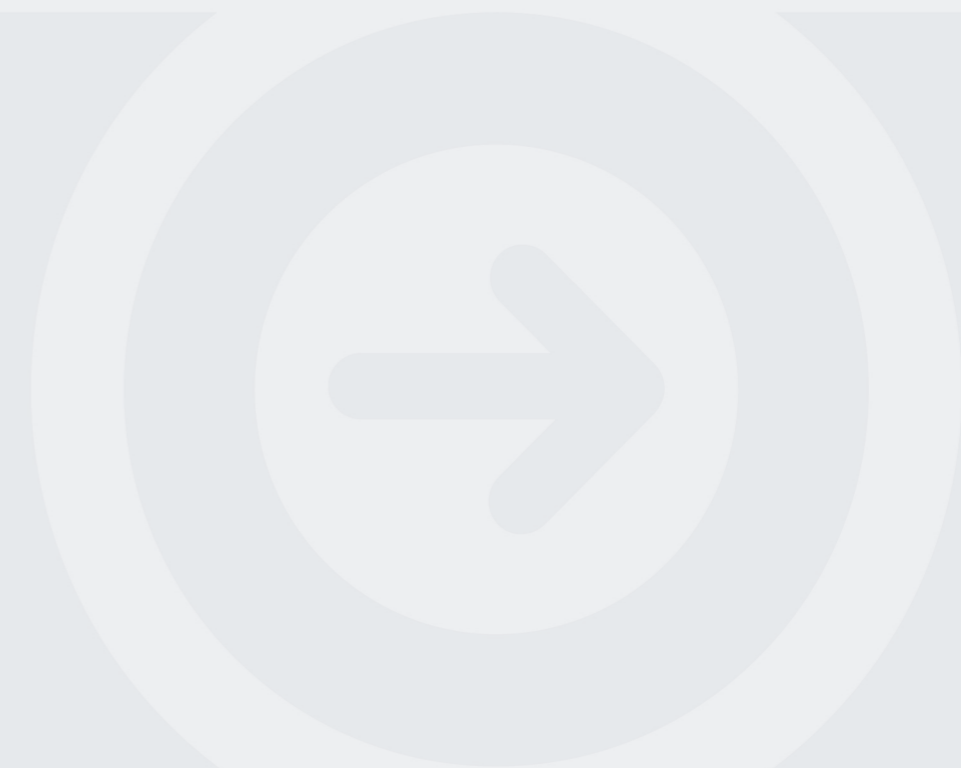


Cultivo e avaliação do potencial da microalga *Chlorella zofingiensis* para a produção de biodiesel e produtos de valor acrescentado

JOÃO MANUEL FERNANDES DE SOUSA
Novembro de 2015



Mestrado em Engenharia Química

Tecnologias de Proteção Ambiental DEQ



Disciplina: Dissertação / Estágio

Orientação: Nídia Caetano, ISEP

Porto, Novembro de 2015

Agradecimentos

Queria começar por agradecer à Engenheira Nídia Caetano, por toda a confiança depositada e por todo o apoio demonstrado ao longo de todo o trabalho.

Aproveito também para agradecer ao Engenheiro António Crispim, pela ajuda, compreensão e apoio ao longo de todo o processo.

Agradeço ao Cláudio Silva por toda a ajuda, paciência, disponibilidade, e essencialmente pelos conselhos fornecidos. Agradeço também à Ana pela ajuda nesta reta final.

Também agradeço a todos os meus amigos, principalmente à Telma, Bruno, João e Carolina, por todos os momentos partilhados e por todo o apoio fornecido ao longo desta etapa.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio prestado ao longo destes anos, essencialmente ao meu pai e irmã por estarem sempre a meu lado e incentivarem a prosseguir o meu percurso académico.

Por fim agradeço à minha namorada, Marisa, pelo apoio, alegria, incentivo, confiança e amor depositado todos os dias para a conclusão desta etapa da minha vida.

Sumário

O presente trabalho tem como objetivo o cultivo da microalga *Chlorella zofingiensis*, e a avaliação da sua potencial aplicação na produção de biodiesel e de produtos de valor acrescentado, de entre os quais se destacam os antioxidantes.

Com o intuito da produção de biocombustível é necessário efetuar o cultivo da microalga num volume que permita a obtenção de elevada quantidade de biomassa para a concretização do trabalho. Além deste biocombustível, existe ainda a possibilidade de valorização de alguns produtos com valor comercial, como é o caso da astaxantina, a saber na área farmacêutica, alimentar ou até mesmo cosmética.

O cultivo da microalga foi feito em meio *Bold's Basal Medium* (BBM), inicialmente em matrizes de 5 L e, quando se obteve uma cultura suficientemente densa, inocularam-se fotobiorreatores de 50 L.

Conseguiu-se atingir uma concentração máxima de 0,76 g/L, no reator de 5 L, após cerca de 6 semanas de ensaio. Por sua vez, em fotobiorreatores de 50 L, a concentração máxima obtida foi de 0,4 g/L, após 4 semanas de ensaio.

Nestas culturas foi possível obter-se uma percentagem lipídica de 7 %, apresentado concentração de pigmentos por litro de cultura na ordem dos 10 mg/L, 4 mg/L e 2 mg/L de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais, respetivamente.

Com esta percentagem lipídica recuperaram-se 400 mg de óleo, obtendo-se posteriormente 280 mg de biodiesel. Pela análise à amostra de biodiesel obtida foi possível obter o perfil lipídico desta microalga, quando cultivada em meio BBM, sendo 41% de ácido palmítico (C16:0), 9% de ácido esteárico (C18:0), 27% de ácido oleico (C18:1) e 23% de ácido linoleico (C18:2).

Os resultados obtidos mostram que a *Chlorella zofingiensis* é uma microalga com interesse potencial para a produção de clorofila e carotenóides, mas não para o óleo para a produção de biodiesel.

Palavras-Chave: Astaxantina, biodiesel, biomassa, *Chlorella zofingiensis*, microalga.

Abstract

This work aims at the cultivation of *Chlorella zofingiensis*, a microalga with potential application in the production of biodiesel and value added products, among which the antioxidants stand out.

For biofuel production it is necessary to cultivate this microalga in a volume that allows to obtain high amount of biomass for extracting enough oil for completing the work. Besides biodiesel, there is the possibility of recovering some products of commercial value, such as astaxanthin, for use namely in the pharmaceutical area, food or even cosmetics industries.

The cultivation of the microalga was done using *Bold's Basal Medium (BBM)* initially in 5 L flasks and when a sufficiently dense culture was reached it was used to inoculate 50 L photobioreactors.

It was possible to reach a maximum concentration of 0.76 g / L in a 5 L reactor after about 6 weeks assay. On the other hand, in 50 L photobioreactors, the maximum concentration achieved was 0.4 g / L after 4 weeks of testing.

From these cultures it was possible to obtain a lipid percentage of 7%, and a pigment concentration in the order of 10 mg / L, 4 mg / L and 2 mg / L of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids, respectively.

For this culture with this lipid percentage it was obtained 400 mg of oil, yielding 280 mg of biodiesel after transesterification. The analysis of the biodiesel sample obtained allowed to get the lipid profile of this microalga, when cultivated in BBM medium, having 41% palmitic acid (C16:0), 9% stearic acid (C18:0), 27% oleic acid (C18:1) and 23% linoleic acid (C18:2).

The results obtained show that *Chlorella zofingiensis* is a microalga with potential interest for chlorophyll and carotenoids production but not for oil for biodiesel production.

Keywords: Astaxanthin, biodiesel, biomass, Chlorella zofingiensis, microalgae.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do trabalho	1
1.2. Enquadramento legal	2
2. Estado da Arte.....	5
2.1. Conceito.....	5
2.2. Biocombustível.....	5
2.3. Bioetanol	5
2.4. Biodiesel	6
2.5. Microalgas.....	7
2.6. Filo das algas.....	8
2.7. Composição nutricional e estrutural das microalgas.....	9
2.8. Cultivo.....	11
2.9. Colheita da biomassa.....	13
2.10. Liofilização.....	13
2.11. Extração dos óleos	14
2.12. Produção de biocombustíveis	15
2.13. A transesterificação	16
2.14. Transesterificação com recurso a catálise homogénea	16
2.15. Transesterificação com recurso a catálise heterogénea	17
2.16. Fermentação	18
2.17. Redução do ácido pirúvico.....	18
2.18. Fermentação alcoólica.....	19
2.19. Microalga <i>Chlorella zofingiensis</i>	19
3. Métodos e Técnicas	21
3.1. Preparação do meio de cultura	21
3.2. Preparação do inóculo	21
3.3. Esterilização de água com hipoclorito de sódio.....	22

3.4. Monitorização das culturas.....	23
3.4.1. Densidade ótica – concentração em biomassa.....	23
3.4.2. pH.....	24
3.4.3. Temperatura.....	24
3.4.4. Iluminação.....	24
3.4.5. Arejamento.....	25
3.5. Colheita.....	25
3.6. Liofilização.....	25
3.7. Determinação da concentração de pigmentos na microalga.....	26
3.8. Quantificação dos lípidos.....	26
3.9. Extração do óleo.....	27
3.10. Transesterificação.....	29
3.11. Perfil em FAME's.....	31
4. Resultados e Discussão.....	33
4.1. Reatores de 1 L e 5 L.....	33
4.2. Ensaio de cultivo com adição de glicose.....	37
4.3. Teste de esterilização de água com hipoclorito de sódio.....	39
4.4. Culturas em tanques de 50 L.....	40
4.5. Produção de pigmentos.....	44
4.6. Produção de lípidos.....	45
4.7. Extração de óleo.....	45
4.8. Transesterificação.....	46
5. Conclusão e sugestão para trabalhos futuros.....	47
6. Referências Bibliográficas.....	49
7. ANEXOS.....	53
ANEXO A – Curvas de crescimento nos reatores de menores dimensões.....	55
ANEXO B – Crescimento da <i>Chlorella zofingiensis</i> no ensaio com adição de glicose.....	57
ANEXO C – Crescimento da <i>Chlorella zofingiensis</i> no ensaio com esterilização com hipoclorito de sódio (HS).....	59

ANEXO D – Crescimento da <i>Chlorella zofingiensis</i> nos tanques de 50 L	61
ANEXO E – Quantificação de pigmentos na microalga <i>Chlorella zofingiensis</i>	63
ANEXO F – Liofilização de microalgas	65
ANEXO G – Quantificação de lípidos	67
ANEXO H – Perfil de FAME's	69
ANEXO I – Curva de calibração para a Absorvância vs concentração de <i>Chlorella zofingiensis</i>	75

Índice de Figuras

Figura 2-1 - Crescimento das microalgas (Barsanti e Gualteri, 2006)-.....	13
Figura 2-2 - Esquema dos tipos de transformações de biomassa microalgal (Adaptado de Wang et al., 2008)	16
Figura 2-3 - Esquema das reações de hidrólise e saponificação dos ácidos gordos	17
Figura 2-4 - Imagens representativas da microalga <i>C. zofingiensis</i> em situação normal (A) e de stress (B) (Liu et al., 2012).	20
Figura 3-1 - Extração de óleo em ultrassom.	27
Figura 3-2 - Separação de fases.	27
Figura 3-3 - Fase superior com óleo e hexano e aspeto da biomassa após os dois processos de extração.	28
Figura 3-4 - Evaporador rotativo com a amostra a destilar e recuperação de hexano.	28
Figura 3-5 - Óleo obtido após o processo de extração.	29
Figura 3-6 - Amostra após esterificação.	29
Figura 3-7 - Amostra após adição de água.....	30
Figura 3-8 - Amostra após adição de 300 mL de água.	30
Figura 3-9 - Amostra antes e após de evaporação de clorofórmio (obtenção de biodiesel). ..	31
Figura 4-1 – Curva de crescimento da <i>C. zofingiensis</i> no reator 1 (5 L).	33
Figura 4-2 - Variação de pH no reator 1.	33
Figura 4-3 – Evolução da temperatura no reator 1.	34
Figura 4-4 - Ilustração dos reatores 1 (à esquerda), 3 (à direita) e 4 (ao centro).	34
Figura 4-5 – Curva de crescimento das culturas dos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L).....	35
Figura 4-6 - Variação de pH das culturas nos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L).	35
Figura 4-7 – Evolução de temperatura das culturas nos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L). ..	36
Figura 4-8 - Crescimento da cultura no reator 4 (balão de 6 L).....	36
Figura 4-9 – Evolução de pH na cultura do reator 4 (balão de 6 L).....	37
Figura 4-10 - Variação de temperatura na cultura do reator 4 (balão de 6 L).....	37
Figura 4-11 - Crescimento da cultura de <i>Chlorella zofingiensis</i> no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.....	38
Figura 4-12 - Variação de pH da cultura no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.	38
Figura 4-13 - Variação de temperatura da cultura no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.....	39
Figura 4-14 - Crescimento das culturas observadas nos reatores para o teste de esterilização da água.	40

Figura 4-15 – Tanques de cultura de 50 L (1 à esquerda e 2 à direita).....	40
Figura 4-16 - Crescimento das culturas de <i>Chlorella zofingiensis</i> em meio BG-11, nos tanques 1 e 2.	41
Figura 4-17 - Imagem representativa do aspeto das microalgas, obtida a microscópio a 40x, sem contaminação (A) e com contaminação (B).	41
Figura 4-18 - Variação de pH nas culturas em meio BG-11, dos tanques de 50 L (1 e 2).....	42
Figura 4-19 - Variação de temperatura das culturas em meio BG-11, nos tanques de 50 L (1 e 2).....	42
Figura 4-20 – Cultivo de <i>Chlorella zofingiensis</i> em meio BBM, em tanques de 50 L (3 à esquerda e 4 à direita).....	43
Figura 4-21 – Crescimento da <i>Chlorella zofingiensis</i> em meio BBM, nos tanques 3 e 4.....	43
Figura 4-22 - Variação de pH nas culturas dos tanques 3 e 4.	44
Figura 4-23 - Variação de temperatura nas culturas dos tanques 3 e 4.....	44
Figura 4-24 - Imagem representativa da separação de fases originadas na quantificação de lípidos.....	45
Figura H-1 - Dados obtidos no CG para a <i>Chlorella zofingiensis</i>	71
Figura H-2 - Dados obtidos no CG da <i>Arthrospira maxima</i>	73
Figura I-1 - Curva de calibração da <i>Chlorella zofingiensis</i> – absorvância vs conc.biomassa seca (g/L)	75

Índice de Tabelas

Tabela 1-1 - Legislação em vigor em Portugal relacionada com os biocombustíveis.....	3
Tabela 2-1 - Comparação de microalgas com outras matérias-primas para a produção de biodiesel. (Adaptado de Mata <i>et al</i> , 2010)	8
Tabela 2-2 - Diferentes tipos de microalgas correspondente teor de óleo. (Adaptado de Sakthivel <i>et al.</i> ,2011.).....	10
Tabela 2-3 - Ácidos gordos presentes com maior frequência nas microalgas. (Adaptado de (Sakthivel <i>et al.</i> , 2011)).....	11
Tabela 4-1 - Concentração de pigmentos na <i>Chlorella zofingiensis</i>	45
Tabela A-1 - Dados de crescimento no reator 1.	55
Tabela A-2 - Dados de crescimento no reator 2.	55
Tabela A-3 - Dados de crescimento no reator 3.	56
Tabela A-4 - Dados de crescimento no reator 4.	56
Tabela B-1 - Dados de crescimento no reator com adição de glicose (0,75 g/L).	57
Tabela B-2 – Dados de crescimento no reator sem adição de glicose.....	57
Tabela C-1 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 0.....	59
Tabela C-2 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 2.....	59
Tabela C-3 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 4.....	59
Tabela C-4 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 6.....	59
Tabela C-5 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 8.....	60
Tabela D-1 - Dados de crescimento no tanque 1.....	61
Tabela D-2 - Dados de crescimento no tanque 2.....	61
Tabela D-3 - Dados de crescimento no tanque 3.....	61
Tabela D-4 - Dados de crescimento no tanque 4.....	62
Tabela E-1 - Massa de amostra pesada para determinação de pigmentos e respetivas concentrações.....	63
Tabela E-2 - Dados das absorvâncias medidas para determinação de pigmentos.....	63
Tabela E-3 - Dados obtidos para clorofila <i>a</i> (Ca), clorofila <i>b</i> (Cb) e carotenoides totais (Car).	63
Tabela E-4 - Percentagens de pigmentos.....	63
Tabela F-1 - Dados obtidos após liofilização.	65
Tabela G-1 - Dados obtidos na quantificação de lípidos.....	67
Tabela H-1 - Dados de CG para a <i>Chlorella zofingiensis</i>	69
Tabela H-2 - Dados de CG para a <i>Arthrospira maxima</i>	69
Tabela I-1 - Dados para a curva de calibração da <i>Chlorella zofingiensis</i> (concentração vs absorvância).....	75

Lista de abreviaturas

BBM – *Bold's Basal Medium*

GEE – *Gases de efeito de estufa*

FAEE – *Fatty Acid Ethyl Esters*

FAME – *Fatty Acid Methyl Esters*

1. Introdução

1.1. Enquadramento do trabalho

A escassez dos combustíveis fósseis e a correspondente contínua subida do seu preço, associadas ainda à necessidade de autonomização das nações dependentes de outros países para disporem de energia, têm sido o motor da procura por energia e combustíveis provenientes de fontes renováveis.

Os biocombustíveis apresentam-se com potencial interesse significativo, uma vez que podem ser usados nos motores convencionais sem necessidade de qualquer tipo de modificações, e podem contribuir para a redução da emissão de gases de efeito de estufa (GEE). No entanto, a sua produção tem sido feita com recurso a fontes de biomassa usadas na alimentação humana ou animal, ou recorrendo a solo fértil, usado na agricultura, o que levanta de imediato problemas associados às questões de ética.

As microalgas existem na natureza sob as mais diversas formas e em diversos ambientes, podendo ser cultivadas com poucos recursos e em solos não aráveis. A existência de 22000 a 27000 estirpes diferentes confere-lhes uma diversidade tal que permite que as microalgas sejam usadas para os mais distintos fins, desde a alimentação humana ou animal, passando pela cosmética ou pela indústria farmacêutica e ainda na produção de biocombustíveis líquidos (como o biodiesel ou o bioetanol) ou gasosos (como o biogás). No entanto, a tecnologia disponível presentemente ainda não permite produzir comercialmente biocombustíveis de microalgas (nomeadamente o biodiesel). Questões como a necessidade de remover as grandes quantidades de água que constitui o meio de cultura, a necessidade de secagem/desidratação das microalgas e de extração de óleos ou dos hidratos de carbono, ou até mesmo a necessidade de utilização de processos de conversão dos óleos microalgais a biocombustível específicos e/ou mais complexos, fazem com que a realização de estudos baseados na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis seja extremamente interessante e necessária.

Neste trabalho pretende-se avaliar a possibilidade de produzir um biocombustível a partir da biomassa de microalgas, obtendo simultaneamente produtos de valor acrescentado que permitam tornar o processo economicamente viável. A microalga utilizada neste trabalho é a *Chlorella zofingiensis*, uma microalga verde capaz de acumular teores de óleo que podem atingir os 52% em peso da sua massa seca. A escolha desta microalga para o estudo em questão deveu-se ao facto de se tratar de uma microalga com uma quantidade de óleos aceitável para a produção de biocombustíveis, mas também pelo

fato de se poderem obter compostos de maior valor, como é o caso de pigmentos como a astaxantina.

Para se conseguir obter quantidades de biomassa que sejam adequadas para a produção de biocombustíveis, como biodiesel ou bioetanol, é necessário o cultivo da microalga de modo a obter grandes quantidades de biomassa.

1.2. Enquadramento legal

A produção e comercialização de biocombustíveis está regulamentada, pelo que é necessário fazer uma avaliação da legislação em vigor nesta atividade. Existe legislação relativa aos biocombustíveis, e à sua produção, como se pode verificar em seguida.

A Diretiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009 faz o enquadramento geral, incluindo algumas definições como biomassa ou biocombustível. Outro documento em vigor é o Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de Março, onde também se encontram as definições referidas, bem como em que tipos de produção e de consumo é que esta legislação se aplica, e as salvaguardas necessárias para a produção de biocombustíveis.

Estes não são os únicos documentos legislativos, existindo muitos outros complementares, de entre os quais se faz referência a alguns mais significativos, como os que se listam na tabela seguinte.

Tendo em conta o trabalho subjacente a este projeto, é também necessário conhecer a legislação em vigor relacionada com o tratamento dos efluentes gerados ao longo do processo, pois por questões ambientais estes têm que respeitar alguns valores limite de emissão e sofrer tratamento de forma a poderem ser descarregados no domínio público hídrico ou no coletor municipal.

Para ter conhecimento dos valores legais recorre-se ao Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto, onde se encontram algumas definições tais como *águas residuais industriais*, *valor limite de emissão* ou *valor máximo recomendado*. Constam ainda os valores limite de emissão bem como os valores recomendados para os diversos parâmetros.

Tabela 1-1 - Legislação em vigor em Portugal relacionada com os biocombustíveis.

Diploma Normativo	Data de publicação	Descrição
Portaria n.º 13/2009	13/01/2009	Fixa o valor da isenção do imposto sobre os produtos petrolíferos e energéticos (ISP) para o biocombustível substituto do gasóleo e revoga a Portaria n.º 3-A/2007, 2 de Janeiro
Resolução do Conselho de Ministros n.º 21/2008	5/02/2008	Aprova a estratégia para o cumprimento das novas metas nacionais de incorporação de biocombustíveis nos combustíveis fósseis.
Decreto-Lei n.º 89/2008	30/05/2008	Estabelece as normas referentes às especificações técnicas aplicáveis ao propano, butano, GPL, auto, gasolinas, petróleos, gasóleos rodoviários, gasóleo colorido e marcado e as condições para a comercialização de misturas de biocombustíveis com gasolina e gasóleo em percentagens superiores a 5%.
Portaria n.º 134/2009	2/02/2009	Fixa o valor da isenção do imposto sobre os produtos petrolíferos e energéticos (ISP) para o biocombustível substituto do gasóleo.
Decreto-Lei n.º 49/2009	26/02/2009	Estabelece mecanismos de promoção de biocombustíveis nos transportes rodoviários.
Portaria n.º 543/2010	21/07/2010	Atualiza o cálculo do preço máximo de venda, pelos produtores, às entidades que introduzem gasóleo rodoviário no consumo, do biodiesel cuja incorporação seja obrigatório.
Decreto-Lei n.º 117/2010	25/10/2010	Estabelece os critérios de sustentabilidade para a produção e utilização de biocombustíveis e biolíquidos e define os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis para os anos 2011 a 2020, transpondo os artigos 17.º a 19.º e os anexos III e V da Diretiva n.º 2009/28/CE, do Conselho e do Parlamento Europeu, de 23 de Abril, e o n.º 6 do artigo 1.º e o anexo IV da Diretiva n.º 2009/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril.
Portaria n.º 41/2011	19/01/2011	Estabelece o preço máximo de venda de biodiesel pelos produtores de biocombustíveis às entidades obrigadas a efetuar a sua incorporação no gasóleo rodoviário.

2. Estado da Arte

2.1. Conceito

O consumo de energia a nível global, como petróleo, gás natural, carvão etc., tem vindo a aumentar ao longo do tempo, originando um aumento de exploração destes recursos, e conduzindo progressivamente a um declínio destes recursos naturais. Com esta preocupação em mente, tem-se vindo a desenvolver métodos para obtenção de fontes de energia sustentáveis, de modo a substituir os combustíveis fósseis que se encontram em escassez. Fontes de energia como os biocombustíveis têm vindo a tornar-se cada vez mais importantes. Pela sua produção, espera-se obter novas oportunidades na diversificação de fontes de combustíveis que venham a substituir os combustíveis fósseis (Mata et al., 2010).

2.2. Biocombustível

Designa-se por biocombustível o combustível líquido ou gasoso para transportes, produzido a partir de biomassa. Biomassa é a fração biodegradável de produtos e resíduos provenientes da agricultura (incluindo substâncias animais e vegetais), da silvicultura e das indústrias conexas, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos.

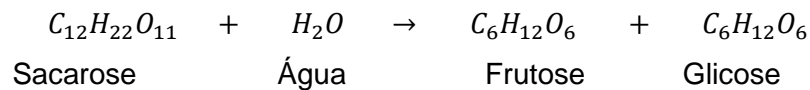
Para a obtenção de biocombustíveis pode-se recorrer a biomassas obtidas a partir de, por exemplo, óleo de palma, *jatropha* e microalgas. As microalgas têm vindo a receber uma crescente atenção devido à sua alta taxa fotossintética, levando a valores médios de $6,9 \times 10^4$ células/ml/h (Suali & Sarbatly, 2012)

Os biocombustíveis podem ser classificados em três categorias, com base no tipo de biomassa utilizada, a saber: primeira geração, segunda geração e terceira geração. Os biocombustíveis mais comuns de primeira geração e segunda geração são o biodiesel produzido a partir de oleaginosas convencionais como o girassol, a palma e a soja, e o bioetanol produzido a partir do milho ou da cana-de-açúcar, que podem substituir o *diesel* e a gasolina, respetivamente (L. D. Zhu et al., 2014).

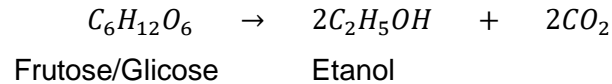
2.3. Bioetanol

O bioetanol é um dos biocombustíveis mais utilizados nos dias de hoje, sendo um substituto para a gasolina. É produzido principalmente através de fermentação de açúcar, embora também possa ser gerado por reação de etileno com vapor de água. De modo a produzir açúcares a partir de biomassa, esta é pré-tratada com ácidos ou enzimas, fazendo com que a celulose e hemiceluloses se hidrolisem em glucose, sacarose e outros açúcares simples, sendo posteriormente fermentados a etanol.

A reação química deste processo é representada abaixo:



Seguindo-se a seguinte reação:



O etanol é um líquido incolor, sendo biodegradável e com baixa toxicidade. É um combustível com alto índice de octano, tendo vindo a ser um elemento potenciador na gasolina. Ao misturar etanol na gasolina é possível uma maior oxigenação da mistura de modo a que esta apresente uma queima mais completa e consequentemente reduza as emissões poluentes. O bioetanol apresenta inúmeras vantagens comparativamente com outros combustíveis, a saber: o facto de ser proveniente de uma fonte renovável, apresentar uma baixa emissão de gases com efeito de estufa, extensão de vida dos recursos naturais usados na produção do combustível, baixa toxicidade, redução das emissões de monóxido de carbono provocando um melhoramento da qualidade do ar e facilidade de integração no sistema de distribuição de combustível. (Ho et al., 2013)

2.4. Biodiesel

O biodiesel é um éster metílico de óleos vegetais, designadamente *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME), produzido a partir da colza, soja e palma. Biodiesel é o nome dado ao combustível alternativo, produzido a partir de recursos domésticos e renováveis. Não contém petróleo, contudo pode ser utilizado para obter misturas com combustíveis derivados do petróleo. Este tipo de combustível é simples de usar, biodegradável, não tóxico e livre de compostos sulfurados e aromáticos. O processo de produção de biodiesel dá-se através de transesterificação, onde há simultaneamente a produção da glicerina a partir da gordura ou óleo vegetal. A glicerina produzida no processo pode ser valorizada posteriormente em indústrias de sabão, por exemplo. O biodiesel, tal como o bioetanol, apresenta inúmeras vantagens, a saber: é uma energia renovável, um ótimo lubrificante, apresenta baixo risco de explosão e consequentemente é de fácil transporte e armazenamento, promove a diminuição dos gases de efeito de estufa devido à sua queima completa e fácil inserção no sistema de distribuição de combustível.

A norma que rege a qualidade do gasóleo a nível europeu (EN 590) estipula que o gasóleo pode incorporar até 7% (% v/v) de biodiesel, desde que cumpra as especificações constantes da norma a que este está sujeito (EN 14214).

Tal como referido anteriormente, estes biocombustíveis são produzidos a partir de biomassa e constituem por isso energias renováveis, contribuindo para uma diminuição das emissões de combustão. Por estas razões estes biocombustíveis têm vindo a ser cada vez mais cobijados como uma alternativa aos combustíveis fósseis já existentes. (Chen et al., 2015)

2.5. Microalgas

O interesse da utilização de microalgas provem do seu potencial para a produção de biomassa utilizando eficientemente a luz solar. As microalgas podem ser encontradas por todo o mundo, situando-se preferencialmente em águas, mas também podem ser encontradas na superfície do solo. As microalgas são seres microscópicos unicelulares, em que podem ser referidas como toda a alga microscópica *stricto sensu*, onde podem ser incluídas as espécies mais comuns, assim como as bactérias fotossintéticas (cianobactérias) classificadas anteriormente por *Cyanophyceae*. Embora as microalgas sejam promissoras para a obtenção de uma nova fonte de energia, os custos associados para tal tornam difícil o seu processamento, sendo necessário mais tempo para se descobrirem formas de tornar este processo mais viável (Perez-Garcia et al., 2011; Williams & Laurens, 2010). As microalgas possuem diversas características que asseguram uma boa produção de biocombustíveis, tais como:

- Elevada eficiência fotossintética, conduzindo a maiores produtividades por área, do que as culturas vegetais convencionais;
- Elevada remoção de dióxido de carbono por área de cultura ocupada;
- Elevada capacidade de síntese e acumulação de lípidos;
- Ciclo de vida curto, indicando um crescimento muito rápido;
- Fácil manuseamento por se cultivarem em meio líquido;
- Devido ao curto período de vida (1 a 10 dias, consoante o processo) apresentam uma produção não sazonal, o que possibilita colheitas contínuas durante todo o ano;
- Capacidade de maior produção específica por unidade de área, com aplicação de biorreactores.

O potencial que as microalgas apresentam para o desenvolvimento da produção de biocombustíveis é muito superior comparativamente ao potencial que outras espécies apresentam. Segue-se um quadro representativo dessa mesma comparação.

Tabela 2-1 - Comparação de microalgas com outras matérias-primas para a produção de biodiesel. (Adaptado de Mata *et al*, 2010)

Planta	Óleo de semente (% p/p)	Óleo obtido (L/ha.ano)	Área de cultura (m ² / kg _{biodiesel} /ano)	Produção de biodiesel (kg _{biodiesel} /ha.ano)
Milho	44	172	66	152
Linho	33	363	31	321
Soja	18	636	18	562
Jatropha	28	741	15	656
Camelina	42	915	12	809
Colza	41	974	12	862
Girassol	40	1070	11	946
Óleo de palma	36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor óleo)	30	58700	0,2	51927
Microalga (teor médio óleo)	50	97800	0,1	86515
Microalga (alto teor óleo)	70	136900	0,1	121104

2.6. Filo das algas

As algas podem-se organizar em 5 tipos de grandes grupos (Filos ou Divisões), onde se destacam principalmente pela coloração e pela natureza das substâncias de reserva que apresentam. Os *Filos* são: *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria*, *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta* e *Chromophyta*.

O grupo *Cyanophyta* ou *Cyanobacteria* caracteriza-se pelo facto da coloração das algas ser azul-esverdeada, avermelhada ou de tonalidade roxa. As células possuem uma organização procariótica, não apresentando um núcleo organizado, sem plastos e os pigmentos aparecem em lamelas fotossintéticas na periferia do citoplasma, atribuindo às células uma tonalidade mais homogénea.

O grupo *Chlorophyta* é caracterizado pela tonalidade verde nas algas. As algas deste grupo apresentam plastos verdes, o que lhes dá esta coloração, sendo a principal substância de reserva o amido intraplastidial.

O grupo *Euglenophyta*, assim como o *Chlorophyta* também apresenta plastos verdes, apresentando também uma coloração deste tipo. Por sua vez a principal substância de reserva para este tipo de algas é o paramido, uma substância quimicamente vizinha do amido.

O grupo *Rhodophyta*, ao contrário dos grupos mencionados anteriormente, apresenta plastos de tonalidade roxa e vermelha, podendo também apresentar uma tonalidade azul ou verde-azeitona. As algas que são classificadas como pertencentes a este grupo são maioritariamente marinhas, e apresentam como principal substância de reserva o amido florídeo.

Por fim, o grupo *Chromophyta* é representado por algas com tonalidade dos tipos castanha, dourada e amarelo-esverdeado, devendo-se as referidas colorações aos plastos. Um aspeto a salientar é o facto de estas possuírem como principal substância de reserva os lípidos.

2.7. Composição nutricional e estrutural das microalgas

A composição nutricional das microalgas inclui-se essencialmente lípidos, hidratos de carbono, proteínas e nutrientes vestigiais, incluindo vitaminas e antioxidantes. Contudo, o seu conteúdo pode variar consoante a espécie de microalga, ou mesmo estirpes e condições de crescimento, incluindo o fornecimento de nutrientes, temperatura, luz solar, etc. Dependendo das condições de crescimento é possível, para a mesma alga, a obtenção de composições em lípidos, hidratos de carbono e proteínas diferentes, podendo cada um destes constituintes variar entre 15 a 50% de massa em peso seco (Algae4feed).

Estas espécies podem apresentar uma estrutura procariótica (onde não possuem núcleo organizado nem plastos) ou eucariótica (possuindo um núcleo organizado e um ou vários plastos). Dado o seu tamanho diminuto, estas apresentam um esqueleto rígido de forma a ser possível o combate da força da gravidade tal como as plantas superiores, podendo ser organismos unicelulares ou coloniais e possuírem ou não mobilidade (Doran, 2005).

As microalgas apresentam uma capacidade acrescida de ajuste ou alteração da sua estrutura interna, composição fisiológica e bioquímica, demonstrando um poder de sintetizar uma vasta variedade de compostos, tendo em linha de conta as condições ambientais ou de

cultivo, como é o caso da concentração de nutrientes (Renaud et al., 2002; Sayegh et al., 2011).

As algas são capazes de produzir diversos tipos de lípidos, podendo estes funcionar como compostos estruturais em membranas, fonte de energia, metabolitos e produtos de armazenamento. Os lípidos são essencialmente compostos de glicerol, açúcares, ou bases de ácidos gordos esterificados, podendo apresentar dois tipos de polaridade, neutra ou polar. Os lípidos polares correspondem aos principais constituintes das membranas, tais como glicolípidos e fosfolípidos. Por sua vez, os lípidos neutros são essencialmente triglicéridos e ácidos gordos. Consoante o número de ligações duplas presentes nas cadeias dos ácidos gordos, as microalgas podem apresentar ácidos insaturados (50-65%), destacando-se principalmente os ácidos palmitóico (C16:1), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolénico (C18:3), assim como ácido palmítico (C16:0). Quanto ao ácido linolénico e a ácidos gordos com 4 ligações duplas é de se salientar que é necessário ter uma atenção especial, uma vez que a norma EN 14214 limita a sua quantidade no biodiesel, para este poder ser considerado de qualidade, em 12 e 1% respetivamente. Na Tabela 2-2 é possível evidenciar a diferença de percentagem de óleo que vários tipos de microalgas possuem (Jos, 2013).

Tabela 2-2 - Diferentes tipos de microalgas correspondente teor de óleo. (Adaptado de Sakthivel et al., 2011.)

Microalga	Teor em óleo (% p/p seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp</i>	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp</i>	16-37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp</i>	25-33
<i>Nanochloris sp</i>	20-35
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloropsis sp</i>	31-68
<i>Neochloris oseoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium sp</i>	50-77
<i>Tetraselmis suecia</i>	15-23

É possível evidenciar os tipos de ácidos gordos encontrados mais frequentemente nas microalgas.

Tabela 2-3 - Ácidos gordos presentes com maior frequência nas microalgas. (Adaptado de (Sakthivel et al., 2011))

Ácido gordo	Comprimento da cadeia: número de ligações duplas	Composição do óleo (peso/lípidos totais)
Ácido palmítico	16:0	12-1
Ácido palmitoléico	16:1	55-7
Ácido esteárico	18:0	1-2
Ácido oleico	18:1	58-60
Ácido linoleico	18:2	4-20
Ácido linolénico	18:3	4-30

Com o intuito de maximizar a produtividade do óleo para a produção de um biocombustível, para além do teor lipídico, é necessário ter em conta a taxa de crescimento das microalgas e a composição dos ácidos gordos, assim como as condições de cultivo.

2.8. Cultivo

O crescimento das microalgas é influenciado diretamente por diversificados fatores, a saber: os abióticos como a luminosidade (qualidade, quantidade), temperatura, nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidade e produtos químicos tóxicos; os bióticos tais como a existência de microrganismos patogénicos (bactérias, fungos, vírus), a competição por parte de outras microalgas; e os operativos como o arejamento deficiente, diluições mal efetuadas e a frequência da colheita (Mata et al., 2010).

O modo *batch* é o método habitualmente mais utilizado para o cultivo de microalgas. Consiste em introduzir num recipiente (reator) uma determinada quantidade de meio de cultura e o respetivo inóculo no início do cultivo (Richmond, 2004). Devido à não ocorrência quer de entradas ou saídas de matéria, haverá um esgotamento dos nutrientes com o passar do tempo (Barsanti e Gualtieri, 2006). Para este tipo de cultivo, e em determinadas espécies, existe uma necessidade de agitação garantindo assim uma troca eficaz de nutrientes e gases na interface células-água. É principalmente pela introdução de um dado caudal de arejamento que a agitação é fornecida aos sistemas (Richmond, 2004).

Até ocorrer o esgotamento de fatores limitantes, a densidade das microalgas tem um aumento exponencial, sendo possível referenciar a diminuição ao longo do tempo da concentração de nutrientes como um desses fatores. Também os produtos excretados pelas células sofrem um aumento com o crescimento das microalgas, sendo este mais notório aquando do estabelecimento da fase estacionária, havendo a possibilidade de se tornarem inibitórios do crescimento (Doran, 2005).

Uma vez consumidos totalmente os recursos (nutrientes), as culturas acabam por morrer, salvo o caso de se fornecer novamente os nutrientes ao meio de cultivo. A cultura

pode ter quer iluminação artificial ou natural. Face à sua facilidade, o cultivo em *batch* é muito utilizado a nível industrial (Barsanti e Gualtieri, 2006).

A população, num cultivo do tipo *batch*, apresenta um padrão de crescimento de acordo com uma curva sigmóide, seguindo diversas fases de crescimento (Barsanti e Gualtieri, 2006). As várias fases de crescimento da população são:

- **Fase Lag (1)** – trata-se da fase de adaptação às condições do novo meio de cultura por parte das microalgas, tendo em conta alterações ao nível de nutrientes, salinidade, luminosidade, irradiação, entre outros. Sendo que esta fase apresenta uma taxa de crescimento nula (Andersen, 2005);
- **Fase de aceleração (2)** – é uma fase intermédia entre a Lag e a exponencial, onde a adaptação já está completa (Barsanti e Gualtieri, 2006);
- **Fase exponencial (3)** – começa a haver o crescimento e multiplicação das microalgas, alcançando o valor máximo de multiplicação celular (Barsanti e Gualtieri, 2006). Durante a fase exponencial a duplicação da biomassa nas microalgas ocorre em 24 horas (Mata et al., 2010);
- **Fase de desaceleração (4)** – dá-se aquando do decréscimo da taxa de crescimento celular, podendo estar na sua causa a diminuição da quantidade de luz que chega às células, a diminuição de nutrientes, alteração de pH, o défice de CO₂, entre outros fatores físicos e químicos, que se tornam limitantes ao crescimento (Barsanti e Gualtieri, 2006);
- **Fase estacionária (5)** – permanece inalterada a concentração das células no seu valor máximo, até haver um esgotamento dos nutrientes (Richmond, 2004);
- **Fase de morte da cultura (6)** – caracteriza-se por uma taxa de crescimento negativa, sendo também denominada por *crash*. Tendo em conta a acumulação dos produtos de excreção tóxicos no meio de cultivo e a inexistência de nutrientes, este deteriora-se de forma significativa, sendo impossível o sustento da cultura. Existe um decréscimo abrupto da densidade celular, fazendo com que a cultura entre em colapso (Barsanti e Gualtieri, 2006).

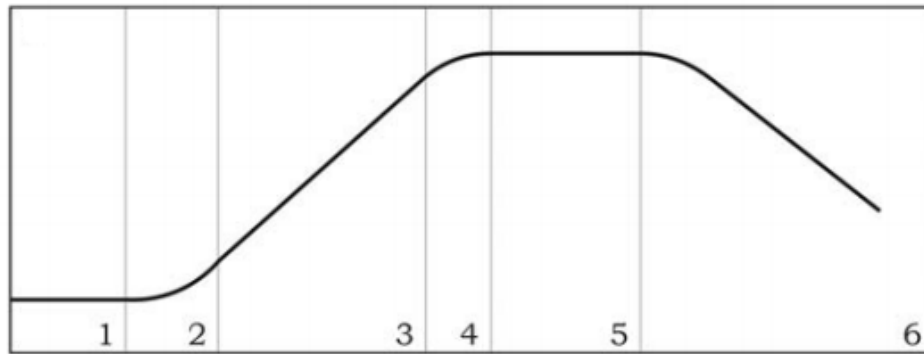


Figura 2-1 - Crescimento das microalgas (Barsanti e Gualteri, 2006)-

2.9. Colheita da biomassa

Quando se determina que a cultura se encontra na fase estacionária, ou seja, na fase onde a quantidade de microalgas é maior, procede-se à colheita da biomassa. Esta colheita é realizada por uma ou mais etapas de separação sólido-líquido.

Embora vários métodos de colheita possam ser utilizados, como por exemplo a floculação, centrifugação, ultrassons e material carregado positivamente, a centrifugação, filtração e floculação são as técnicas mais utilizadas, principalmente em grande escala, embora sejam de assinalar limitações, podendo nem sempre ser as técnicas mais vantajosas.

2.10. Liofilização

A liofilização é uma técnica também denominada de criodesidratação ou criosecagem. Para a sua execução é necessário congelar previamente a amostra que se quer liofilizar, de modo a transformar soluções aquosas numa mistura de duas fases, cristais de gelo e solução concentrada de amostra. As condições mais adequadas à congelação dependem do que vai ser liofilizado. Porém, ao aplicar liofilização, se houver a presença de grandes cristais de gelo, com uma geração de uma rede cristalina, obtém-se uma boa estrutura porosa, o que facilita a libertação de vapor de água no processo, assim como a entrada de água numa posterior reidratação.

Nesta técnica é possível distinguir duas etapas: desidratação primária, onde ocorre a maior perda de água da amostra, e desidratação secundária, que visa retirar os vestígios de água ainda possivelmente existentes. Na desidratação primária, a água é removida por sublimação, que ocorre sob vácuo e com adição de calor. Parte deste calor é consumido quando as moléculas passam do estado sólido para o gasoso, o que leva a uma diminuição

da temperatura da amostra congelada. A fase terminal desta primeira etapa pode ser evidenciada pelo aumento da temperatura da amostra num valor próximo ao ambiente.

A fase secundária, também denominada de dessorção, acontece após todo o gelo ter sido todo eliminado. Nesta fase a amostra é levada a temperaturas entre 20 e 60 °C, mantendo-se o vácuo, ocorrendo assim a evaporação dos vestígios de água ainda existentes.

Esta técnica apresenta como vantagens a conservação das componentes nutritivas da amostra, facilidade de a transformar em pó, facilidade de rehidratar e mínima perda de atividade em materiais sensíveis ao calor. Quanto às desvantagens desta técnica, é possível destacar os custos do processo, assim como o tempo necessário para que uma amostra fique liofilizada (4 dias) (Terroni et al., 2013).

2.11. Extração dos óleos

Após a colheita da biomassa microalgal é necessário proceder à extração dos óleos que estas possam conter de modo a, posteriormente, se proceder à produção de um biocombustível. Para a extração existem técnicas convencionais que podem ser utilizadas como: técnica de prensagem, a partir de solventes ou através da utilização de dióxido de carbono em condições supercríticas. Contudo outras técnicas menos estudadas, por enquanto, também podem promover a extração dos óleos de microalgas eficientemente, como é o caso da utilização de enzimas e a aplicação de ultrassons.

A prensagem como técnica para a extração de óleos utiliza força mecânica de modo a forçar a rutura das células das microalgas. É utilizada em vários métodos de extração de óleo, contudo o seu *design* tem de ser adaptado ao tipo de alga que se pretende. Esta técnica apresenta como vantagens a não utilização de produtos químicos, é apropriada para algas com alto teor de óleo, e é capaz de extrair até cerca de 80% do óleo existente na alga. Por sua vez, apresenta desvantagens como a permanência de biomassa residual no óleo prensado (especialmente quando as microalgas têm dimensões muito reduzidas, o que as leva a escapar juntamente com o óleo), é uma técnica com elevado custo, assim como elevados custos de manutenção e maioritariamente é necessário realizar posteriormente uma extração por solvente.

A extração por solventes utiliza solventes como benzeno, éter, álcool e o hexano para degradar as paredes celulares das algas, podendo ser utilizada em conjunto com a prensagem mecânica. O óleo obtido dissolve-se no solvente e é recolhido após destilação do solvente. Esta técnica apresenta como vantagens o facto de possuir um custo praticamente desprezável, e consegue-se obter até cerca de 95% dos óleos contidos nas microalgas. Relativamente às limitações desta técnica é de se referir o uso de químicos mais ou menos tóxicos.

O dióxido de carbono em condições supercríticas como fonte para extração de óleos das algas é um processo que utiliza dióxido de carbono líquido a altas temperaturas e pressões, em que o dióxido de carbono penetra nas células e faz com que estas sofram um processo de ruptura. É uma técnica muito utilizada em várias indústrias, como por exemplo as indústrias de obtenção de cafeína a partir dos grãos de café. É uma técnica que apresenta como vantagens um baixo impacto ambiental assim como uma alta quantidade e qualidade de óleo obtido e produto de biomassa. Porém, como limitações, apresenta elevados encargos financeiros, é um processo altamente sintonizado e sensível, e funciona melhor quando as algas já se encontram parcialmente rompidas, sendo um processo com algum risco, uma vez que se trabalha com elevadas pressões.

Por sua vez, a utilização de enzimas é um processo mais recente para a obtenção de óleos de microalgas, utilizando as enzimas para promover a degradação das paredes celulares, utilizando água como solvente. Este processo não apresenta impacto ambiental significativo, não utiliza químicos tóxicos e não é necessário um “bolo seco” para a extração de óleos. Porém é relativamente mais caro que o processo de extração por hexano.

Outro processo para a extração de óleos é a aplicação de ultrassons, que usa ondas ultrassónicas para criar bolhas no solvente. Aquando do colapso das bolhas, cria-se uma onda de choque que faz com que as paredes das células se quebrem. Esta técnica pode ser utilizada em conjunto com a extração enzimática, apresentando vantagens iguais às da extração enzimática, embora as limitações desta técnica sejam um pouco diferentes, visto haver um consumo elevado de energia, e este tipo de tecnologia ainda não está demonstrada a nível industrial (OOIL).

2.12. Produção de biocombustíveis

A fotossíntese é o primeiro passo para a conversão da luz em energia química e é responsável pela produção de matéria-prima necessária para os biocombustíveis. A síntese de açúcares e amido traduz-se na produção de bioetanol, enquanto a síntese de óleos se traduz na produção de biodiesel.

Existe um grande número de potenciais caminhos para a conversão de biomassa microalgal em combustíveis. Estes caminhos podem ser classificados em três categorias: os que processam extratos de microalgas, como lípidos e hidratos de carbono, para produzir moléculas de combustível; os que processam toda a biomassa microalgal para produzir moléculas de combustível; e aqueles que se focam na produção direta de microalgas para recuperar moléculas de combustível sem a necessidade da sua extração. O processo de transformação de biomassa de microalgas pode ser bioquímico, termoquímico, químico e

combustão direta. A Figura 2-2 esquematiza os tipos de transformação que a biomassa pode sofrer.

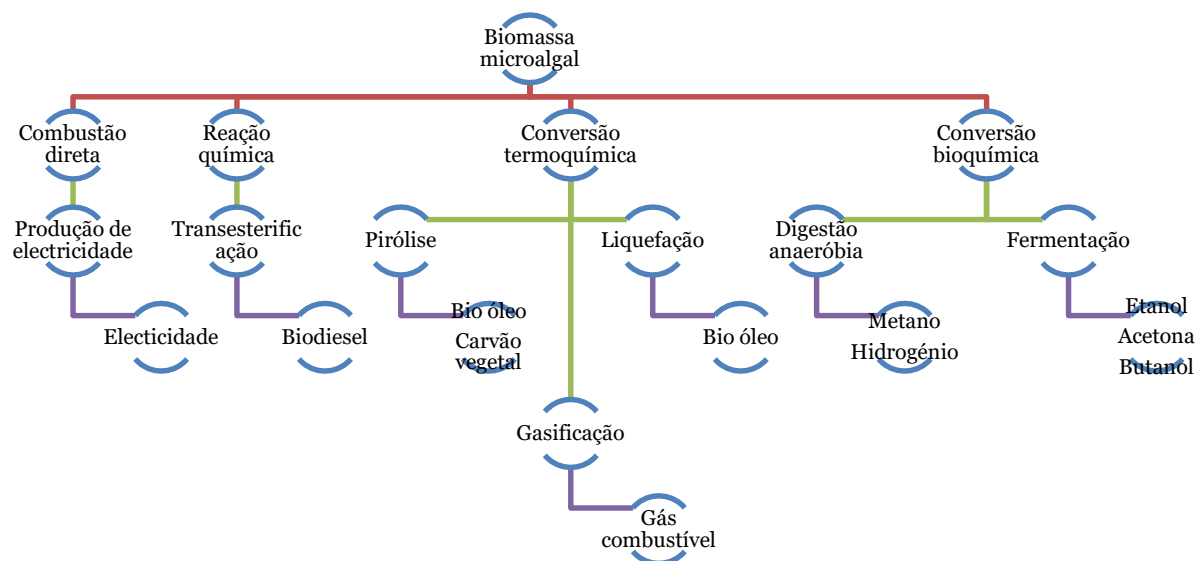


Figura 2-2 - Esquema dos tipos de transformações de biomassa microalgal (Adaptado de Wang et al., 2008)

2.13. A transesterificação

Na reação de transesterificação de óleos vegetais, a catálise homogénea permite obter velocidades de reação superiores, em comparação à catálise heterogénea, uma vez que não ocorrem limitações difusionais. Contudo, a recuperação do catalisador é muito mais difícil ou impossível, o que torna o processo mais moroso e economicamente dispendioso.

2.14. Transesterificação com recurso a catálise homogénea

A produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais pode ocorrer com recurso à utilização de catalisadores homogéneos, sejam eles ácidos ou básicos. Na transesterificação com recurso à catálise homogénea ácida, é utilizado como catalisador um ácido inorgânico, geralmente ácido sulfúrico ou sulfónico. Este método necessita de temperaturas relativamente elevadas e grande quantidade de álcool e mesmo sendo catalisado, apresenta uma baixa velocidade de reação, pelo que não é utilizado a nível industrial.

Atualmente os processos industriais para a produção de biodiesel utilizam catalisadores homogéneos fortemente alcalinos (hidróxido de sódio ou de potássio, dissolvido em metanol). Estes catalisadores, para além de serem nocivos para o ambiente, têm o

inconveniente de hidrolisarem os triglicéridos levando à formação de sabões (Figura 2-3), e consequentemente, a emulsões persistentes.

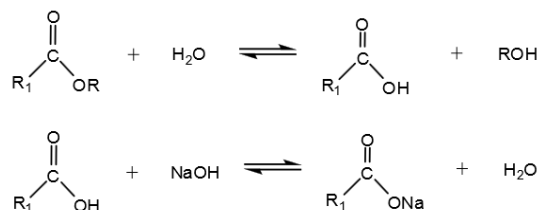


Figura 2-3 - Esquema das reações de hidrólise e saponificação dos ácidos gordos

A água surge mesmo quando os reagentes são usados secos, devido à reação entre o hidróxido e o álcool. Para além disso, a qualidade do biodiesel produzido é adversamente afetada pela presença do catalisador, pelo que este tem de ser removido.

Contudo os procedimentos de purificação exigidos requerem etapas de separação que, para além de demoradas e economicamente dispendiosas, podem levar a sérios problemas ambientais devido ao consumo de grandes quantidades de água e à descarga de efluentes básicos. Este problema pode ser ultrapassado pela utilização de catalisadores heterogéneos (Santos, 2012).

2.15. Transesterificação com recurso a catálise heterogénea

As vantagens dos catalisadores heterogéneos sobre os correspondentes homogéneos são óbvias, uma vez que podem ser facilmente separados da mistura reacional e reutilizados. Deste modo, além de evitarem os passos de purificação requeridos quando são empregues bases homogéneas, o uso de catalisadores suportados em materiais de elevada área superficial permite ainda eliminar ou reduzir substancialmente a corrosão dos equipamentos que ocorre quando a catálise tem lugar em fase homogénea.

Uma variedade de catalisadores alcalinos e ácidos heterogéneos incluindo óxidos metálicos, hidróxidos e sais suportados em materiais de elevada área superficial como zeólitos, sílicas mesoestruturadas e resinas de troca iónica têm sido referenciados para obtenção de biodiesel. Neste contexto, também a utilização de guanidinas tem sido estudada. Sendo bases orgânicas fortes mas menos corrosivas do que as bases minerais, são boas alternativas para catálise básica homogénea pelo que, a sua utilização em catálise heterogénea tem sido considerada, quando ancoradas em materiais mesoporosos com elevada área superficial.

Além da vantagem associada à maior facilidade de recuperação e/ou reciclagem dos catalisadores heterogéneos, os recentes avanços na catálise heterogénea têm também evidenciado que a estrutura ou textura dos catalisadores sólidos afeta diretamente a

seletividade da reação. Por este motivo a utilização de catalisadores dispersos ou ancorados em polímeros pode também ser vantajosa uma vez que a escolha apropriada do ambiente polimérico pode regular a adsorção/absorção seletiva de reagentes e produtos, e aumentar a atividade catalítica. Desta forma, a utilização de membranas catalíticas de base polimérica nas quais são imobilizados catalisadores básicos sólidos suportados em sílicas mesoporosas, ou a utilização de membranas poliméricas tornadas cataliticamente ativas através da ancoragem de grupos funcionais adequados, podem ser alternativas bastante interessantes para a otimização do processo de produção de biodiesel por metanólise de óleos vegetais (Santos, 2012).

2.16. Fermentação

A fermentação é um processo anaeróbio que ocorre na ausência de oxigénio, realizado por certas espécies de bactérias e leveduras, durante a qual moléculas orgânicas são utilizadas na produção de ATP.

Os processos de fermentação envolvem conjuntos de reações enzimáticas que ocorrem no hialoplasma:

- Glicólise - ocorre a degradação da glicose em ácido pirúvico;
- Redução do ácido pirúvico - conduz à formação dos produtos de fermentação.

Balanço à glicólise:

- Formam-se 2 NADH;
- Gastam-se 2 ATP;
- Formam-se 4 ATP;
- Formam-se 2 ácidos pirúvicos.

O que dá um rendimento energético global de 2 ATP.

2.17. Redução do ácido pirúvico

O ácido pirúvico, ou moléculas orgânicas que se formam a partir deste, são aceitadoras de eletrões do NADH, o que permite regenerar o NAD⁺. O NAD⁺ pode, assim, voltar a ser utilizado na oxidação da glicose com formação de 2 ATP. Os produtos finais da fermentação dependem da molécula orgânica que é produzida a partir do ácido pirúvico.

2.18. Fermentação alcoólica

Após a glicólise, o ácido pirúvico experimenta uma descarboxilação (liberta CO₂), originando aldeído acético que, por redução, origina o etanol (composto altamente energético)-

2.19. Microalga *Chlorella zofingiensis*

A *Chlorella* tem vindo a ser comercialmente aplicada para alimentação humana, animal e para a obtenção de compostos bioativos. Nos últimos anos, tem-se assistido a um aumento do potencial de utilização de *Chlorella* para a produção de biodiesel, devido à sua grande produtividade lipídica e à sua adaptação ambiental. Estudos recentes mostram que a *Chlorella zofingiensis* pode ser utilizada como uma fábrica de produção de óleo, aquando da privação de azoto no meio (Zhu et al., 2014), utilizando águas residuais para o seu crescimento (Yuan et al., 2013) e pode ser utilizada em promissoras aplicações comerciais. Outros estudos também mostraram que esta microalga apresenta altos teores de lípidos e concentração em biomassa (Feng et al., 2012) embora este tipo de microalga tenha sido mais utilizada na produção de astaxantina, um pigmento muito utilizado a nível cosmético, alimentar e farmacêutico (Ip & Chen, 2005).

A *Chlorella zofingiensis* é uma microalga de tonalidade verde, tendo sido associada ao género *Chlorella*, mas alguns estudos classificam esta microalga como *Muriella*, *Mychonastes*, ou *Chromochloris*, indicando uma distância evolucionária da “verdadeira” *Chlorella*. Este tipo de microalga apresenta células imóveis e unicelulares de forma esférica, em que o seu tamanho varia entre os 2 a 15 µm de diâmetro. Com a formação de esporos este tipo de microalga reproduz-se assexuadamente, produzindo células filhas a partir de células parentais imóveis. Esta fase assexuada geralmente é composta por três fases: crescimento, amadurecimento e divisão (Liu et al., 2014).

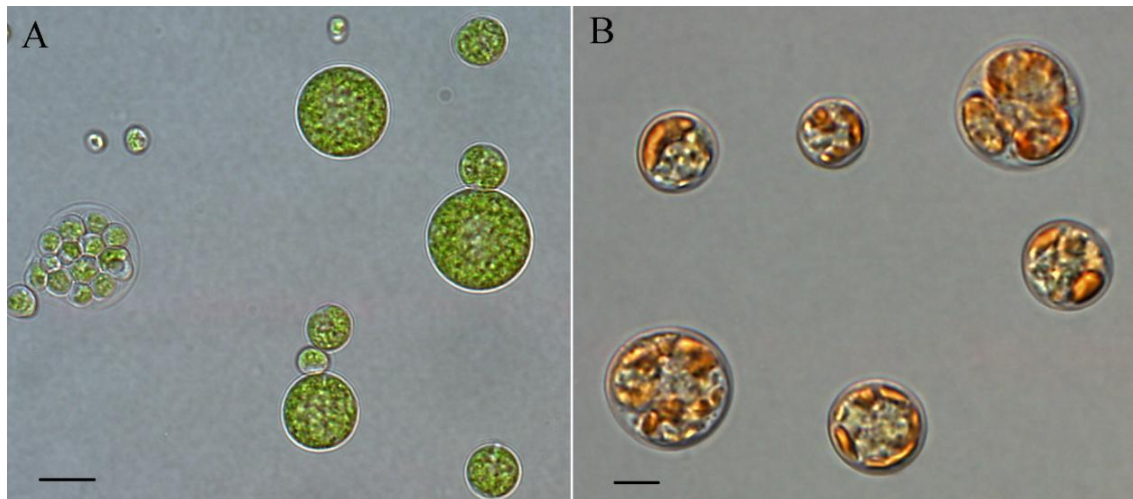


Figura 2-4 - Imagens representativas da microalga *C. zofingiensis* em situação normal (A) e de stress (B) (Liu et al., 2012).

Esta microalga contém clorofila *a* e *b*, o que confere a capacidade de fotossíntese, e carotenoides primários e secundários. Como as plantas e outros tipos de microalgas a *C. zofingiensis* sintetiza e acumula carotenoides primários, como é o caso da luteína, β -caroteno, etc., nos cloroplastos. Por sua vez, os carotenoides secundários como a astaxantina, cantaxantina e adonixantina podem ser encontrados em corpos de lípidos no exterior dos cloroplastos. A acumulação destes carotenóides secundários é normalmente associada a condições de *stress* para as algas, em que estas são protegidas de danos oxidativos por este tipo de carotenoides, uma vez que estes são considerados antioxidantes, quebrando espécies de oxigénio reativo (ROS) e outros radicais livres. Um exemplo, quando a *C. zofingiensis* é cultivada em meio sem azoto e com altas intensidades de luz, produz carotenóides secundários, dos quais cerca de 70% é astaxantina (Liu et al., 2014).

Muitos estudos mostram que a *C. zofingiensis* apresenta um crescimento rápido, com uma alta taxa de crescimento ($0,769 \text{ dia}^{-1}$), e que pode ser cultivada em diversas condições (Imamoglu, 2007; Ip and Chen, 2005; Sun et al., 2008). Liu et al. (2010, 2011) mostraram que esta microalga apresenta uma forte capacidade de acumular lípidos, com uma percentagem de 52% (p/p) em cultivos “*indoor*”. Assim, estes estudos demonstram o potencial que esta microalga apresenta para produzir biocombustíveis. Contudo, não existem muitos estudos sobre a sua adequação para a produção de biocombustíveis quando cultivada em condições “*outdoor*”. Assim sendo, é necessário um estudo sistemático do crescimento e acumulação de lípidos desta microalga em condições “*outdoor*”.

3. Métodos e Técnicas

3.1. Preparação do meio de cultura

A *Chlorella zofingiensis* foi cultivada num meio de cultura padrão, o *Bold's Basal Medium* (BBM) (Bischoff et al., 1963), que é preparado, usando os reagentes de qualidade p.a., do seguinte modo: 25 mg de NaNO₃, 17,5 mg KH₂PO₄, 10 mg de K₂HPO₄, 7,5 mg de MgSO₄.7H₂O, 2,5 mg de CaCl₂.2H₂O, 2,5 mg de NaCl, 3,1 mg de KOH, 0,498 mg de FeSO₄.7H₂O, 1,142 mg de H₃BO₃, 0,882 mg de ZnSO₄.7H₂O, 0,144 mg de MnCl₂.7H₂O, 0,071 mg de MoO₃, 0,157 mg de CuSO₄.5H₂O, 0,049 mg de Co(NO₃)₂.6H₂O, 5 mg de Na₂EDTA, 100 mL de água destilada.

Inicialmente, realizou-se o cultivo da microalga em matrizes de 1 L, seguindo-se matrizes de 5 L, com o meio de cultura especificado, de modo a comprovar a viabilidade do seu crescimento. Averiguada a sua viabilidade, passou-se essa cultura para tanques de maiores dimensões (50 L) para proceder ao crescimento da cultura densa de microalgas. É nestes tanques que as maiores dificuldades de cultivo irão surgir, uma vez que, ao contrário dos matrizes de 5 L, em que o sistema se encontrava fechado, e o meio era previamente esterilizado, e totalmente controlado, os tanques de grande capacidade são preparados sem cuidados especiais. Por sua vez a microalga apresenta alguma suscetibilidade para a ocorrência de contaminações.

Após o cultivo em tanques de 50 L procedeu-se à colheita da biomassa microalgal que foi obtida durante a fase de cultivo. Esta colheita foi efetuada por centrifugação, após a sedimentação da biomassa pretendida por um período de três dias.

Obtida a biomassa, esta foi liofilizada com o intuito de se obter uma quantidade de biomassa seca pronta para se efetuar os estudos seguintes.

3.2. Preparação do inóculo

A microalga *Chlorella zofingiensis* foi fornecida pelo estudante de doutoramento Cláudio Silva, tendo sido obtida a partir de uma estirpe *C. zofingiensis* SAG-211.14 adquirida da *Experimental Phycology and Culture Collection of Algae* da Universidade de Goettingen (Alemanha).

A preparação dos ensaios iniciais foi feita a partir de um matraz de 1 L com uma concentração de 1,5 g/L de biomassa seca de *C. zofingiensis*. Para o efeito, colocou-se 800 mL desta cultura num matraz de 5 L, perfazendo o volume com meio de cultura BBM.

Deste matraz foram realizados posteriormente mais 2 cultivos em matrizes de 5 L e num balão de 6 L. Para cada um dos matrizes de 5 L foi retirado 1 L da solução inicial e o volume foi completado com meio *BBM*. À cultura inicial sobranete também foi adicionado novo

meio de cultura após se ter retirado 1 L para inocular outros ensaios. Por sua vez para a preparação do balão de 6 L foi retirado 1 L da cultura inicial e o volume foi completado também com meio *BBM*.

Após várias semanas de observação a microscópio e de análises aos ensaios foi possível verificar que as microalgas cresceram sem contaminações embora o seu crescimento não tenha sido tão rápido quanto o esperado e descrito nos estudos já realizados anteriormente (Feng et al., 2012; Zhang et al., 2012).

Após se ter atingido concentrações relativamente altas, transferiram-se estas culturas para dois tanques de 50 L, utilizando-as como inóculo. Nesta fase do crescimento das microalgas em tanques foi mudado o meio de cultura para BG11 (Stanier et al., 1971), uma vez que segundo estudos com este tipo de meio e nas mesmas condições das que se utilizaram foram conseguidos valores muito promissores quer de concentração de biomassa seca quer de percentagem lipídica desta microalga, num curto espaço de tempo (Feng et al., 2011).

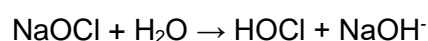
O meio BG-11 é composto por 15 g/L de NaNO₃ (1), 2,0 g/500 mL de K₂HPO₄ (2), 3,75 g/500 mL de MgSO₄.7H₂O (3), 1,80 g/500 mL de CaCl₂.2H₂O (4), 0,30 g/500 mL de ácido cítrico (5), 0,30 g/500 mL de citrato de amónio férrico verde (6), 0,05 g/500 mL de EDTANA₂ (7), 1 g/500 mL de Na₂CO₃ (8). Para os micronutrientes (9) este meio é composto por 2,86 g/L de H₃BO₃, 1,81 g/L de MnCl₂.4H₂O, 0,22 g/L de ZnSO₄.7H₂O, 0,39 g/L de Na₂MoO₄.2H₂O, 0,08 g/L de CuSO₄.5H₂O, 0,05 g/L de Co(NO₃)₂.6H₂O. Para a execução do meio foram utilizados 100 mL da solução (1), 10 mL de cada solução (2-8) e 1 mL da solução (9).

Após duas semanas de observações e análises concluiu-se que os valores de concentração de biomassa obtidos eram muito inferiores aos esperados. Estes tanques foram mantidos com arejamento constante e luz durante aproximadamente 8 semanas e os valores esperados continuaram a não ser atingidos.

Por fim, voltou-se a inocular mais dois tanques de 50 L mas com meio *BBM*, contudo neste foi imposto uma maior intensidade de luz e maior arejamento, com o intuito de se aprimorar as condições para um melhor desenvolvimento da microalga, tentando-se assim atingir os valores de concentração esperados.

3.3. Esterilização de água com hipoclorito de sódio

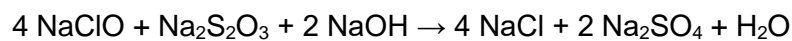
O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um composto muito eficaz na purificação de água. É utilizado em várias áreas, como purificação de superfícies, remoção de odores e branqueamento. A sua desinfeção é assegurada pela seguinte reação química com a água:



O ácido hipocloroso é dividido em ácido clorídrico (HCl) e um átomo de oxigénio (O), em que o oxigénio é um oxidante muito forte.

Esta técnica de desinfeção apresenta algumas vantagens, como é o caso de o hipoclorito de sódio ser de fácil e seguro transporte e armazenamento, a sua dosagem é simples, é tão eficaz como o cloro gasoso nos processos de desinfeção e produz desinfetantes residuais. Por sua vez apresenta desvantagens como, ser uma substância corrosiva e perigosa, é necessário ter cuidados no seu manuseamento e no seu despejo e não deve estar em contato com o ar pois desintegra-se facilmente. Relativamente a microrganismos como *Giardia Lambia* e *Cryptosporidium*, este desinfetante não consegue atuar sobre estes microrganismos.

Após a utilização de hipoclorito de sódio como desinfetante de água, esta fica com uma concentração elevada de cloro. De modo a remover-se o cloro existente na água, utilizou-se tiosulfato de sódio, um agente de remoção de cloro. Este atua com o hipoclorito de sódio de acordo com a seguinte reação:



Assim, o cloro é removido da água que se pretendeu purificar e obtém-se água esterilizada. Esta é uma técnica que apresenta uma elevada eficácia com baixos custos monetários associados (Grubbs & Ladshawz, 1991)

3.4. Monitorização das culturas

A monitorização das culturas envolveu a medição de diversos parâmetros, nomeadamente: densidade ótica (relacionada com a concentração de biomassa), o pH do meio (indicativo do estado das culturas), a temperatura e a intensidade luminosa e o arejamento.

3.4.1. Densidade ótica – concentração em biomassa

A absorvância foi um dos parâmetros mais importantes na primeira fase deste trabalho experimental, uma vez que foi através da medição de absorvância ao comprimento de onda de 680 nm que foi possível verificar se a microalga se encontrava em crescimento ou não. Assim, conforme o valor medido a este comprimento de onda, foi possível determinar a concentração de biomassa em massa seca, por correlação com a reta de calibração previamente obtida (Silva, 2015). Para o efeito usou-se um espectrofotómetro UV-Vis Pharmaspec UV-1700 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

3.4.2. pH

Outro parâmetro importante ainda nesta fase experimental foi o pH. O valor de pH da cultura (monitorizando com um medidor SCHOTT Instruments GmbH) apresentou uma tendência para subir, devido ao facto de as microalgas realizarem fotossíntese, consumindo o dióxido de carbono existente no meio e libertando oxigénio. A redução da concentração de CO₂ origina a elevação do pH. Assim, é possível concluir que a obtenção de valores elevados de pH significa que o meio contém uma concentração de dióxido de carbono baixa, sendo este prejudicial para o desenvolvimento das microalgas.

3.4.3. Temperatura

Outro parâmetro que foi monitorizado devido à sua influência no desenvolvimento de microrganismos foi a temperatura. Este é também um parâmetro importante pois as microalgas são muito sensíveis à temperatura, tendo assim havido a necessidade de se controlar os valores de temperatura obtidos. A temperatura foi um parâmetro de difícil controlo. O crescimento das microalgas foi realizado durante o verão, e por isso mesmo, com temperaturas mais altas o seu crescimento pode ter sido afetado, não se conseguindo atingir maiores valores de concentração de biomassa.

3.4.4. Iluminação

A intensidade luminosa foi outro dos parâmetros avaliados, uma vez que a quantidade de luz é um fator essencial para o desenvolvimento das microalgas. Desta forma, foi medida a intensidade de luz que chegava aos reatores, usando-se um luxímetro LI-190 ligado a um medidor de luz LI-250A (LI-COR Inc., USA). A luz incidente sobre as microalgas, principalmente em reatores de grandes dimensões, deve ser intensa, com o intuito de haver uma maior penetração de luz no meio de cultura. As microalgas que se encontram na periferia do reator conseguem absorver maior quantidade de luz do que as que se encontram no centro do reator. Com isto, o que maioritariamente acontece, quando a agitação é insuficiente, é que às microalgas que se encontram no centro do reator não chega luz, fazendo com que estas não se desenvolvam tão bem como as que se encontram na periferia do reator. Com o intuito de prevenir que tal aconteça, um aumento da intensidade de luz faz com que esta tenha um poder de penetração maior, podendo assim chegar ao centro do reator. Assim, se o meio apresentar uma concentração baixa de microalgas, a intensidade luminosa necessária para chegar ao centro do reator é menor que a necessária para uma concentração mais elevada de microalgas.

3.4.5. Arejamento

Um último parâmetro que foi monitorizado foi o arejamento, quer nos tanques, quer nos ensaios realizados em reatores mais pequenos. Para os ensaios em reatores mais pequenos o arejamento foi realizado por uma bomba de ar. Contudo o arejamento dos tanques foi feito através da rede de ar comprimido existente no Laboratório de Tecnologia. Na saída do ar comprimido estava inserido um divisor que fez a distribuição do caudal por quatro saídas reguláveis, estando acoplado a cada saída um borbulhador de ar, para promover a formação de bolhas de pequenas dimensões, e assim aumentar a dispersão no meio. Em cada tanque foram colocados dois borbulhadores de ar com o intuito de aumentar a área de contacto entre o meio e o ar injetado.

Outros parâmetros, como a concentração de nitratos, poderiam também ser seguidos, pois a concentração de nitratos, por correlação com os outros nutrientes existentes no meio, indica os níveis de concentração de nutrientes do meio.

3.5. Colheita

Para se proceder à colheita das microalgas, inicialmente foi cortada a injeção de ar comprimido. Após cinco dias sem arejamento as microalgas depositaram na sua maioria, o que era o pretendido, pois facilitou o processo de colheita destas. Assim, posteriormente foi retirado o sobrenadante e a solução concentrada de microalgas foi levada a uma centrífuga, com o intuito de retirar o excesso de água que estas continham.

Para a centrifugação foram utilizados seis frascos com uma capacidade de 250 mL, embora se tenha enchido os frascos com 180 mL, de modo a não haver nenhum transbordo de solução. Estes frascos foram previamente pesados para posterior determinação da quantidade de biomassa recuperada.

3.6. Liofilização

No que respeita à liofilização, o frasco com a biomassa para liofilizar foi previamente congelado durante um período de três dias. A liofilização ocorreu num período de quatro dias, tendo-se após este período atingido o objetivo de obter biomassa seca. Foram recuperadas 20 g de biomassa de *C. zofingensis*, valor um pouco abaixo do esperado (24 g de biomassa seca), tendo em conta a concentração da biomassa nos tanques na altura da colheita.

3.7. Determinação da concentração de pigmentos na microalga

A determinação da concentração dos pigmentos foi realizada de acordo com o procedimento descrito por (Lichtenthaler & Wellburn, 1983), em que se adaptou o método para a utilização de biomassa liofilizada. Assim, foi pesado cerca de 1 mg de biomassa e a esta biomassa foi adicionado 5 mL de dimetil sulfóxido. Foram realizadas réplicas de modo a se obter um valor médio. Após 30 min num banho a 55 °C, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 15 min e posteriormente mediu-se a absorvância a 480 nm, 649 nm, 665 nm (UV-VIS Pharmaspec UV-1700 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)). Utilizando as equações que se seguem foi possível determinar as concentrações de clorofila *a* (*Ca*), clorofila *b* (*Cb*) e carotenoides totais (*Car*):

$$Ca = 12.19 \cdot A_{665} - 3.45 \cdot A_{649} \quad (3.1)$$

$$Cb = 21.99 \cdot A_{649} - 5.32 \cdot A_{665} \quad (3.2)$$

$$Car = \frac{1000 \cdot A_{480} - 2.14 \cdot Ca - 70.16 \cdot Cb}{220} \quad (3.3)$$

Sendo, A_{665} a absorvância medida a 665 nm, A_{649} a absorvância medida a 649 nm, e A_{480} a absorvância medida a 480 nm.

Tendo como referência (Bar et al., 1995), é possível comparar os valores obtidos, verificando-se que estes se encontram dentro do esperado para estas condições de cultura.

3.8. Quantificação dos lípidos

Os lípidos foram extraídos seguindo o protocolo de (Bligh and Dyer, 1959), com pequenas adaptações. Foram pesadas 0,20 g de biomassa liofilizada em tubos de vidro, e foram adicionados 1 mL de clorofórmio, 2 mL de metanol e 0,8 mL de água destilada (1:2:0,8, v:v:v). Esta mistura foi agitada em vortex (VWR VV3) durante 3-5 min, e posteriormente colocada por um período de 24 h no escuro. Após as 24 h a mistura foi centrifugada a 4000g durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo pré-pesado (M_1 , g). À biomassa centrifugada contida nos tubos foram adicionados mais 2 mL de metanol e 1 mL de clorofórmio, seguindo o procedimento anterior de agitação em vortex e permanência durante 24 h no escuro. Completas as 24 h, a mistura foi novamente centrifugada a 4000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi recolhido no mesmo tubo pré-pesado. Foi adicionado 1 mL de clorofórmio, seguido de 1 mL de água destilada (2:2:1,8, v:v:v). A mistura foi bem agitada. Quando a separação de fases foi concluída o sobrenadante foi removido e a parte centrifugada foi seca à temperatura ambiente. O resíduo e o tubo foram posteriormente secos no forno a 105 °C até peso constante (M_2 , g). A percentagem de lípidos foi calculada subtraindo M_1 a M_2 (Feng et al., 2011).

3.9. Extração do óleo

Para a extração do óleo das microalgas foi seguido o método de Halim (Halim et al., 2011). Este método tem como base a extração do óleo utilizando hexano e isopropanol como solvente. Foram utilizados 120 mL de hexano por cada 5 g de biomassa de microalgas, e uma proporção de 3:2 (v:v) de isopropanol. Para se facilitar a extração, a mistura foi colocada num banho de ultrassom por um período de 30 min, promovendo uma agitação a nível molecular, fazendo com que as membranas celulares se rompam, proporcionando a extração do óleo pelos solventes.



Figura 3-1 - Extração de óleo em ultrassom.

Após 30 minutos em ultrassom a amostra foi filtrada de modo a remover a lama de microalgas obtidas após este processo. O filtrado, que contém o óleo, foi transferido para um balão de decantação. Ao filtrado foram adicionados 40 mL de hexano e 40 mL de água, por esta ordem, de forma a induzir uma estratificação bifásica.

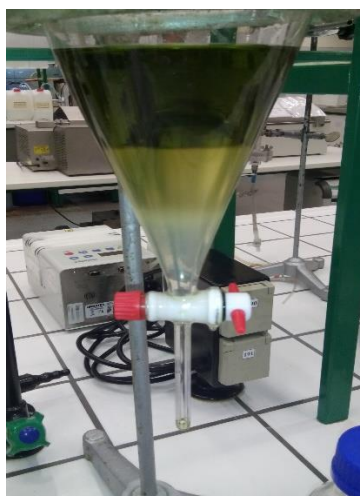


Figura 3-2 - Separação de fases.

A fase superior é constituída por hexano e óleo, enquanto a fase inferior contém água, isopropanol e pigmentos. Como a fase superior possui o óleo pretendido, a fase inferior é descartada. De forma a maximizar o processo de extração de óleo da biomassa refez-se o procedimento anterior, com a biomassa extraída, isto é, fez-se uma segunda etapa de extração.



Posteriormente, a fase de hexano e óleo foi sujeita a destilação, com o intuito de se obter o óleo extraído. Assim, levou-se esta fase a um evaporador rotativo, programando-se a recuperação de hexano para 40 °C, a uma pressão de 420 mbar.



Figura 3-4 - Evaporador rotativo com a amostra a destilar e recuperação de hexano.

Concluída a destilação foi possível se pesar o óleo obtido.

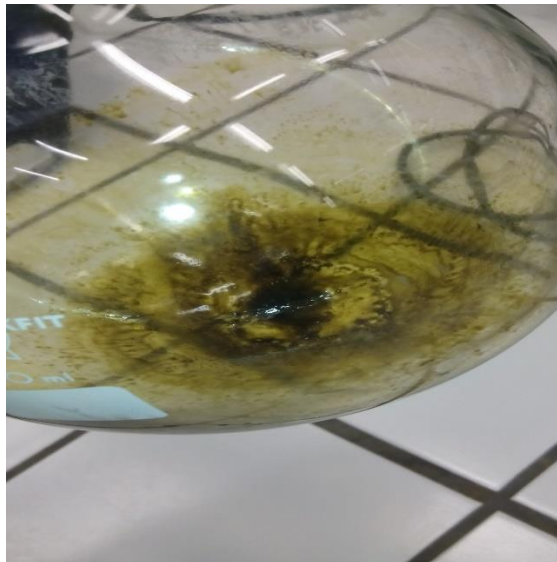


Figura 3-5 - Óleo obtido após o processo de extração.

3.10. Transesterificação

Para se proceder à transesterificação é necessário se redissolver os lípidos extraídos. Assim sendo, para cada 10 mg de óleo obtido, adicionou-se 2 mL de uma mistura clorofórmio:metanol (2:1, v:v). Neste caso, como se conseguiu obter 400 mg de óleo, foram adicionados 80 mL da mistura.

Para se realizar a transesterificação foi então adicionado mais metanol e ácido sulfúrico 95-97%, que atuam como reagente e catalisador, respetivamente. Assim por cada 10 mg de óleo obtido foram adicionados 1 mL de metanol e 0,33 mL de ácido, ou seja, neste caso foram adicionados 40 mL de metanol e 12 mL de ácido sulfúrico. Seguidamente, a mistura foi agitada vigorosamente durante 5 minutos e colocada num banho a 85 °C, por 2 horas, tempo necessário para que a reação se dê toda no sentido direto, ou seja, na formação de biodiesel.



Figura 3-6 - Amostra após esterificação.

Após as 2 horas em reação, a amostra foi colocada a arrefecer de modo a que a reação cesse. Quando a amostra se encontrava à temperatura ambiente, adicionou-se 100 mL de água destilada.



Figura 3-7 - Amostra após adição de água.

Ao adicionar a água visualizou-se a formação de duas fases. A fase superior, constituída por água, metanol e ácido sulfúrico foi descartada, enquanto a fase inferior que continha clorofórmio e ésteres foi armazenada. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, de modo a separar todo o ácido e metanol da fase com os ésteres.

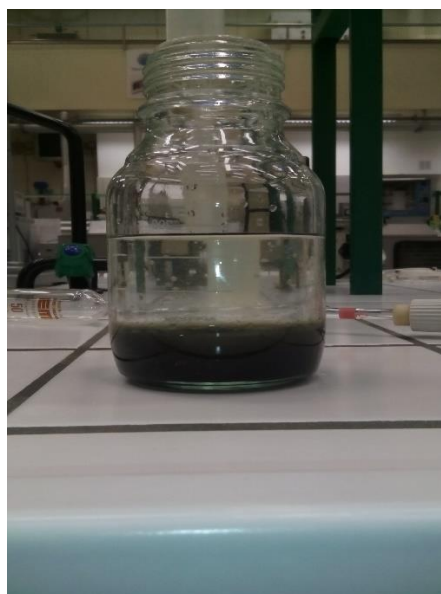
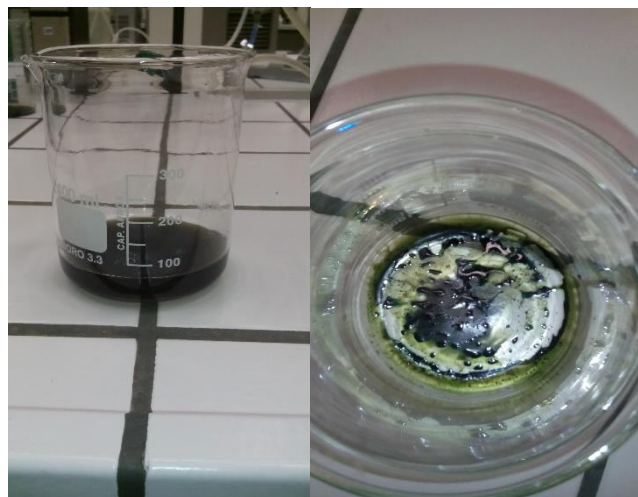


Figura 3-8 - Amostra após adição de 300 mL de água.

Por fim, deixou-se o clorofórmio evaporar, na *hotte*, de modo a obter apenas os ésteres, correspondendo estes ao biodiesel.



3.11. Perfil em FAME's

A preparação da amostra para análise em GC foi feita segunda a norma NP EN 14103: 2010. Preparou-se uma solução de heptadecanoato de metilo (padrão interno) de 10 mg/mL, por adição de 500 mg do padrão a um balão volumétrico de 50 mL devidamente limpo, e perfazendo o volume com heptano. Por fim, foram adicionados 2 mL da solução de heptadecanoato de metilo à amostra. Os ésteres foram analisados num cromatógrafo gasoso Dani, GC 1000 DPC, com FID e coluna para FAME's/FAEE's (AT-WAX) (*Fatty Acid Methyl Esters/Fatty Acid Ethyl Esters*) com injeção de 0,2 μ L de amostra, às temperaturas do forno, detetor e injetor de 195 °C (com variação progressiva a partir da análise do éster C18:3 até aos 250 °C), 250 °C e 250 °C, respetivamente, e caudal de gás de arraste, o hélio, de 1 mL/min.

4. Resultados e Discussão

4.1. Reatores de 1 L e 5 L

É possível observar que o crescimento da *C. zofingiensis* no reator 1 foi bem-sucedido, tendo-se atingido concentrações de biomassa seca de cerca de 0,77 g/L (Figura 4-1). Como se pode verificar o crescimento foi contínuo, não havendo indicação de anomalias. Foi possível também observar que a cultura não apresentava qualquer tipo de contaminações, quer bacterianas quer de outras estirpes de microalgas, por observação microscópica.

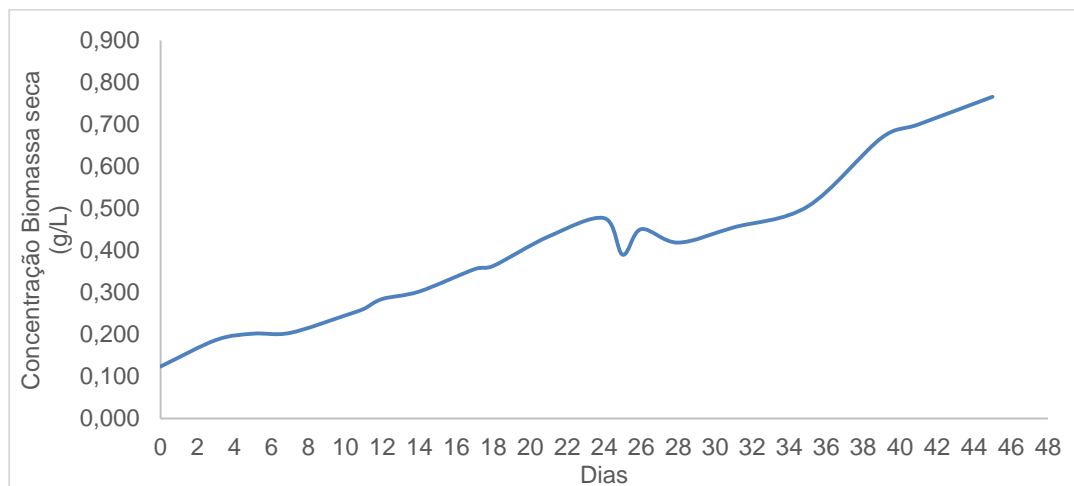


Figura 4-1 – Curva de crescimento da *C. zofingiensis* no reator 1 (5 L).

Relativamente ao pH da cultura no reator é possível verificar (Figura 4-2) que este apresenta uma tendência a subir, o que era de esperar, pois o consumo de CO₂ do meio faz com que haja um aumento de pH no meio, devido às características ácidas do dióxido de carbono em solução.

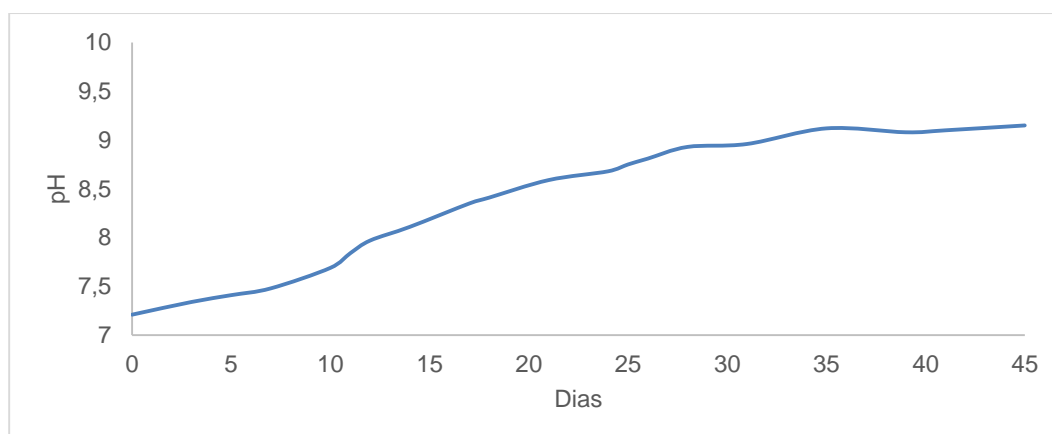


Figura 4-2 - Variação de pH no reator 1.

Quanto à temperatura, podemos verificar na Figura 4-3 que os valores são variáveis, devendo-se tal facto às variações de temperatura ambiente.

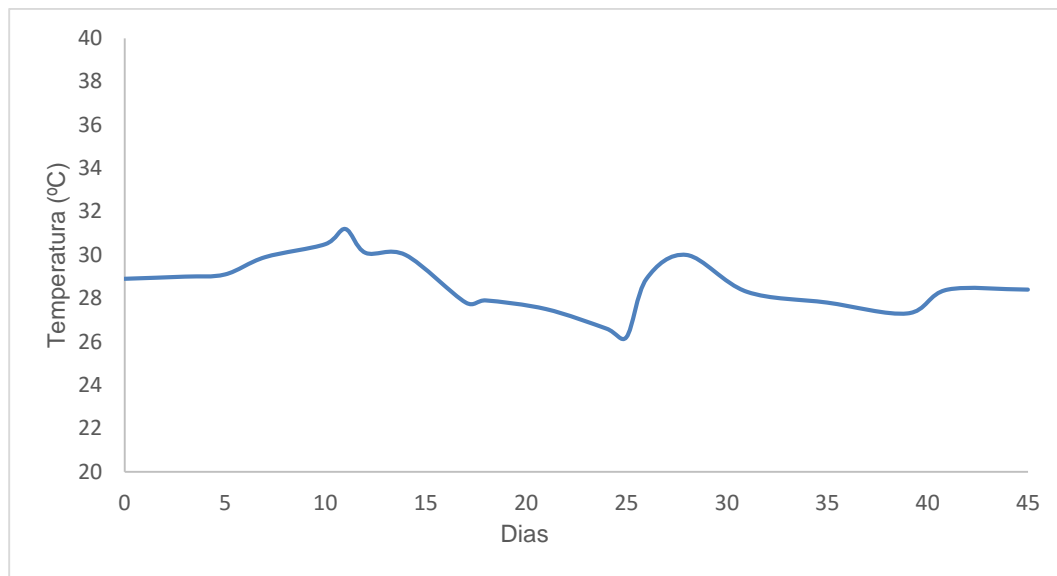


Figura 4-3 – Evolução da temperatura no reator 1.

Os ensaios nos reatores 2 e 3 foram realizados ao mesmo tempo, tendo-se verificado pequenas diferenças entre eles. Como se pode verificar a cultura do reator 2 apresentou uma maior concentração de biomassa (0,66 g/L) em relação à do reator 3 (0,62 g/L).



Figura 4-4 - Ilustração dos reatores 1 (à esquerda), 3 (à direita) e 4 (ao centro).

Pelos dados obtidos foi possível verificar que nas primeiras duas semanas ambos os reatores apresentavam uma taxa de crescimento muito baixa, o que não era esperado. Deste modo, e uma vez que o arejamento era aparentemente insuficiente, foi aumentado o arejamento para o dobro do caudal com o intuito de se ver melhorias no seu crescimento. Assim, após o aumento de arejamento, pôde-se verificar que a taxa de crescimento aumentou, conseguindo-se assim os resultados representados na Figura 4-5.

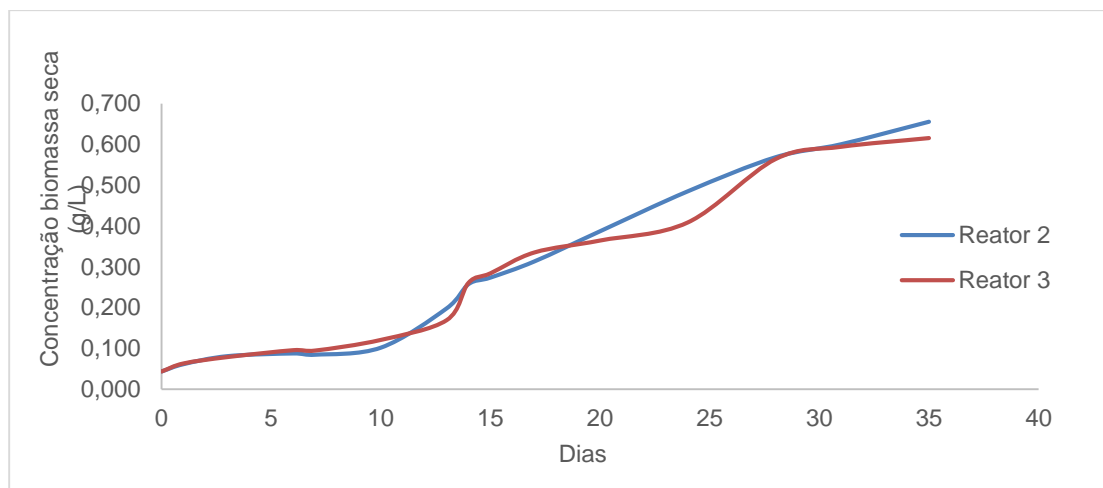


Figura 4-5 – Curva de crescimento das culturas dos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L).

Quanto ao pH das culturas nos dois reatores podemos verificar, no gráfico da Figura 4-6, que houve um ligeiro aumento, como era de esperar.

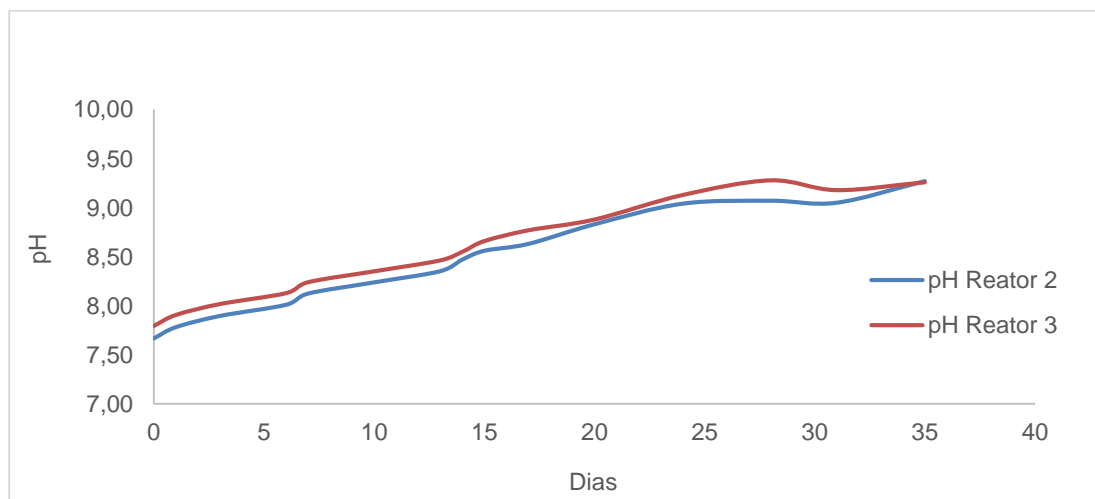


Figura 4-6 - Variação de pH das culturas nos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L).

A temperatura das culturas dos reatores 2 e 3 está representada no gráfico da Figura 4-7, podendo-se verificar que os seus valores são variáveis, estando relacionados com a temperatura ambiente do Laboratório.

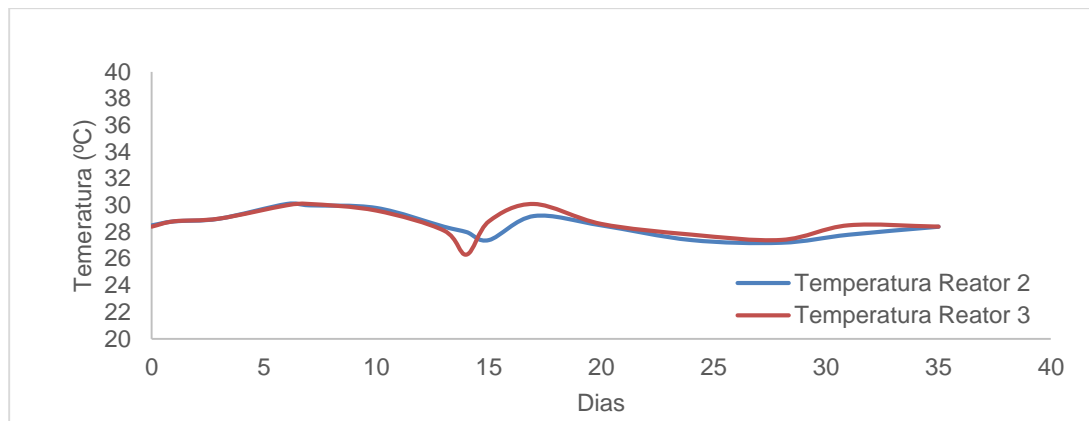


Figura 4-7 – Evolução de temperatura das culturas nos reatores 2 e 3 (matrizes de 5 L).

O reator 4 foi realizado num balão de 6 L. Resolveu-se utilizar um balão como reator pelo simples facto de ser mais fácil conseguir fazer chegar o arejamento a todo o fundo do balão, o que não acontecia nos matrizes de 5 L. Assim sendo, pelos resultados obtidos podemos verificar (Figura 4-8) que o crescimento foi contínuo, não havendo contaminações quer bacterianas quer de outras estirpes de microalgas, como se pode verificar nas figuras. Neste reator conseguiu-se atingir concentrações de 0,47 g/L de biomassa.

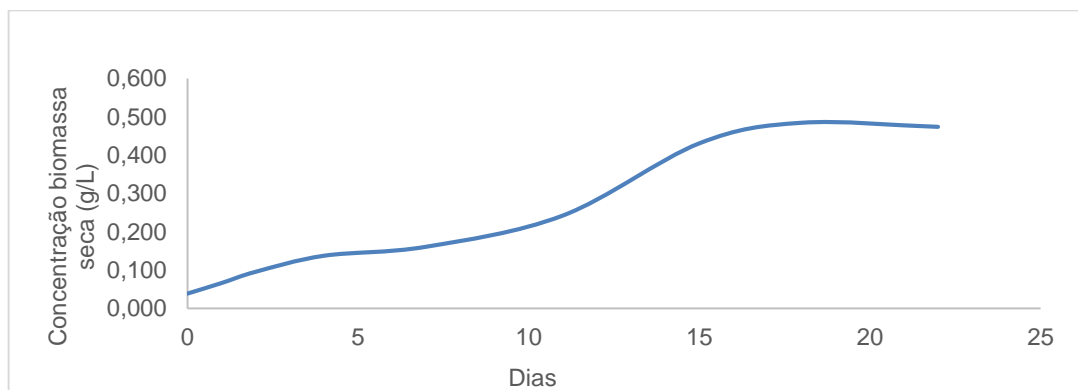


Figura 4-8 - Crescimento da cultura no reator 4 (balão de 6 L).

Podemos verificar que os valores de pH (Figura 4-9) foram similares aos observados nos outros reatores, observando-se um aumento gradual de pH, característico de uma cultura em crescimento.

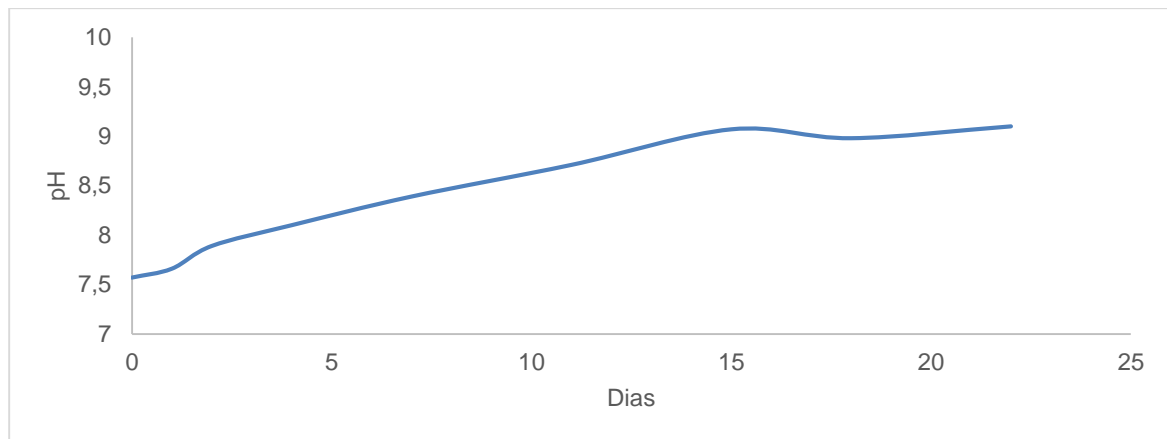


Figura 4-9 – Evolução de pH na cultura do reator 4 (balão de 6 L).

Relativamente à temperatura, é possível observar (Figura 4-10) que os valores se encontravam próximos dos registados noutros reatores.

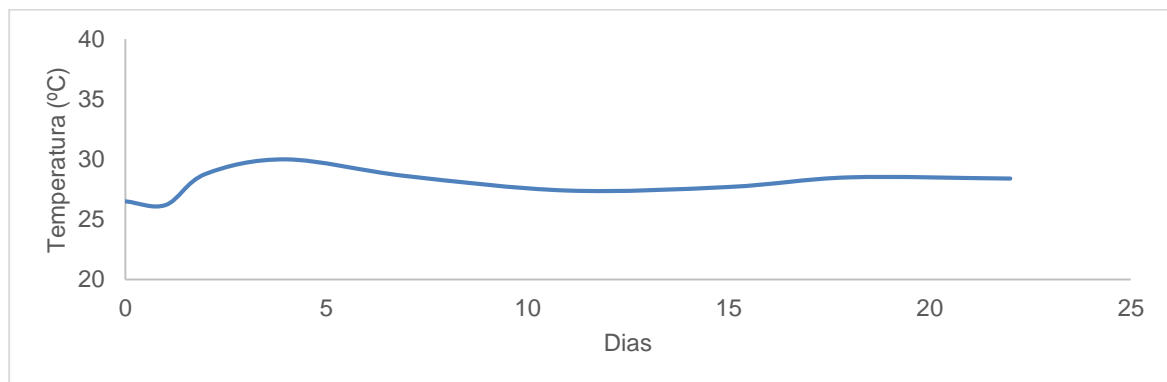


Figura 4-10 - Variação de temperatura na cultura do reator 4 (balão de 6 L).

4.2. Ensaios de cultivo com adição de glicose

Foram realizados ensaios de cultivo da *Chlorella zofingiensis* com adição de glicose (0,75 g/L) ao meio de cultura, tendo como referência estudos realizados por (Sun et al., 2008) com a adição de açúcares para se obter maiores concentrações de biomassa. Pelos resultados obtidos, podemos concluir que a adição de açúcares não teve uma contribuição significativa para o seu crescimento, mas sim uma contribuição negativa no que toca a contaminações. O reator que continha glicose, após uma semana de ensaio, apresentava contaminações bacterianas, não tendo sido possível continuar o ensaio.

Relativamente ao reator em que não foi adicionada glicose, este apresentou taxas de crescimento elevadas, como é possível verificar pelos resultados da Figura 4-11. Uma das contribuições para tão altas taxas de crescimento e concentração de biomassa pode-se dever ao facto de o reator do ensaio ter sido de pequenas dimensões (250 mL), tornando o crescimento de microalgas mais facilitado, uma vez que a área exposta a elevada intensidade luminosa era maior e o arejamento mais uniforme. Neste reator foi possível obter

concentrações de 2,4 g/L de biomassa, podendo este valor estar afetado por evaporação de água, o que levou a um aumento da concentração de microalgas.

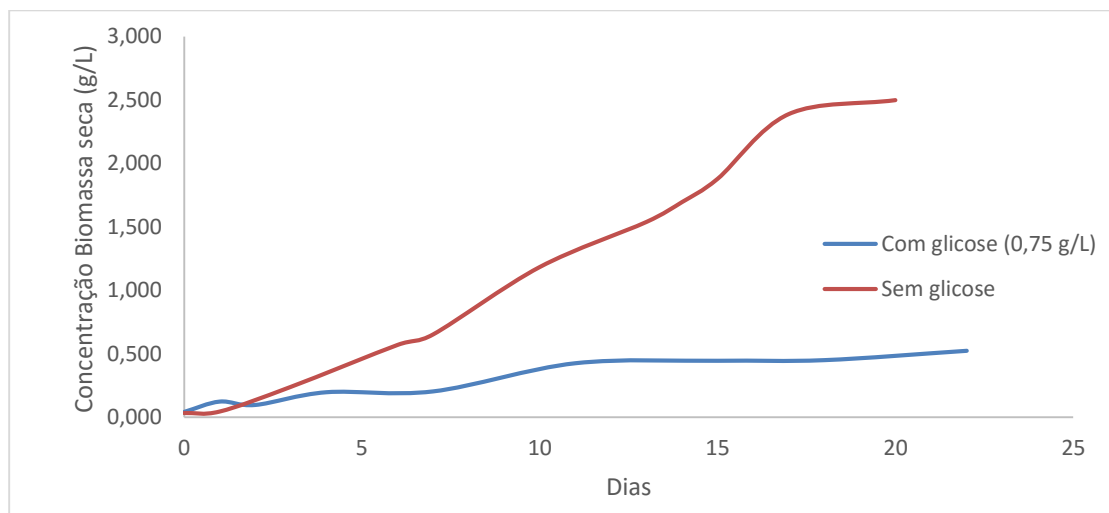


Figura 4-11 - Crescimento da cultura de *Chlorella zofingiensis* no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.

Relativamente ao pH, podemos verificar (Figura 4-12) que os valores aumentaram significativamente nos primeiros dias para o reator com adição de glicose, enquanto nos restantes dias o pH se manteve praticamente constante. No reator sem adição de glicose verifica-se um aumento contínuo de pH, estando de acordo com o esperado.

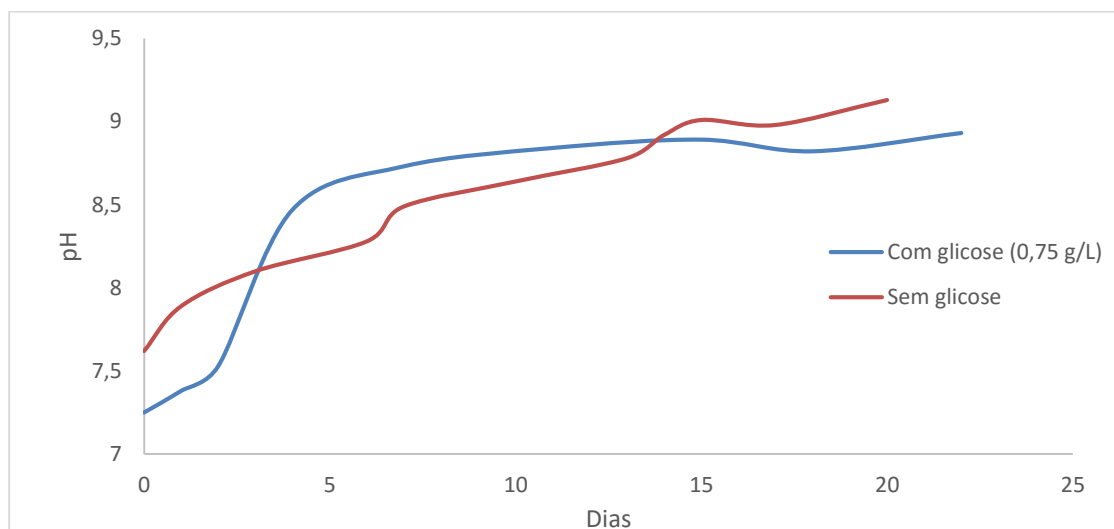


Figura 4-12 - Variação de pH da cultura no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.

As temperaturas (Figura 4-13) foram próximas das observadas nos ensaios efetuados no interior do laboratório.

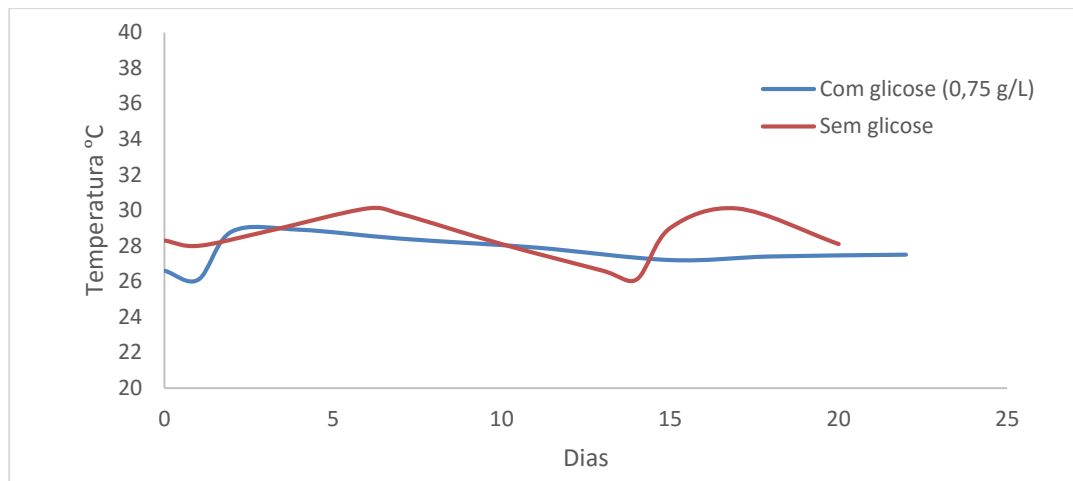


Figura 4-13 - Variação de temperatura da cultura no reator de 250 mL com e sem adição de glicose.

4.3. Teste de esterilização de água com hipoclorito de sódio

Como este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de um biocombustível a partir de biomassa microalgal, deve-se ter em conta todos os aspetos relevantes para a sua obtenção. Assim, desde o crescimento das microalgas que se tem tomado medidas para uma melhor e mais económica forma de se conseguir atingir este objetivo. Deste modo, embora nos primeiros ensaios se tenha utilizado água desionizada e autoclavada para a preparação das culturas, ao realizar cultivos em grande escala não é viável a utilização de água desionizada e autoclavada. Assim, de forma a ser viável este estudo utilizou-se água da rede e foram efetuados testes de modo a desinfetar esta água com hipoclorito de sódio.

Deste modo, foram efetuados ensaios com o intuito de se estudar o desenvolvimento de microalgas, com a utilização desta técnica de purificação de água, e foi-se observando o sucedido no seu crescimento. Foram realizadas seis culturas, uma sem qualquer esterilização, e as restantes com adição de hipoclorito de sódio (HS) e tiosulfato de sódio (TS) para remover o excesso de cloro.

Pelos resultados obtidos podemos verificar que o crescimento de microalgas (Figura 4-14) não foi influenciado pela utilização de hipoclorito ou tiosulfato de sódio, tendo-se registado um crescimento normal das microalgas. Após duas semanas do decorrer do ensaio foi observado o aparecimento de pequenas contaminações, o que levou ao aparecimento de pequenos aglomerados de microalgas que se depositavam com muita frequência. Tanto no reator 1, sem adição de HS e TS, como no reator 2, com 0,5 mL de HS, foi observado um crescimento normal e pequenas contaminações. No reator 3, com 1 mL de HS, e no reator 4, com 2 mL de HS, pôde-se verificar um crescimento normal, mas com menos contaminações que nos primeiros 2 reatores. Por fim, no reator 5, com 5 mL de HS, e no reator 6, com 10 mL de HS, o crescimento foi normal e sem contaminações.

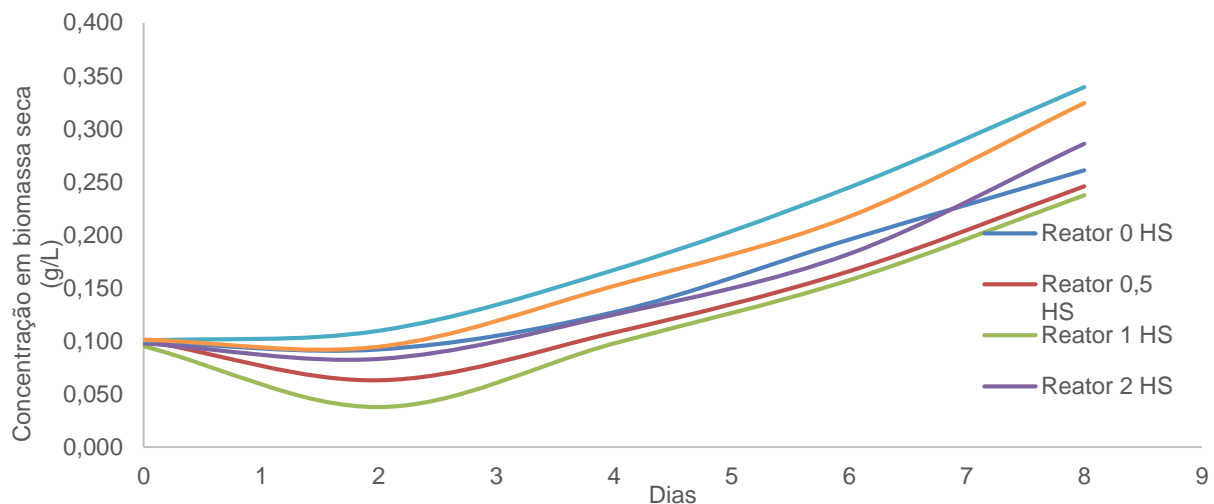


Figura 4-14 - Crescimento das culturas observadas nos reatores para o teste de esterilização da água.

Como já foi dito anteriormente, o objetivo com este estudo era o de minimizar os custos. Assim, embora os dois últimos reatores apresentassem melhores resultados do que os outros reatores, a utilização de 5 ou 10 mL de HS para 250 mL de cultura é um gasto excessivo e com custos elevados de HS. Assim, optou-se por se utilizar as condições do reator 4, aquando da passagem para tanques de 50 L de cultura.

4.4. Culturas em tanques de 50 L

A preparação dos tanques foi realizada segundo as condições do reator 4 do teste de HS, contudo houve a alteração de meio de cultura utilizada para o BG-11, tendo-se inoculado os tanques com as culturas dos reatores 3, 4 e 1 obtidas nos primeiros ensaios. Estes tanques (Figura 4-15) estiveram em cultivo durante dois meses.



Figura 4-15 – Tanques de cultura de 50 L (1 à esquerda e 2 à direita).

Os resultados obtidos não foram os esperados, tendo havido um crescimento muito reduzido da cultura de microalgas, atingindo-se apenas uma concentração de cerca de 0,3 g/L (Figura 4-16). Foi possível também observar-se que os tanques não se encontravam contaminados com outras estirpes de microalgas, mas apresentavam uma contaminação que fez com que as microalgas se aglomerassem e depositassem no fundo dos tanques, o que não era esperado. Na Figura 4-17 é possível visualizar a contaminação observada.

Uma das possíveis causas para um crescimento tão pequeno, tendo em conta o tempo de cultivo, pode ter sido o fraco arejamento dos tanques, assim como fraca intensidade de luz incidente nos tanques.

Embora a concentração de biomassa determinada tenha sido baixa, a correspondente quantidade de biomassa total poderia não ser equivalente. É de se frisar que havia uma boa quantidade de biomassa depositada no fundo nos tanques, e como a sua agitação era de difícil execução, não foi possível efetuar-se uma recolha de amostra com a concentração representativa da biomassa existente no tanque de cultivo.

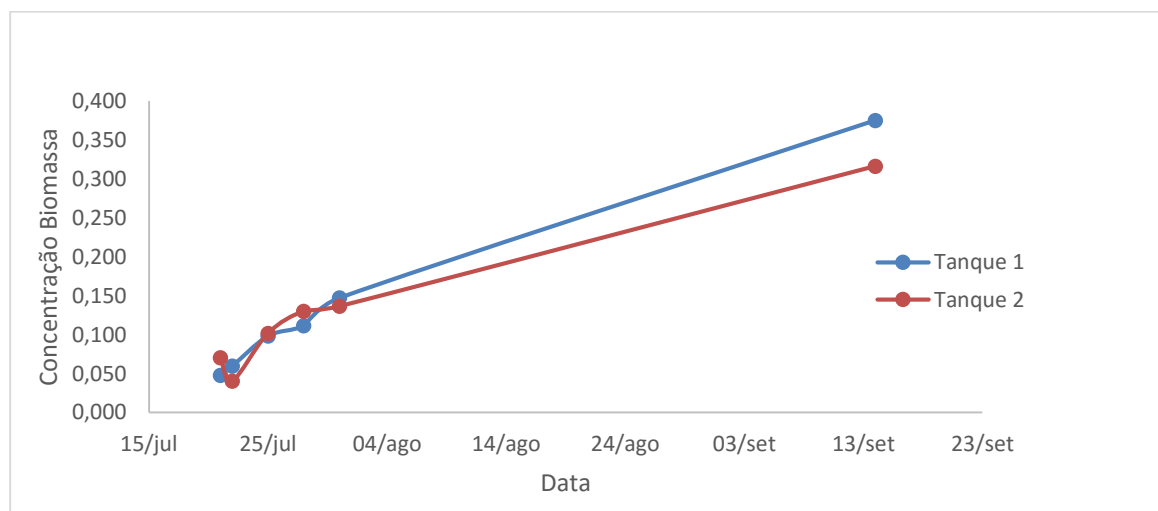


Figura 4-16 - Crescimento das culturas de *Chlorella zofingiensis* em meio BG-11, nos tanques 1 e 2.

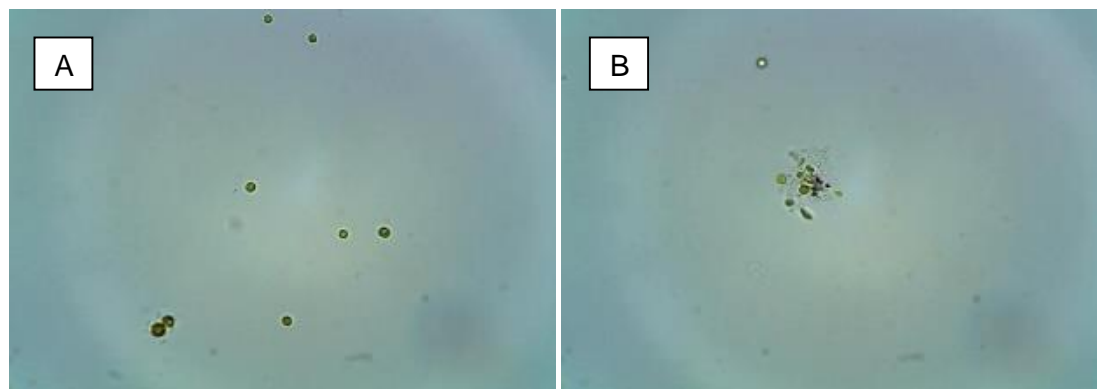


Figura 4-17 - Imagem representativa do aspeto das microalgas, obtida a microscópio a 40x, sem contaminação (A) e com contaminação (B).

Os valores de pH obtidos (Figura 4-18) não se encontram de acordo com o esperado, uma vez que era esperado um crescimento gradual de pH, podendo-se observar que na última análise efetuada ao tanque o pH baixou para 7,5. Este valor é possível que não esteja correto pois posteriormente foi detetada uma anomalia no medidor.

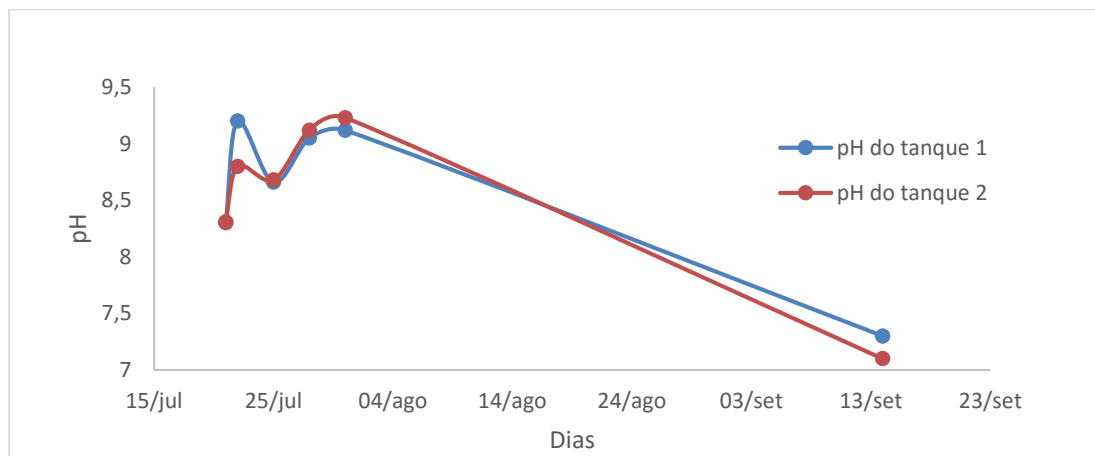


Figura 4-18 - Variação de pH nas culturas em meio BG-11, dos tanques de 50 L (1 e 2).

As temperaturas obtidas (Figura 4-19) estão em conformidade com o esperado, pois estas foram variando consoante a temperatura ambiente do laboratório.

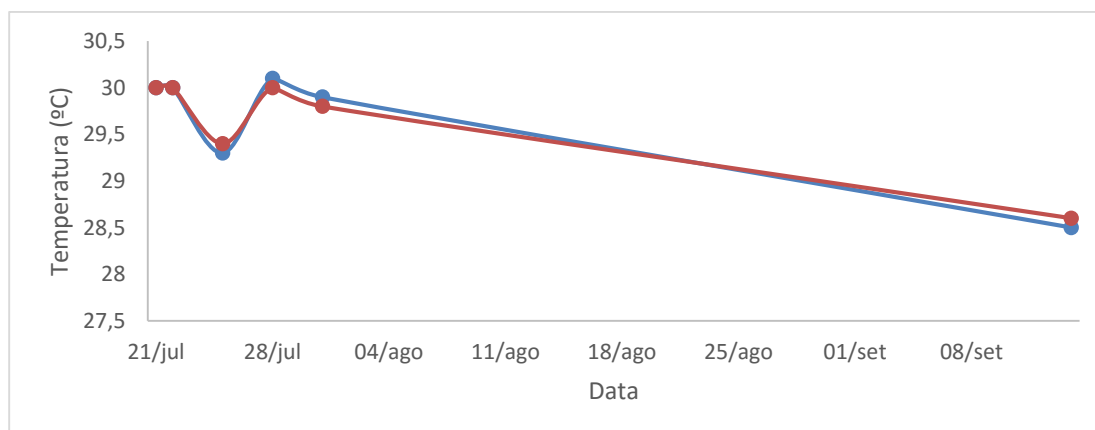


Figura 4-19 - Variação de temperatura das culturas em meio BG-11, nos tanques de 50 L (1 e 2).

Pelos motivos acima mencionados foram realizadas mais duas culturas em dois tanques de 50 L (Figura 4-20), contudo com maior arejamento e maior intensidade de luz. É de notar que nestes dois tanques voltou-se a utilizar o meio BBM, uma vez que demonstrou ser um bom meio para o crescimento das microalgas, e não o BG-11, tendo-se concluído que este último meio não tinha sido o ideal para o cultivo de microalgas em tanques de 50 L. Pelos dados obtidos podemos verificar que o crescimento das microalgas tem sido melhor, comparativamente aos outros dois cultivos efetuados.

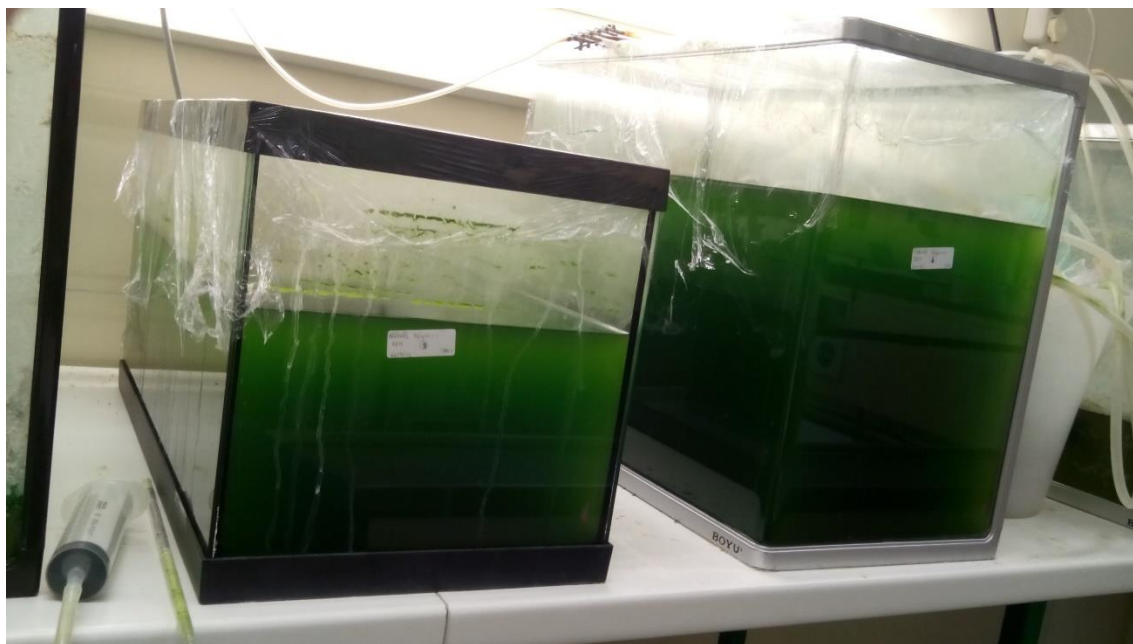


Figura 4-20 – Cultivo de *Chlorella zofingiensis* em meio BBM, em tanques de 50 L (3 à esquerda e 4 à direita).

É de assinalar que as concentrações obtidas nestes dois tanques (Figura 4-21) foram um pouco superiores às obtidas nos outros, em metade do tempo de cultivo. Como é possível se verificar houve pontos em que a concentração de biomassa decresceu. Para tal facto é possível que a amostra nesses dias não tenha sido representativa, contribuindo para tal uma má agitação do tanque o que contribui para uma diminuição da concentração medida. Devido à escassez de tempo para um contínuo crescimento das microalgas, foi cessado o ensaio para se proceder às análises pretendidas das culturas destes tanques.

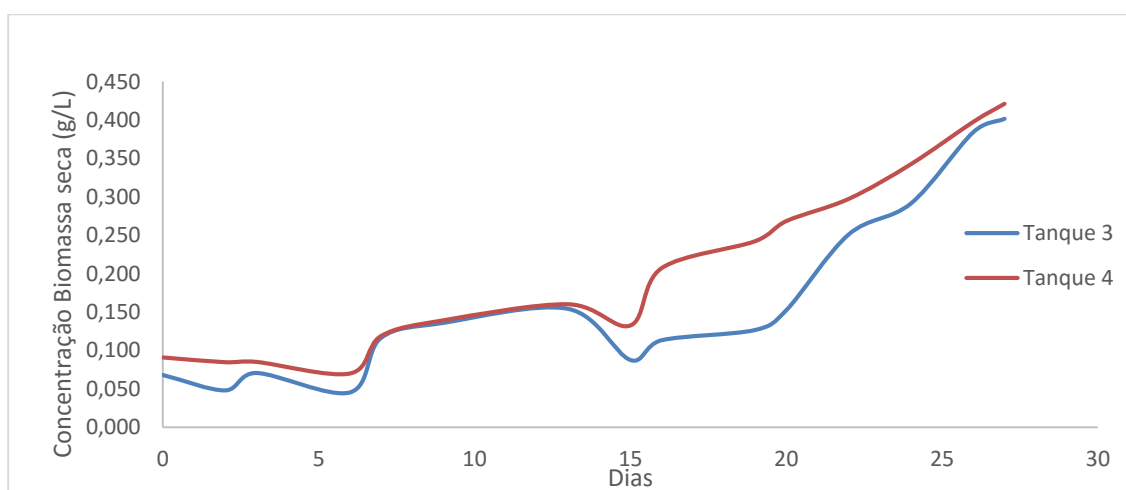


Figura 4-21 – Crescimento da *Chlorella zofingiensis* em meio BBM, nos tanques 3 e 4.

Os valores de pH obtidos (Figura 4-22) estão de acordo com o esperado, uma vez que é possível observar um crescimento contínuo de pH.

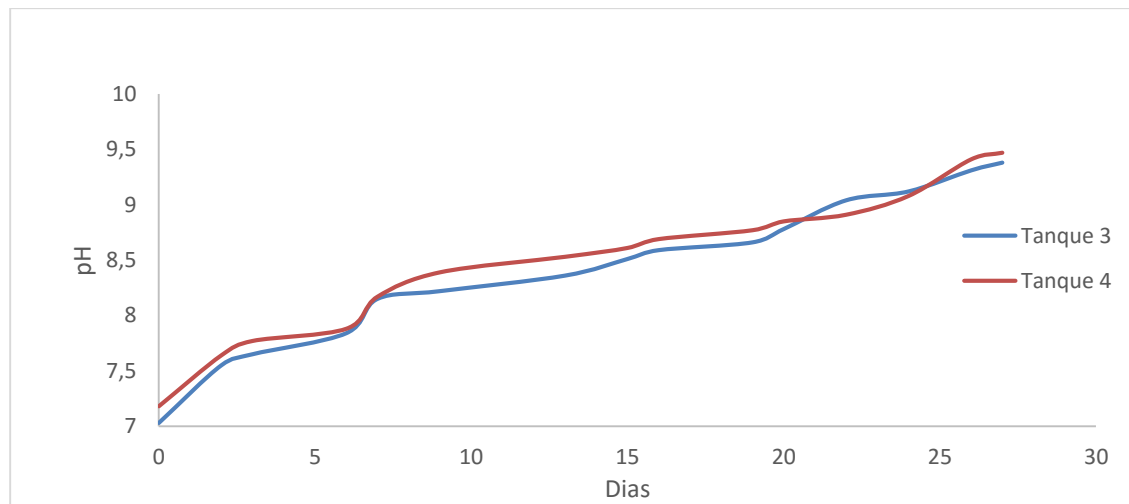


Figura 4-22 - Variação de pH nas culturas dos tanques 3 e 4.

Por sua vez a temperatura (Figura 4-23) apresenta valores relativamente mais baixos que todos os ensaios realizados anteriormente, pois a temperatura ambiente do laboratório também se encontrava mais baixa, uma vez que já nos encontrávamos perto do Inverno, o que pode significar que esta microalga está mais adaptada a temperaturas mais baixas.

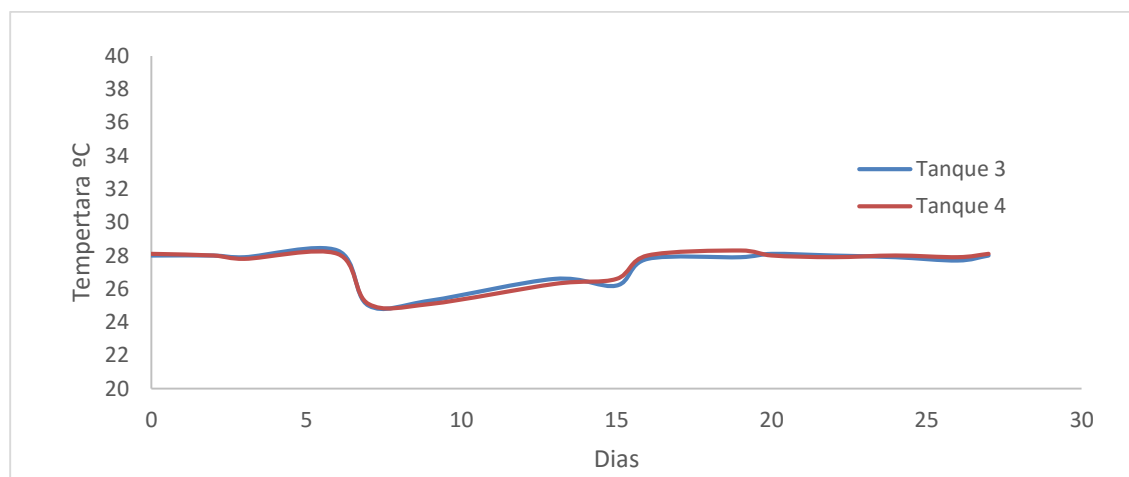


Figura 4-23 - Variação de temperatura nas culturas dos tanques 3 e 4.

4.5. Produção de pigmentos

Após análises à biomassa obtida, foi possível observar-se uma percentagem de pigmentos satisfatória, tendo-se conseguido valores de concentração próximos dos descritos na literatura, no que diz respeito à concentração de clorofila. É de assinalar que os carotenóides totais apresentam um valor de concentração inferior ao esperado, possivelmente por falta de iluminação para que este valor conseguisse chegar aos valores esperados (Bar et al., 1995). Pela Tabela 4-1 é possível visualizar as concentrações obtidas para clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides totais.

Tabela 4-1 - Concentração de pigmentos na *Chlorella zofingiensis*

Pigmentos	Valor obtido (mg/L)
Clorofila <i>a</i>	10,38
Clorofila <i>b</i>	4,290
Carotenoides totais	2,617

4.6. Produção de lípidos

Relativamente à produção de lípidos obtida (Figura 4-24) é possível concluir que a percentagem obtida de 7% de lípidos é muito mais baixa que a esperada de 52%. É de salientar que o meio de cultivo não foi o ideal para a obtenção de uma elevada percentagem de lípidos, uma vez que para tal era necessário realizar o cultivo das microalgas em meio com deficiência de azoto. Assim, grande parte da contribuição para se conseguir atingir os valores de 52% não foi conseguida.

**Figura 4-24 - Imagem representativa da separação de fases originadas na quantificação de lípidos.**

4.7. Extração de óleo

Nesta fase do processo de recolha de óleo, decidiu-se iniciar todo o processo de extração com a microalga *Arthrospira maxima*, de forma a ganhar sensibilidade e experiência na execução do processo. Assim sendo, conseguiu-se 1 g de óleo desta microalga a partir de 5 g de biomassa. Por sua vez, foi possível se obter 400 mg de óleo, da microalga *Chlorella zofingiensis*, de 5 g iniciais de biomassa. Como é possível se verificar pela Figura 9, o óleo apresenta uma coloração verde/amarelada. A diferença de extração de óleo de uma microalga

para outra deve-se à capacidade que cada microalga apresenta para acumular óleo, assim como a forma de cultivo de cada microalga, podendo afetar o teor de óleos que as microalgas apresentam. Assim sendo, é possível se verificar que a microalga *Arthrospira maxima* apresenta um maior teor de óleo que a microalga *Chlorella zofingiensis*.

4.8. Transesterificação

Como no processo de extração de óleo, este processo de transesterificação também foi realizado, primeiramente, com a microalga *Arthrospira maxima*. A partir da transesterificação do óleo obtido foi possível se verificar, no final do processo, a obtenção de 1,03 g de biodiesel da microalga *Arthrospira maxima*. Por sua vez, conseguiu-se obter 280 mg de biodiesel de *Chlorella zofingiensis*. O biodiesel obtido de cada microalga foi então quantificado por CG, conseguindo-se obter para a *Arthrospira maxima*, 40,05% de C16:0, 5,90% de C18:0, 35,62 % de C18:1 e 18,43% de C18:2. Relativamente à *Chlorella zofingiensis* foi possível se obter 40,98% de C16:0, 8,97% de C18:0, 27,19% de C18:1 e 22,86% de C18:2. Sendo C16:0 ácido palmítico, C18:0 ácido esteárico, C18:1 ácido oleico e C18:2 ácido linoleico. Por comparação com valores de outros autores (Haas & Wagner, 2011) é possível se verificar que estes valores estão próximos dos valores referidos na literatura, estando assim dentro dos valores esperados para estas microalgas.

5. Conclusão e sugestão para trabalhos futuros

Através deste trabalho experimental conseguiu-se chegar a várias conclusões. Relativamente ao cultivo da microalga em meio BBM e BG-11, foi possível concluir que o meio BBM foi o mais eficiente para o cultivo desta microalga em tanques de maiores dimensões. Foi também possível se verificar que o crescimento destes microrganismos é mais facilitado em reatores de menores dimensões, uma vez que é mais fácil o controlo desse reator, quer a nível de contaminações que possam ocorrer, quer a nível de controlo de variáveis como pH, temperatura, intensidade luminosa.

Quanto à colheita realizada foi possível se obter um rendimento de 84,52 % de biomassa obtida, tendo-se conseguido 20,44 g de biomassa.

Pela determinação da concentração de pigmentos foi possível observar que os valores obtidos estavam dentro dos valores aceitáveis para esta microalga, com 10,38 g/L de clorofila *a*, 4,29 g/L de clorofila *b* e 2,62 g/L de carotenoides totais. Os respetivos valores esperados eram de 10 g/L de clorofila (*a* e *b*) e 6 g/L de carotenoides totais.

Foi possível concluir, pelos testes de adição de glicose, que esta microalga não se desenvolveu como era esperado, uma vez que a adição de açúcares (0,75 g/L de glicose) ao meio não fez aumentar a concentração de biomassa obtida.

Por outro lado, nos testes efetuados com adição de hipoclorito de sódio para esterilização de água, foi possível concluir que é possível esterilizar água de uma forma mais rápida e principalmente mais económica.

A análise quantitativa de lípidos, permitiu concluir que a microalga apenas apresentava 7% de lípidos, nestas condições de cultivo, resultando num valor muito baixo, tendo em conta o potencial, reportado na literatura, que esta microalga apresenta para acumular lípidos (até 52% em condições favoráveis).

Pela extração de óleo da *Chlorella zofingiensis*, podemos verificar que a extração não obteve um rendimento elevado, uma vez que se obtiveram 400 mg de óleo a partir de 5 g de biomassa. Por sua vez, na *Arthrospira maxima* foi conseguido um maior rendimento da extração pois foi obtido 1 g de óleo em 5 g de biomassa iniciais.

Quanto ao processo de transesterificação conseguiu-se obter no final do processo 1,03 g de biodiesel na *Arthrospira maxima* e 280 mg de biodiesel na *Chlorella zofingiensis*. Relativamente à caracterização do biodiesel por CG foi possível identificar ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico em ambas as estirpes de microalgas, com pequenas variações de percentagens de uma para outra.

Existem variados trabalhos que podem ser realizados no futuro, a saber: o cultivo da microalga em meio mais adequado para desenvolvimento de lípidos, como por exemplo meio sem azoto; estudo dos produtos de valor acrescentado, como pigmentos, principalmente

astaxantina; estudo de cultivo em tanques de maiores dimensões, de modo a se efetuar comparações a nível industrial, com o intuito de obtenção de grandes quantidades de biomassa; estudo de cultivo em águas residuais, de modo a se averiguar o seu crescimento e possível tratamento das águas.

6. Referências Bibliográficas

- Algae4feed - <http://www.algae4feed.org/brief/microalgae-nutritional-composition/53> (acedido em 8/03/2015)
- Barsanti, L. e Gualtieri, P., 2006. *Algae-Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 1st ed. Taylor e Francis Group. London, England. 209-249.
- Bischoff, H. W., Bold, H. C. 1963 Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological Studies IV.*, Univ. No. 6318, Texas, p. 95
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25, 294–306.
- Doran, P.M., 2005. *Bioprocess Engineering Principles*. 1º Ed. Academic Press Limited, London, Reino Unido. 333-340.
- Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., & Arad, S. (Malis). (1995). Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of Plant Physiology*, 146(4), 527–534. doi:10.1016/S0176-1617(11)82019-5
- Bligh and Dyer. (1959). A rapid Method of Total Lipid Extration and Purification, 37.
- Chen, C.-L., Huang, C.-C., Ho, K.-C., Hsiao, P.-X., Wu, M.-S., & Chang, J.-S. (2015). Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. *Bioresource Technology*, 194, 179–186. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.021
- Feng, P., Deng, Z., Fan, L., & Hu, Z. (2012). Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), 405–410. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.05.007
- Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., & Fan, L. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology*, 102(22), 10577–10584. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.109
- Grubbs, R., & Ladshawz, T. (1991). LOW COST APPROACH FOR DECHLORINATION, 253–254.
- Haas, M. J., & Wagner, K. (2011). Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1219–1229. doi:10.1002/ejlt.201100106
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. a. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 178–185. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.136
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191–198. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.015
- Imamoglu, E. (2007). Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3), 5–9.
- Ip, P.-F., & Chen, F. (2005). Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Process Biochemistry*, 40(2), 733–738. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.039

- Jos, F. (2013). Produção de single cell oil para biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* em cultivo autotrófico e heterotrófico em simultâneo com troca simbiótica de correntes gasosas em circuito fechado Dissertação para obtenção do Grau Mestre em Mestra.
- Lichtenthaler, H., & Wellburn, A. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(1955), 591–592. doi:10.1042/bst0110591
- Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Liu, Z., Jiang, Y., & Chen, F. (2014). *Chlorella zofingiensis* as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: Biology and Industrial Potential. *Marine Drugs*, 12(6), 3487–3515. doi:10.3390/md12063487
- Mata, T. M., Martins, A. a., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- OOIL - http://www.originclear.com/pdf/OOIL_World_Biofuels_Markets_100316.pdf (acedido em 14/03/2015)
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037
- Renaud, S.M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, Parry, Parry, D. L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*. 211, 195–214.
- Richmond, A., 2004. Biological Principles of Mass Cultivation. Richmond, A., (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. Oxford, London. pp 547.
- Sakthivel, R., Elumalai, S., & Arif, M. (2011). Microalgae lipid research, past, present: a critical review for biodiesel production, in the future. *Journal of Experimental Sciences*, 2(10), 29–49. doi:2218-1768
- Santos, R. (2012). Produção de biodiesel por transesterificação de óleos vegetais sobre guanidinas ancoradas em suportes sólidos.
- Sayegh, F.A.Q.e Montagnes, D.J.S., 2011. Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology*. 102, 3007–3013
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171–205.
- Suali, E., & Sarbatly, R. (2012). Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. doi:10.1016/j.rser.2012.03.047
- Sun, N., Wang, Y., Li, Y.-T., Huang, J.-C., & Chen, F. (2008). Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Process Biochemistry*, 43(11), 1288–1292. doi:10.1016/j.procbio.2008.07.014
- Terroni, H. C., Jesus, M. D. E., Thaessa, L., Lucina, A., Ventura, V., Fernandes, R., & Damy,

- C. (2013). Liofilização. *Revista Científica UNILAGO*, 271–284.
- Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3, 554–590. doi:10.1039/b924978h
- Yuan, Z., Wang, Z., Takala, J., Hiltunen, E., Qin, L., Xu, Z., ... Zhu, L. (2013). Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 137, 318–25. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.144
- Zhang, X., Amendola, P., Hewson, J. C., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2012). Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology*, 116, 477–84. doi:10.1016/j.biortech.2012.04.002
- Zhu, L. D., Hiltunen, E., Antila, E., Zhong, J. J., Yuan, Z. H., & Wang, Z. M. (2014). Microalgal biofuels : Flexible bioenergies for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, 1035–1046. doi:10.1016/j.rser.2013.11.003
- Zhu, S., Huang, W., Xu, J., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2014). Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology*, 152, 292–298. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.092

7. ANEXOS

ANEXO A – Curvas de crescimento nos reatores de menores dimensões.

Apresentam-se de seguida os resultados experimentais obtidos durante a avaliação do crescimento da *Chlorella zofingiensis* em meio BBM, nos diferentes fotobiorreatores.

Tabela A-1 - Dados de crescimento no reator 1.

Reator 1 (5 L)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max}.$ (d ⁻¹)
0	0,304	7,21	28,9	0,124	
3	0,446	7,34	29	0,187	0,1371
5	0,480	7,41	29,1	0,202	0,038823
7	0,484	7,48	29,9	0,204	0,004375
10	0,578	7,69	30,5	0,246	0,06209
11	0,613	7,84	31,2	0,261	0,061358
12	0,666	7,97	30,1	0,285	0,086288
14	0,706	8,11	30	0,303	0,030262
17	0,826	8,35	27,8	0,356	0,054092
18	0,843	8,41	27,9	0,363	0,020999
21	1,026	8,59	27,5	0,434	0,058894
24	1,052	8,68	26,6	0,477	0,031888
25	0,903	8,75	26,2	0,390	-0,20157
26	1,04	8,81	28,9	0,451	0,144982
28	0,968	8,93	30	0,419	-0,03679
31	1,124	8,96	28,3	0,455	0,027563
35	1,236	9,12	27,8	0,505	0,02594
39	1,604	9,08	27,3	0,668	0,070132
41	1,676	9,1	28,4	0,700	0,023375
45	1,824	9,15	28,4	0,766	0,022434

Tabela A-2 - Dados de crescimento no reator 2.

Reator 2 (5 L)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max}.$ (d ⁻¹)
0	0,1226	7,67	28,5	0,043	
1	0,163	7,78	28,8	0,061	0,346077
3	0,207	7,90	29	0,081	0,138289
6	0,222	8,01	30,1	0,088	0,026385
7	0,215	8,12	30	0,084	-0,03616
10	0,254	8,24	29,8	0,102	0,062203
13	0,471	8,35	28,4	0,198	0,222128
14	0,605	8,47	28	0,258	0,262657
15	0,641	8,56	27,4	0,274	0,060209
17	0,73	8,63	29,2	0,313	0,067465
20	0,897	8,83	28,5	0,387	0,070855
24	1,192	9,04	27,4	0,485	0,056307
28	1,38	9,07	27,2	0,569	0,039699
31	1,452	9,05	27,8	0,601	0,018236
35	1,576	9,27	28,4	0,656	0,021931

Tabela A-3 - Dados de crescimento no reator 3.

Reator 3 (5 L)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max} \cdot (d^{-1})$
0	0,1226	7,80	28,4	0,043	
1	0,167	7,91	28,8	0,063	0,374629
3	0,202	8,02	29	0,079	0,110092
6	0,24	8,13	30	0,096	0,064796
7	0,238	8,24	30,1	0,095	-0,009341
10	0,297	8,35	29,6	0,121	0,081469
13	0,406	8,46	28,1	0,169	0,112297
14	0,613	8,55	26,3	0,261	0,433835
15	0,665	8,66	28,8	0,284	0,084727
17	0,78	8,77	30,1	0,335	0,082613
20	0,846	8,88	28,6	0,365	0,027932
24	0,946	9,13	27,8	0,409	0,028731
28	1,296	9,28	27,4	0,565	0,080517
31	1,364	9,18	28,5	0,595	0,017372
35	1,412	9,26	28,4	0,616	0,008804

Tabela A-4 - Dados de crescimento no reator 4.

Reator 4 (6 L)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max} \cdot (d^{-1})$
0	0,112	7,57	26,5	0,039	
1	0,174	7,66	26,2	0,066	0,53756
2	0,24	7,89	28,8	0,096	0,366486
4	0,334	8,1	30	0,137	0,181281
7	0,387	8,39	28,6	0,161	0,052752
11	0,57	8,71	27,4	0,242	0,102262
15	0,994	9,07	27,7	0,430	0,14385
18	1,115	8,98	28,5	0,484	0,039219
22	1,091	9,1	28,4	0,474	-0,00557

ANEXO B – Crescimento da *Chlorella zofingiensis* no ensaio com adição de glicose

Tabela B-1 - Dados de crescimento no reator com adição de glicose (0,75 g/L).

Reator com adição de glicose (250 mL)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,118	7,25	26,6	0,041	
1	0,302	7,38	26,1	0,123	1,090704
2	0,242	7,53	28,8	0,096	-0,24402
4	0,468	8,47	28,9	0,197	0,356719
7	0,483	8,73	28,4	0,203	0,011097
11	0,983	8,84	27,9	0,426	0,184466
15	1,027	8,89	27,2	0,445	0,011225
18	1,038	8,82	27,4	0,450	0,003639
22	1,204	8,93	27,5	0,524	0,037934

Tabela B-2 – Dados de crescimento no reator sem adição de glicose.

Reator sem adição de glicose (250 mL)					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,1	7,62	28,3	0,033	
1	0,126	7,89	28	0,045	0,29729
3	0,564	8,1	28,8	0,239	0,836895
6	1,334	8,28	30,1	0,570	0,288811
7	1,518	8,49	29,8	0,652	0,13546
10	2,766	8,64	28,1	1,184	0,198647
13	3,564	8,78	26,6	1,539	0,08752
14	3,916	8,92	26,1	1,695	0,096768
15	4,328	9,01	29	1,878	0,102516
17	4,92	8,98	30,1	2,388	0,120135
20	5,824	9,13	28,1	2,499	0,015031
Adição de meio ao reator					
20	2,348	8,67	28,2	0,999	
24	2,772	9,15	27,7	1,187	0,04319
28	2,396	9,32	27,3	1,020	-0,03791
31	2,592	8,98	28,4	1,107	0,027301
35	3,192	9,07	28,5	1,374	0,053925

ANEXO C – Crescimento da *Chlorella zofingiensis* no ensaio com esterilização com hipoclorito de sódio (HS)

Tabela C-1 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 0.

DIA 0					
Reator	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0 HS	0,248	7,87	27,9	0,099	
0,5 HS	0,251	7,89	28,2	0,100	0,006679
1 HS	0,239	7,94	28,3	0,095	-0,02727
2 HS	0,245	7,99	28,5	0,098	0,013819
5 HS	0,251	8,11	28,6	0,100	0,013448
10 HS	0,253	8,32	29,1	0,101	-0,0011

Tabela C-2 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 2.

Dia 2					
Reator	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0 HS	0,232	8,2	28	0,092	
0,5 HS	0,167	8,3	28,1	0,063	-0,18834
1 HS	0,11	8,4	28,4	0,038	-0,25635
2 HS	0,212	8,59	28,5	0,083	0,393908
5 HS	0,272	8,58	28,6	0,110	0,139075
10 HS	0,238	8,72	29,3	0,095	0,018504

Tabela C-3 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 4.

Dia 4					
Reator	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0 HS	0,311	8,31	27,9	0,127	
0,5 HS	0,268	8,51	28	0,108	-0,0814342
1 HS	0,245	8,58	28,5	0,098	-0,0496954
2 HS	0,306	8,67	28,5	0,125	0,1223142
5 HS	0,401	8,69	28,1	0,167	0,1455722
10 HS	0,367	8,8	29	0,152	0,01184399

Tabela C-4 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 6.

Dia 6					
Reator	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0 HS	0,465	8,47	27,6	0,195	
0,5 HS	0,398	8,67	27,7	0,166	-0,08258
1 HS	0,379	8,62	28	0,157	-0,02613
2 HS	0,435	8,74	28,2	0,182	0,073411
5 HS	0,576	8,72	28,2	0,245	0,147758
10 HS	0,514	8,89	28,9	0,217	0,014919

Tabela C-5 - Dados de crescimento no ensaio com esterilização com HS, no dia 8.

Dia 8					
Reator	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0 HS	0,612	8,68	27,7	0,261	
0,5 HS	0,578	8,81	27,7	0,246	-0,02983
1 HS	0,559	8,71	28,2	0,237	-0,01748
2 HS	0,669	8,95	28,2	0,286	0,093635
5 HS	0,789	8,91	28,3	0,339	0,085422
10 HS	0,755	9,11	28,6	0,324	0,00569

ANEXO D – Crescimento da *Chlorella zofingiensis* nos tanques de 50 L

Tabela D-1 - Dados de crescimento no tanque 1.

Tanque 1					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,133	8,3	30	0,048	
1	0,159	9,2	30	0,060	0,215529
4	0,246	8,66	29,3	0,098	0,166676
7	0,276	9,05	30,1	0,112	0,042412
10	0,356	9,12	29,9	0,147	0,09219
54	0,869	7,3	28,5	0,375	0,021269

Tabela D-2 - Dados de crescimento no tanque 2.

Tanque 2					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,183	8,31	30	0,070	
1	0,116	8,8	30	0,040	-0,55127
4	0,254	8,68	29,4	0,102	0,3074
7	0,318	9,12	30	0,130	0,082118
10	0,332	9,23	29,8	0,136	0,015553
54	0,737	7,1	28,6	0,316	0,019115

Tabela D-3 - Dados de crescimento no tanque 3.

Tanque 3					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,178	7,03	28	0,068	
2	0,133	7,55	28	0,048	-0,17402
3	0,184	7,65	27,9	0,071	0,386476
6	0,127	7,84	28,3	0,045	-0,14786
7	0,287	8,15	25	0,116	0,942773
9	0,331	8,22	25,3	0,136	0,077593
13	0,372	8,36	26,6	0,154	0,031425
15	0,222	8,51	26,2	0,088	-0,28295
16	0,280	8,59	27,8	0,113	0,257944
19	0,310	8,66	27,9	0,127	0,037061
20	0,368	8,78	28,1	0,152	0,185182
22	0,59	9,04	28	0,251	0,24949
24	0,681	9,12	27,9	0,291	0,074655
26	0,89	9,31	27,7	0,384	0,138266
27	0,929	9,38	28	0,402	0,044095

Tabela D-4 - Dados de crescimento no tanque 4.

Tanque 4					
Dia	Abs	pH	T (°C)	C (g/L)	$\mu_{max.}(d^{-1})$
0	0,229	7,18	28,1	0,091	
2	0,215	7,64	28	0,084	-0,03553
3	0,216	7,77	27,8	0,085	0,005247
6	0,182	7,88	28,1	0,070	-0,0653
7	0,292	8,17	25,1	0,119	0,530741
9	0,338	8,39	25,1	0,139	0,07945
13	0,385	8,53	26,3	0,160	0,034965
15	0,323	8,61	26,6	0,132	-0,09448
16	0,491	8,69	28	0,207	0,446971
19	0,570	8,77	28,3	0,242	0,05219
20	0,629	8,85	28	0,268	0,10277
22	0,694	8,91	27,9	0,297	0,051097
24	0,796	9,08	28	0,343	0,070942
26	0,92	9,41	27,9	0,398	0,074559
27	0,973	9,47	28,1	0,421	0,057525

ANEXO E – Quantificação de pigmentos na microalga *Chlorella zofigiensis*

Tabela E-1 - Massa de amostra pesada para determinação de pigmentos e respetivas concentrações.

Massa pesada para análise de pigmentos	0,0019 g	0,38 g/L	380 mg/L
Replicado	0,0016 g	0,32 g/L	320 mg/L

Tabela E-2 - Dados das absorvâncias medidas para determinação de pigmentos.

Medição	480 nm	649 nm	665 nm
1	0,847	0,413	0,921
2	0,951	0,448	1,025

$$Ca = 12.19 \cdot A_{665} - 3.45 \cdot A_{649}$$

$$Cb = 21.99 \cdot A_{649} - 5.32 \cdot A_{665}$$

$$Car = \frac{1000 \cdot A_{480} - 2.14 \cdot Ca - 70.16 \cdot Cb}{220}$$

Tabela E-3 - Dados obtidos para clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) e carotenoides totais (Car).

Ca=	9,80214 mg/L	0,025795	mg de pigmento/mg de biomassa
	10,94915 mg/L	0,034216	mg de pigmento/mg de biomassa
Cb=	4,18215 mg/L	0,011006	mg de pigmento/mg de biomassa
	4,39852 mg/L	0,013745	mg de pigmento/mg de biomassa
Car=	2,42092 mg/L	0,006371	mg de pigmento/mg de biomassa
	2,81349 mg/L	0,008792	mg de pigmento/mg de biomassa

Tabela E-4 - Percentagens de pigmentos.

Clorofila a	2,579511	3,00%
	3,421609	
Clorofila b	1,100566	1,23%
	1,374538	
Carotenoides totais	0,637086	0,76%
	0,879217	

ANEXO F – Liofilização de microalgas

As microalgas foram concentradas por decantação, seguindo-se uma centrifugação. Ainda assim, as microalgas retêm muita água que inibe a transesterificação, pelo que foram congeladas e depois liofilizadas. A massa seca total obtida após liofilização encontra-se de seguida.

Tabela F-1 - Dados obtidos após liofilização.

Massa frasco vazio	54,7725 g
M. amostra liofilizada + frasco	75,2126 g
Biomassa seca	20,4401 g

ANEXO G – Quantificação de lípidos

Os lípidos foram extraídos pela ação de solvente e, após a remoção dos solvente, foi quantificada a quantidade recuperada. Os resultados encontra-se na Tabela G-1.

Tabela G-1 - Dados obtidos na quantificação de lípidos.

QUANTIFICAÇÃO DOS LÍPIDOS				
	Massa tubo	Massa pós extração	% Lípidos	% Média de lípidos
massa tubo 1	12,678 g	12,769 g	9,1 %	6,866667
massa tubo 2	12,626 g	12,705 g	7,9 %	
massa tubo 3	12,871 g	12,907 g	3,6 %	

ANEXO H – Perfil de FAME's

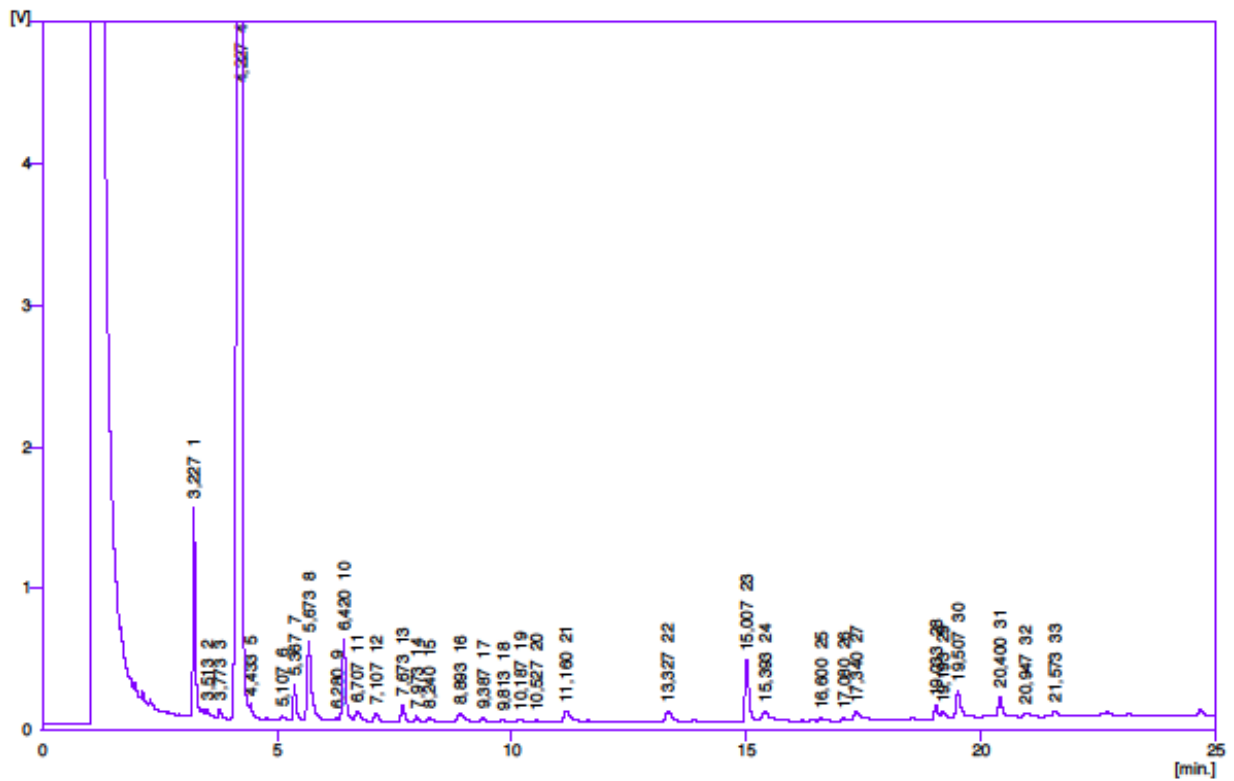
O perfil de lípidos da *Chlorella zofingiensis* e da *Arthrospira maxima*, encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela H-1 - Dados de CG para a *Chlorella zofingiensis*.

<i>Chlorella zofingiensis</i>			
Tempo (min)	Área (mV.s)		
3,227	5442,799	40,98%	C16
5,367	1191,916	8,97%	C18:0
5,673	3611,031	27,19%	C18:1
6,42	3035,502	22,86%	C18:2
	13281,248		

Tabela H-2 - Dados de CG para a *Arthrospira maxima*.

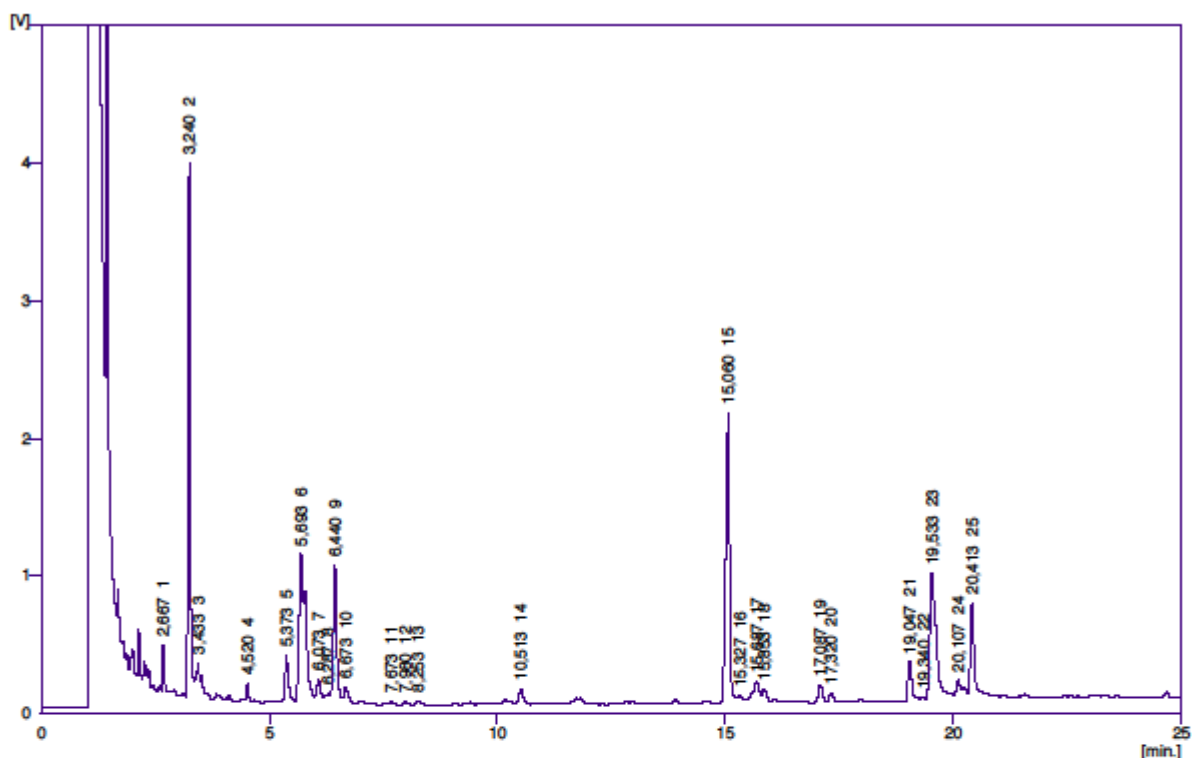
<i>Arthrospira maxima</i>			
Tempo (min)	Área (mV.s)		
3,24	11968,311	40,05%	C16
5,373	1764,364	5,90%	C18:0
5,693	10644,722	35,62%	C18:1
6,44	5507,071	18,43%	C18:2
	29884,468		



Result Table - Calculation Method ESTD

Reten. Time	Area [mV.s]	Area % [%]	Amount [µl]	Amount % [%]	Peak Type	Compound Name
3.227	5442,796	5,6	0,0	0,0		
3.513	482,309	0,5	17,6	56,9	ISTD	ISTD
3.773	335,350	0,3	0,0	0,0		
4.227	69240,296	71,2	0,0	0,0		
4.433	533,869	0,5	0,0	0,0		
5.107	182,957	0,2	0,0	0,0		
5.367	1191,916	1,2	0,0	0,0		
5.673	3611,081	3,7	0,0	0,0		
6.290	115,393	0,1	0,0	0,0		
6.420	3035,502	3,1	0,0	0,0		
6.707	559,168	0,6	0,0	0,0		
7.107	351,154	0,4	13,3	43,1	Ordnr	1-xylen
7.673	708,043	0,7	0,0	0,0		
7.973	216,845	0,2	0,0	0,0		
8.240	261,843	0,3	0,0	0,0		
8.893	629,784	0,6	0,0	0,0		
9.387	158,574	0,2	0,0	0,0		
9.813	135,962	0,1	0,0	0,0		
10.187	216,082	0,2	0,0	0,0		
10.527	132,747	0,1	0,0	0,0		
11.160	819,287	0,8	0,0	0,0		
13.327	783,166	0,8	0,0	0,0		
15.007	2578,056	2,7	0,0	0,0		
15.393	943,581	1,0	0,0	0,0		
16.600	112,503	0,1	0,0	0,0		
17.080	120,284	0,1	0,0	0,0		
17.340	725,153	0,7	0,0	0,0		
19.033	533,001	0,5	0,0	0,0		
19.193	377,785	0,4	0,0	0,0		
19.507	1426,394	1,5	0,0	0,0		
20.400	804,241	0,8	0,0	0,0		
20.947	273,303	0,3	0,0	0,0		
21.573	230,665	0,2	0,0	0,0		

Figura H-1 - Dados obtidos no CG para a *Chlorella zofingiensis*.



Result Table - Calculation Method ESTD

Reten. Time	Area [mV.s]	Area % [%]	Amount [µl]	Amount % [%]	Peak Type	Compound Name
2.667	811,607	1,1	0,0	0,0		
3.240	11968,311	16,4	0,0	0,0		
3.433	2336,375	3,2	85,1	100,0	ISTD	ISTD
4.520	408,514	0,6	0,0	0,0		
5.373	1764,364	2,4	0,0	0,0		
5.693	10644,722	14,6	0,0	0,0		
6.073	1148,005	1,6	0,0	0,0		
6.287	467,911	0,6	0,0	0,0		
6.440	5507,071	7,6	0,0	0,0		
6.673	808,713	1,1	0,0	0,0		
7.673	115,291	0,2	0,0	0,0		
7.980	150,126	0,2	0,0	0,0		
8.253	223,056	0,3	0,0	0,0		
10.513	897,491	1,0	0,0	0,0		
15.060	12577,429	17,3	0,0	0,0		
15.327	621,586	0,9	0,0	0,0		
15.687	1680,254	2,3	0,0	0,0		
15.853	812,735	1,1	0,0	0,0		
17.087	867,151	1,2	0,0	0,0		
17.320	533,794	0,7	0,0	0,0		
19.047	1827,597	2,5	0,0	0,0		
19.340	173,967	0,2	0,0	0,0		
19.533	9718,180	13,4	0,0	0,0		
20.107	1778,142	2,4	0,0	0,0		
20.413	5145,163	7,1	0,0	0,0		
Total	72786,097	100,0	85,1	100,0		

Figura H-2 - Dados obtidos no CG da *Arthrospira maxima*.

ANEXO I – Curva de calibração para a Absorvância vs concentração de *Chlorella zofingiensis*.

Tabela I-1 - Dados para a curva de calibração da *Chlorella zofingiensis* (concentração vs absorvância).

	Absorvância 680 nm	Concentração da amostra
	-	g/L
Biomassa Verde	0,65	0,2875
	0,98	0,4313
	0,59	0,2464
	0,55	0,2300
	0,51	0,2156
	0,88	0,3833
	0,82	0,3538
	0,77	0,3286
	0,71	0,3067
	0,48	0,1917
	0,43	0,1769
	0,42	0,1643
	0,38	0,1533
	0,34	0,1438
	0,24	0,0958
	0,23	0,0885
	0,20	0,0821
	0,19	0,0767
0,18	0,0719	
0,08	0,0288	

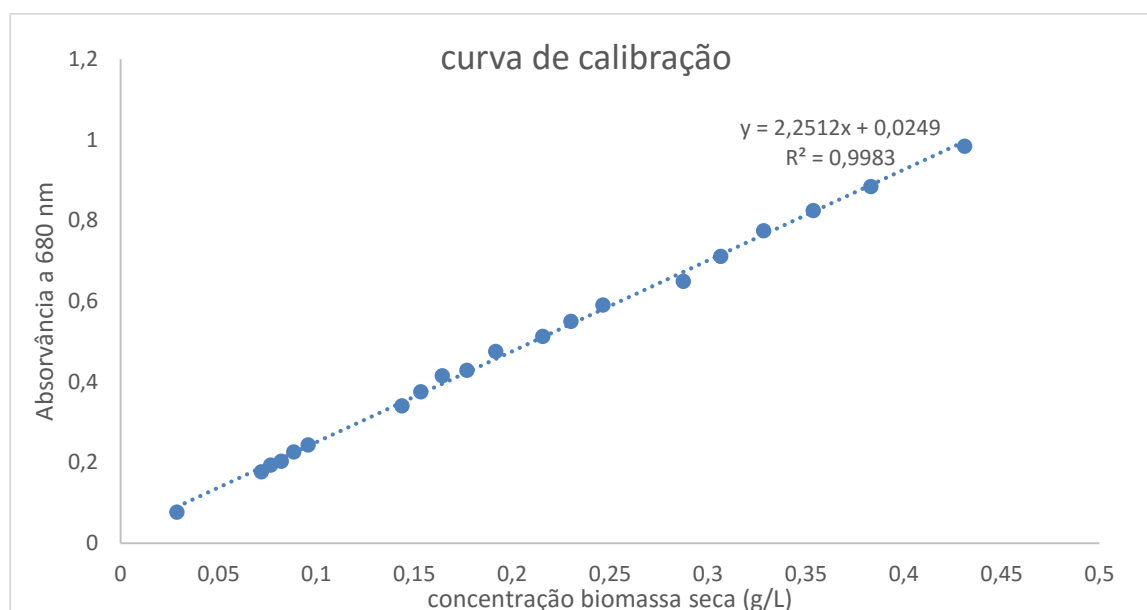


Figura I-1 - Curva de calibração da *Chlorella zofingiensis* – absorvância vs conc.biomassa seca (g/L)