Amido e celulose
<i>Cyanophyta</i> (algas azuis)	Clorofila -a e ficobilinas	Amido e proteínas (cianoficina)

As microalgas podem ainda ser classificadas segundo o seu sistema de crescimento, dividindo-se em fotoautotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. As microalgas mais abundantes são as autotróficas, cujo crescimento só acontece na presença de compostos inorgânicos e luz, sendo esta última usada como fonte de energia e para degradação de compostos. A fotossíntese realizada por estas microalgas poderá constituir uma resposta a questões ambientais relacionada com a acumulação de gases de estufa (GEE), já que têm a capacidade de fixar CO<sub>2</sub>. Este composto é, juntamente com a radiação solar, absorvido pelos cloroplastos e transformados em adenosina trifosfato (ATP), uma fonte de energia para as células, e O<sub>2</sub> (Pôjo, 2016; De Souza *et al.*, 2023). As microalgas heterotróficas utilizam apenas compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, sendo capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono. Assim, o meio de cultura pode ser semelhante ao meio usado pelas microalgas autotróficas, com a substituição dos compostos inorgânicos por orgânicos, como glucose, acetato ou glicerol. As microalgas mixotróficas conseguem crescer em sistemas autotróficos ou heterotróficos, dependendo da concentração dos compostos no meio e a disponibilidade e intensidade da luz. Dada a capacidade de funcionar com diferentes fontes de energia, podem ser fundamentais para ultrapassar a limitação de luz, um dos problemas mais frequentes no cultivo de autotróficas (Pôjo, 2016; Cunha, 2020). De acordo com Wan Mahari *et al.* (2022), os sistemas

de cultivo fotoautotróficos são mais eficientes energeticamente e, quando utilizado um sistema mixotrófico, a produtividade de biomassa e crescimento de organismos pode ser bastante superior.

Devido às características descritas anteriormente, estes organismos podem ser considerados fundamentais para solucionar problemas ambientais, dada a sua capacidade de fixar CO<sub>2</sub> e utilizar águas residuais para a produção de compostos de valor, como os biocombustíveis. A exploração comercial das microalgas teve início nos anos 1960, com foco nos suplementos alimentares com algas dos géneros *Chlorella* e *Spirulina*. Os lípidos e pigmentos são compostos frequentemente usados na indústria farmacêutica, alimentar, entre outras. A biomassa microalgal pode conter cerca de 60% de proteínas, 15% de hidratos de carbono e 15% lípidos, dependendo da espécie de microalga. Atualmente, a biomassa microalgal é maioritariamente comercializada para a produção de biocombustíveis, nomeadamente bio-óleo, biodiesel, biogás, bioetanol e bio-hidrogénio (Oliveira, 2009; Cunha, 2020).

## 2.2.2 Aplicações das Microalgas

O cultivo de microalgas pode, como referido no capítulo 2.2.1, gerar diferentes produtos de valor. Na Figura 1 é possível observar um esquema-resumo das aplicações das microalgas e respetivos produtos atualmente utilizados comercialmente.

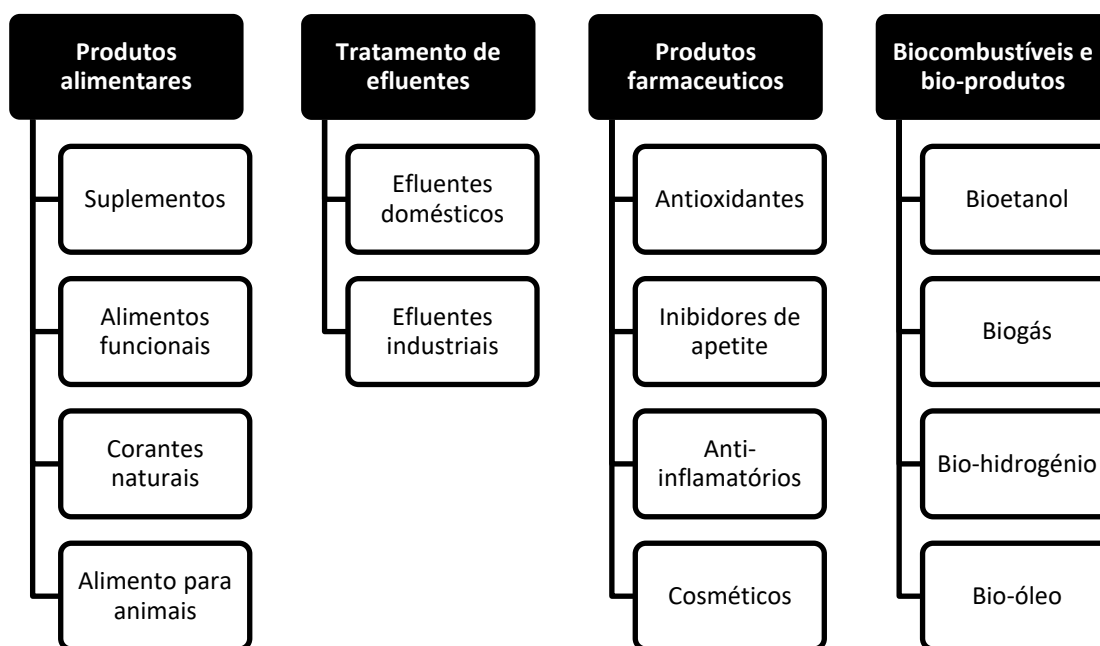


Figura 1 – Aplicações das microalgas (Oliveira, 2009; Dolganyuk *et al.*, 2020; Hussain *et al.*, 2021).

As microalgas podem ser usadas como alimento tanto para humanos (com apenas algumas espécies a serem consideradas seguras) como para organismos aquáticos. Alguns estudos realizados para compreender o impacto do uso de microalgas na dieta de organismos aquáticos, citados por Abdel-Latif *et al.* (2022), evidenciaram efeitos diretos na pigmentação de peixes

ornamentais e revelaram um aumento das capacidades antioxidantes, bem como do crescimento e imunidade de alguns organismos. Também em humanos, a suplementação traz benefícios para o sistema digestivo, redução de colesterol, entre outros. Para além das aplicações apresentadas na Figura 1, as microalgas podem ainda ser utilizadas nos solos como fertilizantes (Hussain *et al.*, 2021).

Existem diversas áreas passíveis de comercialização com origem na biomassa microalgal, como já foi evidenciado, sendo a mais explorada a produção de biocombustíveis. Esta procura deriva da necessidade de encontrar alternativas a um produto que está a esgotar-se e que apresenta emissões excessivas de contaminantes, que afetam diretamente o tratamento de efluentes. Nesta área, com o objetivo de reduzir os elevados custos de tratamento e tornar o processo mais eficiente e sustentável, as microalgas podem ser valiosas, sendo necessário continuar a investigação, através do aperfeiçoamento dos métodos existentes e do desenvolvimento de novos métodos que utilizem microalgas neste contexto (Marella *et al.*, 2019; Ali, Mastropetros, *et al.*, 2022).

Na Figura 2 é possível observar-se um esquema representativo diferentes constituintes importantes que podem ser encontrados na biomassa da *Chlorella vulgaris* e que podem resultar em compostos de valor.

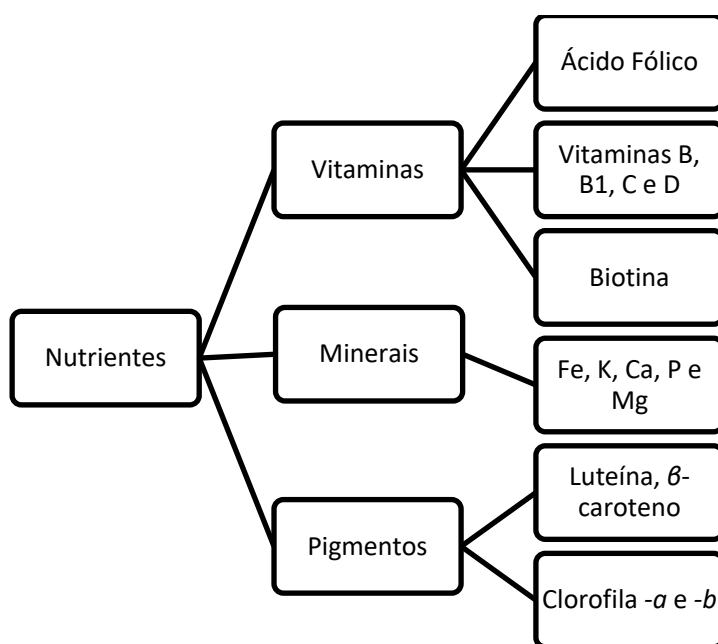


Figura 2 - Esquema representativo de alguns dos nutrientes presentes na *Chlorella vulgaris* passíveis de serem usados para produzir compostos de valor.

### 2.2.3 Biomassa

Segundo Azarpour *et al.* (2022), a biomassa residual “representa a parte biodegradável dos resíduos e detritos agrícolas, bem como a parte biodegradável de resíduos urbanos e industriais”. A biomassa é uma das fontes de energia renovável mais amplamente distribuída pelo planeta (Marella *et al.*, 2019; Dolganyuk *et al.*, 2020).

A biomassa é a principal fonte de extração de produtos, podendo a sua qualidade e produtividade ser afetadas por fatores como luz, pH e nutrientes, estando associada a grande complexidade e elevados custos de recolha. Outros dos problemas mais importantes da conversão da biomassa passam pela de necessidade de elevadas quantidades de água e o risco de contaminação por outros organismos, dependendo das condições de cultura. Alguns dos fatores influenciadores da produtividade do cultivo de microalgas passam pela temperatura (idealmente os 30 °C), a agitação de cerca de 50 rpm (rotações por minuto), o pH (que deverá ser próximo de 4) , o tipo de sistema de cultivo/reatores de produção de microalgas e, ainda, a disponibilidade de nutrientes no meio (Miranda *et al.*, 2017; Dolganyuk *et al.*, 2020).

A biomassa microalgal é constituída por proteínas, lípidos, hidratos de carbono, pigmentos, vitaminas, antioxidantes, ácidos nucleicos, entre outros. A sua composição está dependente do sistema de cultivo, do metabolismo e da disponibilidade ou escassez de nutrientes. Em condições ótimas de cultivo, as proteínas, utilizadas como suplementação alimentar, encontram-se em maior quantidade (cerca de 60% de peso seco), seguindo-se dos lípidos (entre 20% e 50% de peso seco), que constituem a fonte do biodiesel, e hidratos de carbono (cerca de 15%), que podem converter-se em bioetanol, apresentando-se os restantes em percentagens pouco significativas (Liyanaarachchi *et al.*, 2021; Maroušek *et al.*, 2023).

As biorrefinarias, unidades produtivas responsáveis por uma grande parte de produtos de biomassa microalgal, podem ser consideradas fábricas “verdes” e neutras de emissões de CO<sub>2</sub>, já que existe fixação deste gás (características fitoquímicas), libertação de oxigénio e baixo consumo de água, podendo aliar-se ao consumo e tratamento de águas residuais (Dolganyuk *et al.*, 2020; Mondal *et al.*, 2022).

De acordo com Ideris *et al.* (2022), existem poucas espécies recomendadas para produção de biocombustíveis. Num estudo realizado com 12 espécies diferentes de microalgas, a *Chlorella vulgaris* demonstrou ser a espécie mais promissora para a produção de biocombustível. Tendo em conta o trabalho de Rame, Purwanto and Sudarno (2023), as espécies *Chlorella vulgaris* e *Parachlorella kessleri* apresentam rendimentos de biomassa de 1,37 g/L/dia e 1,04 g/L/dia, respetivamente.

#### **2.2.4 Lípidos e Ácidos Gordos**

Os lípidos e ácidos gordos são dos constituintes da biomassa com maior importância, principalmente para a produção de biodiesel, visto que o maior constituinte do biodiesel é um lípido, o triglicerídeo (TAG), e que a presença de ácidos gordos, influencia as características gerais e qualidade do produto final (Safi *et al.*, 2014).

Os lípidos são um grupo heterogéneo de compostos que se divide em polares e não polares, consoante a ausência ou presença de propriedades hidrofílicas já que, na sua grande maioria, são praticamente insolúveis em água, mas solúveis em solventes polares. Os lípidos polares são anfipáticos, pois contêm um grupo hidrofílico, responsável por atrair a água e uma ponta não polar, repelente de água (hidrofóbica), principalmente constituída por ácidos gordos. Os fosfolípidos são os lípidos polares mais conhecidos e desempenham um papel fundamental na

membrana celular já que lhe proporcionam estabilidade estrutural e fluidez, assim como os glicolípidos, entre outros. Apesar desta característica fundamental, os lípidos polares apresentam alguma complexidade de processamento e extração e não têm grande relevância económica. Os lípidos não polares são maioritariamente hidrofóbicos e constituídos por cadeias de hidrocarbonetos e a sua função é maioritariamente de armazenamento energético e estrutura membranar. Os TAG são o composto base de produção de biodiesel, que ocorre através da transesterificação do mesmo. Estes são o exemplo mais relevante deste tipo de lípidos e correspondem a uma grande parte dos óleos extraídos da biomassa. A sua síntese ocorre em duas fases: no cloroplasto e, de seguida, no retículo endoplasmático. Estes lípidos são mais facilmente extraídos devido à sua facilidade de ligação a solventes polares (D'Oca *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2022; Pandey *et al.*, 2024).

Os ácidos gordos são constituídos por cadeias de hidrocarbonetos, sendo que, no caso das microalgas com 4 a 36 cadeias, com um grupo carboxílico (-COOH) no final. Estes ácidos gordos podem ser saturados (SFA), quando não têm ligações duplas entre átomos de carbono, monoinsaturados (MUFA), se contêm uma ligação dupla na cadeia de carbonos ou polinsaturados (PUFA), nos quais existem duas ou mais ligações duplas na cadeia carbónica. Quando estes não se encontram ligados a outras moléculas, são considerados ácidos gordos livres (FFA). Os SFA mais importantes encontram-se entre o ácido butanóico (C4:0) e ácido octanóico (C28:0), sendo o mais frequente encontrar-se ácido palmítico (C16:0). Por outro lado, os MUFA podem conter entre 14 e 24 carbonos, sendo o MUFA mais comum o ácido oleico (C18:1). Por fim, os PUFA, que representam os lípidos de maior potencial para produção de compostos de valor acrescentado, têm como compostos mais comuns o ómega 3 ou ácido linolénico (C18:3) e ómega 6 ou ácido linoleico (C18:2) (Chen *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Tien Thanh *et al.*, 2022). Na Figura 3 encontram-se alguns exemplos de diferentes MUFA, PUFA e SFA.

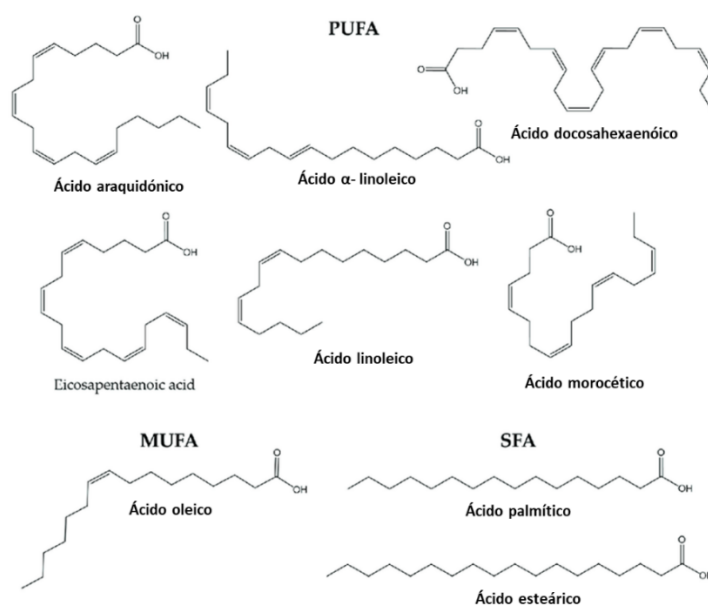


Figura 3 - Estrutura química de alguns ácidos gordos do tipo MUFA, PUFA e SFA. Retirado de Díaz-Puertas *et al.* (2023).

A composição ideal de lípidos e ácidos gordos para posterior produção de biodiesel passa por equilíbrio entre os diferentes compostos que estão em menor quantidade (SFA, MUFA, PUFA e FFA) mas, caso não seja possível, é benéfico para o produto final quando a quantidade de MUFA é superior aos restantes, já que podem ter influência positiva na fluidez e estabilidade oxidativa do biocrude (Demirbas and Fatih Demirbas, 2011; Ali, Mastropetros, *et al.*, 2022) .

### 2.2.5 Cultivo – Biorreatores, Metabolismo e Condições de Cultivo

A escolha do tipo de reatores é fundamental para aumentar a eficiência do cultivo de microalgas para produção de biomassa, tratamento de efluentes e fixação de CO<sub>2</sub>. O cultivo das microalgas pode ser feito em reatores que se distinguem pela sua configuração estrutural (abertos ou fechados), pelo seu modo de operação (descontínuo, contínuo ou semi-contínuo) e pelo tipo de processo físico (com agitação ou sem agitação). Na Figura 4 encontram-se representados diferentes tipos de biorreatores, classificados pela sua configuração estrutural (Liyanaarachchi *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022).

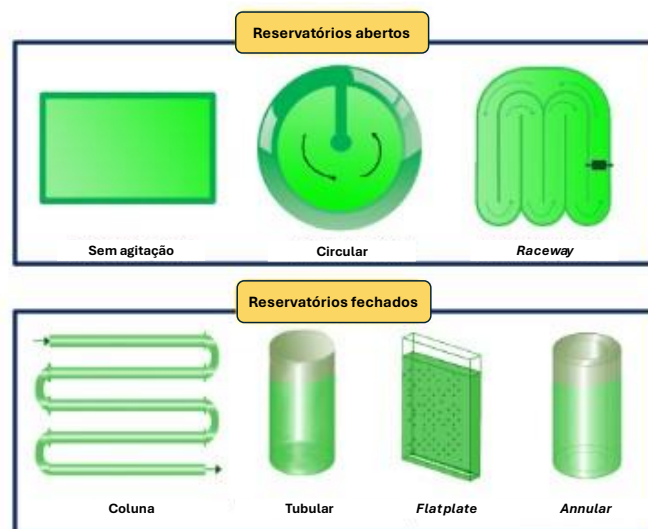


Figura 4 - Representação dos diferentes tipos de biorreatores. (Adaptado de Ali *et al.* 2022).

Os biorreatores abertos apresentam dimensões elevadas, podendo ser reservatórios naturais, artificiais, circulares e *raceways* (RWP), entre outros. Como é representado na Figura 4 (à esquerda), os RWP apresentam uma forma oval ou retangular, com canais/pistas e equipados com sistemas de circulação mecânica para melhorar o arejamento e a distribuição de nutrientes e luz. O cultivo por este tipo de reator é bastante utilizado à escala industrial já que tem grande eficiência relativamente aos baixos custos de construção e manutenção. Contudo apresentam também alguns problemas, como a possível contaminação microbiana e, devido à exposição ao ambiente, problemas de controlo da evaporação, temperatura e disponibilidade de nutrientes, que podem afetar o crescimento das microalgas.



Figura 5 - Reatores tipo *raceway* (à esquerda) e FBR tubular (à direita). Retirado de Oliveira (2009).

Os reatores fechados são, como o nome indica, reservatórios sem exposição a elementos externos, que permitem criar um ambiente controlado com o objetivo de otimizar a produção das microalgas. Este tipo de reservatório minimiza a evaporação e o risco de contaminação por outros organismos e aumentam o crescimento e concentração das microalgas. Devido à sua configuração e necessidade de infraestruturas mais complexas, os custos de produção e manutenção são mais elevados, existindo ainda o risco de sobreaquecimento e incrustações nas paredes do sistema de cultivo. Alguns dos tipos destes reatores, também representados na Figura 4, podem ser fotobiorreatores (FBR), fermentadores, *microalgal turf scrubber*, entre outros. Os FBR são normalmente constituídos por tubos de vidro, plástico ou policarbonato, podendo dividir-se, segundo o seu design e forma de operação, em FBRs tubulares (Figura 5), placas planas (*flat plate*), em coluna ou ainda em fibras ocas (*hollow fiber*) (Barata, 2016; Ali *et al.*, 2022).

Os organismos utilizados podem ser classificados de acordo com as suas características fisiológicas, como a temperatura ideal para o seu crescimento, dividindo-se em psicrófilos, com um crescimento ideal abaixo de 15 °C, e mesófilos, capazes de crescer entre os 15 °C e 45 °C. Devido à instabilidade das clorofilas, as microalgas fotossintéticas não sobrevivem em temperaturas superiores a 75 °C (Azarpour *et al.*, 2022).

O crescimento das microalgas está dependente de diversos fatores, como a luminosidade, pH e agitação, mas também da disponibilidade de alguns elementos no seu meio de cultivo, tanto macronutrientes, como micronutrientes e ainda nanopartículas. Os macronutrientes, azoto (N), fósforo (P) e carbono (C), como o nome indica, são os elementos de que os organismos necessitam em maior quantidade (Dolganyuk *et al.*, 2020). O azoto é fundamental para a fotossíntese, em que, em conjunto com a energia solar, ocorre transformação de CO<sub>2</sub> numa molécula energética (ATP) e O<sub>2</sub>. Este elemento pode ser utilizado sob diferentes formas (nitrato, nitrito, entre outros), mas apresenta maior assimilação quando está disponível como catião de amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e maiores variações de pH quando se encontra sob forma do composto amoníaco (NH<sub>3</sub>). O fósforo é fundamental para o crescimento celular, metabolismo energético (é outro dos componentes do ATP) e como componente das membranas celulares. Tal como o azoto, o fósforo pode estar presente no meio sob diferentes formas, mas é mais facilmente assimilado pelas células quando se encontra sob a forma de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. A relação N/P

pode ser usada de forma qualitativa para perceber o potencial de crescimento das microalgas num determinado meio e, quando qualquer um dos compostos se encontra em sobrecarga, ocorre alteração estrutural e de composição da biomassa. O carbono é imprescindível para a fotossíntese das células mas é tóxico quando, tal como os outros nutrientes, se encontra em excesso, inibindo o crescimento microalgal e, quando em déficit, pode reduzir a remoção de fósforo (Cunha, 2020; Hussain *et al.*, 2021; Mondal *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2023).

O ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), silício (Si), entre outros são considerados micronutrientes, ou *trace elements*, já que são necessários em quantidades muito baixas. Os elementos mencionados podem estar presentes no meio sob a forma de diferentes moléculas, sendo que alguns tipos de algas podem ser capazes de absorver e metabolizar quando se encontram sob forma de certos compostos (Oliveira, 2009; Cunha, 2020; Ali, Mastropetros, *et al.*, 2022).

O crescimento das microalgas acontece, normalmente, segundo diferentes fases (representadas na Figura 6) que nem sempre são facilmente distinguíveis. A fase *lag* corresponde à fase de adaptação das microalgas ao meio onde foram inseridas, havendo assim um crescimento muito pouco significativo e costuma ter uma duração entre os 3 e 5 dias. De seguida entra a fase de crescimento ou *log*, em que, como o nome indica, existe um crescimento exponencial das microalgas num curto período, quando estão na presença de condições descritas anteriormente neste capítulo. A fase estacionária corresponde à fase de estabilização de crescimento, que pode ser explicada pela diminuição da disponibilidade de nutrientes do meio, aumento de presença de metabolitos expelidos pelos organismos e a possível diminuição de exposição de todos os organismos às mesmas condições (como luz e arejamento). Por fim, quando já não há capacidade do meio de suprir as necessidades das microalgas, pode dar-se a morte das mesmas (Pina *et al.*, 2021).

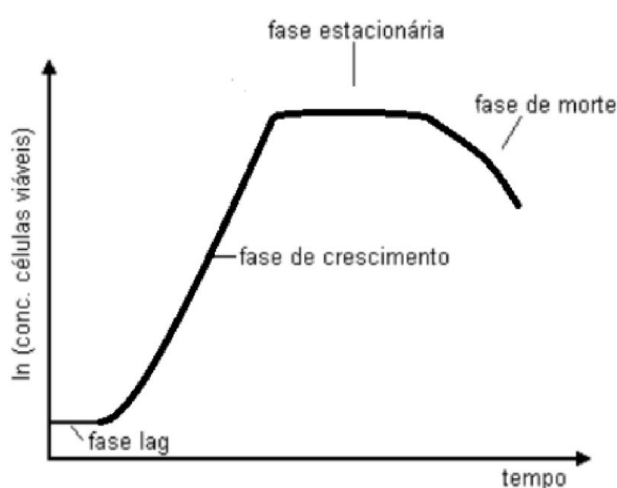


Figura 6 - Diferentes fases do crescimento microalgal. Retirado de Pina *et al.* (2021).

De acordo com diversos estudos e trabalhos realizados, como o de Liyanaarachchi *et al.* (2021) e Cunha (2020), quando as culturas são colocadas em situação de *stress*, com déficit de nutrientes ou outras condições do meio, pode desencadear-se maior produção de lípidos ou

outros componentes, apesar de poder haver inibição ou término do crescimento das microalgas. Observou-se que, para aumentar a produção de lípidos, é fundamental privar as microalgas de azoto e aumentar a temperatura e a disponibilidade de luz do meio.

A exposição das microalgas a técnicas de co-cultivo com bactérias e outros organismos e a alternância do uso de diferentes metabolismos podem induzir um aumento significativo de produção de lípidos e mitigar problemas de contaminação do meio (Azarpour *et al.*, 2022).

### 2.3 Caracterização da *Chlorella vulgaris*

As microalgas do género *Chlorella* são dos organismos protistas fotossintéticos mais populares no Mundo. A *Chlorella vulgaris* é uma microalga verde de água doce, do Reino Protista e Filo *Chlorophyta*, que se estima que exista na Terra desde o período Pré-Câmbrico. O seu nome deriva do grego *chloros* (verde) conjugado com o sufixo latino *ella* (pequeno), já que se tratam de microalgas com cerca de 5 a 10 µm de diâmetro (Oliveira, 2009; Al-Hammadi and Güngörmüşler, 2024).

Devido à facilidade de manuseamento e crescimento rápido, a *Chlorella vulgaris* tem sido amplamente usada na investigação para utilização em diversos processos, como na suplementação alimentar, e áreas da biotecnologia, como na indústria farmacêutica. A *Chlorella vulgaris* foi descrita e publicada pela primeira vez em 1890, por M.W. Beijerinck, quando este recolheu amostras de um lago, nos Países Baixos, e observou que “a água de uma lagoa pouco profunda perto de Delft foi colorida de verde intenso por algas microscópicas. A cor verde era quase tão forte como a da relva na margem; a letra impressa já não podia ser lida através de uma camada de um centímetro.” (*Chlorella vulgaris* Beijerinck - *AlgaeBase*, 2023). Na Figura 7 é possível observar-se a microalga em estudo a nível microscópico.

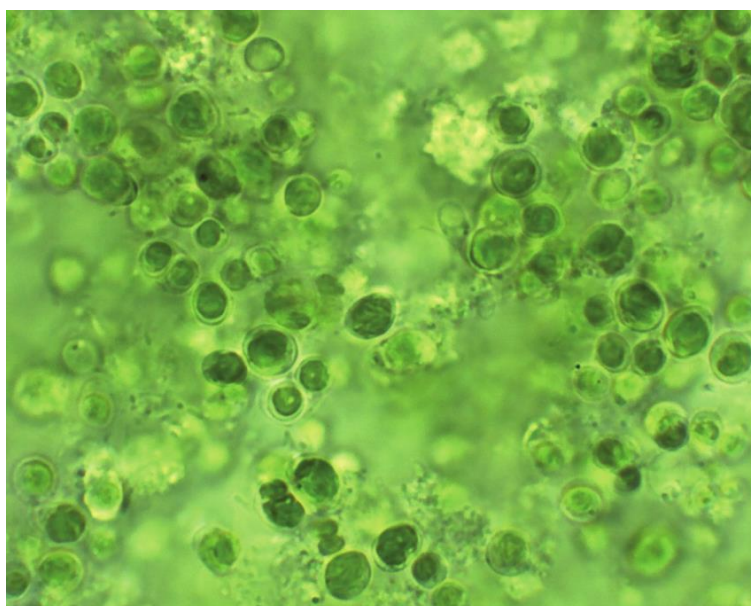


Figura 7 – Imagem de microscópio de *Chlorella vulgaris*, com ampliação de 400x (Brzychczyk, Kowalczyk e Gielzecki, 2016).

Ao longo dos anos, muitos organismos verdes e circulares foram erradamente designados como *Chlorella*, tendo isso sido alterado quando surgiu a quimiotaxonomia. Segundo esta disciplina da botânica, e tendo em conta o trabalho de E. Kessler, foi possível limitar esta classificação a apenas a organismos procariontes segundo a sua morfologia (Krienitz, Huss e Bock, 2015).

Segundo Rame, Purwanto e Sudarno (2023), esta espécie de microalga pode sobreviver em valores mais elevados de dissolução de CO<sub>2</sub> (cerca de 51,59%) quando cultivada em reatores na presença de nanofibras com nanopartículas de óxido de ferro. Estes organismos são constituídos por biomassa com elevada quantidade de proteínas (61,6%), lípidos (12,5%) e hidratos de carbono (13,7%) (Cunha, 2020; Abdel-Latif *et al.*, 2022).

## 2.4 Biocombustíveis

Com a disponibilidade dos combustíveis fósseis em declínio e a procura de energia em rápido crescimento, é fundamental integrar novas fontes de combustíveis para fazer face a estas necessidades. Admite-se que a solução possa passar pelos combustíveis provenientes de biomassa, os biocombustíveis, que podem ser bioetanol, biodiesel, biogás, entres outros (Nigam e Singh, 2011; Ideris *et al.*, 2022).

Os biocombustíveis dividem-se em quatro grandes grupos, denominadas de gerações, que se diferenciam pelo seu substrato ou origem da matéria-prima (MP) da biomassa, podendo originar diferentes tipo de bio-produtos (Nigam e Singh, 2011; Maroušek *et al.*, 2023). Na Tabela 2 encontra-se um resumo das gerações de biocombustíveis, da origem da biomassa e exemplos e dos biocombustíveis que podem gerar.

Tabela 2 - Diferentes gerações de biocombustíveis, a origem da MP e alguns exemplos, assim como os possíveis biocombustíveis que podem originar.

Geração	Origem	Exemplos	Biocombustíveis
1ª geração	Culturas agrícolas alimentares	Milho, soja, cana-de-açúcar e plantas oleaginosas	Bioetanol e biodiesel
2ª geração	Culturas não alimentares, resíduos florestais e agrícolas	Mandioca, madeira, palha, erva	Bioetanol, bio-metanol e biogás
3ª geração	Organismos fotossintéticos	Microalgas	Biodiesel, bioetanol, bio-hidrogénio e bio-metano
4ª geração	Organismos com modificações genéticas	Microalgas modificadas	Biodiesel, geendiesel e combustível para aviação.

Os combustíveis de 1ª geração foram os primeiros a serem explorados, mas suscitaram alguns debates e problemas como o dilema “*food versus fuel*” e a sua baixa eficiência tendo em conta

a área de solo arável utilizada para o seu cultivo. Este dilema levantou questões sobre se a sua exploração poderia agravar os problemas sociais (pobreza e fome) e ambientais (risco de desflorestação e danos na vida selvagem) (Atabani *et al.*, 2013; Maroušek *et al.*, 2023). De forma a ultrapassar estas questões sociais, começaram a ser usadas culturas não alimentares (biomassa lignocelulósica) como matéria-prima para a produção de combustível, originando a 2ª geração de biocombustíveis. Ainda assim, mantiveram-se algumas das questões associadas anteriormente aos combustíveis de 1ª geração, como a dificuldade da transformação em biomassa e os seus custos elevados. Desta forma, a utilização de biomassa de microalgas foi a solução mais viável, já que estas contêm um elevado teor de lípidos, uma grande capacidade de absorção de CO<sub>2</sub> e um crescimento rápido e sem necessidades espaciais de maior (Pôjo, 2016; Cunha, 2020; Ahmad *et al.*, 2022).

A transformação da biomassa em biocombustíveis de 1ª geração ocorre por fermentação e transesterificação, sendo que a produção de combustíveis de 2ª geração ocorre por fermentação (celulósica), gasificação e pirólise. No caso dos biocombustíveis atualmente mais utilizados, os de 3ª geração (microalgas e macroalgas), a transesterificação e liquefação hidrotérmica são os processos mais comuns de transformação (Nigam e Singh, 2011; Atabani *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2022).

#### **2.4.1 Biodiesel**

O biodiesel pode ser produzido recorrendo à transformação de biomassa de diversas fontes, como materiais agrícolas e microalgas. Neste momento, a fonte mais explorada são as microalgas, devido à eficiência de produção elevada, sem a necessidade de competir com outras culturas para utilização do solo e a sua capacidade de absorção e fixação de CO<sub>2</sub>.

Na O processo inicia-se pelo cultivo das microalgas (ex.: *Chlorella vulgaris*), que pode ser efetuado recorrendo a diferentes sistemas de cultivo (mencionados na secção 2.2.3) e tendo em conta algumas necessidades básicas para o crescimento das microalgas. Segundo (Dolganyuk *et al.*, 2020), para um crescimento ideal desta espécie, os valores de temperatura e pH do meio não devem ultrapassar os 29 °C e 4,1, respetivamente, e o tempo de cultivo não deve ultrapassar os 14 dias, mantendo o fornecimento de CO<sub>2</sub> e agitação de 60 rpm. No entanto, este estudo denota que, aumentando a iluminação e recorrendo ao défice de azoto e fósforo, a quantidade de lípidos aumenta, assim como a acumulação de TAGs (Mata, Martins e Caetano, 2010; Liyanaarachchi *et al.*, 2021; Maroušek *et al.*, 2023; Rame, Purwanto e Sudarno, 2023).

De seguida, é necessária a colheita de microalgas, que pode ser feita recorrendo a um método apenas ou uma conjugação de vários métodos, que podem ser métodos tradicionais ou métodos avançados. Os métodos tradicionais incluem a centrifugação (o método mais utilizado) a sedimentação e a filtração associada à coagulação. Os métodos avançados de colheita podem ser a floculação (orgânica, inorgânica e autofloculação), filtração membranar, separação magnética, entre outros (Zhang *et al.*, 2022; Al-Hammadi e Güngörmüşler, 2024). De acordo com Maroušek *et al.* (2023), os métodos tradicionais de colheita apresentam problemas de eficiência na produção em massa, já que os seus custos e consumo de energia são elevados e, em alguns dos métodos, é necessário desenvolverem-se novas tecnologias para evitar

entupimentos e sujidade ou para tornar o processo mais rápido. Os métodos avançados são considerados promissores por serem ecológicos e mais viáveis economicamente, mas apresentam ainda algumas dificuldades na produção em grande escala (Barros *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2023). Para uma maior eficiência de colheita e custos, Barros *et al.* (2015) sugerem a utilização combinada de diferentes métodos.

Tabela 3 estão descritas as diferentes etapas da produção de biodiesel, assim como a metodologia que pode ser aplicada.

O processo inicia-se pelo cultivo das microalgas (ex.: *Chlorella vulgaris*), que pode ser efetuado recorrendo a diferentes sistemas de cultivo (mencionados na secção 2.2.3) e tendo em conta algumas necessidades básicas para o crescimento das microalgas. Segundo (Dolganyuk *et al.*, 2020), para um crescimento ideal desta espécie, os valores de temperatura e pH do meio não devem ultrapassar os 29 °C e 4,1, respetivamente, e o tempo de cultivo não deve ultrapassar os 14 dias, mantendo o fornecimento de CO<sub>2</sub> e agitação de 60 rpm. No entanto, este estudo denota que, aumentando a iluminação e recorrendo ao défice de azoto e fósforo, a quantidade de lípidos aumenta, assim como a acumulação de TAGs (Mata, Martins e Caetano, 2010; Liyanaarachchi *et al.*, 2021; Maroušek *et al.*, 2023; Rame, Purwanto e Sudarno, 2023).

De seguida, é necessária a colheita de microalgas, que pode ser feita recorrendo a um método apenas ou uma conjugação de vários métodos, que podem ser métodos tradicionais ou métodos avançados. Os métodos tradicionais incluem a centrifugação (o método mais utilizado) a sedimentação e a filtração associada à coagulação. Os métodos avançados de colheita podem ser a floculação (orgânica, inorgânica e autofloculação), filtração membranas, separação magnética, entre outros (Zhang *et al.*, 2022; Al-Hammadi e GÜngörmüşler, 2024). De acordo com Maroušek *et al.* (2023), os métodos tradicionais de colheita apresentam problemas de eficiência na produção em massa, já que os seus custos e consumo de energia são elevados e, em alguns dos métodos, é necessário desenvolverem-se novas tecnologias para evitar entupimentos e sujidade ou para tornar o processo mais rápido. Os métodos avançados são considerados promissores por serem ecológicos e mais viáveis economicamente, mas apresentam ainda algumas dificuldades na produção em grande escala (Barros *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2023). Para uma maior eficiência de colheita e custos, Barros *et al.* (2015) sugerem a utilização combinada de diferentes métodos.

Tabela 3 - Etapas, breve descrição e métodos da produção de biodiesel a partir das microalgas.

<b>Etapas</b>	<b>Descrição</b>	<b>Métodos</b>
Cultivo das microalgas	Crescimento de microalgas recorrendo a diferentes sistemas de cultivo	Mencionados em 2.2.3
Colheita	Colheita de material para posterior extração de lípidos	Centrifugação, floculação ou filtração
Processamento	Transformação das microalgas (inseridas em meio) em biomassa seca	Desidratação, filtração e secagem

O	Extração de lípidos/óleos	Disrupção celular da biomassa e extração dos lípidos/óleos	Mecânicos, químicos biológicos ou combinação de ambos
	Produção de biodiesel	Reação química entre os TAG e um álcool (com catalisador)	Transesterificação <i>in situ</i> , com catalisador ou supercrítica
	Purificação	Purificação do crude (de biodiesel) obtido da transesterificação	Lavagem a seco e com água e secagem
	Teste de qualidade	Avaliação para cumprir as normas para utilização em motores	Análise de viscosidade, cetano total, ponto de inflamação, propriedades de fluxo a frio e conteúdo de glicerol

processamento prossegue quando é necessário obter biomassa seca para posterior utilização na extração de lípidos. Nesta etapa ocorre filtração, desidratação e secagem da biomassa. De acordo com Shokravi *et al.* (2022), a desidratação da biomassa tem um consumo elevado de energia, baixa eficiência e dificuldades de estabilização e armazenamento dos lípidos. Tendo em conta estas desvantagens, e com o avanço das tecnologias, as etapas de processamento e extração podem não se realizar, ocorrendo produção de biodiesel a partir de biomassa húmida.

A extração de lípidos é outro dos processos com maior impacto económico na produção de biocombustível e pode atingir 90% do custo total de produção (Ideris *et al.*, 2022). Esta etapa pode ser feita usando diferentes protocolos e procedimentos e a sua escolha está dependente, entre outros fatores, da microalga utilizada já que algumas espécies contêm paredes celulares robustas e de quebra mais complexa (Azarpour *et al.*, 2022). Os métodos de Folch, Lees e Stanley (1957), Bligh e Dyer (1959) e Matas *et al.*, (2008) são dos métodos convencionais mais utilizados atualmente, mesmo que com algumas adaptações, e todos utilizam metanol como solvente polar, assim como um sistema de separação em duas fases: fase orgânica, que contém o material pretendido, e aquosa que contém proteínas, açúcares e outros compostos. As suas principais diferenças encontram-se na escolha de um dos co-solventes e na proporção necessária dos mesmos. Algumas das dificuldades destes métodos estão associados ao risco de degradação e alterações químicas do óleo, assim como a morosidade do processo. Para ultrapassar estes problemas, foram desenvolvidas técnicas que recorrem a micro-ondas e ultrassons para, juntamente com os métodos anteriores, aumentarem o rendimento da extração de lípidos (Bermúdez Menéndez *et al.*, 2014; Vinatoru, Mason e Calinescu, 2017).

Na produção de biodiesel acontece, maioritariamente, a transesterificação (química ou enzimática), processo em que há transformação de triglicerídeos em ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) e glicerol, seguida da separação dos mesmos. A transesterificação divide-se em *in situ*/direta, por catalisador (ácido, base ou enzimático), supercrítica, entre outros. Na Figura 8 está representada a equação química de transformação de TAGs em biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) e glicerol. A transesterificação *in situ*/direta elimina a necessidade de secagem de biomassa e a extração de lípidos uma vez que é realizada com recurso a biomassa húmida e a um catalisador (ácido ou base). Ao utilizar este processo há a redução de

custos de equipamento e processos (eliminação das etapas de processamento e extração), simplificando o processo e aumentando a eficiência de produção quando a quantidade de lípidos é reduzida. Por outro lado, o risco de contaminação do biodiesel por impurezas é mais elevado, assim como a necessidade de utilização de grandes quantidades de álcool, havendo o aumento de custos associados. O método de transesterificação por catalisador ácido/básico/enzimático ocorre de forma semelhante à transesterificação direta, diferenciando-se na quantidade de álcool necessária e na fase em que se encontra a matéria-prima, no caso, lípidos extraídos de biomassa seca. Na Tabela 4 estão descritas, consoante o catalisador usado as principais diferenças (Demirbas e Fatih Demirbas, 2011; Barata, 2016; Ali, Mastropetros, *et al.*, 2022).

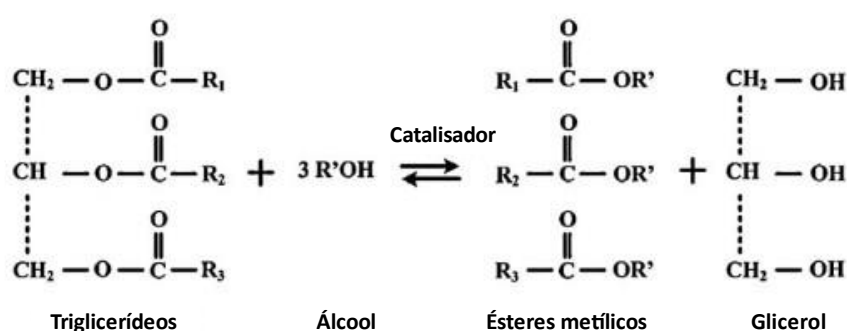


Figura 8 - Transesterificação dos triglicerídeos (TAG). Adaptado de Mata, Martins e Caetano (2010)

Tabela 4 - Principais diferenças da transesterificação com catalisador (Ma e Hanna, 1999).

Catalisador	Vantagens	Desvantagens
Alcalino (NaOH e KOH)	Reação mais rápida, custos do catalisador reduzidos e eficiente para baixas quantidades de ácidos gordos livres (FFA)	Risco de formação de sabão quando há elevada concentração de FFAs
Ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e HCl)	Eficiente na presença de muitos FFAs e TAGs, simultaneamente	Reação mais lenta, necessidade de manuseamento de reagente corrosivo e custos mais elevados
Enzimas	Sem risco de formação de sabão, eficiente na presença de elevado teor de FFAs e com catalisador reutilizável	Custos mais elevados, risco de inibição de enzimas pelo álcool e perda de atividade ao longo do tempo

A transesterificação supercrítica acontece quando há um aumento de temperatura da mistura dos lípidos com álcool até atingirem o ponto crítico (cerca de 240 °C). Quando o álcool atinge este ponto, encontra-se numa fase intermédia entre gás e líquido, acelerando a reação. Este método funciona tanto para a transformação de TAGs como FFAs e é rápido sem necessitar de

catalisador. No entanto, tem custos mais elevados, tanto pela necessidade elevada de energia como de equipamento especializado. A separação biodiesel-glicerol ocorre, normalmente, através de centrifugação ou sedimentação (Nigam e Singh, 2011; Marella *et al.*, 2019).

Por fim, e já após a separação do glicerol, é necessário retirar substâncias indesejáveis que possam permanecer no biodiesel e é efetuada a lavagem (habitualmente com água) e secagem do produto. O produto final, passa então por testes de qualidade, com análises à viscosidade, ao número de cetano, ponto de inflamação, à quantidade de glicerol, entre outros (Atabani *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2023). A norma que estabelece os requisitos de qualidade e os métodos respetivos parâmetros é a NP EN ISO 14214.

A avaliação do ciclo de vida é fundamental para compreender a rentabilidade da implementação de negócios com determinadas características. No artigo de Tien Thanh *et al.* (2022) foram realizadas algumas avaliações em que a transesterificação *in situ* (biomassa húmida) e transesterificação com recurso a óleos previamente extraídos. Relativamente a consumos energéticos, a transesterificação *in situ* apresentou valores mais baixos, no entanto, a reação é inibida pela presença da água e resulta numa diminuição de produtividade de FAMES inversamente proporcional ao aumento da percentagem de humidade. Esta abordagem pode ser fundamental para diminuir a necessidade energética do processo, mas ainda necessita de desenvolvimentos técnicos para ser mais rentável e poder ser utilizada à escala industrial.

## 2.5 Águas Residuais

C. ePerumalsamy (2022) afirmam que “as águas residuais compreendem os resíduos líquidos descarregados pelos sectores doméstico, agrícola e industrial”. Como mencionado no capítulo 1, a produção de águas residuais tem aumentado proporcionalmente ao crescimento da população mundial e das indústrias. Algumas substâncias nocivas para o ambiente presentes nestas águas podem ser utilizadas como nutrientes para organismos, como as microalgas, e são, na sua maioria, metais pesados, fertilizantes químicos, e produtos farmacêuticos. Quando não existe qualquer tipo tratamento, a libertação indiscriminada destes constituintes pode desencadear eutrofização e instabilidade no sistema aquático.

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos diferentes métodos de tratamentos biológicos ou químicos para remediação ou remoção de poluentes. Os métodos químicos mais comuns, como a filtração por membrana e osmose, não são eficientes em grande escala e podem ter efeitos nefastos no ambientes e organismos. Desta forma, o foco é sempre o uso de processos biológicos que, apesar de mais lentos, apresentam custos mais reduzidos face à sua maior eficiência e menor impacto ambiental. O método biológico mais estudado atualmente passa pela biorremediação, ou remediação biológica, em que há a utilização de microrganismos para reduzir o número de poluentes orgânicos e inorgânicos no meio, tanto por absorção como acumulação. A biorremediação divide-se em duas fases ativas distintas: a bioabsorção e bioacumulação. Na bioabsorção ocorre a eliminação de iões de metais pesados das soluções ácidas, regulando o pH do meio; na bioacumulação ocorre absorção de produtos químicos pelas paredes celulares dos organismos. Pode ainda ocorrer biorremediação de forma passiva

envolvendo processos fitoquímicos realizados nas células microbianas (vivas ou mortas). Este método apresenta-se como um dos mais favoráveis para o futuro do tratamento de águas residuais já que os seus custos são reduzidos, é sustentável e apresenta bons resultados a longo prazo (Ahmad *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2022).

As microalgas fazem parte dos organismos capazes de biorremediação. Graças à sua capacidade de fixação e transformação de CO<sub>2</sub> em oxigénio e outros nutrientes, capacidade de crescimento em condições adversas e capacidade de produzir produtos de elevado valor (bio óleos para biocombustíveis, entre outros), tornaram-se o foco da atenção dos investigadores pelo seu potencial para uso nas estações de tratamento de águas residuais (ETAR). Assim, têm sido desenvolvidos estudos e pesquisa de melhores técnicas de cultivo para redução da complexidade e dos custos no tratamento de águas (Miranda *et al.*, 2017; Ideris *et al.*, 2022). A utilização específica de microalgas verdes, como a *Chlorella vulgaris*, surgiu dado o seu potencial mais elevado de posterior utilização como matéria-prima para a produção de biocombustíveis (maior quantidade de lípidos), já que o preço, escassez e impactos ambientais dos combustíveis fósseis são cada vez mais elevados (Ahmad *et al.*, 2022).

Como mencionado na secção 2.2.4, o carbono, azoto e fósforo são macronutrientes fundamentais para os processos biológicos das microalgas, sendo também dos constituintes principais das águas residuais. Na Figura 9 encontram-se representadas as diferentes formas nas quais se encontram os macronutrientes nas águas residuais.

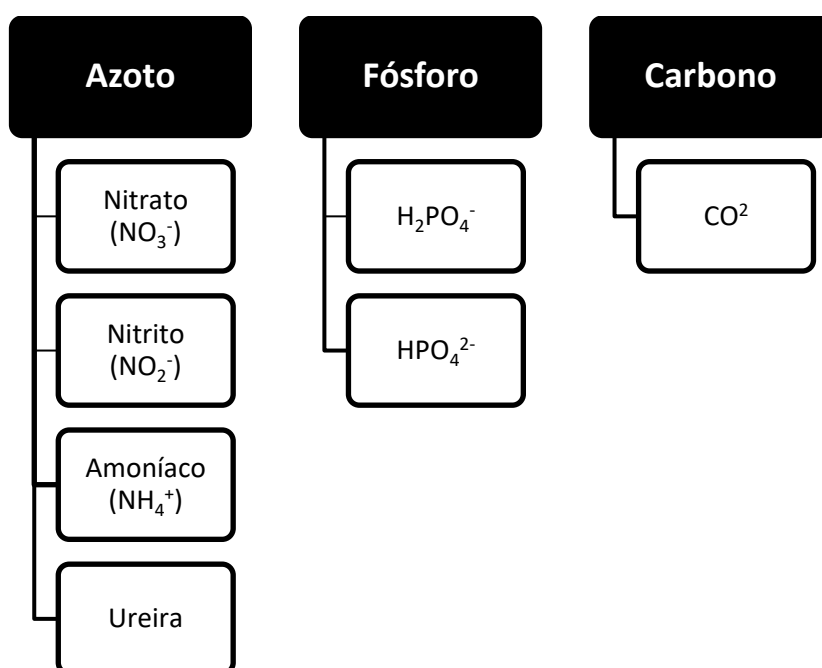


Figura 9 - Diferentes formas em que os macronutrientes são encontrados. Adaptado de (Mondal *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2023)

O estudo efetuado por Peng *et al.* (2016), em que o meio contém 0,05 g/L de concentração inicial de algas e 3,5 L de BBM, atingiu um valor máximo de produção de biomassa de 1,34 g/L, ao dia 13 de cultivo. Por outro lado Choi (2016), recorrendo a um meio constituído por 1 L de *Jaworski Medium* (JM), 10 L de efluente de uma empresa de lacticínios e 0,367 g/L de inóculo

de *Chlorella vulgaris*, obteve valores de produção máxima de biomassa de 1,23 g/L ao dia 7 de cultivo, o que mostra o efeito da composição do meio no crescimento da biomassa microalgal.

### 2.5.1 Algas e o Tratamento de Águas Residuais

Como já referido, as microalgas podem ser fundamentais para o tratamento de água residuais devido à sua capacidade de biorremediação.

O grupo de Liyanaarachchi *et al.* (2021) compilou um conjunto de estudos feitos recorrendo a diferentes metabolismos no crescimento em águas residuais e destacou algumas técnicas que podem melhorar o tratamento de efluentes. Um desses estudos menciona que, ao sujeitar as microalgas a condições fotoautotróficas seguidas de condições mixotróficas, existe um aumento de produtividade de lípidos, assim como uma remoção mais eficiente de nutrientes como carbono e azoto do meio.

Apesar da integração das microalgas no tratamento de águas ser muito benéfica, é necessária uma análise cuidada do tipo de águas residuais usadas e da quantidade de nutrientes e outros compostos integrantes dos efluentes a usar. Quando são usadas águas residuais farmacêuticas não tratadas, Su *et al.* (2023) demonstram que não há qualquer tipo de crescimento microalgal, já que existe um desequilíbrio muito elevado de nutrientes e possivelmente compostos inibitórios do crescimento microalgal.

A carência química de oxigénio (CQO) é um indicador da qualidade da água que mede a quantidade de componentes orgânicos e inorgânicos da água, através do valor de oxigénio necessário para os oxidar. Assim sendo, no âmbito do tratamento de águas residuais, este procedimento é fundamental para identificar a quantidade de oxigénio necessária para tratar a água, fornecendo informações fundamentais sobre a eficácia do tratamento (de Castro *et al.*, 2023).

Dada toda a revisão bibliográfica estudada neste trabalho, procedeu-se ao cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em três ensaios diferentes, com diferentes quantidades e águas residuais utilizadas para perceber qual seria a simbiose mais interessante para o crescimento microalgal, produção de biomassa e lípidos, e consequente produção de biodiesel. Neste estudo foram utilizados diferentes métodos de produção de biodiesel, apenas por transesterificação direta da biomassa, eliminando a necessidade de efetuar a extração de lípidos devido à dificuldade deste processo e baixa eficiência do mesmo.

### 3 Materiais e Métodos

O trabalho experimental realizado pretendeu avaliar e perceber quais as melhores condições de cultivo de *Chlorella vulgaris*, em regime fotoautotrófico, para a produção eficiente de biodiesel, recorrendo simultaneamente a utilização e tratamento de águas residuais provenientes da ETAR de Gaia Litoral, gentilmente cedidas pela empresa SimDouro. A recolha de águas foi feita em três estágios de tratamento da ETAR: à entrada do tanque de arejamento (água residual 1), no interior do tanque de arejamento após tratamento biológico (água residual 2) e à saída do decantador secundário (água residual 3).

A inoculação dividiu-se em quatro etapas/ensaios diferentes consoante o tipo de água residual utilizada e, nos primeiros três ensaios, foram utilizados matrizes de 250 mL com 20 mL de biomassa e o restante com diferentes quantidades de BBM e água residual. Foi realizado outro ensaio com recurso a matrizes de 5 L, com 200 mL de biomassa e 50% de água residual.

A monitorização do crescimento das microalgas foi feita pelas leituras da densidade ótica (DO) de amostra das culturas nos matrizes, recorrendo ao espectrofotómetro Shimadzu UV-1900i. Apesar de diversos estudos indicarem o comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 680 nm para a absorvância máxima, foi efetuado um varrimento para confirmar se seria o caso da microalga a utilizar. O valor máximo de absorvância foi obtido no  $\lambda$  de 685 nm.

As medições da intensidade de luz nas culturas em matraz e nos aquários foi feita por luxímetro LUTRON LX-1102.

A câmara de fluxo laminar vertical utilizada ao logo da fase experimental é da marca CRUMA, modelo 670FL. Durante a extração de lípidos e transesterificação, foram utilizados um vórtex Scientific Industries Genie 2 e um ultrassom Sonorex TK30.

## 3.1 Preparação de Materiais

### 3.1.1 Meio de cultivo BBM

O meio de cultura padrão utilizado neste estudo trata-se do meio BBM já que se trata do meio de cultura de referência. Este irá ser utilizado ainda em combinação com águas residuais. A composição deste meio de cultura pode ser observada na Figura 10.

Reagentes	C <sub>Mássica</sub> (g/L <sub>conc</sub> )	solução nº	Volume (mL <sub>conc</sub> /L <sub>final</sub> )	C <sub>Mássica final</sub> (g/L <sub>final</sub> )	[elemento] (mg/L)		
					Elemento	mg/L	
Macronutrientes	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5	1	10	0,075	K	33,7
						P	13,3
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5	2	10	0,175	K	50,3
						P	39,9
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5	3	10	0,075	Mg	7,4
						S	9,8
	NaNO <sub>3</sub>	2,5	4	10	0,25	N	41,2
						Na	67,6
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5	5	10	0,025	Ca	6,8
						Cl	12,1
	NaCl	2,5	6	10	0,025	Na	3,3
						Cl	5,1
	EDTA-Na <sub>2</sub>	50	7	1	0,05	C	16,1
N						3,7	
+ KOH	31	7	1	0,031	Na	6,2	
					K	21,6	
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> *	4,98 + 1,00 mL	8	1	0,0050 + 0,0010 mL	Fe	1	
					S	1,6	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	9	1	0,0114	B	2	
Micronutrientes	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,412	10	1	0,001412	Zn	
						S	
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,232	10	1	0,000232	Mn	
						Cl	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,252	10	1	0,000252	Cu	
S							
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,08	10	1	0,00008	Co		
					N		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,192	10	1	0,000192	Mo		
					Na		
H <sub>2</sub> O destilada		solução mãe	936				
				1000			

Figura 10 - Composição do meio BBM. Retirado de Oliveira (2009).

Os reagentes foram pesados numa balança analítica eletrónica de precisão KERN ALJ 220-4.

As soluções foram preparadas, individualmente, em câmara de fluxo laminar CRUMA, em condições assépticas e armazenadas no frigorífico em frascos GL 45, como observado na Figura 11, de 1 L (soluções 1, 2 e 3), 500 mL (soluções 4, 5 e 6) e 100 mL, (soluções 7, 8, 9 e 10) de vidro transparente graduados, borossilicato 3.3, previamente autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. No final, a preparação do meio de cultura, de pH 6,85 ± 0,15, foi também feita na câmara de fluxo laminar vertical, em condições assépticas.

A solução 8, com FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, foi preparada em hotte devido à presença de um ácido e a solução seguinte (solução 9) foi preparada numa placa de aquecimento com agitação magnética.

As soluções concentradas foram etiquetadas com identificação “BBM, número de solução, data de preparação e assinatura” e armazenadas a  $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  num frigorífico Teka, como é possível observar na Figura 11.



Figura 11 - Soluções distintas de BBM.

### 3.1.2 Cultura de *Chlorella vulgaris* Usada Como Inóculo.

A microalga *Chlorella vulgaris*, de referência 211-8L da SAG (Culture Collection of Algae at the University of Göttingen, Germany), foi cedida pelo Laboratório de Tecnologia (LT) do Instituto Superior de Engenharia do Porto. (ISEP).

A inóculo cedido, aproximadamente 9 L de cultura húmida, foi dividido em duas frações posteriormente colocadas em 2 aquários de 50 L como apresentado na Figura 12, a temperatura ambiente (entre os 16 e 22 °C), com intensidade de luz de 3500 lux e agitação assegurada por bombas de ar EHEIM air 400. Foram preparados 60 L (30 L para cada aquário) de meio de cultura BBM, esterilizado na câmara de fluxo laminar vertical sob luz UV por 15 minutos, para eliminação de possíveis contaminantes microbiológicos.

A monitorização do crescimento foi feita através da leitura de densidade ótica (DO), a 685 nm, em espectrofotómetro Shimadzu-UV-1900i, ao longo de cerca de 15 dias. O cálculo da concentração real de microalgas no meio ( $C_{\text{Real}}$ ), é realizado através da equação (1), retirada de Oliveira (2009):

$$C_{\text{Real}} = \frac{-0,037 + \sqrt{0,0037^2 - 4 * (0,0207 - DO) * (-1 * 10^{-6})}}{2 * (-1 * 10^{-6})} * FD \text{ [mg/L]} \quad (1)$$

Em que *DO* corresponde ao valor medido no espectrofotómetro e *FD* é o fator de diluição da amostra. A monitorização do crescimento foi feita através da leitura de DO, a 685 nm, ao longo de 15 dias.

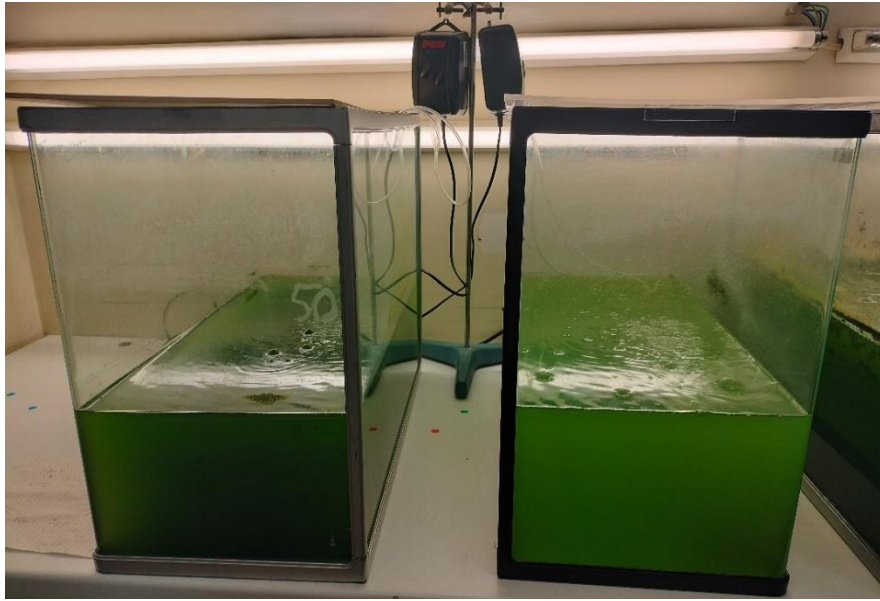


Figura 12 - Inoculação de *Chlorella vulgaris* para uso nos ensaios de crescimento.

### 3.1.3 Águas residuais

A recolha de águas residuais foi feita em três estágios de tratamento da ETAR: à entrada do tanque de arejamento (água residual 1) após o tratamento físico, no interior do tanque de arejamento após o tratamento biológico (água residual 2) e à saída do decantador secundário (água residual 3).

Na Figura 13 encontram-se as amostras relativas à água residual 1 e à água residual 3, recolhidas na ETAR de Gaia Litoral operada pela SimDouro.



Figura 13 - Amostras de água à entrada do tanque de arejamento (à esquerda) e no decantador secundário (à direita) cedidas pela SimDouro.

### 3.1.4 Caracterização das Águas Residuais – Análises de CQO, TOC, IC, TC e TN

- Medição da carência química de oxigênio (CQO)

Para caracterização das águas residuais utilizadas para o crescimento de culturas de microalgas neste trabalho foi medida a carência química de oxigênio – CQO. Antes de iniciar a utilização das águas residuais, procedeu-se à sua filtração com filtro de fibra de vidro de modo a remover partículas que dificultariam a transmissão de luz no meio aquoso. Procedeu-se, de seguida, à sua esterilização em câmara de fluxo laminar vertical com luz UV por 15 minutos. As águas residuais filtradas foram depois usadas na medição da CQO e para ensaios de crescimento de culturas de microalgas.

Foram utilizadas as seguintes soluções, disponibilizadas pelo Laboratório de Tecnologia:

Solução catalisadora - 10,12 g/L de sulfato de prata ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );

Solução digestora - 10,22 g/L de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e 33,3 g/L de sulfato de mercúrio ( $\text{HgSO}_4$ ) em 17% de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) em água desmineralizada.

Prepararam-se diluições volumétricas das águas residuais.

Para cada água residual a testar, 2,5 ml de amostra homogeneizada foram adicionados a 3,5 ml de solução catalisadora e 1,5 ml de solução digestora num tubo de digestão. O tubo foi então tapado e a mistura foi homogeneizada. Uma condição de controlo, constituindo o branco, foi preparada adicionando 2,5 ml de água a 3,5 ml de solução catalisadora e 1,5 ml de solução digestora noutro tubo de ensaio e homogeneizando bem o tubo fechado. Os tubos correspondentes às diferentes amostras e ao branco foram colocados a 150 °C num reator Velp Eco 25 durante 2 horas. Após a digestão, as amostras arrefeceram até cerca de 120 °C, foram homogeneizadas, e depois colocadas de novo a arrefecer até à temperatura ambiente.

O branco e as amostras digeridas foram analisados por colorimetria num colorímetro Hach DR/2000. Foram feitas 5 medições por cada amostra. A média destas medições foi calculada, bem como o desvio padrão.

Os valores lidos no colorímetro devem encontrar-se num intervalo de 20 a 1000  $\text{mgO}_2$  /L. O cálculo de CQO é feito recorrendo à equação (2).

$$\text{CQO} = \text{Leitura média do colorímetro} \times \text{Fator de diluição} [\text{mgO}_2 /\text{L}] \quad (2)$$

As medições de determinação de CQO foi repetido 3 vezes, em diferentes dias, e com variação do FD. Estas medições, que foram denominados de Testes (1, 2 e 3), foram feitas nas seguintes condições:

- Teste 1

Na primeira tentativa foram utilizados, no total, 15 tubos de ensaio, dividindo-se em: 2 tubos de branco/controlo (água desmineralizada) e 2 tubos de ensaio com meio BBM, com FD de 4.

Para cada água foram utilizados 2 tubo de ensaio com FD de 4, seguindo-se a utilização de 2 tubos das Água 1 e Água 2, e 1 tubo de Água 3, com FD de 6.

- Teste 2

Nesta tentativa foram testadas com 2 tubos de branco (água desmineralizada), e os restantes dividem-se em: uma amostra em duplicado da Água 3 não diluída e uma amostra, em duplicado, de cada uma das Águas 1 e 2 com FD 2, 5 e 10.

- Teste 3

Este teste foi realizado preparando amostras em quadruplicado de cada uma das três águas residuais não diluídas.

- Medição do carbono orgânico total (TOC), carbono inorgânico (IC), carbono total (TC) e azoto total (TN)

Para além da medição da CQO, a caracterização das águas residuais utilizadas para o crescimento microalgal pode ser efetuada pela medição do TOC, IC, TC e a TN. Esta medição foi efetuada no equipamento SHIMADZU TOC-V CSN/TNM-1.

Antes de se iniciar esta medição, a água residual foi filtrada com filtro de fibra de vidro de forma a remover partículas que podem interferir com a transmissão de luz no meio aquoso e diluída volumetricamente em água desmineralizada (com um fator de diluição de 10).

Para ser possível iniciar a medição, foi necessário abrir uma garrafa de ar reconstituído, localizada no exterior do edifício, assim como a válvula do mesmo nas traseiras do equipamento. De seguida foram feitas as ativações do gerador de ozono, na unidade TN e no forno, que atinge 719 °C, sendo então necessário aguarda, cerca de 30 minutos, para a estabilização do equipamento antes de proceder à submissão e análise das amostras.

Foi selecionado o modo contínuo, de forma a possibilitar as análises em simultâneo da TOC, IC, TC e TN na mesma amostra inserida no equipamento, seguindo-se da inserção do tubo de aspiração nessa amostra.

Quando a leitura é finalizada, o equipamento emite um sinal sonoro, procedendo-se ao término do processo (fecho das válvulas no exterior e nas traseiras do equipamento).

## **3.2 Ensaios de Crescimento de *Chlorella vulgaris* em Águas Residuais**

As microalgas foram inicialmente cultivadas como descrito na secção 3.1.2. Na Figura 14, é possível observar a concentração de microalgas do meio, calculada recorrendo à equação (1). No gráfico encontra-se representado o aquário 1 como AQ1 e o aquário 2 como AQ2.

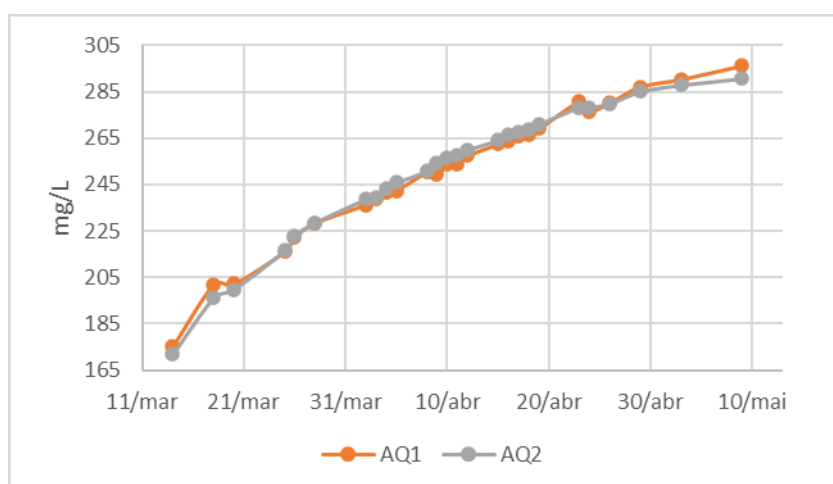


Figura 14 - Crescimento das culturas de microalgas dos dois aquários de inoculação.

Foram realizados três ensaios para testar o efeito das três águas residuais recolhidas e filtradas no crescimento de culturas de *Chlorella vulgaris*.

No início de todos os ensaios foi realizada uma análise dos valores obtidos pela determinação de CQO de forma a decidir qual seria o intervalo ideal de proporções de água residual : meio BBM na cultura para avaliar o crescimento das algas (Apêndice A).

### 3.2.1 Ensaio 1 – Cultivo com Água Residual à Entrada do Tanque de Arejamento

Para determinar o efeito da utilização de água residual 1 (entrada do tanque de arejamento) no crescimento das microalgas, foram inoculadas 6 culturas com diferentes proporções de água residual:BBM como meio de cultivo, em duplicado, num total de 12 culturas por ensaio. Foram realizados dois cultivos adicionais de controlo de crescimento sem água residual no meio (controlo). As culturas foram inoculadas (20 mL de inóculo de *Chlorella vulgaris* em meio BBM), numa câmara de fluxo laminar, para um volume total de 200 ml de cultura, utilizando um matraz de 250 ml de capacidade. Na Tabela 5 estão detalhadas as condições de cultura usadas para cada amostra.

Tabela 5 - Composição do meio no ensaio 1 (1.A e 1.B).

Percentagem de água residual (%)	Volume de BBM (ml)	Volume de água residual (ml)	Volume de cultura de microalgas (ml)
0 – Controlo	180	0	20
3	174	6	20
5	170	10	20
7	166	14	20
9	162	18	20
10	160	20	20
15	150	30	20

Este ensaio foi dividido em duas fases, 1.A e 1.B, já que ao 21º dia foi adicionado meio fresco a todos os matrizes, de forma a analisar o efeito do mesmo na fase de decréscimo de crescimento microalgal. Assim, o ensaio 1.A decorreu entre 3 e 22 de abril de 2024, e o ensaio 1.B entre 22 de abril e 6 de maio de 2024.

Após a preparação e homogeneização das culturas nos matrizes na câmara de fluxo laminar vertical e recolha de amostras de 1,5 mL de amostras para leitura da DO, estes foram posicionados de modo que cada matriz recebesse a intensidade de 3000 lux, como é observável na Figura 15.

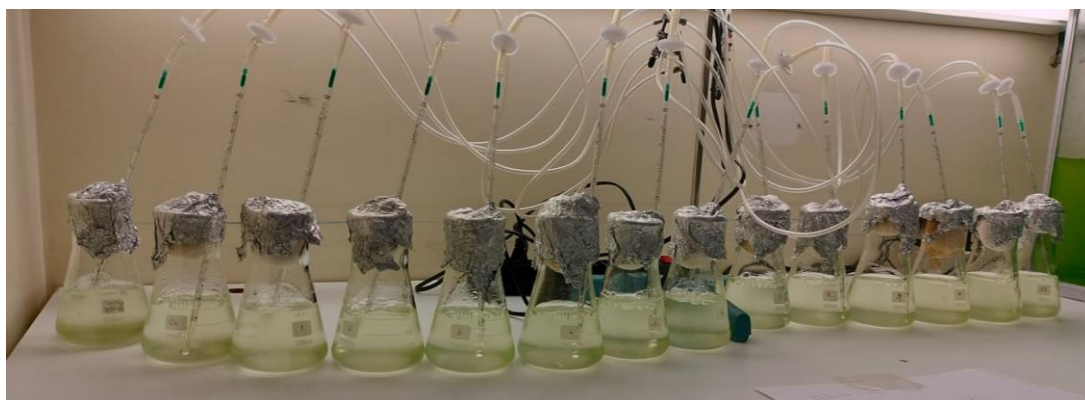


Figura 15 - Matrizes do ensaio 1 no primeiro dia.

Este ensaio (1.A e 1.B) teve uma duração total de 34 dias, com temperaturas exteriores entre os 20 e os 11 °C, valores retirados de *Porto, Portugal Weather Conditions | Weather Underground (2024)*. Devido à utilização recorrente das instalações, a temperatura interior apresenta uma amplitude térmica baixa, podendo-se estimar que a temperatura se encontrou muito próxima dos 20 °C.

No decorrer do ensaio, foram efetuadas recolhas de 1,5 mL de amostras alternadamente de cada um dos dois matrizes de cada condição, para leitura de DO, em câmara de fluxo laminar vertical em condições antisséticas. Quando as amostras atingiram valores de DO próximos de 1 procedeu-se à diluição das amostras com FD 5 e efetuou-se leitura de DO das amostras diluídas (Figura 16). Os valores de DO medidos e da concentração das microalgas no meio, calculados de acordo com a equação (1), encontram-se tabelados no Apêndice B.1 (ensaio 1.A) e Apêndice B.2 (ensaio 1.B).

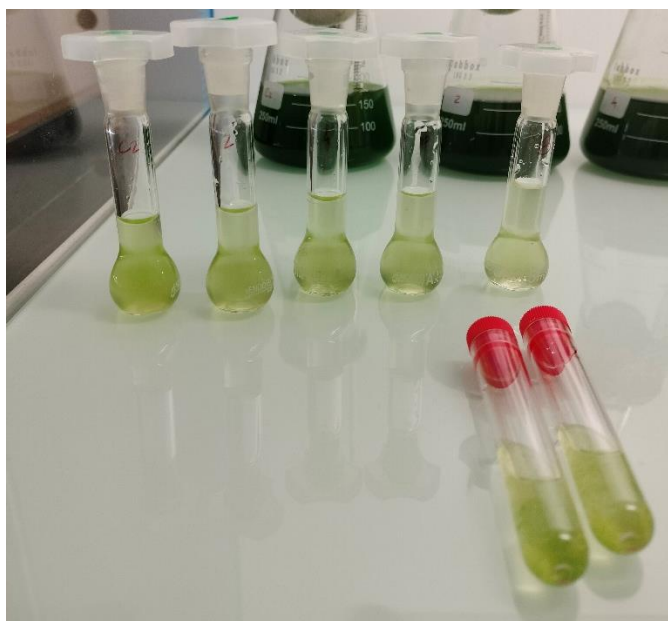


Figura 16 - Recolha de amostras para leitura de DO, com fatores de diluição de 1 (sem diluição) e 5.

### 3.2.2 Ensaio 2 – Cultivo com Água Residual no Interior do Tanque de Arejamento

Para determinar o efeito da utilização de água residual 2 (dentro do tanque de arejamento) no crescimento das microalgas, foram inoculadas 6 culturas preparadas com diferentes proporções de água residual:BBM como meio de cultivo, em duplicado, num total de 12 culturas por ensaio. Duas culturas adicionais de controlo de crescimento foram incluídas sem água residual no meio (controlo). As culturas foram inoculadas (20 mL de inóculo de *Chlorella vulgaris* em meio BBM), numa câmara de fluxo laminar, para um volume total de 200 ml de cultura, utilizando um matraz por cultura de 250 ml de capacidade. Na Tabela 6 estão detalhadas as condições de cultura usadas para cada amostra e na Figura 17 é possível observar os matrizes no ensaio 2.

Tabela 6 - Composição do meio do ensaio 2.A.

Percentagem de água residual (%)	Volume de BBM (ml)	Volume de água residual (ml)	Volume de cultura de microalgas (ml)
Controlo - 0	180	0	20
65	50	130	20
70	40	140	20
75	30	150	20
80	20	160	20
85	10	170	20
90	0	180	20



Figura 17 - Matrazes do ensaio 2 (2.A) no primeiro dia de cultivo.

No decorrer do ensaio, foram efetuadas recolhas de 1,5 mL de amostras alternadamente de cada um dos dois matrazes de cada condição, para leitura de DO, em câmara de fluxo laminar vertical em condições antisséticas. Quando as amostras atingiram valores de DO próximos de 1 procedeu-se à diluição das amostras com FD 5 e efetuou-se leitura da DO da amostra diluídas. Os valores de DO medidos (e normalizados) e da concentração das microalgas no meio, calculada recorrendo à equação (1), encontram-se tabelados no Apêndice B.3.

A monitorização dos valores de DO e das condições de cor e de translucidez das culturas levou ao término deste ensaio devido a problemas de crescimento (Figura 18), possivelmente dada a elevada quantidade de água residual. Assim, este ensaio estendeu-se por 12 dias, com início a 9 de maio e fim a 20 de maio de 2024, atingindo temperaturas entre os 18 °C e 12 °C com uma média aproximada de 15 °C, sendo os valores retirados de *Porto, Portugal Weather Conditions / Weather Underground* (2024). Devido à utilização recorrente das instalações, a temperatura interior apresenta uma amplitude térmica baixa, podendo-se estimar que a temperatura se encontrou muito próxima dos 18 °C.

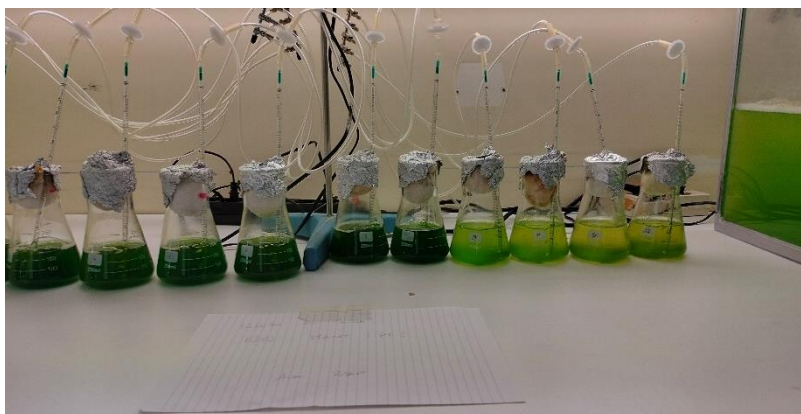


Figura 18 – Observação de problemas de crescimento em alguns matrazes (*stress*), comparativamente.

Tendo em conta os problemas observados, o ensaio foi repetido (ensaio 2.B), com adaptações na quantidade de água residual (Tabela 7), e com o intuito de provar que é possível o crescimento em águas residuais não tratadas.

Tabela 7 - Matrazes do ensaio 2.B.

Percentagem de água residual (%)	Volume de BBM (ml)	Volume de água residual (ml)	Volume de cultura de microalgas (ml)
0 – Controlo	180	0	20
20	140	40	20
30	120	60	20
35	110	70	20
40	100	80	20
45	90	90	20
50	80	100	20

No decorrer do ensaio, foram efetuadas recolhas de 1,5 mL de amostras alternadamente de cada um dos dois matrazes de cada condição, para leitura de DO, em câmara de fluxo laminar vertical em condições antissépticas. Quando as amostras atingiram valores de DO próximos de 1 procedeu-se à diluição das amostras com FD 5 e efetuou-se leitura da DO da amostra diluídas. Os valores de DO medidos (e normalizados) e da concentração das microalgas no meio, calculada recorrendo à equação (1), encontram-se tabelados no Apêndice B.4.



Figura 19 - Culturas (controlo, 20%, 30% e 40%) no primeiro dia do ensaio 2.B.

O ensaio 2.B teve a duração de 8 dias, iniciando-se no dia 29 de maio e terminando no dia 6 de julho, com temperatura exteriores entre os 25 °C e 15 °C, e temperatura média de 20 °C (retirado de *Porto, Portugal Weather Conditions | Weather Underground, 2024*). Devido à utilização recorrente das instalações, a temperatura interior apresenta uma amplitude térmica baixa, podendo-se estimar que a temperatura se encontrou muito próxima dos 20 °C.

### 3.2.3 Ensaio 3 – Cultivo com Água do Interior do Tanque de Arejamento

No ensaio 3 (Figura 20), as culturas foram inoculadas em matrazes de 1 L, (em triplicado) das culturas contendo água residual, realizando-se uma cultura adicional, sem adição de qualquer

tipo de água residual , o controlo. Este ensaio foi realizando recorrendo a uma mistura de BBM e uma amostra fresca de água residual do interior do tanque de arejamento da ETAR de Gaia Litoral, segundo as condições observadas na Tabela 8.

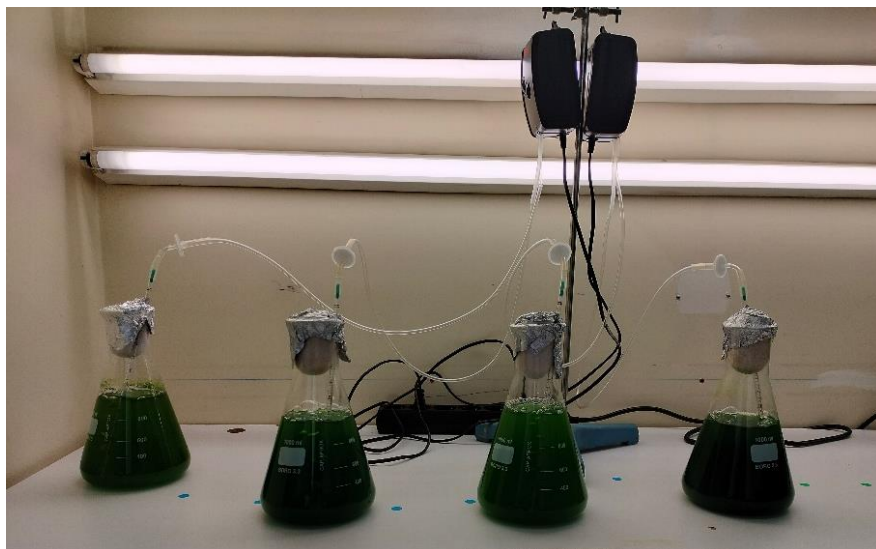


Figura 20 - Matrazes do ensaio 3.

Tabela 8 - Composição do meio do ensaio 3.

Percentagem de água residual (%)	Volume de BBM (ml)	Volume de água residual (ml)	Volume de cultura de microalgas (ml)
Controlo - 0	800	0	200
50	300	500	200

Tal como nos ensaios anteriores, foram efetuadas recolhas de 1,5 mL de amostras alternadamente de cada um dos dois matrazes de cada condição, para leitura de DO, em câmara de fluxo laminar vertical em condições antisséticas. Quando as amostras atingiram valores de DO próximos de 1 procedeu-se à diluição das amostras com FD 5 e efetuou-se leitura da DO da amostra diluídas. Os valores de DO medidos (e normalizados) e da concentração das microalgas no meio, calculada recorrendo à equação (1), encontram-se tabelados no Apêndice B.5.

Este ensaio teve uma duração de 43 dias, com temperatura exteriores entre 23 °C e 15 °C, e temperatura média de 19 °C (retirado de *Porto, Portugal Weather Conditions | Weather Underground, 2024*). Devido à utilização recorrente das instalações, a temperatura interior apresenta uma amplitude térmica baixa, podendo-se estimar que a temperatura se encontrou muito próxima dos 20 °C.

### 3.3 Extração de Lípidos e Quantificação por Gravimetria

Antes de proceder à extração dos lípidos, a biomassa dos 3 ensaios foi recolhida por centrifugação no equipamento Sorvall Superspeed SS-3 Automatic, a 6000 rpm por 20 minutos. Foi congelada e posteriormente liofilizada nas instalações do LEPABE (na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto) recorrendo ao equipamento VirTis BenchTop 6K Freeze Dryer – Model # 6KBTEL – 85 e armazenadas em exsiccador.

Os protocolos de extração de lípidos basearam-se em dois métodos, Bligh e Dyer (1959) e Matyash *et al.* (2008). Foram desenvolvidas e testadas diferentes adaptações destes métodos, incluindo alteração dos co-solventes a usar (tentativa de utilização de MTBE e a implementação de ultrassons para acelerar o processo, entre outros).

#### 3.3.1 Método de Extração de Bligh e Dyer (B&D adaptado)

O método de Bligh e Dyer (1959) é um método muito utilizado para quantificar o teor de lípidos em microalgas. Como estas apresentam diferentes características morfológicas dependendo do género e espécie, é frequente utilizar procedimentos adaptados. Assim, o primeiro método seguido para extração de lípidos tratou-se de um método B&D adaptado, cedido pela Mestre Bruna Bacaro Borrego. Foram utilizados 5 mg de biomassa seca e adicionados num tubo a esferas de vidro, 2 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol. Seguiu-se agitação em vórtex, por cerca de 10 minutos, e adição de 1 mL de água, com agitação manual. A mistura foi deixada em repouso até haver uma clara separação de fases, transferindo-se a fase do clorofórmio foi transferida para um novo tubo. O restante foi lavado com 2 mL de NaCl, agitado e deixado em repouso até haver uma separação visível em fases. Uma segunda fase de clorofórmio foi então extraída para novo tubo de ensaio. Os tubos de ensaio contendo as fases de clorofórmio e nelas a fração de lípidos foram incubados numa hotte para evaporação do clorofórmio.

Após a evaporação, a amostra foi pesada e o teor de lípidos da biomassa foi calculado utilizando a equação (3):

$$\text{Lípidos da biomassa} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Quantidade de biomassa seca}} * 100 \quad (3)$$

Em que *Peso final* corresponde à massa do tubo com os lípidos extraídos e *Peso Inicial* é a massa do tubo vazio.

#### 3.3.2 Método de Extração de Matyash adaptado

Na extração baseada no protocolo de Matyash *et al.* (2008) foram elaborados processos experimentais para testar diferentes adaptações do método, com recurso a diferentes solventes e métodos mecânicos para quebra de parede celular.

- Processo 1

Nesta experiência, a 50 mg de biomassa liofilizada foram adicionados 5 mL de MTBE e 1,5 mL de metanol. A mistura foi agitada no vórtex, lavada com 2,5 mL de água e novamente agitada no vórtex. A separação de fases foi então feita com recurso a centrifugação a uma velocidade de 1000g. A fase superior foi extraída para um tubo de ensaio. Seguiu-se nova lavagem seguida de nova extração da fase superior para um novo tubo de ensaio. Os tubos de ensaio foram incubados numa hotte para secagem dos lípidos de um dia para o outro.

Num destes tubos (em duplicado) foi adicionada uma colher de pó de vidro, como feito no método B&D, com a intenção de perceber se facilitava a quebra das paredes celulares e melhorava a eficiência da extração. As amostras foram excluídas do ensaio já que não foi possível obter duas fases distintas.

- Processo 2

Este processo consiste na utilização de 50 mg de biomassa liofilizada, com adição de 1,5 mL de metanol e 5 mL de MTBE, colocado em ultrassons por 30 minutos seguida de agitação em shaker por 1 hora à temperatura ambiente. De seguida adicionaram-se 1,25 mL de água, colocou-se novamente a amostra em ultrassons por 10 minutos e centrifugou-se a 1000g por 10 minutos. Foi recolhida a parte orgânica (fase superior) para outro tubo e feita nova extração, adicionando 1 mL de solventes em proporção MTBE/metanol/água de 10/3/2 (v/v), com agitação em *shaker* por 10 minutos e centrifugação nas condições referidas anteriormente, havendo nova recolha da parte superior para um novo tubo. Os tubos de ensaio foram deixados em hotte de um dia para o outro para evaporação do metanol.

A secagem, ou evaporação do metanol, foi realizada em cadinhos para aumentar a rapidez desta secagem. Após esta etapa, as amostras dos dois processos foram pesadas e a fração de lípidos da biomassa foi calculada utilizando a equação (3).

### 3.4 Produção de Biodiesel

A produção de biodiesel, por transesterificação, foi realizada com recurso a biomassa liofilizada, seca e húmida. Foram seguidos três protocolos diferentes, nomeadamente os descritos por Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015), Torres *et al.* (2017) e Mathimani *et al.* (2024), com adaptações.

#### 3.4.1 Método 1 – Transesterificação Direta pelo Método de Torres *et al.* (2017)

Este método retirado de Torres *et al.* (2017) foi dividido em 2 processos diferentes, com algumas adaptações. Em cada processo, foram preparados 6 tubos com as mesmas condições. Por questões de segurança, todos os procedimentos, exceto a pesagem da biomassa, foram elaborados em hotte, com uso de óculos de proteção, luvas e vidro da hotte parcialmente aberto.

- Processo 1

Na etapa I, a 300 mg de biomassa liofilizada ou seca (pelo menos por 24h, a 60 °C) foram adicionados 2,73 mL de metanol e 1,365 mL de ácido sulfúrico a 98% lentamente, seguindo-se agitação no vórtex por 1 minuto. Seguiu-se a etapa II, em que as amostras foram colocadas no digestor a 100 °C por 2 horas, com agitação manual dos tubos a cada 15 minutos. De seguida, os tubos foram colocados a arrefecer à temperatura ambiente até aos 30 °C, aproximadamente. Na etapa seguinte (III), foram adicionados 2,73 mL de hexano e 1,2 mL de água a cada tubo, sendo depois agitados em shaker a 100 rpm por 30 min (ou no vórtex por 5 minutos). Foi feita uma separação por fases por centrifugação a 1000 g por 10 minutos (etapa IV). De seguida (etapa V), a fase contendo biodiesel e hexano (fase superior) foi recolhida e colocada em tubo previamente pesado. Foram adicionados 1,2 mL de água à fase de hexano e repetiu-se a agitação em shaker (ou vórtex), nas mesmas condições previamente utilizadas. Foi repetida a separação por centrifugação (etapa VI), também às condições anteriores. Na etapa VII foi retirada a fase contendo biodiesel e hexano (fase superior) para outro tubo (previamente pesado) tendo este último sido deixado em hotte até ao dia seguinte, para evaporação do hexano.

- Processo 2

Este processo é uma adaptação do processo 1, com alteração apenas na primeira etapa (etapa I), em que após a pesagem da biomassa e adição do metanol e ácido sulfúrico, os tubos foram colocados nos ultrassons por 10 minutos e posteriormente agitados no vórtex durante 1 minuto. As restantes etapas foram realizadas segundo o descrito no processo 1.

### **3.4.2 Método 2 - Transesterificação Direta pelo Método de Marthimani *et al.* (2024)**

Neste método, 6 tubos foram preparados para cada condição, colocando em cada tubo 1 g de biomassa liofilizada ou seca e adicionando 3 mL de metanol e 0,3 mL de ácido sulfúrico a 98% lentamente. Os tubos foram então colocados num shaker a 70 °C por 4 horas. De seguida, 3 mL de hexano e 1 mL de água foram acrescentados a cada tubo e, após separação, a fase superior foi retirada para um novo tubo, previamente pesado e seco. Este tubo foi deixado em hotte até ao dia seguinte para evaporação do hexano.

### **3.4.3 Método 3 - Transesterificação Direta pelo Método de Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015)**

Neste método foi preparada uma solução de 0,02 g de hidróxido de potássio (KOH) 2% a 17,2 mL de metanol. De seguida, foram colocados 300 mg de biomassa liofilizada (ou seca), 5,16 mL da solução anterior e 5,16 mL de hexano num tubo (utilizados 6 tubos para cada condição) que foi colocado em banho-maria a 60 °C por 4 horas. Após este tempo, os tubos foram deixados a arrefecer e centrifugados a 1000 g por 10 minutos, de forma a separar a fase de glicerol e biodiesel do restante. A fase contendo biodiesel foi recolhida e 1,2 mL de água foi adicionado,

para lavagem. A água foi posteriormente rejeitada e o processo repetido até a água apresentar-se limpa. Os tubos foram posteriormente deixados em hotte para evaporação do hexano e pesados quando o hexano tinha evaporado completamente.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Análises Complementares

#### 4.1.1 CQO

As análises de CQO foram feitas em 3 datas distintas, 18/03/2024, 17/05/2024 e 23/05/2024. Os valores encontram-se, na sua totalidade no Apêndice A, sendo possível observar na Tabela 9 os valores com maior importância para este trabalho.

Tabela 9 - Valores de CQO obtidos em três determinações feitas para as diferentes águas residuais.

Data	Fator de diluição	Água Residual	CQO [mgO <sub>2</sub> /L]	Desvio Padrão [mgO <sub>2</sub> /L]	
18/03/2024	4	1	506	356	
		2	554	13	
		3	Sem valores	Sem valores	
	6	1	1212	406	
		2	576	92,72	
		3	Valor < 20	Sem valor	
27/05/2024	2	1	250	15,917	
		2	419	125	
	5	1	550	226	
		2	465	83	
	10	1	715	83	
		2	595	172	
		3	38	4	
	23/05/2024	1	1	205	10
			2	300	12
3			69	11	

No primeiro ensaio, de 18/03/2024, as amostras correspondentes à água residual do decantador secundário (água 3), com FD 4 foram descartadas devido a uma anomalia no digestor que impossibilitou a sua leitura em colorímetro. Com o FD 6, as leituras deste tipo de água foram inferiores ao valor mínimo lido pelo colorímetro, tendo assim de ser descartadas. Como descrito na secção 2.5.1, o CQO indica a qualidade da água residual e, como a água 3 provém de uma etapa final de tratamento, estima-se que os seus valores sejam mais reduzidos. A água 1, apesar de só ter sofrido separação física, apresenta valores de CQO mais baixos do que a água dentro do tanque de arejamento, onde já existe tratamento biológico, possivelmente devido a diferentes fatores: sobrecarga do sistema ou baixa quantidade de oxigénio disponível, o que pode afetar a degradação aeróbia pelos microrganismos. Com o aumento da diluição, é observado um aumento do valor de CQO, contrariando o expectável. Este problema de medição pode dever-se à presença de oxidante residual no final do processo, ou à presença de substâncias que podem interferir com as soluções utilizadas na análise (nitratos, amoníaco, entre outros). Podem também existir problemas de medição do colorímetro ou dos tubos usados, uma vez que os valores do desvio padrão são elevados, indicando medições muito diferentes nos dois tubos utilizados para cada condição e/ou entre as 5 medições recolhidas de cada tubo.

No segundo ensaio, assim como é observado no anterior, os valores obtidos variam muito consoante a diluição utilizada, sendo o contrário do que seria esperado. A justificação para estes resultados pode ser a mesma, apesar de terem sido obtidos valores de desvio padrão mais reduzidos. Os valores obtidos são também superiores aos obtidos anteriormente, o que pode estar relacionado com o tempo de intervalo entre as duas medições já que, mesmo com o cuidado armazenamento das águas residuais, podem ter ocorrido reações biológicas nas águas 1 e 2. Por este motivo, a amostra usada da água residual 2 teve de ser desprezada.

No terceiro ensaio, foi utilizada uma amostra mais recente da água residual 2, da mesma empresa. A zona da qual a água foi retirada é a mesma do ensaio anterior. Com esta nova amostra, foram obtidos valores mais fiáveis, ou seja, com menores desvios e mais próximos do expectável.

Os valores que se encontram legislados correspondem à água que irá ser devolvida ao meio ambiente, sendo essa a água do decantador secundário. Segundo a diretiva Europeia (*DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL concerning urban wastewater treatment (recast)*, 2022), o valor de CQO de uma amostra não-filtrada tem de ser abaixo dos 125 mgO<sub>2</sub>/L. Para este estudo, as amostras foram filtradas, o que resulta num valor mais reduzido de CQO, mas que se trata de um valor de acordo com o esperado.

Os valores mais comuns de CQO de água residual não tratada proveniente de esgotos domésticos, segundo *Understanding Laboratory Wastewater Tests: I. Organics (BOD, COD, TOC, O&G)* (2022), encontram-se entres os 250 e 800 mgO<sub>2</sub>/L, o que pode indicar que todas as amostras analisadas neste trabalho correspondentes a água não tratada (água 1) estão dentro dos valores típicos de CQO, exceto a amostra do primeiro dia com FD de 6. No entanto, com FD 4, o valor de CQO já se encontra dentro dos limites reportados. Esta diferença pode estar associada ao erro de diluição mencionados anteriormente.

#### 4.1.2 TOC, IC, TC e TN

Na Tabela 10 é possível observar-se os valores de TOC, IC, TC e TN obtidos, fornecidos pela mestre Bruna Bacaro Borrego. Apenas os valores de IC, TC e TN são fornecidos pelo equipamento e, assim, os valores de TOC podem ser obtidos pelo cálculo da diferença entre as médias de TC e IC.

Tabela 10 - Valores obtidos na medição TOC, IC, TC e NT.

Água residual	Parâmetro analisados	Medições (mg/L)			Média (mg/L)	Desvio Padrão (mg/L)
Água 1	TOC	---			28,59	0,55
	IC	77,06	76,96		77,01	0,05
	TC	106,1	105,1		105,6	0,50
	TN	62,29	60,51		61,40	0,89
Água 2	TOC	---			29,21	1,68
	IC	76	76,04		76,02	0,02
	TC	107	103,7	105	105,23	1,66
	TN	61,37	60,35		60,86	0,51
Água 3	TOC	---			8,27	2,43
	IC	62,15	62,06		62,01	0,05
	TC	73,12	68,89	69,11	70,37	2,38
	TN	43,72	42,71		43,22	0,51

Os valores das águas 1 e 2 são, como esperado, muito semelhantes já que estas águas provêm de zonas da ETAR consecutivas, onde ainda não existiu um tratamento químico, apenas físico e biológico. Segundo Understanding Laboratory Wastewater Tests: I. Organics (BOD, COD, TOC, O&G) (2022), os valores de TOC para águas residuais não tratadas encontram-se entre os 80 mg/L (concentração baixa) e 260 mg/L (concentração elevada). Tanto a água 1 como a 2 têm valores muito abaixo da concentração mínima, que pode ser explicado pela separação física no processo anterior à recolha da água na ETAR e filtração efetuada no laboratório antes da análise.

Os valores obtidos da água 3 são consideravelmente mais reduzidos, como seria de esperar, já que neste ponto, a água já passou por todas as fases diferentes de tratamento, tendo havido uma eficaz remoção dos nutrientes para ser descarregada em massas de água naturais.

Estes valores podem ser interessantes para uma posterior análise de crescimento das microalgas e para perceber qual a influência da presença dos compostos medidos no crescimento/inibição das culturas.

## 4.2 Avaliação do Crescimento Microalgal

A avaliação do crescimento microalgal foi efetuada segundo a análise da densidade ótica medida como descrito em 3.2.

Um dos focos deste trabalho é unir o crescimento microalgal ao tratamento das águas residuais, tentando reduzir a necessidade da execução de algumas das fases de tratamento da água por

processos químicos. Assim sendo, tendo em conta que a água residual 3 (decantador secundário) provém de uma fase final do tratamento, esta não foi utilizada em nenhum dos ensaios de crescimento realizados. Apesar disso, a sua utilização pode ser interessante para reduzir ou evitar a utilização de água passível de ser consumida.

#### 4.2.1 Ensaio 1 – Cultivo com Água Residual à Entrada do Tanque de Arejamento

O ensaio 1 foi efetuado de acordo com o descrito na secção 3.2.1, com meio contendo diferentes proporções de água residual:BBM (água residual 1). A recolha do material para posterior leitura no espectrofotómetro foi efetuada na câmara de fluxo laminar, com a devida desinfecção da mesma. As medições de DO foram feitas diariamente, sempre que possível, e intercalando entre os matrizes duplicados.

Na Figura 21 é possível observar o gráfico do crescimento microalgal, calculado através da equação (1) e de acordo com as medições da DO ao longo do ensaio. Os valores de DO e crescimento microalgal das diferentes culturas encontram-se tabelados no Apêndice B.1.

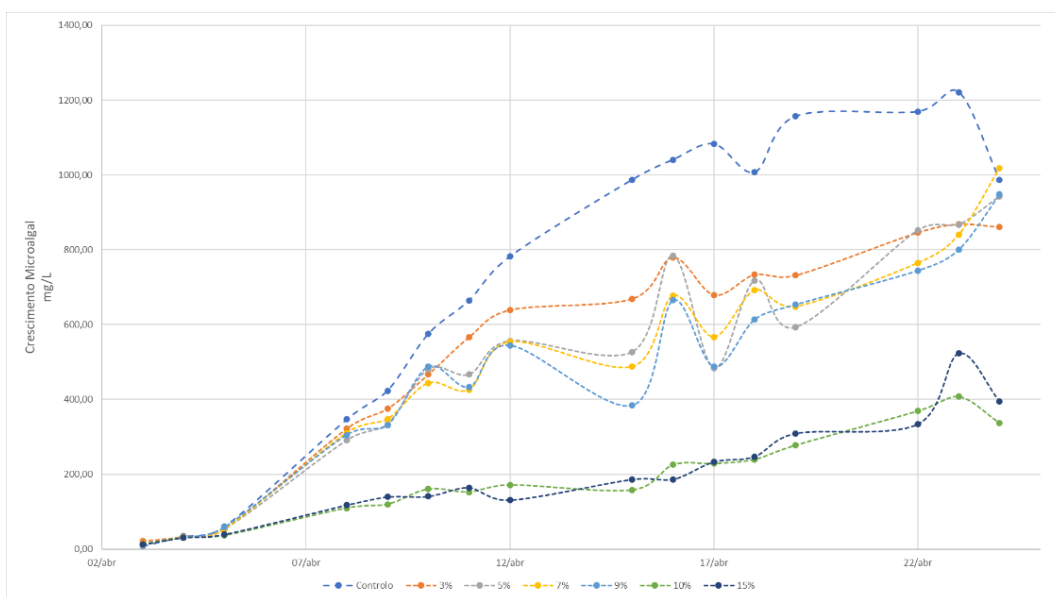


Figura 21 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo do ensaio 1.A.

No ensaio 1.A, o gráfico apresenta 3 fases diferentes de crescimento celular, mais significativas nas primeiras 4 amostras, juntamente com o controlo. A distinção entre fases pode apresentar algumas dificuldades, dependendo das culturas. Todos os matrizes mantiveram-se na fase *lag*, a fase de crescimento pouco significativo, durante os primeiros três dias (3 a 5 de abril). Este crescimento mais lento pode ser explicado pela necessidade de adaptação das células a um meio com características muito diferentes de onde estavam inseridas anteriormente.

A fase seguinte, fase *log*, ou crescimento exponencial, ocorre entre o quarto e o vigésimo primeiro dia (6 a 23 de abril, respetivamente) para as culturas com menor quantidade de água residual (3%, 5%, 7% e 9%), com um crescimento bastante substancial. O crescimento das restantes culturas não se revela tão substancial, o que poderá estar relacionado a uma maior

dificuldade por parte das microalgas na adaptação ao meio e ao comprometimento da absorção de nutrientes devido à maior proporção de águas residuais no meio. Pode assumir-se que existe fase *log* muito pouco pronunciada só entre o décimo nono e vigésimo dia (22 e 23 de abril) para estas culturas. Na fase *log*, a absorção de nutrientes é elevada, o que justifica um crescimento acentuado das culturas com menor quantidade de água residual, que deverão encontrar maior quantidade de nutrientes no meio. Consequentemente, há uma maior libertação de resíduos pelas algas do que nas restantes fases. Dado tratar-se de um sistema de crescimento descontínuo, não há adição de nutrientes no meio, o que pode explicar a queda no crescimento ao 21º dia no controlo e nas culturas de 10% e 15% de água (possível início da fase de morte).

No entanto, entre o décimo dia e o décimo sétimo dia, existem aumentos e decréscimos de leitura de DO nas culturas com menor quantidade de água residual (3%, 5%, 7% e 9%) que podem estar associados a erros de medição ou de crescimento das culturas, já que estas leituras são feitas com amostras dos 2 matrizes diferentes de cada condição. Estes problemas podem surgir quando há uma compactação das microalgas, podendo desencadear um ligeiro atraso de crescimento, diminuindo a intensidade luminosa que chega às algas que se encontrem mais no interior desta aglutinação de organismos.

Com o decréscimo acentuado observado na final do ensaio nas duas culturas com maior quantidade de água residual, foram adicionados 25 mL de meio fresco aos matrizes, de forma a perceber se haveria uma recuperação e crescimento das microalgas. Esta nova fase do ensaio (1.B) encontra-se representada na Figura 22, e os valores da DO estão detalhados no Apêndice B.2.

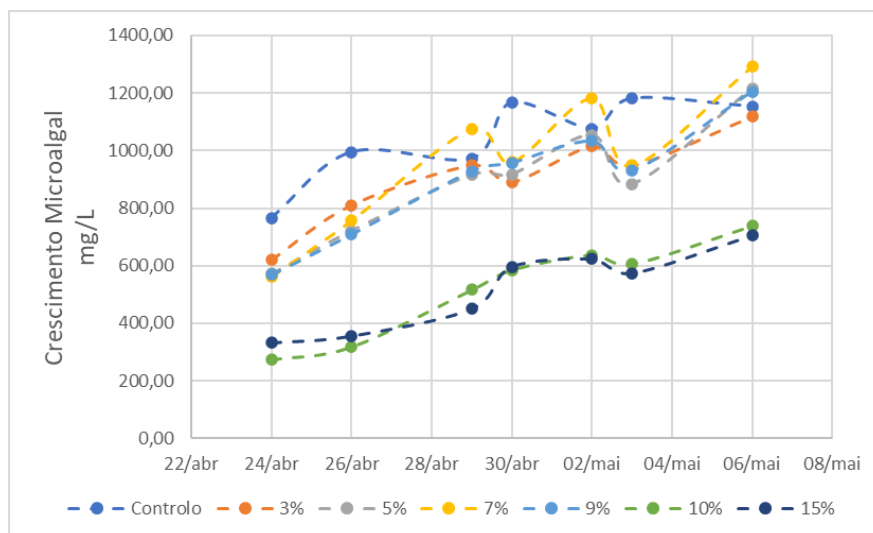


Figura 22 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo da segunda fase do ensaio 1 (1.B).

Ao adicionar meio nas culturas, existiu crescimento microalgal, especialmente no caso das culturas com 10% e 15% de água residual no meio. Contudo, de uma forma geral, o crescimento foi mais lento e pouco significativo. Para evitar um decréscimo acentuado de material e dado o objetivo ser a produção de biodiesel, onde é necessária a maior quantidade de biomassa possível, finalizou-se o ensaio ao dia 6 de maio de 2024.

O crescimento reduzido do material pode ser justificado por diversos fatores: a duração do ensaio, que se prolongou o dobro do tempo ideal (14 dias); a absorção rápida dos nutrientes disponíveis; perda de exposição à luz devido a aglomerações das microalgas, principalmente desencadeadas por situação de *stress*, e as características da água residual utilizada.

Para a colheita da biomassa, o conteúdo dos matrizes foi centrifugado por 20 minutos, a 6000 rpm na centrífuga, seguindo-se a rejeição da fase superior resultante deste processo (mistura de água com metabolitos e outras substâncias) e lavagem. Após lavagem e nova centrifugação, a biomassa (fase inferior mais densa) foi recolhida e armazenada em frascos para posterior liofilização, nas instalações do LEPABE, com o equipamento anteriormente mencionado.

#### 4.2.2 Ensaio 2 – Água Dentro do Tanque de Arejamento

O ensaio 2, dividido em 2.A (Apêndice B.3) e 2.B (Apêndice B.4), foi desenvolvido de acordo com o procedimento descrito em 3.2.2., com recurso à água residual do interior do tanque de arejamento. A recolha do material para posterior leitura no espectrofotómetro foi efetuada na câmara de fluxo laminar, com a devida desinfeção da mesma. As medições de DO foram feitas diariamente, sempre que possível, e intercalado entre os matrizes duplicados.

Na Figura 23 é possível observar o gráfico da densidade ótica medida ao longo do ensaio, já com os valores corrigidos para os fatores de diluição utilizados (desde o dia 4 de junho).

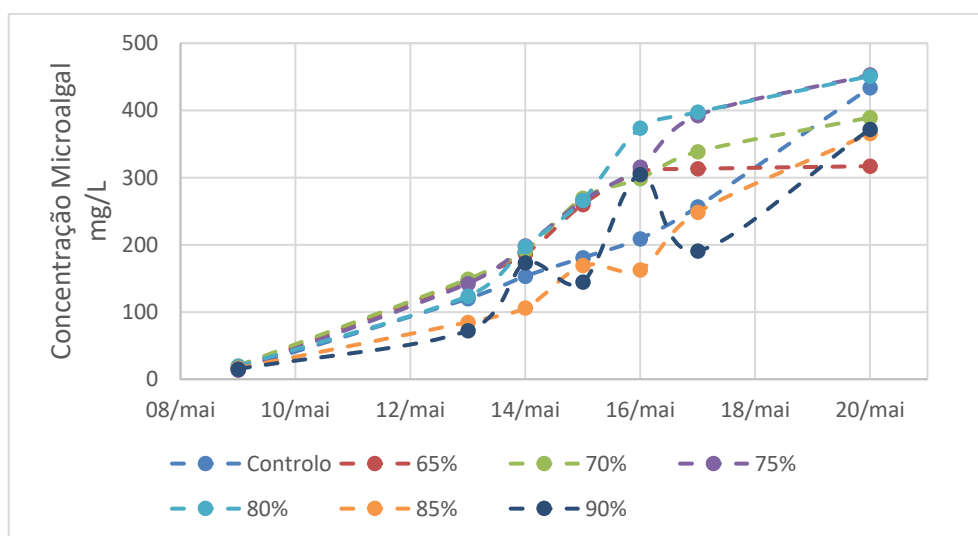


Figura 23 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo da primeira fase do ensaio 2 (2.A).

No primeiro período do ensaio 2 (2.A), é possível observar 3 fases distintas da curva do crescimento típico das microalgas em algumas culturas em estudo. A fase *lag*, *log* e fase de estabilização. A fase de *lag* acontece durante os primeiros quatro dias, entre os dias 9 e 13 de maio. Do dia 13 de maio até ao dia 20 de maio (final do ensaio), existe crescimento do material orgânico de uma forma mais reduzida que a fase *log* no ensaio 1.A, existindo até decréscimo de crescimento nas amostras correspondentes aos 65, 70, 75 e 80% de água residual nas culturas e uma alteração significativa na cor das culturas nos matrizes, observado sem ser necessário

recorrer às leituras de DO. Existem alguns desníveis de crescimento na amostra com 90% de quantidade de água residual que podem estar associados à medição dos diferentes matrizes da mesma cultura, podendo ter existido algum erro na composição de um deles ou uma resposta diferente ao *stress* entre os matrizes, tendo em conta que o matraz medido por último apresentava um cor distinta e aglomeração de material comparado com o seu duplicado, como é observável na Figura 24. Dados estes problemas de coloração e translucidez do material, o crescimento muito reduzido e até o decréscimo de crescimento em alguns dos matrizes, indicador de diminuição da produção de biomassa importante para a produção de biodiesel, esta tentativa foi dado como terminada ao dia 20 de maio.

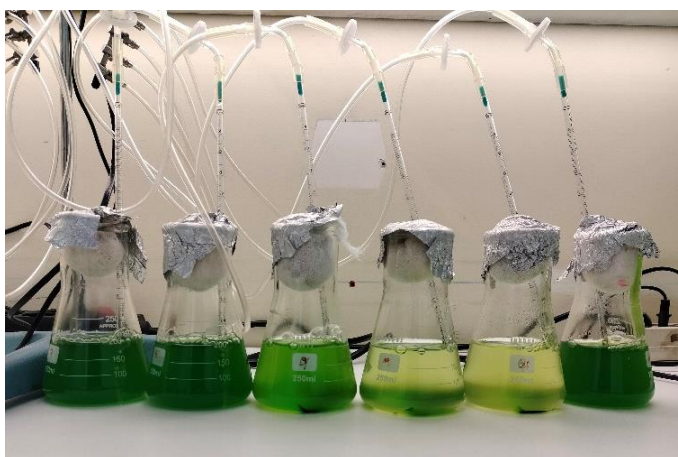


Figura 24 - Matrizes, em duplicado, das culturas de 80 %, 85 % e 90 % (da esquerda para a direita).

Comparando as culturas entre si, o controlo não foi a amostra que apresentou o maior crescimento, mas sim a cultura com 80% de água residual. Isto pode ser explicado dado que, apesar de o controlo só conter um meio teoricamente mais favorável e controlado, a quantidade de azoto e outros nutrientes presentes na água residual podem desencadear uma melhor resposta desta cultura ao crescimento. A cultura com 65% de água apresenta um crescimento diferente do esperado, já que o seu crescimento na fase log sofre um abrandamento comparado com a amostra de cultura com 80% de água residual, e um decréscimo acentuado no final. Assim, devido à sua concentração mais elevada de BBM (comparativamente), o esperado seria que se mantivesse com crescimento até ao final do ensaio.

Analogamente ao ensaio anterior (ensaio 1), era esperado que o crescimento seria mais lento e sem uma fase exponencial evidente, devido aos valores de CQO obtidos para a água residual utilizada, e às quantidades da mesma utilizadas neste cultivo. No entanto, apesar do tempo de adaptação do material orgânico ao meio ter apresentado uma diferença pouco acentuada (apenas um dia a mais do que o ensaio anterior), os valores obtidos de DO (e posteriormente convertidos em crescimento microalgal) na fase de log não corresponderam aos valores esperados, tendo sido até observado um decréscimo de valores de crescimento.

Foi feita a colheita da biomassa por centrifugação, tal como feito anteriormente, tendo sido posteriormente levado para as instalações do LEPABE para liofilização. Como já estimado, a

baixa quantidade de biomassa húmida obtida resultou numa quantidade baixa de biomassa seca, tendo sido impossível a utilização desta para produção de biodiesel.

Como o resultado desta tentativa de ensaio não correspondeu ao pretendido, foi realizada uma nova tentativa com quantidades mais reduzidas da mesma água residual (ensaio 2.B), com o gráfico do seu crescimento representado na Figura 25.

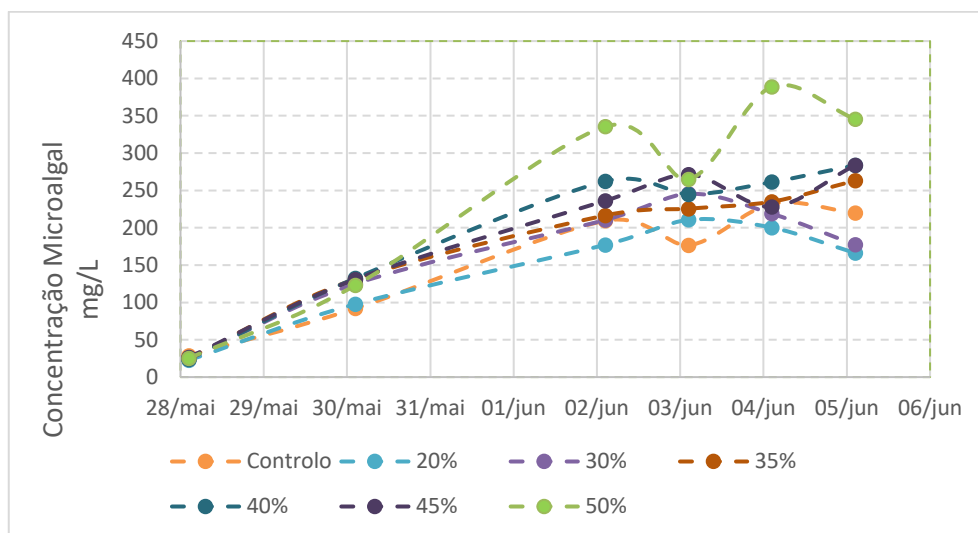


Figura 25 - Representação gráfica do crescimento ao longo da segunda fase do ensaio 2 (2.B).

Neste ensaio, o comportamento do material em estudo foi semelhante ao anterior (2.A), com crescimento *lag* com uma duração semelhante (durou menos um dia), atingindo a fase de *log* entre os dias 31 de maio e 5 de junho, com algumas oscilações pelo meio que podem estar associadas ao erro de diluição ou à leitura feita em matrizes intercalados da mesma cultura. As culturas apresentaram um crescimento mais acentuado nas culturas com maior quantidade de água residual (40, 45 e 50%), o que pode ser explicado pela disponibilidade de nutrientes no meio BBM, com complementaridade dos nutrientes da água residual. Desta mesma forma, pode ser justificado o crescimento mais reduzido das amostras relativas ao controlo e 20%, já que o BBM é o seu único ou maior constituinte. Estes resultados são consistentes com os obtidos no ensaio 2.A, em que várias das culturas com maior proporção de água residual (entre os 65 e 80%) mostram um ligeiro aumento no perfil de crescimento comparando com o controlo.

Apesar deste ensaio não ter apresentado os resultados esperados, já que existe decréscimo de crescimento antes da duração ideal para o cultivo das microalgas (14 dias) descrito na literatura, foi fundamental para compreender que a cultura com 50% de água residual representava a melhor opção para o cultivo em maior escala do ensaio seguinte (ensaio 3). Mesmo assim, e como efetuado nas etapas anteriores, procedeu-se à recolha de biomassa gerada no ensaio 2 por centrifugação (a 6000 rpm por 20 minutos) e posterior liofilização e armazenamento do material.

Comparando o comportamento do controlo nos dois ensaios (2.A e 2.B) é possível perceber que o crescimento em ambos é muito semelhante. No caso do ensaio 2.A, de acordo com a medição estimada, o valor do controlo ao décimo dia é pouco superior (cerca de 40 mg/L) ao valor do

controlo medido ao mesmo dia no ensaio 2.B. Esta pequena variação pode estar relacionada com uma pequena variação de temperatura entre os dois ensaios.

#### 4.2.3 Ensaio 3 – Cultura com Água Do Interior do Tanque de Arejamento

O ensaio 3 foi realizado de acordo com a metodologia descrita em 3.2.3 e os valores de DO obtidos encontram-se tabelados no (Apêndice B.5). De forma a obter a maior quantidade de biomassa possível, este ensaio decorreu até ser notado um decréscimo acentuado das quantidades de microalgas (decréscimo de valor de DO) irreversível, tendo sido acrescentado BBM no final do mesmo, entre os dias 25 e 30 de julho, na tentativa de potenciar uma continuação de crescimento.

Como sucedeu nos ensaios anteriores, a recolha do material para posterior leitura no espectrofotómetro foi efetuada na câmara de fluxo laminar, com a devida desinfeção da mesma. As medições de DO foram feitas diariamente, sempre que possível, e intercalado entre os matrizes duplicados (controlo) e triplicados (50%).

A Figura 26 apresenta a representação gráfica do crescimento microalgal no decorrer do ensaio 3, e os seus valores de DO e crescimento (através dos cálculos usando a equação (1)) encontram-se tabelados no Apêndice B.5.

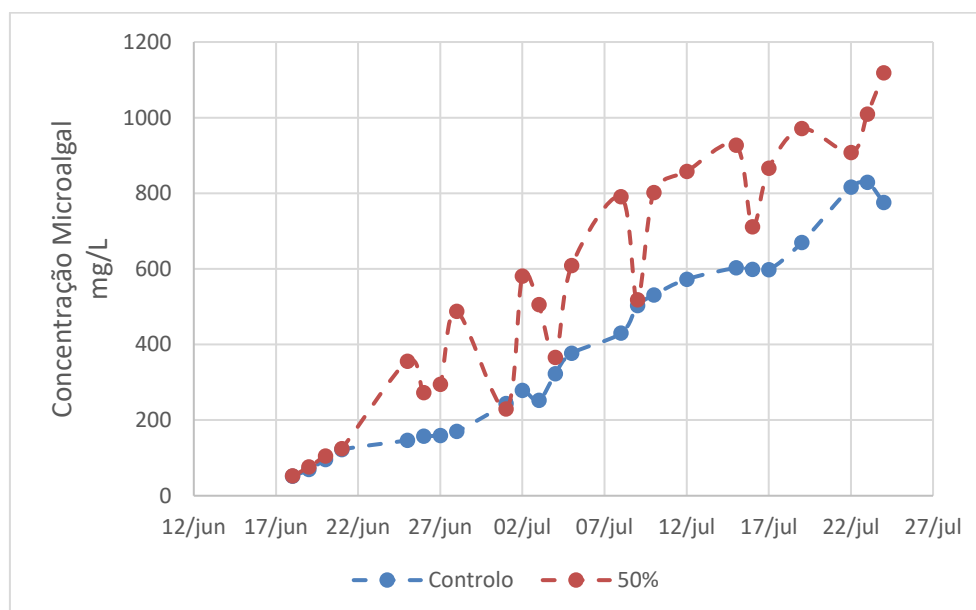


Figura 26 - Gráfico do crescimento microalgal ao longo do ensaio 3.

Este ensaio inicia-se com uma fase de adaptação ao meio, a fase de crescimento *lag*, entre o primeiro dia do ensaio (18 de junho) e o quarto dia (21 de junho). De seguida, dá-se a fase *log*, claramente mais acentuada na amostra com água residual (50%), o que se estima dever-se à disponibilidade mais elevada de nutrientes, aliando os macro e micronutrientes presentes no meio BBM com os nutrientes encontrados na água residual. Pode assumir-se que o *log* se estende do quarto dia de ensaio até ao trigésimo oitavo dia (24 de julho).

A amostra recolhida e medida da cultura com água residual no dia 26 de junho (oitavo dia de cultivo) apresentava diferenças na sua cor e aglomeração das células relativamente aos restantes matrazes com as mesmas condições de cultivo, observável na Figura 27 (cor mais escura no fundo do matraz à esquerda). Este tipo de alteração pode estar associado a um possível problema de arejamento, exposição à luz ou algum problema de disponibilidade de nutrientes.

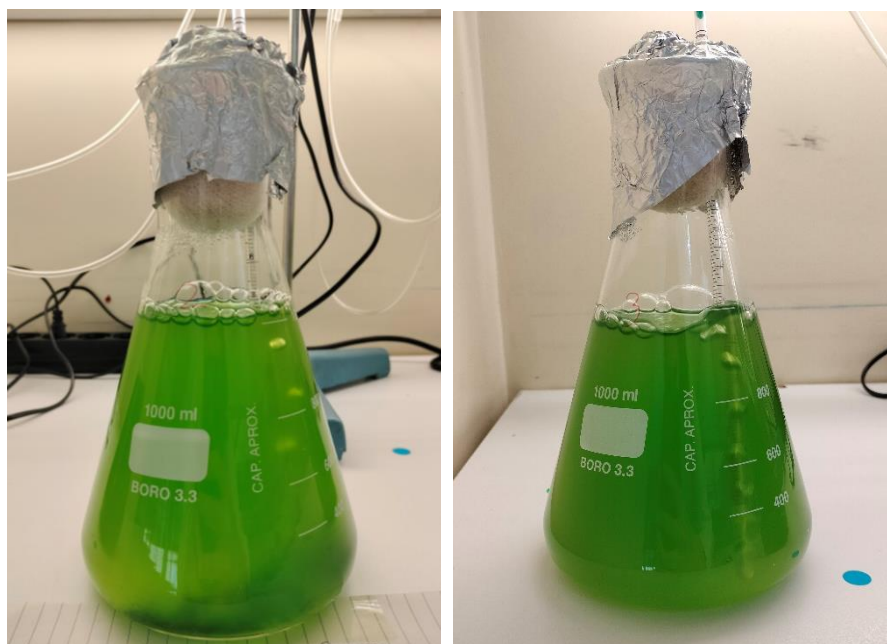


Figura 27 Comparação entre o matraz com problemas (à esquerda) e outro matraz da mesma condição.

No dia 24 de julho (trigésimo oitavo dia) foi observado um decréscimo significativo de crescimento na amostra relativa ao controlo e, antes de se proceder à cessação do ensaio, foi preparado meio BBM fresco para ser adicionado às culturas no dia seguinte. Como é possível observar na Figura 28, este acrescento de meio às culturas não foi relevante, já que o crescimento não foi acentuado. Assim, o ensaio foi dado como terminado no dia 30 de julho.

O material presente nestas culturas foi recolhido por centrifugação a 6000 rpm por 20 minutos. A biomassa recolhida foi armazenada e posteriormente liofilizada nas instalações do LEPABE.

Como esperado, e devido ao volume utilizado nestas culturas, a biomassa recolhida foi consideravelmente superior ao que tinha sido recolhido nos ensaios anteriores.

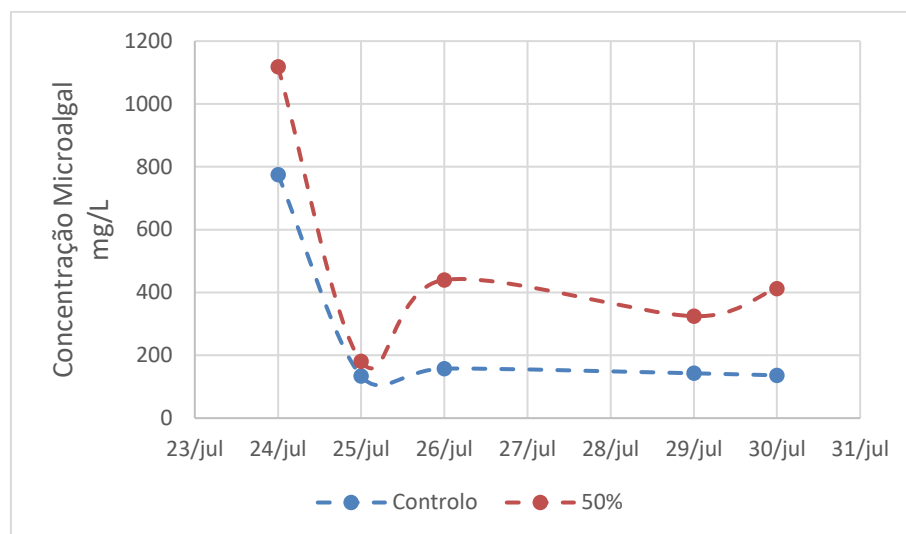


Figura 28 - Gráfico do crescimento das microalgas, após adição de BBM.

### 4.3 Determinação da Quantidade de Lípidos

A extração de lípidos da biomassa liofilizada foi realizada recorrendo a diferentes métodos/protocolos retirados da literatura. A utilização de baixas quantidades de biomassa requeridas pelos diferentes métodos para extrair e determinar a percentagem de lípidos presentes nas culturas torna-se benéfica devido à baixa quantidade de material obtido nos ensaios 1 e 2.

A extração de lípidos através da adaptação de dois protocolos foi elaborada segundo o descrito na secção 3.3.

A extração lipídica iniciou-se com a adaptação do método B&D, com representações de algumas das etapas presentes na Figura 29. Foi realizado um primeiro ensaio (Teste 1) com uma única amostra proveniente de biomassa liofilizada de uma cultura de *Chlorella vulgaris* cedida pelo Laboratório de Tecnologia (LT) do ISEP e cultivada num trabalho anterior. Apesar de ter sido obtido um valor muito elevado, de 62% de lípidos na biomassa total, o método foi feito com facilidade e com necessidade de baixa quantidade de biomassa e por isso foi realizado um segundo ensaio/tentativa (Teste 2). Assim, foram preparadas 6 amostras de biomassa cedida pelo LT (biomassa usada entres os 0,0052 g e 0,0057 g), tendo sido uma desprezada devido à falta de divisão das amostras em duas fases diferentes. Os restantes tubos de ensaio resultaram em valores de quantidade de lípidos entre os 47 e os 278%. Como foram obtidos valores com percentagens muitos superiores a 100 %, uma situação impossível, e dada a necessidade do uso de clorofórmio (um composto tóxico), a utilização deste método foi cessada.

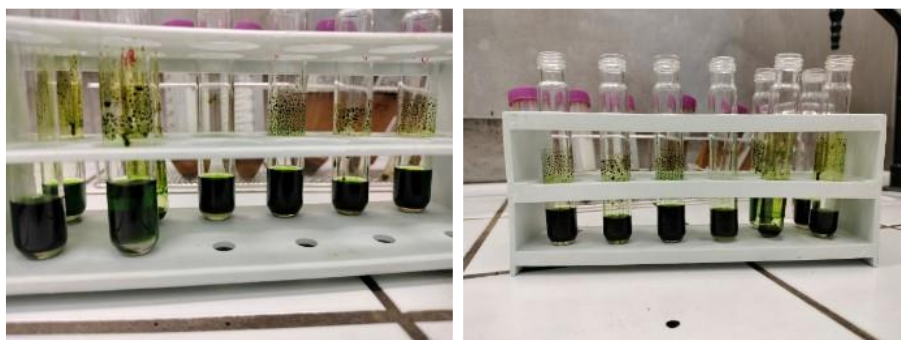


Figura 29 - Separação das fases (à esquerda) e secagem de solventes (à direita) recorrendo ao método B&D adaptado.

Seguiu-se a utilização do método Matyash *et al.* (2008) adaptado (Figura 30), pelos 2 processos distintos descritos na secção 3.3. As primeiras duas tentativas foram realizadas utilizando a biomassa cedida pelo LT. Na tentativa 1, foram utilizadas 7 amostras, tendo uma delas sido excluída uma vez que, para tentar acelerar e melhorar o processo de quebra de parede celular da amostra, foi adicionada uma colher de pó de vidro que resultou numa gelatina espessa sem divisão em fases. Os valores de quantidade de lípidos obtidos (em percentagem) estiveram entre os 24,4% e 246,5%. Mais uma vez, apenas duas das amostras testadas resultaram em valores de lípidos abaixo dos 100%, o que indica problemas no método ou na sua execução. Existem algumas explicações para estes valores demasiado elevados que podem passar pela presença de impurezas (biomassa) ou resíduos de compostos utilizados no procedimento no produto final ou pela dificuldade de perceber quando as amostras se encontram totalmente secas (sem clorofórmio na amostra).

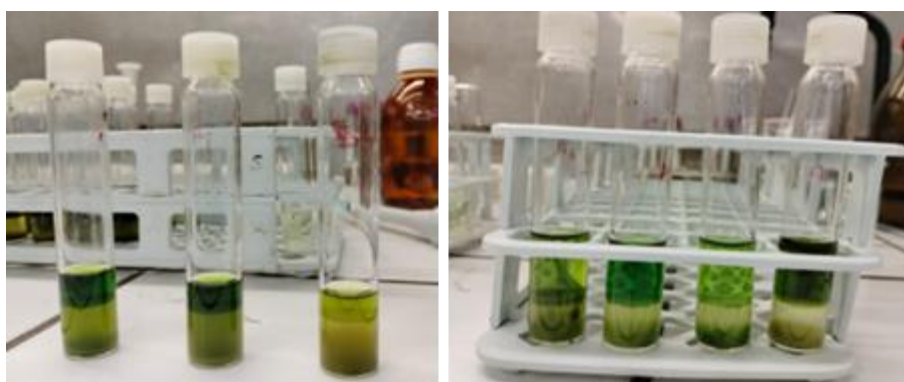


Figura 30 - Diferentes fases do material após as etapas do Matyash *et al.* (2008).

Dados os problemas descritos anteriormente, foi utilizado um segundo procedimento dentro deste método, muito semelhante ao processo 1, mas com a incorporação de ultrassons e agitação por *shaker*, como descrito em 3.3. Na primeira tentativa usando o novo método, foram extraídos lípidos de 3 amostras com resultados muito semelhantes, apresentados no Apêndice C.2 (9,8%, 10,14% e 10,0%) e a sua média encontra-se na Tabela 11. Como os valores obtidos se encontram dentro do esperado, já que a cultura cedida tinha sido cultivada em condições

desconhecidas, durante vários meses e possivelmente na ausência de nutrientes que não o azoto, já que a carência do mesmo pode induzir a acumulação de lípidos. Este processo foi repetido duas vezes (Tentativas 3 e 4), agora com amostras da biomassa relevantes para este trabalho visto que eram as provenientes das diferentes fases dos ensaios 1 e 2 deste trabalho.

Na tentativa 3, foi utilizada metade da quantidade de material (biomassa) referida no protocolo devido à baixa quantidade disponível do mesmo. As restantes quantidades de solventes e água foram reduzidas na mesma proporção, ou seja, metade do estipulado na literatura. Assim, foram preparadas amostras em duplicado de 5 culturas diferentes, do ensaio 1 e 2 (9%, 15%, 65%, 80% e 20%, respetivamente) e os controlos do ensaio 1 e 2.A e 2.B. Para facilitar a análise dos dados, foi calculada a média da quantidade de lípidos extraídos de cada amostra, em duplicado, e foi inserida na Tabela 11, estando os valores totais tabelados em anexo no Apêndice C.2. Analisando assim a tabela, é possível observar que a percentagem de lípidos na biomassa total se encontra num intervalo entre os 12,1% e os 21,5%. Na extração do material proveniente do ensaio com água bruta, o controlo foi a condição com mais lípidos, seguida da amostra com 15 % de água residual, com 19,7% e , por fim, a amostra de 9 % com 15,2%. Os valores mais elevados da cultura com 15% de água residual comparando com a amostra de 9% podem ser justificados devido ao comportamento a nível de crescimento destas culturas observado em 4.2.1, já que a amostra de 15% apresentou um crescimento mais constante e sem decréscimo abrupto no decorrer do ensaio comparativamente com a de 9 %, havendo assim uma maior quantidade de lípidos na primeira cultura. É de salientar que os valores obtidos nas amostras duplicadas de 15% de água (19,9% e 19,5%) apresentam um menor desvio padrão do que as restantes. O desvio padrão mais elevado observado para algumas culturas nas medições das duas amostras da mesma condição pode ser justificado por erro humano na capacidade de extrair todo o material pretendido, assim como de algum problema na etapa de rotura da parede celular para libertação dos lípidos.

As culturas referentes ao ensaio 2.A (Controlo, 65% e 80%) tiveram valores de 19,7% (80%), 17,5% (controlo) e os 12,1% (65%). As duas amostras referentes ao controlo resultaram em valores diferentes entre si, e as razões para este acontecimento são as mencionadas no parágrafo anterior. As duas amostras referentes aos 65% de água apresentaram valores muito próximos entre si, de 12,0 % e 12,1%. Analisando o gráfico do crescimento das microalgas deste ensaio, é observável que a cultura de 80 % de água residual apresentou um crescimento mais elevado, o que se reflete também na percentagem de lípidos desta, relativamente às restantes culturas analisadas.

As últimas culturas utilizadas nesta tentativa corresponderam ao controlo e a cultura com 20% de água residual do ensaio 2.B. Uma das amostras referentes aos 2 % de água apresentou um valor de lípidos de 26,5% e a segunda amostra com apenas 16,5%, resultando numa média de 21,5%. Mais uma vez, esta amplitude entre valores pode ser justificada por erro humano ou de protocolo na capacidade de extrair todo o material pretendido, assim como de algum possível problema nas etapas de rotura da parede celular para libertação dos lípidos. Por outro lado, o controlo apresentou um desvio mais reduzido e uma média total de 15,3%.

Para finalizar a extração de lípidos, procedeu-se à Tentativa 4, onde é feita a repetição da extração das culturas com uma grande diferença entre as amostras duplicadas, juntamente com

extração lipídica da cultura correspondente aos 5% de água residual (ensaio 1), 90% (ensaio 2.A), 40% e 50% (ensaio 2.B). As culturas repetidas dos 9% (ensaio 1) e controlo do ensaio 2.A apresentaram valores entre amostras muito diferentes, de aproximadamente 6 % na cultura do ensaio 1 referente aos 9%. Por outro lado, a cultura de controlo do ensaio 1 diminuiu a sua amplitude de valores entre duplicados. Uma das amostras da repetição da extração da cultura de 20% (ensaio 2.B) teve de ser excluída devido a problemas de separação de fases. As restantes culturas, analisadas pela primeira vez, resultaram em valores médios de 12,8%, 11,2%, 9,3% e 5,6%, esta última sendo o resultado médio de uma amostra com 15,6% e outra que apresentou valores negativos.

Tabela 11 - Valores de lípidos extraídos, segundo o método escolhido e a biomassa utilizada.

<b>Método utilizado</b>	<b>Nº de Teste</b>	<b>Tipo de biomassa</b>	<b>Teor de lípidos (%)</b>	
Método B&D adaptado	Teste 1	Biomassa cedida pelo LT	62,0	
			80,1	
	Teste 2	Biomassa cedida pelo LT	101,9	
			247,3	
			278,2	
Método Matyash <i>et al.</i> (2008)	Tentativa 1 (Processo 1)	Biomassa cedida pelo LT	47,4	
			32,27	
			24,4	
			246,5	
			214,5	
			241,1	
			188,8	
	Tentativa 2	Biomassa cedida pelo LT	10,0	
	Tentativa 3 (Processo 2)	Controlo – Ensaio 1	21,5	
			9% - Ensaio 1	15,2
			15% - Ensaio 1	19,7
			Controlo – Ensaio 2.A	17,5
			65% - Ensaio 2.A	19,7
			80% - Ensaio 2.A	12,1
			Controlo – Ensaio 2.B	15,3
	Tentativa 4 (Processo 2)	20% - Ensaio 2.B	21,5	
			5% - Ensaio 1	15,6
9% - Ensaio 1			10,0	
90% - Ensaio 2.A			11,2	
20% - Ensaio 2.B			12,7	
Tentativa 4 (Processo 2)	40% - Ensaio 2.B	12,8		
		50% - Ensaio 2.B	9,2	

Como descrito na secção 3.3., a secagem foi efetuada em cadinhos para aumentar a área de evaporação, como pode ser observado na Figura 31.



Figura 31 - Cadinhos com material extraído na tentativa 4 após a evaporação do solvente.

Apesar de o protocolo de B&D adaptado ser o mais simples de fazer, foram obtidos resultados sem qualquer significado, tendo em conta que, como mencionado anteriormente, a quantidade de lípidos extraída é muito superior à quantidade de biomassa total, uma situação impossível de acontecer. O método adaptado de Matyash *et al.* (2008), apesar de bastante mais trabalhoso e consumidor de tempo, revelou-se mais fiável e com resultados finais dentro do expectável, especialmente na última tentativa. Este aumento de fiabilidade de resultados poderá estar relacionado com a adaptação do procedimento inicial com a incorporação dos ultrassons (processo 2).

O processo de extração de lípidos revelou-se uma das etapas mais difíceis, com elevado consumo de tempo e energia, tal como descrito nos trabalhos realizados na área. A necessidade elevada de energia inicia-se pela matéria-prima necessária, a biomassa seca, já que esta necessita de ser liofilizada num equipamento com gastos elevados de energia e tempo. Os custos associados a equipamentos, na metodologia utilizada, não são das questões mais preocupantes, uma vez que foram utilizados equipamentos e materiais que também são utilizados em diversas outras técnicas laboratoriais. No entanto, a implementação destas metodologias a uma escala superior torna-se difícil e pouco rentável, havendo necessidade de adquirir equipamentos com custos bastantes elevados. Os solventes utilizados, como o hexano e clorofórmio, são poluentes, inflamáveis e tóxicos para a saúde humana e animal, para além dos custos de aquisição elevados. Existe também a possibilidade de as técnicas de extração não serem eficientes, limitando o rendimento do processo.

Para tentar colmatar estas dificuldades, foi testada uma alternativa, a utilização direta da biomassa liofilizada (seca) ou húmida na transesterificação para a produção de biodiesel, eliminando a necessidade da extração de lípidos, reduzindo os custos de operação, tempo despendido e potenciando o aumento do rendimento e eficiência da produção de biodiesel.

## 4.4 Produção de Biodiesel – Transesterificação Direta

A etapa principal deste trabalho é a produção do biodiesel através do crescimento de microalgas em águas residuais. Dado tratar-se de um trabalho à escala laboratorial, e devido à produção de quantidades reduzidas de biomassa, foram geradas quantidades também reduzidas de produto final, o biodiesel.

- Tentativa 1

A primeira tentativa foi realizada recorrendo ao método Torres *et al.* (2017), descrito em 3.4.1 e com utilização da biomassa liofilizada do ensaio 3 (controlo e 50%). Devido à baixa quantidade de biomassa, foi utilizada metade da quantidade descrita no procedimento, mantendo a proporção 2:1 de metanol: ácido sulfúrico e utilizando metade das quantidades de solvente (hexano) e água. Na primeira tentativa foram utilizados 7 tubos de ensaio, com biomassa proveniente do ensaio 5, nas quantidades descritas na Tabela 12.

Tabela 12 - Quantidade de biomassa utilizada em cada amostra.

Amostras	Quantidade de biomassa (g)
1	0,1414
2	0,1390
3	0,1395
4	0,1276
5	0,1150
6	0,1070
7	0,1840

Como descrito, as etapas I e II foram realizadas com especial atenção aos equipamentos de segurança, uma vez que é utilizado um ácido forte e corrosivo, o ácido sulfúrico (98%). Quando este é adicionado ao metanol, dá-se numa reação exotérmica, havendo assim um aumento de temperatura nos tubos e possibilidade de salpicos. Durante o aquecimento no digestor, a pressão dentro dos tubos aumenta, e, sempre que era necessário proceder à agitação manual dos tubos, era necessário abrir lentamente os tubos antes para libertar os gases e a pressão acumulada. Durante este processo de agitação, a amostra 7 foi rejeitada, já que devido aos fatores mencionados (elevada temperatura e pressão no interior dos tubos) algum do material foi acidentalmente expelido.

Na etapa seguinte, procedeu-se à abertura lenta dos tubos de ensaio, adição do hexano e água, seguida de agitação em vórtex e centrifugação, a 1000g por 10 minutos, como descrito. Foram obtidas duas fases, como observado na Figura 32.

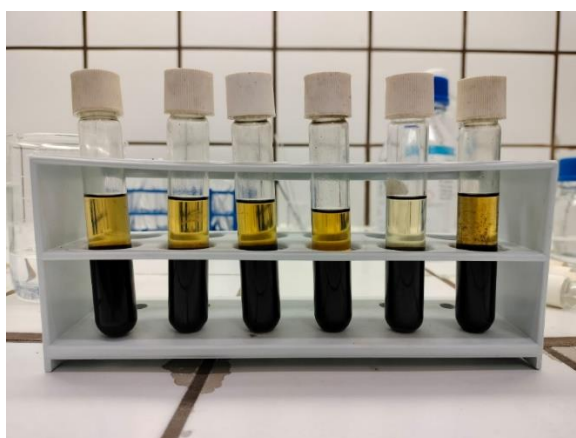


Figura 32 - Amostras após as etapas I, II, III e IV do processo 1.

Seguiram-se as etapas V, VI e VII e, nesta última, foi extraída a fase superior dos tubos, composta por hexano e biodiesel. As amostras foram deixadas em hotte de um dia para o outro para evaporação do hexano.

O produto final sem hexano, observável na Figura 33, foi pesado, tendo-se calculado de seguida a quantidade de biodiesel, tanto em peso final como a sua percentagem face à biomassa inicial utilizada. Os resultados estão demonstrados na Tabela 13.

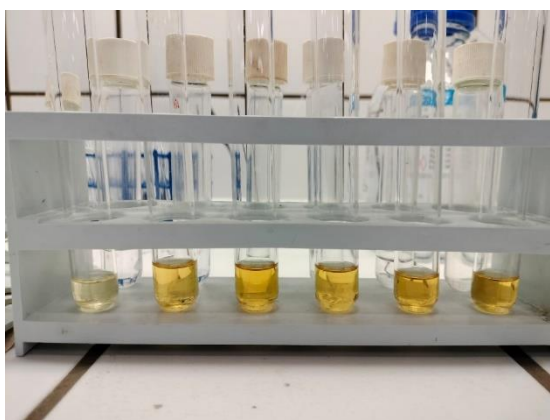


Figura 33 - Biodiesel resultante do primeiro ensaio.

Tabela 13 – Rendimento de biodiesel no primeiro ensaio de produção de biodiesel, após a etapa VII.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo de Biomassa</b>	<b>Quantidade de biomassa (g)</b>	<b>Quantidade de biodiesel (g)</b>	<b>Rendimento em biodiesel (g biodiesel/100 g biomassa seca)</b>
1	Controlo	0,1414	0,0062	4,385
2	Controlo	0,1390	0,0105	7,554
3	Controlo	0,1395	0,0025	1,792
4	50%	0,1276	0,0061	4,781
5	50%	0,1150	0,0074	6,435
6	50%	0,1070	0,0126	11,776

Na produção de biodiesel através deste método foram encontradas algumas dificuldades e preocupações. O aquecimento do ácido sulfúrico ao reagir com o metanol é uma destas questões já que, devido à sua reatividade térmica, tornam-se necessários cuidados de manuseamento adicionais, assim como a utilização de equipamentos de proteção mais elevada, como óculos e luvas de Solvex.

Tendo em conta os resultados obtidos, existe uma maior produção de biodiesel na biomassa cultivada em água residual (6,4%), comparativamente com o controlo (4,4%), o que pode comprovar a eficácia da introdução destas águas no crescimento microalgal e na acumulação de lípidos. O valor da última amostra (amostra 6) apresenta uma diferença elevada para as outras duas amostras da mesma condição, sendo que este valor tão diferente dos restantes pode ser explicado por uma evaporação menos eficiente do solvente dessa amostra.

Apesar dos resultados obtidos serem promissores, para uma produção de biodiesel eficaz é necessária uma elevada quantidade de biomassa liofilizada para elevar a produção a uma escala superior, o que torna a utilização desta metodologia bastante dispendiosa, tanto de energia como de tempo.

- Tentativa 2

Na segunda tentativa, foram seguidos os protocolos de Torres *et al.* (2017) (Processos 1, 2 e 3), Mathimani *et al.* (2024) e Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015).

Na Tabela 14 encontram-se descritas as condições de cada amostra utilizada, especificando a proveniência da biomassa, o protocolo utilizado, a quantidade de biomassa inicial e a percentagem de biodiesel obtida em relação à biomassa inicial utilizada. Os valores totais obtidos encontram-se tabelados no Apêndice D.2.

Tabela 14 - Condições utilizadas na tentativa 2 de transesterificação direta.

Proveniência da biomassa	Protocolo utilizado	Amostra	Biomassa inicial (g)	Rendimento em biodiesel (g biodiesel/100 g biomassa seca)	
Ensaio 3 – 50%	Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015)	1	0,1163	4,39	
		2	0,1111	6,39	
Ensaio 1 – 5%		3	0,1253	0,96	
		4	0,1361	1,18	
		5	0,1244	1,77	
		6	0,1273	0,55	
Biomassa dos aquários	Torres <i>et al.</i> (2017)) – Processo 1	7	0,3107	1,12	
		8	0,4044	0,84	
		9	0,3031	1,35	
		Torres <i>et al.</i> (2017)– Processo 2	10	0,3507	0,59
			11	0,2817	0,23
	Mathimani <i>et al.</i> (2024)	12	0,5190	0,74	
		13	0,5068	1,77	
		14	0,6090	0,52	
		15	0,5067	0,81	
		16	0,1253	0,62	
		17	0,1361	0,22	

No método descrito por Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015), foram utilizadas quantidades mais baixas de biomassa (cerca de metade) do que as descritas no processo devido à baixa quantidade de biomassa produzida no ensaio 1 (amostra com 5% de água residual). Para ser possível uma comparação entre as diferentes fontes de biomassa, também a quantidade de biomassa proveniente do ensaio 3 (50%) foi reduzida à mesma proporção. Assim, comparando entre estas condições testadas com este método, a produção de biodiesel foi superior quando utilizada biomassa do ensaio 3 (50%), o que seria esperado de acordo com a quantidade de lípidos obtidos em cada uma das condições. De todos os métodos utilizados nesta tentativa, este foi o que apresentou maiores quantidades de biomassa (da amostra de 50%, em percentagem). No entanto, foi o único realizado com a biomassa liofilizada e proveniente do cultivo na presença de água residual.

Quando utilizada biomassa do aquário (seca em estufa a 60 °C por 24 horas), as quantidades de biodiesel obtidas são consideravelmente mais reduzidas que os restantes tipos de biomassa, mesmo quando utilizados diferentes métodos. Esta produção de biodiesel encontra-se apenas entre os 0,2% e 1,7% (valor obtido em comparação com a biomassa inicial), com o método mais eficiente para extração de biodiesel desta biomassa a ser o método descrito por Torres *et al.* (2017), sem utilização de ultrassons (processo 1). Os valores obtidos pela utilização de biomassa seca em estufa podem ser explicados pela utilização de um processo de secagem pouco eficaz (quando comparado com a liofilização), podendo a água ter influenciado as reações químicas na extração de biodiesel e ainda pela falta de nutrientes presente na água residual que influenciar a quantidade de lípidos presentes nas microalgas. O método de Mathimani *et al.* (2024) apresentou os valores mais reduzidos, o que pode ser explicado pela utilização de menores quantidades de solvente e catalisador, assim como pela ausência de utilização de centrifugação para a separação de fases, podendo algum biodiesel ter ficado retido na fase inferior do conteúdo dos tubos.

Por fim, esta tentativa demonstrou que os melhores resultados foram obtidos aquando da utilização de biomassa do ensaio 3 (com 50% de água residual) através do método descrito por Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015) e que a utilização de biomassa seca, não liofilizada, resulta em menor quantidade de biodiesel obtido, devido à água presente nas amostras.

- Tentativa 3

Na última tentativa realizada, foi apenas utilizado o método de transesterificação direta descrito por Torres *et al.* (2017), já que tinha sido o método mais rápido e com melhores valores obtidos nas tentativas anteriores. No entanto, a implementação deu-se sem ter obtidos os valores do processo 3 da tentativa anterior, tendo sido então escolhido o processo 2 que, em comparação com tentativas anterior, não demonstrou ser o mais eficaz. Na Tabela 15 encontram-se descritas as condições utilizadas na realização desta extração de biodiesel.

Mais uma vez, tendo em conta a disponibilidade reduzida de biomassa liofilizada do ensaio 1, o procedimento foi adaptado e utilizou-se metade da biomassa descrita no procedimento. Para comparação, foram pesadas quatro amostras de biomassa do ensaio 3 (5%) com a mesma quantidade de biomassa do ensaio 1. No entanto, outras quatro amostras foram preparadas de acordo com os valores originais do método.

Tabela 15 – Rendimento em biodiesel para as condições utilizadas na tentativa 3 de transesterificação pelo processo 2 do método de Torres *et al.* (2017).

Amostra	Tipo de Biomassa	Biomassa Inicial (g) – Valores médios	Quantidade de biodiesel (g)	Rendimento em biodiesel (g biodiesel/100 g biomassa seca)
1	Controlo – E1	0,1189	0,0032	2,7
2		0,1354	0,003	2,2
3		0,1288	0,0045	3,5
4	3% - E1	0,1428	0,0026	1,8
5		0,144	0,0037	2,6
6		0,1985	0,0031	1,56
7	7% - E1	0,127	0,0056	4,4
8		0,1845	0,0053	2,9
9	50% - E3	0,1414	0,0054	3,8
10		0,1622	0,0056	3,5
11		0,1439	0,0037	2,6
12		0,1648	0,0057	3,5
13		0,3134	0,013	4,2
14		0,2685	0,0077	2,9
15		0,2706	0,0117	4,3
16		0,2806	0,009	3,2

A biomassa com maior produção de biodiesel, em valores médios, trata-se da biomassa produzida no ensaio 3, relativa aos 50% de água residual utilizada no meio de cultura, com valores médios de produção (em percentagem) de 3,50% comparativamente com os valores de 3,3% da biomassa de 7% do ensaio 1, 1,9% da biomassa de 3% de água no meio e ainda 3,01 % na amostra de controlo do mesmo ensaio. Nesta tentativa, é possível verificar que, ao analisar individualmente as amostras com a quantidade de biomassa descrita pelo método, a produção de biodiesel poderá ser superior, com amostras a chegar aos 4,3% de biodiesel. No entanto, em termos médios, a quantidade de biodiesel é mais elevada, mas com uma diferença pouco significativa (0,2% superior comparativamente à utilização do método com metade da biomassa).

Tendo em conta os valores obtidos nos três momentos de produção de biodiesel (tentativas 1, 2 e 3), a biomassa que resultou numa maior produção de biodiesel é, sem dúvidas, a biomassa referente ao ensaio 3 com 50% de água residual na composição do seu meio, com valores de 6,4%, 5,4% e 3,6% de produção de biodiesel. Comparando com os resultados da biomassa proveniente do ensaio 1, pode concluir-se que existe maior produção de biodiesel quando há cultivo de microalgas em meio com maior quantidade de água residual.

O método com maior quantidade de biodiesel produzido, comparando com a biomassa inicial utilizada, corresponde ao descrito por Torres *et al.* (2017), em ambos os processos utilizados, especialmente o processo sem utilização de ultrassons.

Como já foi mencionado, os métodos em que foi utilizada biomassa dos aquários após secagem em estufa mostraram baixa quantidade de biodiesel produzida, possivelmente devido à elevada quantidade de água ainda presente no material biológico.

O método de Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015) pode trazer alguns problemas à produção de biodiesel, como a elevada duração total do processo, assim como a possível formação de sabão, já que é utilizada um composto alcalino como catalisador. Outra operação que pode dificultar o processo trata-se da necessidade de lavagem das amostras. A sua lavagem só é concluída quando a água não apresenta turvação e, neste estudo, foi necessário proceder-se a quatro lavagens para isto ocorrer, aumentando o risco de perda de biodiesel aquando da rejeição da água.



## 5 Conclusão e Trabalhos Futuros

### 5.1 Conclusão

No decorrer deste trabalho foi efetuado o crescimento de microalgas, a *Chlorella vulgaris*, em regime fotoautotrófico, usando um meio constituído por BBM e amostras de águas residuais provenientes de diferentes etapas da ETAR Gaia Litoral, e posterior produção de biodiesel.

Após a realização de diferentes ensaios de crescimento com as diferentes águas residuais, concluiu-se que a água residual mais promissora para o crescimento elevado de microalgas se tratava da água residual proveniente do interior do tanque de arejamento e, possivelmente, após algumas reações biológicas.

Como estas águas contêm uma elevada quantidade de nutrientes, mas também de contaminantes e outros compostos e, tendo em conta o comportamento de algumas amostras, é fundamental assegurar que algumas condições de cultivo sejam cumpridas, como o arejamento adequado do material, para uma melhor exposição à luz. A utilização de água residual como fonte de nutrientes para o crescimento algal revela-se assim possível e importante para a redução significativa da utilização de água doce, que escasseia ao longo do tempo e é fundamental para o consumo humano.

A utilização de microalgas para produção de biomassa em pequena escala ou escala laboratorial, provou ser simples mas resulta em quantidades muito reduzidas de biomassa. A obtenção de pequenas quantidades, pode comprometer a quantidade de lípidos e/ou biodiesel obtidos através da extração dos mesmos, uma vez que os lípidos correspondem, no máximo, a 21% da massa total da biomassa.

De acordo com os diversos estudos realizados nesta área, existe uma variedade de métodos de extração de lípidos, sendo necessário recorrer a uma escolha adequada de método para aumentar a rentabilidade de todo o processo. Deste modo, após uma análise cuidada da literatura publicada nesta área, foram utilizados métodos baseados nos trabalhos de Bligh e

Dyer e Matyash *et al.*, tendo este último sido o método com melhores resultados, com teores de lípidos entre os 21% (no controlo do ensaio 1.A e 2.B na amostra com 20% de água residual) e 10% (nas amostras referentes ao controlo do ensaio 2.A e 50% de água residual do ensaio 2.B). Ao analisar os valores obtidos nos diversos momentos de testagem, é possível assumir que a quantidade de lípidos aumenta à medida que a quantidade de água residual no meio aumenta. A implementação de ultrassons à extração de lípidos apresentou uma melhoria do rendimento deste método. Apesar deste melhoramento do método, este permaneceu moroso e com baixos rendimentos, o que tornaria difícil o aumento de escala necessário para uma produção eficaz de biodiesel. Numa tentativa de otimização do processo, a extração lipídica foi contornada, sendo a biomassa liofilizada utilizada diretamente como matéria-prima na produção de biodiesel (transesterificação direta).

A produção de biodiesel, recorrendo aos métodos escolhidos neste trabalho foi também ela morosa e exigiu especial atenção devido aos compostos, tanto tóxicos como corrosivos, necessários para o processo. Apesar disso, o processo é relativamente simples, mas resulta em quantidades reduzidas de biodiesel comparativamente com as quantidades de material biológico e químico utilizadas (biomassa, ácido sulfúrico e outros). Como esperado e de acordo com os estudos analisados ao longo deste trabalho, a biomassa com maior quantidade de água residual no meio resultou num maior rendimento em biodiesel, com valores de 6,43 g biodiesel / 100 g biomassa seca (tentativa 1), 5,39 g biodiesel / 100 g biomassa seca (tentativa 2) e 3,50 g biodiesel / 100 g biomassa seca (tentativa 3). O método com melhores resultados tratou-se do processo 1 de Torres *et al.*, com valores máximos de 6,50 g biodiesel / 100 g biomassa seca para a biomassa com maior quantidade de água residual.

## 5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros

Após a realização deste trabalho e analisando os resultados obtidos, propõem-se algumas otimizações que podem ser testadas em trabalhos futuros:

1. Realização de ensaios com variações de intensidade de luz e/ou do fotoperíodo, assim como variações na gama de comprimentos de onda da luz utilizada, para perceber os seus impactos no crescimento algal.
2. Aumento do volume de microalgas cultivadas com recurso a águas residuais sem qualquer tipo de tratamento (exceto tratamento físico), analisando a evolução da concentração dos diferentes macro e micronutrientes ao longo do ensaio.
3. Realização de estudo de avaliação de ciclo de vida para o processo de cultivo de microalgas considerando tratamento de águas residuais e obtenção de produtos de valor elevado para implementação numa ETAR.
4. Experimentação de métodos diferentes dos utilizados para extração de lípidos, adaptando e implementando novas técnicas e procedimentos, como a utilização de ultrassons, entre outros.

5. Continuação da exploração de diferentes métodos para produção de biodiesel e análise comparativa entre eles, assim como uma análise económica para implementação numa ETAR, assim como utilização de métodos de produção de biodiesel recorrendo a biomassa húmida, que não foi possível incluir neste estudo.



# Referências

- Abdel-Latif, H.M.R. *et al.* (2022) 'The effectiveness of *Arthrospira platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview - ScienceDirect', *Aquaculture Reports*, 24, p. 101135. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101135>.
- Ahmad, A. *et al.* (2022) 'Algae biotechnology for industrial wastewater treatment, bioenergy production, and high-value bioproducts', *Science of The Total Environment*, 806, p. 150585. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150585>.
- Al-Hammadi, M. and Güngörmüşler, M. (2024) 'New insights into *Chlorella vulgaris* applications', *Biotechnology and Bioengineering*, 121(5), pp. 1486–1502. Available at: <https://doi.org/10.1002/bit.28666>.
- Ali, S.S., *et al.* (2022) 'Microalgae-mediated wastewater treatment for biofuels production: A comprehensive review', *Microbiological Research*, 265, p. 127187. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127187>.
- Ali, S.S. *et al.* (2022) 'Recent advances in wastewater microalgae-based biofuels production: A state-of-the-art review', *Energy Reports*, 8, pp. 13253–13280. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2022.09.143>.
- Atabani, A.E. *et al.* (2013) 'Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18, pp. 211–245. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.10.013>.
- Azarpour, A. *et al.* (2022) 'A review on microalgal biomass and biodiesel production through Co-cultivation strategy', *Energy Conversion and Management*, 267, p. 115757. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115757>.
- Barata, A. (2016) *Microalgas: produção económica e ambientalmente sustentável*. masterThesis. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Available at: <http://hdl.handle.net/10451/23615>.
- Barros, A.I. *et al.* (2015) 'Harvesting techniques applied to microalgae: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp. 1489–1500. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>.
- Bermúdez Menéndez, J.M. *et al.* (2014) 'Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(11), pp. 1779–1784. Available at: <https://doi.org/10.1002/jctb.4272>.
- Biocombustíveis em Portugal* (2023) *Biocombustíveis em Portugal*. Available at: <https://www.dgeg.gov.pt/pt/areas-setoriais/energia/eficiencia->

- energetica/biocombustiveis/biocombustiveis-em-portugal/ (Accessed: 17 September 2024).
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) 'A rapid method of total lipid extraction and purification', *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), pp. 911–917. Available at: <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- Brzychczyk, B., Kowalczyk, Z. and Gielzecki, J. (2016) 'Evaluation of Usefulness of the Designed Laboratory Photobioreactor for Microalgae Cultivation in Controlled Conditions', *Agricultural Engineering*, 20. Available at: <https://doi.org/10.1515/agriceng-2016-0002>.
- C., S.M. and Perumalsamy, M. (2022) 'Bioremediation of dairy industry wastewater and assessment of nutrient removal potential of *Chlorella vulgaris*', *Biomass Conversion and Biorefinery* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03068-x>.
- de Castro, C.M. *et al.* (2023) 'Environmental application of a cost-effective smartphone-based method for COD analysis: Applicability in the electrochemical treatment of real wastewater', *Science of The Total Environment*, 855, p. 158816. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158816>.
- Chen, J. *et al.* (2018) 'The potential of microalgae in biodiesel production', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90, pp. 336–346. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.073>.
- Chlorella vulgaris* Beijerinck - *AlgaeBase* (2023) *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890. Available at: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=27676](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27676) (Accessed: 2 September 2024).
- Choi, H.-J. (2016) 'Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application', *Environmental Engineering Research*, 21(4), pp. 393–400. Available at: <https://doi.org/10.4491/eer.2015.151>.
- Cunha, A.E.P. (2020) Influência da intensidade luminosa e exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o crescimento e acumulação de lípidos e carotenoides. Universidade da Beira interior.
- De Souza, D.S. *et al.* (2023) 'New methods to increase microalgae biomass in anaerobic cattle wastewater and the effects on lipids production', *Biomass and Bioenergy*, 176, p. 106915. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106915>.
- Demirbas, A. and Fatih Demirbas, M. (2011) 'Importance of algae oil as a source of biodiesel', *Energy Conversion and Management*, 52(1), pp. 163–170. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>.
- Dianursanti, Religia, P. and Wijanarko, A. (2015) 'Utilization of n-Hexane as Co-solvent to Increase Biodiesel Yield on Direct Transesterification Reaction from Marine Microalgae', *Procedia Environmental Sciences*, 23, pp. 412–420. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.01.059>.

- Díaz-Puertas, R. *et al.* (2023) 'Fish Skin Mucus Extracts: An Underexplored Source of Antimicrobial Agents', *Marine Drugs*, 21(6), p. 350. Available at: <https://doi.org/10.3390/md21060350>.
- DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL concerning urban wastewater treatment (recast)* (2022). Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52022PC0541> (Accessed: 16 September 2024).
- D'Oca, M.G.M. *et al.* (2011) 'Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*', *Biomass and Bioenergy*, 35(4), pp. 1533–1538. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.047>.
- Dolganyuk, V. *et al.* (2020) 'Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts', *Biomolecules*, 10, p. 1153. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom10081153>.
- Ferreira, G.F. *et al.* (2019) 'A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 109, pp. 448–466. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957) 'A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues', *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), pp. 497–509. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5).
- Hussain, F. *et al.* (2021) 'Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, p. 110603. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>.
- Ideris, F. *et al.* (2022) 'Progress on Conventional and Advanced Techniques of In Situ Transesterification of Microalgae Lipids for Biodiesel Production', *Energies*, 15, pp. 1–33. Available at: <https://doi.org/10.3390/en15197190>.
- Krienitz, L., Huss, V.A.R. and Bock, C. (2015) '*Chlorella*: 125 years of the green survivalist', *Trends in Plant Science*, 20(2), pp. 67–69. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.005>.
- Liu, Z. *et al.* (2023) 'Technologies for harvesting the microalgae for industrial applications: Current trends and perspectives', *Bioresourc. Technology*, 387, p. 129631. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129631>.
- Liyanaarachchi, V.C. *et al.* (2021) 'Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review', *Algal Research*, 57, p. 102353. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353>.
- Ma, F. and Hanna, M.A. (1999) 'Biodiesel production: a review1', *Bioresourc. Technology*, 70(1), pp. 1–15. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5).

- Marella, T.K. *et al.* (2019) 'Biodiesel production through algal cultivation in urban wastewater using algal floway', *Bioresource Technology*, 280, pp. 222–228. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.031>.
- Maroušek, J. *et al.* (2023) 'Techno-economic identification of production factors threatening the competitiveness of algae biodiesel', *Fuel*, 344, p. 128056. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128056>.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, Nidia.S. (2010) 'Microalgae for biodiesel production and other applications: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp. 217–232. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.
- Mathimani, T. *et al.* (2024) 'Process optimization of one-step direct transesterification and dual-step extraction-transesterification of the *Chlorococcum-Nannochloropsis* consortium for biodiesel production', *Environmental Research*, 240, p. 117580. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117580>.
- Matyash, V. *et al.* (2008) 'Lipid extraction by methyl-*tert*-butyl ether for high-throughput lipidomics', *Journal of Lipid Research*, 49(5), pp. 1137–1146. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.D700041-JLR200>.
- Miranda, A.F. *et al.* (2017) 'Applications of microalgal biofilms for wastewater treatment and bioenergy production', *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), p. 120. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0798-9>.
- Mondal, S. *et al.* (2022) 'Redefining the role of microalgae in industrial wastewater remediation', *Energy Nexus*, 6, p. 100088. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100088>.
- Nigam, P.S. and Singh, A. (2011) 'Production of liquid biofuels from renewable resources', *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), pp. 52–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>.
- Oliveira, S.C.F. de (2009) *Produção de biomassa aquática como fonte de lípidos para biocombustíveis*. masterThesis. Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Available at: <https://recipp.ipp.pt/handle/10400.22/2367> (Accessed: 19 August 2024).
- Pandey, S. *et al.* (2024) 'Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges', *Fuel*, 367, p. 131547. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2024.131547>.
- Peng, H. *et al.* (2016) 'Regulation of carbon metabolic fluxes in response to CO<sub>2</sub> supplementation in phototrophic *Chlorella vulgaris*: a cytomic and biochemical study', *Journal of Applied Phycology*, 28(2), pp. 737–745. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0542-4>.
- Pina, L.C.C. de *et al.* (2021) 'Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos / Evaluation of a microalgae cultivation

- system with a mix of tubular and parallel plate photobioreactors for microalgae biomass production in alternative culture media', *Brazilian Journal of Development*, 7(4), pp. 37734–37777. Available at: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-304>.
- Pôjo, V.I.N.C. (2016) *Seleção de microalgas com potencial de produção de biocombustíveis*. masterThesis. Available at: <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/41436> (Accessed: 15 November 2023).
- Porto, *Portugal Weather Conditions | Weather Underground* (2024). Available at: <https://www.wunderground.com/weather/pt/porto/IPORTO192> (Accessed: 12 September 2024).
- Rame, R., Purwanto, P. and Sudarno, S. (2023) 'Sustainable energy harnessing: Microalgae as a potential biofuel source and carbon sequestration solution', *Renewable Energy Focus*, 47, p. 100498. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ref.2023.100498>.
- Safi, C. *et al.* (2014) 'Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp. 265–278. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>.
- Shokravi, Z. *et al.* (2022) 'Impacts of the harvesting process on microalgae fatty acid profiles and lipid yields: Implications for biodiesel production', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 161, p. 112410. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112410>.
- Su, Z. *et al.* (2023) 'Effect of pharmaceutical and domestic wastewater mixed ratios on microalgal growth for nutrients removal coupled with biomass and liquid biofuel generation', *Biomass Conversion and Biorefinery* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04911-5>.
- Tien Thanh, N. *et al.* (2022) 'Fundamental understanding of *in-situ* transesterification of microalgae biomass to biodiesel: A critical review', *Energy Conversion and Management*, 270, p. 116212. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116212>.
- Torres, S. *et al.* (2017) 'Direct transesterification of microalgae biomass and biodiesel refining with vacuum distillation', *Algal Research*, 28, pp. 30–38. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.001>.
- Understanding Laboratory Wastewater Tests: I. Organics (BOD, COD, TOC, O&G) (2022) Understanding Laboratory Wastewater Tests: I. Organics (BOD, COD, TOC, O&G). Available at: <https://extension.uga.edu/publications/detail.html?number=C992&title=understanding-laboratory-wastewater-tests-i-organics-bod-cod-toc-og> (Accessed: 9 September 2024).
- Vinatoru, M., Mason, T.J. and Calinescu, I. (2017) 'Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, pp. 159–178. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>.

Wan Mahari, W.A. *et al.* (2022) 'Recent advances on microalgae cultivation for simultaneous biomass production and removal of wastewater pollutants to achieve circular economy', *Bioresource Technology*, 364, p. 128085. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128085>.

Yang, Y. *et al.* (2023) 'Screening of microalgae species and evaluation of algal-lipid stimulation strategies for biodiesel production', *Science of The Total Environment*, 857, p. 159281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159281>.

Zhang, S. *et al.* (2022) 'A review on biodiesel production from microalgae: Influencing parameters and recent advanced technologies', *Frontiers in Microbiology*, 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.970028>.

# Apêndices

## Apêndice A – Valores de CQO

Data	Proveniência	Fator de diluição	Amostras	Medições normalizadas (x <sub>FD</sub> )					CQO Final [mgO <sub>2</sub> /L]	Desvio padrão
18/03/2024	BBM	4	Tubo 1	184	148	152	164	164	208	49
			Tubo 2	244	280	256	244	232		
	Entrada do Tanque de Arejamento	4	Tubo 1	804	692	1180	1020	860	506	356
			Tubo 2	292	248	256	292	320		
	Dentro do tanque de Arejamento	4	Tubo 1	540	556	552	568	560	554	13
			Tubo 2	580	556	532	552	552		
	Decantador Secundário	4	Tubo 1	x	x	x	x	x	Sem valores	Sem valores
			Tubo 2	x	x	x	x	x		
	Entrada do Tanque de Arejamento	6	Tubo 1	1212	1182	1254	1158	1548	1212	406
			Tubo 2	x	x	x	x	x		
	Dentro do Tanque de Arejamento	6	Tubo 1	x	x	x	x	x	Sem valores	Sem valores
			Tubo 2	x	x	x	x	x		
	Decantador Secundário	6	Tubo 1	372	558	588	576	588	576	923

<b>Data</b>	<b>Proveniência</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Amostras</b>	<b>Medições normalizadas (x<sub>FD</sub>)</b>						<b>CQO Final [mgO<sub>2</sub>/L]</b>	<b>Desvio padrão</b>
27/03/2024	Entrada do Tanque de Arejamento	2	Tubo 1	204	220	210	236	216	212	250	32
			Tubo 2	274	264	266	294	270	284		
	Dentro do tanque de Arejamento	2	Tubo 1	672	678	654	662	658	620	419	245
			Tubo 2	184	182	192	218	180	178		
	Entrada do Tanque de Arejamento	5	Tubo 1	360	320	345	275	295	310	550	226
			Tubo 2	740	750	755	745	750	750		
	Dentro do tanque de Arejamento	5	Tubo 1	560	505	550	505	570	555	465	83
			Tubo 2	380	405	355	425	370	405		
	Entrada do Tanque de Arejamento	10	Tubo 1	740	780	780	810	780	790	715	83
			Tubo 2	690	610	590	580	690	680		
	Dentro do Tanque de Arejamento	10	Tubo 1	440	470	490	380	480	420	595	172
			Tubo 2	810	700	780	780	790	750		
	Decantador Secundário	1	Tubo 1	38	36	40	32	44	56	38	4
			Tubo 2	38	39	36	40	32	36		

<b>Data</b>	<b>Proveniência</b>	<b>Fator de diluição</b>	<b>Amostras</b>	<b>Medições normalizadas (x<sub>FD</sub>)</b>						<b>CQO Final [mgO<sub>2</sub>/L]</b>	<b>Desvio padrão</b>
27/03/2024	Entrada do Tanque de Arejamento	1	Tubo 1	217	201	220	228	219	214	205	10
			Tubo 2	196	210	205	200	204	207		
			Tubo 3	200	190	193	200	191	194		
			Tubo 4	209	214	217	205	204	203		
	Dentro do tanque de Arejamento	1	Tubo 1	278	279	278	279	278	281	300	12
			Tubo 2	300	320	307	307	298	298		
			Tubo 3	306	311	306	300	308	299		
			Tubo 4	303	296	305	298	306	300		
	Decantador Secundário	1	Tubo 1	73	80	81	79	85	72	68	11
			Tubo 2	53	57	63	62	52	57		
			Tubo 3	64	64	60	59	66	63		
			Tubo 4	84	71	83	88	78	74		

## Apêndice B – Valores de DO dos ensaios

### Apêndice B.1 -Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 1.A, respetivamente.

Data	Controlo	3%	5%	7%	9%	10%	15%
03/04/2024	0,051	0,0986	0,0584	0,0749	0,0693	0,0682	0,0669
04/04/2024	0,1472	0,1422	0,1396	0,1329	0,1346	0,1326	0,1323
05/04/2024	0,2385	0,2149	0,213	0,214	0,2323	0,1541	0,1649
08/04/2024	1,1833	1,1084	1,0114	1,074	1,0565	0,4146	0,442
09/04/2024	1,4086	1,2671	1,1444	1,186	1,1357	0,4495	0,5175
10/04/2024	2,166	1,787	1,837	1,706	1,861	0,5893	0,5227
11/04/2024	2,4745	2,135	1,7865	1,644	1,6695	0,5623	0,6014
12/04/2024	2,8745	2,387	2,1	2,0915	2,06	0,6261	0,4886
15/04/2024	3,562	2,49	1,9985	1,861	1,4945	0,5805	0,6754
16/04/2024	3,738	2,868	2,8815	2,5175	2,4755	0,8053	0,6757
17/04/2024	3,875	2,525	1,8465	2,1375	1,8595	0,8153	0,8297
18/04/2024	3,627	2,712	2,6575	2,5685	2,2995	0,8509	0,875
19/04/2024	4,1155	2,7045	2,227	2,419	2,436	0,9719	1,0692
22/04/2024	4,1565	3,092	3,112	2,8165	2,747	1,2523	1,1458
23/04/2024	4,3235	3,1665	3,162	3,073	2,9375	1,581	1,9845

Data	Controlo	3%	5%	7%	9%	10%	15%
03/04/2024	21,18	10,22	14,71	13,18	12,88	12,53	21,18
04/04/2024	33,13	32,42	30,58	31,04	30,49	30,41	33,13
05/04/2024	53,25	52,72	53,00	58,10	36,41	39,39	53,25
08/04/2024	321,99	290,58	310,78	305,11	109,71	117,60	321,99
09/04/2024	374,84	333,82	347,60	330,95	119,77	139,53	374,84
10/04/2024	466,78	481,02	443,75	487,87	160,65	141,05	466,78
11/04/2024	566,39	466,64	426,17	433,40	152,68	164,24	566,39
12/04/2024	639,25	556,32	553,88	544,83	171,58	131,11	639,25
15/04/2024	669,21	527,19	487,87	383,91	158,05	186,33	669,21
16/04/2024	780,05	784,04	677,22	664,98	225,84	186,42	780,05
17/04/2024	679,41	483,73	567,11	487,44	228,92	233,37	679,41
18/04/2024	734,13	718,15	692,11	613,88	239,94	247,44	734,13
19/04/2024	731,93	592,92	648,55	653,49	277,96	309,22	731,93
22/04/2024	846,43	852,38	764,87	744,41	369,83	334,28	846,43
23/04/2024	868,62	867,28	840,78	800,59	408,34	523,17	868,62

**Apêndice B.2 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 1.B, respetivamente.**

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>3%</b>	<b>5%</b>	<b>7%</b>	<b>9%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
24/04/2024	2,8190	2,3230	2,1530	2,1200	2,1420	1,1000	1,3090
26/04/2024	3,5845	2,9730	2,6685	2,7905	2,6260	1,2610	1,3945
29/04/2024	3,5110	3,4355	3,3275	3,8510	3,3680	1,9605	1,7300
30/04/2024	4,1455	3,2420	3,3305	3,4710	3,4635	2,2020	2,2415
02/05/2024	3,8540	3,6540	3,7805	4,1970	3,7130	2,3815	2,3350
03/05/2024	4,1920	3,4300	3,2190	3,4310	3,3745	2,2735	2,1645
06/05/2024	4,0198	3,8470	3,9523	4,0790	3,7148	2,5620	2,4313

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>3%</b>	<b>5%</b>	<b>7%</b>	<b>9%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>
24/04/2024	773,71	629,10	736,92	825,78	568,41	314,12	362,79
26/04/2024	765,60	620,69	571,58	562,08	568,41	273,36	331,76
29/04/2024	994,24	811,10	721,37	757,21	708,92	318,31	355,76
30/04/2024	972,02	949,25	916,78	1075,34	928,94	516,30	450,57
02/05/2024	1165,91	891,17	917,68	959,95	957,68	585,71	597,11
03/05/2024	1076,26	1015,32	1053,81	1181,85	1033,25	637,65	624,17
06/05/2024	1180,30	947,59	884,30	947,89	930,90	606,36	574,89

**Apêndice B.3 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 2. A, respetivamente.**

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>65%</b>	<b>70%</b>	<b>75%</b>	<b>80%</b>	<b>85%</b>	<b>90%</b>
09/05/2024	0,07625	0,0816	0,0943	0,0716	0,09115	0,08105	0,0767
13/05/2024	0,45	0,5434	0,5496	0,5274	0,4636	0,3272	0,2827
14/05/2024	0,5644	0,6761	0,6929	0,7153	0,7123	0,4011	0,6312
15/05/2024	0,6573	0,9156	0,9451	0,9331	0,9351	0,6181	0,5351
16/05/2024	0,7509	1,0668	1,0367	1,089	1,2639	0,5969	1,056
17/05/2024	1,0405	1,2425	1,3335	1,525	1,5425	0,8782	0,6909
20/05/2024	1,438	1,093	1,3099	1,491	1,4861	1,2403	1,2588

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>65%</b>	<b>70%</b>	<b>75%</b>	<b>80%</b>	<b>85%</b>	<b>90%</b>
09/05/2024	15,07	16,53	20,00	13,81	19,14	16,38	15,20
13/05/2024	119,91	147,12	148,94	142,43	123,85	84,78	72,22
14/05/2024	153,30	186,54	191,60	198,36	197,46	105,84	173,10
15/05/2024	180,90	260,16	269,46	265,67	266,30	169,20	144,68
16/05/2024	209,18	308,44	298,71	315,66	373,75	162,90	304,94
17/05/2024	256,81	313,14	338,63	392,52	397,46	248,44	190,99
20/05/2024	433,95	316,96	389,42	452,79	451,04	365,78	372,03

**Apêndice B.4 - Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 2. B, respetivamente.**

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>35%</b>	<b>40%</b>	<b>45%</b>	<b>50%</b>
29/05/2024	0,1259	0,1038	0,10885	0,11325	0,10885	0,118	0,11325
31/05/2024	0,3525	0,3729	0,4671	0,4886	0,493	0,4878	0,4602
03/06/2024	0,7516	0,6448	0,7552	0,7749	0,9223	0,8386	1,1496
04/06/2024	0,751	0,874	1	0,928	0,997	1,093	1,069
05/06/2024	0,952	0,836	0,9035	0,962	1,0565	0,937	1,5115
06/06/2024	0,9065	0,713	0,753	1,063	1,137	1,1375	1,358

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>35%</b>	<b>40%</b>	<b>45%</b>	<b>50%</b>
29/05/2024	28,65	22,60	23,98	25,18	23,98	26,49	25,18
31/05/2024	91,96	97,77	124,86	131,11	132,39	130,87	122,86
03/06/2024	209,39	177,16	210,49	216,51	262,27	236,12	335,54
04/06/2024	176,69	210,64	245,56	225,59	244,72	271,41	264,73
05/06/2024	232,24	200,14	218,80	235,01	261,26	228,08	388,71
06/06/2024	219,63	166,22	177,24	263,07	283,67	283,81	345,51

**Apêndice B.5-Tabelas de medição da DO e da concentração de microalgas (mg/L) do ensaio 3, respetivamente.**

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>50%</b>	<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>50%</b>
18/06/2024	0,2088	0,2098	09/07/2024	1,9115	1,9650
19/06/2024	0,2704	0,2954	10/07/2024	2,0115	2,9410
20/06/2024	0,3645	0,3965	12/07/2024	2,1560	3,1290
21/06/2024	0,4564	0,4660	15/07/2024	2,2595	3,3605
25/06/2024	0,5412	1,2095	16/07/2024	2,2465	2,6325
26/06/2024	0,5764	0,9540	17/07/2024	2,2420	3,1560
27/06/2024	0,5848	1,0226	19/07/2024	2,4905	3,5060
28/06/2024	0,7250	1,8605	22/07/2024	2,9895	3,2950
01/07/2024	0,9920	0,9415	23/07/2024	3,0330	3,6320
02/07/2024	1,1170	2,1835	24/07/2024	2,8505	3,9905
03/07/2024	1,0230	1,9230	25/07/2024	2,4930	3,2870
04/07/2024	1,2745	1,4285	26/07/2024	2,8990	1,6930
05/07/2024	1,4675	2,2800	29/07/2024	2,6410	1,2830
08/07/2024	1,6565	2,9040	30/07/2024	2,5280	1,5960

<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>50%</b>	<b>Data</b>	<b>Controlo</b>	<b>50%</b>
18/06/2024	51,56	51,82	09/07/2024	502,29	517,59
19/06/2024	68,76	75,80	10/07/2024	530,91	801,63
20/06/2024	95,38	104,52	12/07/2024	572,44	857,44
21/06/2024	121,76	124,54	15/07/2024	602,31	926,69
25/06/2024	146,47	355,44	16/07/2024	598,56	710,83
26/06/2024	156,84	272,28	17/07/2024	597,25	865,49
27/06/2024	159,32	294,17	19/07/2024	669,35	970,51
28/06/2024	169,53	487,72	22/07/2024	815,99	907,04
01/07/2024	243,34	229,33	23/07/2024	828,90	1008,64
02/07/2024	278,10	580,37	24/07/2024	774,89	1118,12
03/07/2024	251,94	505,57	25/07/2024	134,02	180,93
04/07/2024	322,09	365,32	26/07/2024	157,84	440,06
05/07/2024	376,30	608,24	29/07/2024	142,66	324,47
08/07/2024	429,71	790,69	30/07/2024	136,06	412,58

## Apêndice C – Tabelas de extração de lípidos por gravimetria

### Apêndice C.1-Tabelas de extração por B&D adaptado.

Tentativa Nº	Amostras	Biomassa (g)	Peso inicial do tubo de ensaio (g)	Peso final do tubo de ensaio (g)	Teor de lípidos (g)
Tentativa 1	A1	0,005	29,6348	29,6379	0,0031
Tentativa 2	B1	0,0052	31,2392	31,2434	0,0042
	B2	0,0053	31,821	31,8264	0,0054
	B3	0,0055	26,9083	26,9219	0,0136
	B4	0,0055	32,17	32,1853	0,0153
	B5	0,0057	30,2683	30,271	0,0027

### Apêndice C.2-Tabelas de extração por Matyash *et al.* (2018) adaptado.

Tentativa Nº	Amostras	Biomassa (g)	Peso inicial do tubo de ensaio (g)	Peso final do tubo de ensaio (g)	Quantidade de lípidos (g)	Teor de lípidos (%)
Tentativa 1 (Processo 1)	1	0,0502	14,3197	14,3359	0,0162	32,27
	2	0,0505	14,1527	14,1650	0,0123	24,36
	3	0,0510	14,0450	14,1707	0,1257	246,47
	4	0,0498	14,1549	14,2617	0,1068	216,74
	5	0,0533	14,2823	14,4108	0,1285	188,83
	6	0,0528	14,2128	14,3125	0,0997	842,44
Tentativa 2	1	0,0604	31,2406	31,2465	0,0059	9,77
	2	0,0513	26,9094	26,9146	0,0052	10,14
	3	0,0562	28,7481	28,7537	0,0056	9,96

**Apêndice C.2-Tabelas de extração por Matyash *et al.* (2018) adaptado (continuação).**

Tentativa Nº	Amostras	Biomassa (g)	Peso inicial do tubo de ensaio (g)	Peso final do tubo de ensaio (g)	Quantidade de lípidos (g)	Teor de lípidos (%)
Tentativa 3	C – E1	0,0243	24,4394	24,4435	0,0041	16,87
		0,0283	26,9769	26,9843	0,0074	26,15
	9% – E1	0,0283	25,3058	25,3108	0,0050	17,67
		0,0290	19,1485	19,1522	0,0037	12,76
	15% – E1	0,0271	31,2394	31,2448	0,0054	19,93
		0,0287	29,6321	29,6377	0,0056	19,51
	C – E2.A	0,0280	25,7176	25,7234	0,0058	20,71
		0,0279	29,2989	29,3029	0,0040	14,34
	80% – E2.A	0,0283	28,7469	28,7529	0,0060	21,20
		0,0287	26,5337	26,5389	0,0052	18,12
	65% – E2.A	0,0274	27,4636	27,4669	0,0033	12,04
		0,0248	28,3924	28,3954	0,0030	12,10
	C – E2.B	0,0256	27,7268	27,7310	0,0042	16,41
		0,0283	28,6027	28,6067	0,0040	14,13
20% – E2.B	0,0273	28,3600	28,3645	0,0045	16,48	
	0,0291	26,1476	26,1553	0,0077	26,46	
Tentativa 4	C – E1	0,0287	28,6004	28,6054	0,0050	17,42
		0,0242	28,3898	28,3934	0,0036	14,88
	5% – E1	0,0279	31,2431	31,2419	-0,0012	-4,30
		0,0270	29,2987	29,3029	0,0042	15,56
	9% – E1	0,0284	26,5332	26,5370	0,0038	13,38
		0,0274	28,3586	28,3604	0,0018	6,57
	C – E2.A	0,0237	26,1460	26,1487	0,0027	11,39
		0,0253	26,6344	26,6361	0,0017	6,72
	90% – E2.A	0,0237	25,3074	25,3090	0,0016	6,75
		0,0250	28,7473	28,7512	0,0039	15,60
	20% – E2.B	0,0165	26,9783	26,9804	0,0021	12,73
		Sem valores	Sem valores	Sem valores	Sem valores	Sem valores
	40% – E2.B	0,0219	25,7184	25,7215	0,0031	14,16
		0,0219	27,4639	27,4664	0,0025	11,42
50% – E2.B	0,0222	24,4402	24,4430	0,0028	12,61	
	0,0302	27,7247	27,7265	0,0018	5,96	

## Apêndice D – Transesterificação Direta

### Apêndice D.1 – Valores da tentativa 1 de produção de biodiesel por transesterificação direta.

Protocolo	Amostras	Biomassa (g)	Peso inicial do tubo de ensaio (g)	Peso final do tubo de ensaio (g)	Quantidade de biodiesel (g)	Rendimento em biodiesel (g biodiesel /100 g de biomassa seca)
Torres et al (2017) - Processo 1	C – E4	0,1414	20,1024	20,1086	0,0062	4,38
		0,1390	20,2010	20,2115	0,0105	7,55
		0,1395	19,7703	19,7728	0,0025	1,79
	50% - E4	0,1276	19,7066	19,7127	0,0061	4,78
		0,1150	20,0890	20,0964	0,0074	6,43
		0,1070	17,0711	17,0837	0,0126	11,78

**Apêndice D.2 – Valores da tentativa 2 de produção de biodiesel por transesterificação direta.**

<b>Protocolo</b>	<b>Proveniência</b>	<b>Amostras</b>	<b>Biomassa (g)</b>	<b>Peso inicial do tubo de ensaio (g)</b>	<b>Peso final do tubo de ensaio (g)</b>	<b>Quantidade de biodiesel (g)</b>	<b>Rendimento em biodiesel (g biodiesel /100 g de biomassa seca)</b>
Dianursanti, Religia e Wijanarko (2015)	50% - E4	1	0,1163	19,2519	19,2835	0,0316	27,17
		2	0,1111	16,7441	16,7889	0,0448	40,32
	5% - E1	3	0,1253	20,1066	20,1244	0,0178	14,21
		4	0,1361	19,7304	19,7514	0,0210	15,43
		5	0,1244	16,7811	16,8119	0,0308	24,76
		6	0,1273	20,1571	20,1898	0,0327	25,69
Torres et al (2017) – Processo 1	Biomassa do aquário (secagem a 60 C, pelo menos por 24h)	7	0,3201	20,1798	20,1834	0,0036	1,12
		8	0,4861	19,7652	19,7693	0,0041	0,84
		9	0,3107	20,2070	20,2146	0,0076	2,45
Torres et al (2017) – Processo 3		10	0,4044	20,2104	20,2128	0,0024	0,59
		11	0,3031	19,4035	19,4042	0,0007	0,23
		12	0,3507	16,6567	16,6593	0,0026	0,74
		13	0,2817	20,1854	20,1904	0,0050	1,77
Mathimani et al. (2024)		14	0,5190	14,2517	14,2544	0,0027	0,52
		15	0,5068	14,2080	14,2121	0,0041	0,81
		16	0,6090	14,3275	14,3313	0,0038	0,62
		17	0,5067	14,0112	14,0123	0,0011	0,22

**Apêndice D.3 – Valores da tentativa 3 de produção de biodiesel por transesterificação direta.**

Proveniência	Amostras	Biomassa (g)	Peso inicial do tubo de ensaio (g)	Peso final do tubo de ensaio (g)	Quantidade de biodiesel (g)	Rendimento em biodiesel (g biodiesel /100 g de biomassa seca)
C – E1	1	0,1189	12,6792	12,6823	0,0031	2,61
	2	0,1354	12,7461	12,778	0,0319	23,56
	3	0,1288	12,7524	12,7568	0,0044	3,42
3% – E1	4	0,1428	12,7384	12,7416	0,0032	2,24
	5	0,144	12,7197	12,723	0,0033	2,29
	6	0,1985	12,6392	12,6422	0,003	1,51
7% – E1	7	0,127	12,6937	12,6985	0,0048	3,78
	8	0,1845	12,7727	12,7778	0,0051	2,76
50% – E3	9	0,1414	12,7214	12,7265	0,0051	3,61
	10	0,1622	12,8174	12,8229	0,0055	3,39
	11	0,1439	12,6763	12,6801	0,0038	2,64
	12	0,1648	12,7592	12,7652	0,006	3,64
	13					
	14					
	15					
	16					

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

---

### DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter conduzido este trabalho académico com integridade. Não plagiei ou apliquei qualquer forma de uso indevido de informações ou falsificação de resultados ao longo do processo que levou à sua elaboração.

Declaro que o trabalho apresentado neste documento é original e de minha autoria, não tendo sido utilizado anteriormente para nenhum outro fim.

Declaro ainda que tenho pleno conhecimento do Código de Conduta Ética do P.PORTO.

ISEP, Porto, 10 de outubro de 2024

*Ana Catarina Pinto Ribeiro*