

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



**Estudos de transesterificação de óleos produzidos a
partir de *Chlorella protothecoides* por via
heterotrófica**

Ana Filipa Garcia de Moraes

Trabalho realizado sob a supervisão de

Doutor Alberto José Delgado dos Reis (LNEG)

Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino (FCUL/LNEG)

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Dissertação

2015

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Doutora Ana Cristina Oliveira e Doutor Alberto Reis, pela possibilidade de realização deste trabalho na Unidade de Bioenergia do LNEG e por todo o apoio dado neste processo que é a escrita de uma dissertação de mestrado. Agradeço a paciência, dedicação e a disponibilidade sempre mostrada. Um agradecimento especial à Doutora Cristina, que aceitou orientar-me quando tudo estava desorientado e me prestou todo o auxílio que precisei. Um grande, grande obrigada.

À Doutora Paula Passarinho, pela ajuda prestada em determinadas partes do trabalho experimental e pela sua permanente disponibilidade para me ajudar e esclarecer qualquer dúvida.

À Natéria de Sousa por toda a ajuda no laboratório, acompanhou-me num ambiente que não era o meu e salvou-me das minhas asneiras.

À Doutora Carla Santos e Engenheiro Carlos Barata por todo o auxílio nas questões referentes à fermentação.

A todos os que esta experiência me trouxe, que mais do que colegas se tornaram bons amigos e foram verdadeiros companheiros, em todo o sentido da palavra.

Aos meus amigos, por me ouvirem, aturarem, pela paciência com a minha falta de disponibilidade e por toda a força que me deram.

Por fim, e porque neste caso os últimos são mesmo os primeiros, à minha família, que todos os dias me fazem sentir que não poderia ter melhor.

Abstract

This work aimed to study the feasibility of biodiesel production from the heterotrophic *Chlorella protothecoides* microalga.

Firstly, microalgae biomass production via fermentation was initiated and monitored. The need of a previous treatment for cell rupture of the dried biomass was evaluated through a mechanical disruption with a bead mill, allowing a saponifiable lipid fraction's extraction of $50.15 \pm 1.07 \text{g}/100 \text{g dw}$ biomass.

The lipid fraction showed an acid value of $3.96 \pm 0.12 \text{mgKOH/g}$, an iodine value of $85.22 \text{gI}_2/100 \text{g}$ and a fatty acids profile dominated by the presence of oleic (57.06%), linoleic (22.61%) and palmitic (14.47%) acids. The saponifiable matter content, determined in the extracted lipid fraction and directly in the biomass, was 96%. Other quality parameters, such as saponification value (189.87mgKOH/g), cetane number (54.46) and CFPP (-9.07°C), were also assessed. The obtained results are in accordance with the EN 14214 quality requirements, enabling the production of good quality biodiesel from the studied microalga.

To complete the characterization of microalgae's composition the content of total lipids ($58.34 \text{g}/100 \text{g dw}$), carbohydrates ($17.47 \pm 4.06 \text{g}/100 \text{g dw}$), protein ($6.45 \text{g}/100 \text{g dw}$) and ash ($6.92 \pm 0.52 \text{g}/100 \text{g dw}$) contents were also determined.

For the biodiesel conversion, the microalgal biomass was put through a direct transesterification. The influence of several parameters in the amount of esters converted has been evaluated. The process has revealed itself effective for a 18h reaction time, with 95% of the saponifiable matter being converted. The process showed to be sensitive to the presence of moisture in the biomass and also to the reaction temperature.

In a preliminary economic and energy analysis, at lab scale, the soxhlet extraction followed by an alkaline transesterification showed to be the most efficient process (0.139). The direct transesterification process proved itself to be a better economic option (11.53€/kg biodiesel) although still far from the economic feasibility.

Keywords: *Chlorella protothecoides*, microalgae characterization, direct transesterification, biodiesel.

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como objetivo o estudo da viabilidade da produção de biodiesel a partir de biomassa da microalga *Chlorella protothecoides* heterotrófica.

Primeiramente, iniciou-se e monitorizou-se uma fermentação, com vista à produção de biomassa microalgal.

Partindo de biomassa liofilizada, avaliou-se a necessidade de pré-tratamento de ruptura celular da mesma para uma eficiente extração/contabilização da fração lipídica. A ruptura mecânica com moinho de bolas mostrou ser necessária, permitindo uma extração de $50,15 \pm 1,07$ g de fração lipídica saponificável/100g ps biomassa.

Esta fração apresentou um índice de acidez de $3,96 \pm 0,12$ mgKOH/g, um índice de iodo de $85,22$ gI₂/100g e um perfil em ácidos gordos dominado pela presença dos ácidos oleico (57,06%), linoleico (22,61%) e palmítico (14,47%). O teor de matéria saponificável, determinado na fração lipídica e diretamente na biomassa, foi de 96%. Foram ainda determinados teoricamente outros parâmetros de qualidade, como o índice de saponificação (189,87 mgKOH/g), o índice de cetano (54,46) e o CFPP (-9,07°C). Os valores obtidos nos parâmetros analisados encontram-se dentro dos limites das especificações da EN 14214, o que viabiliza a obtenção de um biodiesel de qualidade a partir da matéria-prima em estudo.

De forma a caracterizar a microalga em termos de composição, determinaram-se também o teor de lípidos totais (58,34 g/100g ps), de açúcares ($17,47 \pm 4,06$ g/100g ps), de proteína (6,45 g/100g ps) e de minerais ($6,92 \pm 0,5$ g/100g ps).

Para a conversão em biodiesel, a biomassa microalgal foi sujeita a um processo de transesterificação direta, tendo-se avaliado a influência de diversos parâmetros no teor em ésteres. Este revelou-se eficaz, com 95% da fração saponificável a ser convertida às 18h de reação, sendo suscetível a fatores como a presença de humidade na amostra ou a temperatura da reação.

Numa análise económica e energética preliminar, a nível laboratorial, verificou-se que o processo com extração soxhlet seguido de transesterificação alcalina é mais eficiente (0,139), apresentando o biodiesel proveniente de transesterificação direta o menor custo (11,53€/kg biodiesel), embora ainda afastado de um valor economicamente viável.

Palavras-chave: *Chlorella protothecoides*, caracterização microalgal, transesterificação directa, biodiesel.

Lista de abreviaturas

CFPP – Cold filter plugging point (Temperatura limite de filtrabilidade)

C.P. – *Chlorella protothecoides*

C. protothecoides – *Chlorella protothecoides*

CO₂ - Dióxido de carbono

C_xH_{2x}O₂ – Fórmula geral dos ésteres metílicos saturados

DGEG – Direcção Geral da Energia e Geologia

DME - Éter dimetílico

EN – Norma Europeia

UE – União Europeia

FAAE – *Fatty Acid Alkyl Ester* (Ésteres alquílicos de ácidos gordos)

FAME – *Fatty Acid Methyl Ester* (Ésteres metílicos de ácidos gordos)

FFA – *Free Fatty Acids* (Ácidos gordos livres)

GEE – Gases de efeito de estufa

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

H₂O - Água

IA – Índice de acidez

II – Índice de iodo

IS – Índice de saponificação

KOH – Hidróxido de potássio

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P.

NaOH – Hidróxido de sódio

NP – Norma Portuguesa

NO_x – óxidos de azoto

MeOH – metanol

MIPK – metil isso-propil cetona (MIPK)

Mtep – milhões de toneladas equivalentes de petróleo

ps – peso seco

PTN – Pressão e temperatura normais

REN – Redes Energéticas Nacionais

THF – Tetrahidrofurano

vvv – volume de ar por volume de meio de cultura por minuto

Índice

Agradecimentos.....	II
Abstract	III
Resumo.....	IV
Lista de abreviaturas.....	V
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XI
1. Introdução.....	1
1.1 Enquadramento energético	1
1.2 Biocombustíveis	3
1.3 Biodiesel.....	4
1.3.1 Matérias-primas.....	4
1.3.2 Processos de produção - transesterificação	5
1.3.2.1 Transesterificação química.....	6
1.3.2.1.1 Catálise homogénea.....	6
1.3.2.1.2 Catálise heterogénea.....	7
1.3.2.1.3 Transesterificação direta (<i>in situ</i>)	8
1.3.2.2 Transesterificação enzimática	8
1.3.2.3 Transesterificação na ausência de catalisadores.....	9
1.3.2.4 Transesterificação supercrítica	9
1.3.2.5 Transesterificação com recurso a co-solventes	9
1.3.3 Propriedades e qualidade do biodiesel	10
1.4 Microalgas para produção de biodiesel	12
1.4.1 Produção da biomassa microalgal	12
1.4.1.1 Crescimento da biomassa microalgal: Sistemas de cultivo	12
1.4.1.2 Colheita da biomassa microalgal.....	13
1.4.1.3 Extração dos lípidos	13
1.4.1.4 Conversão dos lípidos	14
1.4.2 Valorização da biomassa microalgal após extração lipídica	14

1.5	Microalga <i>Chlorella protothecoides</i>	15
2.	Materiais e métodos.....	17
2.1	Microalga	17
2.2	Reagentes	17
2.3	Meio de crescimento da microalga.....	17
2.4	Equipamentos	17
2.5	Métodos.....	17
2.5.1	Obtenção da biomassa microalgal	17
2.5.2	Rutura celular da biomassa microalgal.....	19
2.5.3	Produção de biodiesel: transesterificação direta da biomassa microalgal	19
2.5.3.1	Efeito do teor de humidade da biomassa	20
2.5.4	Metodologias analíticas	21
2.5.4.1	Caracterização da biomassa microalgal.....	21
2.5.4.1.1	Determinação do teor de lípidos	21
2.5.4.1.2	Determinação do teor de açúcares	22
A.	Hidrólise ácida quantitativa.....	22
B.	Determinação colorimétrica dos açúcares totais	23
2.5.4.1.3	Determinação do teor de proteína.....	23
2.5.4.1.4	Determinação do teor de minerais	24
2.5.4.1.5	Determinação do teor de humidade	24
2.5.4.2	Caracterização da fração lipídica.....	25
2.5.4.2.1	Determinação do índice de acidez	25
2.5.4.2.2	Determinação do índice de iodo	26
A.	Índice de iodo experimental	26
B.	Índice de iodo teórico	26
2.5.4.2.3	Perfil e composição em ácidos gordos	27
B.	Análise cromatográfica.....	28
2.5.4.3	Caracterização do biodiesel	29
3.	Discussão de resultados.....	30
3.1	Crescimento da microalga	30

3.2	Caracterização da biomassa microalgal.....	31
3.2.1	Teor de lípidos.....	31
3.2.1.1	Efeito do pré-tratamento.....	31
3.2.2	Teor de açúcares totais	33
3.2.3	Teor de proteína e minerais	34
3.3	Caracterização da fração lipídica.....	35
3.3.1	Índice de acidez	35
3.3.2	Índice de iodo	36
3.3.3	Perfil e composição em ácidos gordos	36
3.3.4	Índice de saponificação, índice de cetano e CFPP	37
3.4	Transesterificação direta.....	39
3.4.1	Efeito do tempo de reação	39
3.4.2	Efeito do pré-tratamento de rutura celular.....	40
3.4.3	Efeito da humidade.....	41
3.4.4	Efeito da temperatura	44
4.	Aspetos energéticos e económicos	46
5.	Conclusão	51
6.	Trabalho futuro.....	53
7.	Referências	55
	Anexo I.....	60
	Anexo II.....	61
	Anexo III	62
	Anexo IV	63

Índice de figuras

Fig. 1.1 - Produção mundial de energia, por sector energético, em Mtep (Fonte: Pocketbook, 2014). ..	1
Fig. 1.2 - Evolução da taxa de dependência energética (%) em Portugal (Fonte: DGEG, 2014).....	2
Fig. 1.3 - Consumo energético europeu, por sector de actividade, em Mtep (Fonte: Pocketbook, 2014).	2
Fig. 1.4 - Esquema geral da reação de transesterificação (adaptado de Abbaszaadeh <i>et al.</i> , 2012).....	5
Fig. 1.5 - Reação de saponificação (adaptado de Lam <i>et al.</i> , 2010).....	7
Fig. 1.6 - Comparação entre os métodos de transesterificação convencional e <i>in situ</i> (adaptado de Velasquez-Orta <i>et al.</i> , 2012).....	8
Fig. 1.7 - Representação esquemática das várias fases da produção do biodiesel (Adaptado de Amaro <i>et al.</i> , 2012).....	12
Fig. 1.8 – Diferentes combinações de sistemas de valorização da biomassa microalgal residual e dos seus co e subprodutos (adaptado de Soratana <i>et al.</i> , 2014).	15
Fig. 1.9 – Células da microalga <i>Chlorella protothecoides</i> observadas com um microscópio óptico com uma ampliação de 1000x, obtidas através de: a) crescimento heterotrófico, b) crescimento mixotrófico, e c) crescimento autotrófico (Fonte: Santos, 2014).....	16
Fig. 2.1 - Inóculo de <i>Chlorella protothecoides</i>	18
Fig. 2.2 - Fermentador BIOLAFITTE 111 Bd Robespierre 78300 POISSY.	18
Fig. 2.3 - Biomassa microalgal (<i>Chlorella protothecoides</i>) do 2º ensaio, após moagem com 2 esferas de 15mm (2BM).	19
Fig. 2.4 - Extração da fração lipídica em soxhlet.	22
Fig. 2.5- Transmetilação da fração lipídica pelo método de trifluoreto de boro.	28
Fig. 3.1 - Teor de lípidos da biomassa liofilizada de <i>C. protothecoides</i> , obtida de ambos os ensaios fermentativos, em função do pré-tratamento: () moinho de bolas utilizando 2 bolas de 10mm de diâmetro (2 bolas BM), () hidrólise ácida e () sem pré-tratamento.	33
Fig. 3.2 - Composição da microalga <i>Chlorella protothecoides</i> , proveniente do primeiro ensaio fermentativo (N/I – não identificado).....	35
Fig. 3.3 – Influência do tempo na conversão em ésteres metílicos da fração lipídica presente na biomassa liofilizada (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H ₂ SO ₄ ; 50°C; 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.	40
Fig. 3.4 - Influência do pré-tratamento mecânico de rutura celular na conversão em ésteres metílicos para diferentes períodos de incubação: () biomassa liofilizada, () biomassa moída com moinho de bolas (2BM) (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H ₂ SO ₄ ; 50°C; 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.	41
Fig. 3.5 - Influência do teor de humidade da biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo na conversão em ésteres metílicos após um período de incubação de 18 horas, na presença de 4mL de metanol e () 1,2 %v/v de catalisador, em relação ao metanol; () mesma razão catalisador/fase	

aquosa (condições: 50°C, 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.....	42
Fig. 3.6 - Comparação, para a biomassa proveniente do segundo ensaio fermentativo, da conversão em ésteres metílicos utilizando () biomassa húmida (com 89% de humidade) e () biomassa liofilizada com posterior adição de água (para 89% de humidade) (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H ₂ SO ₄ ; 50°C; 200rpm).....	43
Fig. 3.7 - Influência da temperatura (() 50°C, () 80°C) na conversão em ésteres metílicos (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H ₂ SO ₄ ; 200rpm).	44
Fig. 4.1- Quotas de custo associadas a cada processo envolvido nos dois métodos de conversão estudados.....	50
Fig. 6.1 - Esquematização da introdução de uma fonte energética renovável no processo de obtenção de biodiesel microalgal (adaptado de Brownbridge <i>et al.</i> , 2014).....	53

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Parâmetros de qualidade de biodiesel e respetivos limites (EN 14214:2012).....	11
Tabela 1.2 – Concentração máxima de biomassa, produtividade volumétrica de biomassa e teor de lípidos obtidos no cultivo heterotrófico de <i>Chlorella protothecoides</i>	16
Tabela 2.1 - Meio de fermentação da microalga <i>Chlorella protothecoides</i>	17
Tabela 2.2 - Fator de multiplicação dos ésteres metílicos insaturados para o cálculo do índice de iodo teórico (EN 16300:2013).....	27
Tabela 3.1 - Caracterização da biomassa microalgal proveniente dos ensaios fermentativos.	30
Tabela 3.2 - Teor de lípidos da <i>Chlorella protothecoides</i> liofilizada, sem pré-tratamento de rutura celular.	31
Tabela 3.3 - Teor de lípidos, para ambos os ensaios fermentativos, após pré-tratamento com hidrólise ácida. O resultado do primeiro ensaio fermentativo corresponde à média de dois ensaios independentes.	32
Tabela 3.4 - Teor de lípidos, para a biomassa de ambos os ensaios fermentativos, após pré-tratamento físico em moinho de bolas, em função da quantidade (8 ou 2) e tamanho (BP – 10mm; BM – 15mm) das bolas. Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.....	32
Tabela 3.5 - Teor de lípidos totais após pré-tratamento físico com moinho de bolas (2BM) para o primeiro ensaio fermentativo. O resultado da extração com hexano corresponde à média de dois ensaios independentes.	33
Tabela 3.6 - Teor de açúcares totais após hidrólise ácida quantitativa para biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo. O resultado corresponde à média de dois ensaios independentes.	34
Tabela 3.7 - Teores de proteína e minerais da biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo. O resultado para o teor de minerais corresponde à média de dois ensaios independentes.	34
Tabela 3.8 - Índice de acidez para o primeiro ensaio fermentativo. O resultado corresponde à média de dois ensaios independentes.....	35
Tabela 3.9 - Índices de iodo para o primeiro ensaio fermentativo. O valor do índice de iodo teórico corresponde à média de duas análises independentes.	36
Tabela 3.10 - Composição em ácidos gordos das frações lipídicas presentes na biomassa de <i>Chlorella protothecoides</i> , proveniente do primeiro ensaio fermentativo.	36
Tabela 3.11 – Classes e CFPP correspondente, para o biodiesel, em Portugal.	39
Tabela 3.12 - Teor de humidade da biomassa microalgal proveniente do segundo ensaio fermentativo. O resultado obtido corresponde à média de dois ensaios independentes.	41
Tabela 3.13 - Massa de água adicionada para o teor de humidade pretendido.	42
Tabela 4.1 - Processos, equipamentos e consumos associados às etapas dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de <i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica em biodiesel.	47
Tabela 4.2 – Eficiência dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de <i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica em biodiesel.....	48

Tabela 4.3 – Reagentes consumidos e respectivos custos associados às etapas dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em biodiesel. 48

Tabela 4.4 – Custo total de reagentes e eletricidade, por kg e por litro, dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides heterotrófica* em biodiesel. 49

1. Introdução

1.1 Enquadramento energético

O crescente aumento populacional, em conjunto com o cada vez mais rápido desenvolvimento tecnológico a nível mundial, tem conduzido a um aumento cada vez mais significativo na procura de energia. Atualmente considerada um bem essencial e um indicador da qualidade de vida de uma nação, a energia figura-se como um dos grandes objetos de debate da sociedade atual, essencialmente ao nível de formas de produção, distribuição, consumo e gestão dos recursos energéticos (Figura 1.1). A procura e desenvolvimento de tecnologias que permitam uma redução da atual dependência energética constituem um dos grandes desafios do século, já que, a considerável parcela económica direcionada às necessidades energéticas representa, por vezes, uma fatura demasiado pesada. Agregando estas necessidades energéticas atuais à perceção da imprescindibilidade de reverter os impactos das alterações climáticas, causados por anos de uso desregrado dos recursos naturais terrestres, e a busca de um equilíbrio que permita conciliar esta progressiva necessidade energética com a sustentabilidade do meio ambiente, insurge-se a necessidade de aposta na investigação e implementação de formas de produção de energia limpa.

Com a revolução industrial e o despontar da utilização generalizada de carvão e petróleo iniciou-se uma era de desenvolvimento dependente da capacidade de produção de energia e promoção de mobilidade que os combustíveis fósseis proporcionavam. Séculos depois, toma-se consciência de que, além das incertezas existentes quanto à disponibilidade de petróleo como recurso nas próximas décadas, existem também incertezas de natureza política e territorial capazes de causar instabilidade e condicionamentos no acesso ao mercado energético.

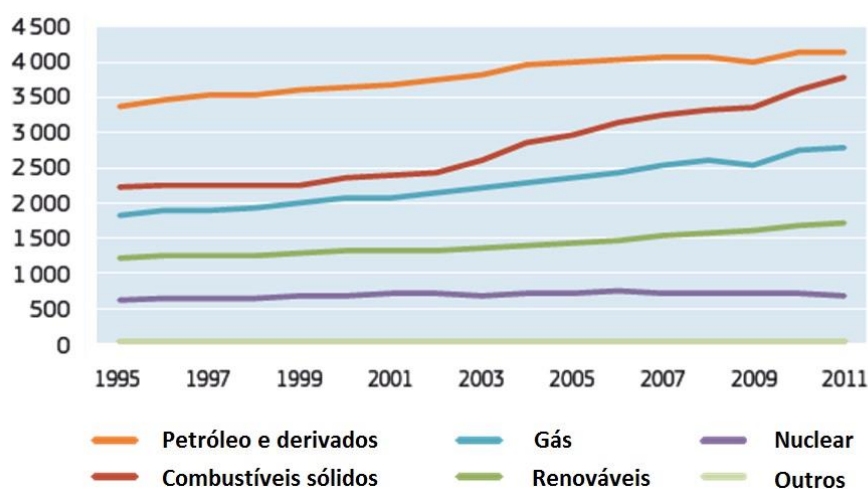


Fig. 1.1 - Produção mundial de energia, por sector energético, em Mtep (Fonte: Pocketbook, 2014).

No contexto Europeu, em 1997, uma das abordagens concretas a esta problemática consistiu em definir como objetivo o aumento, de forma generalizada, do consumo de energia a partir de fontes renováveis de 6% para 12% do consumo total de energia, até 2010. Com a perceção da inviabilidade do cumprimento dos objetivos previamente estabelecidos, provocada pelas prioridades políticas dos vários estados membros, foi lançada, em 2007, a primeira política comum para a energia a nível europeu. Através das metas definidas para 2020, nas Diretivas 20-20-20, pretendia-se promover a diversificação de fontes energéticas e a promoção ambiental nos países membros. Para tal, por comparação com os níveis de 1990, foram definidos três objetivos chave (Comissão Europeia, 2014):

- Redução mínima de 20% das emissões de gases de efeito de estufa (GEE);
- Aumento de 20% da quota de energia de fontes renováveis no consumo total energético da UE;

- Redução de 20% do consumo de energia, mediante medidas de promoção de eficiência energética.

Estas medidas foram revistas a 23 de outubro de 2014, tendo ficado acordado que até 2030 todos os estados membros devem reduzir no mínimo 40% as suas emissões de GEE, aumentar no mínimo 27% a quota de consumo renovável e reduzir no mínimo 27% o consumo energético, estando já em mente uma revisão deste valor para 30% em 2020 (Comissão Europeia, n.d.). Portugal, tal como os restantes estados membros da UE, tem o compromisso de atingir estas metas. Segundo dados da Direção Geral de Energia e Geologia, a dependência energética exterior portuguesa tem diminuído nos últimos anos sendo, porém, ainda bastante elevada (Figura 1.2). Tal deve-se à carência de recursos como o petróleo, o carvão e o gás natural que ainda representam a base do sistema electroprodutor português.

É, no entanto, de destacar o crescente aumento de penetração de produção renovável na rede, com valores a atingirem máximos históricos de 64% no ano de 2014 (REN, 2014).

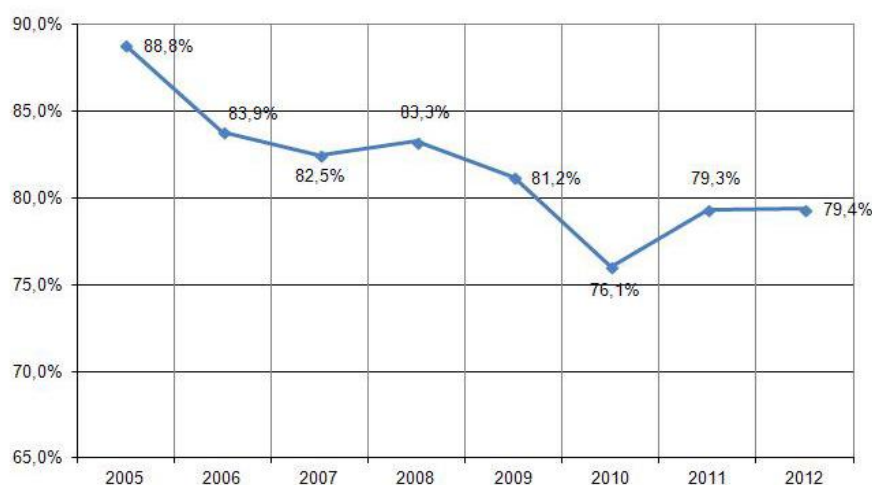


Fig. 1.2 - Evolução da taxa de dependência energética (%) em Portugal (Fonte: DGEG, 2014).

O sector dos transportes tem um especial peso no consumo de combustíveis fósseis, representando 63,7% do consumo mundial de petróleo (Key World, 2014). Na Europa confirma-se a predominância que este sector representa, sendo visível a sua tendência evolutiva nos últimos anos e como, atualmente, é a principal fonte do consumo energético europeu (Figura 1.3).

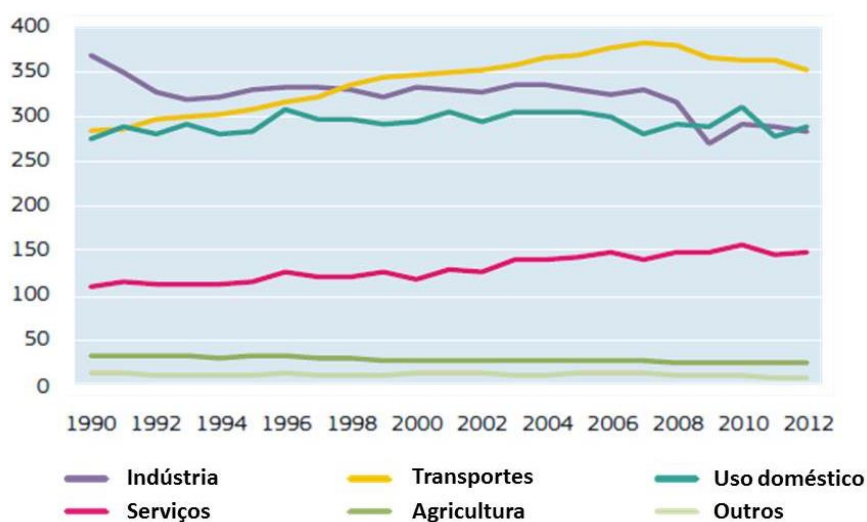


Fig. 1.3 - Consumo energético europeu, por sector de actividade, em Mtep (Fonte: Pocketbook, 2014).

Em 2003 a parcela do consumo procedente deste sector foi de 352MTep, representando cerca de 30% do consumo total da energia final da UE (Eurostat, 2013), tendo sido, nesse mesmo ano, publicada a Diretiva 2003/30/EC com vista à implementação de um mínimo de 5,75% do consumo total de energia a partir de biocombustíveis e/ou outros combustíveis renováveis em detrimento da gasolina e do gasóleo até ao final de 2010. Esta diretiva foi transposta para a legislação portuguesa em 2006, através do Decreto-Lei n° 62/2006, com a intenção de criar mecanismos para promover a colocação no mercado de quotas mínimas de biocombustíveis.

Com o novo acordo Europeu estabelecido em 2007, derivado das medidas propostas veio também o objetivo de incorporar no consumo de energia no sector dos transportes, um mínimo de 10% de biocombustíveis e outros combustíveis renováveis. Ficou também estabelecido que essa produção de biocombustíveis deve ser sustentável e que a sua implementação deve contribuir com uma redução mínima de 35% das emissões de GEE, quando comparados com o combustível fóssil a substituir, devendo essa redução passar a 50% a partir de 1 de janeiro de 2017 (Comissão Europeia, 2009).

Em Portugal esta evolução foi acompanhada com a definição das quotas mínimas de incorporação obrigatória de biocombustíveis em gasóleo rodoviário e ao estabelecimento da isenção parcial ou total do imposto sobre produtos petrolíferos nos biocombustíveis através da publicação de vários Decretos-Lei (n°66/2006, n°206/2008 e n°49/200) entre 2006 e 2009 e, em 2010, do Decreto-Lei n° 117/2010 por transposição para a ordem jurídica nacional dos artigos 17° e 19° e anexos III e V da Diretiva Europeia 2009/28/EC.

Em outubro de 2014 a UE lançou a proposta para a alteração da Diretiva 2009/28/CE, na qual se limita a utilização de biocombustíveis produzidos a partir de cereais e outras culturas ricas em amido e culturas açucareiras e oleaginosas a 7% do valor total do consumo final de energia nos transportes em 2020 (Comissão Europeia, 2014).

1.2 Biocombustíveis

De uma forma geral, os biocombustíveis podem ser classificados como primários ou secundários. Enquanto que os biocombustíveis primários – lenha, aparas de madeiras ou *pellets* - são naturais, sem qualquer processamento, maioritariamente provenientes de material orgânico sem qualquer modificação à sua constituição química, sendo utilizados para aquecimento, para cozinhar ou para produção de eletricidade, os biocombustíveis secundários são obtidos através do processamento da biomassa e podem ser utilizados para uma série de aplicações, entre as quais se destacam o sector dos transportes e diversos processos industriais. São, portanto, combustíveis primários modificados, processados e produzidos em forma de sólidos, líquidos ou gases. Exemplos de biocombustíveis secundários são o bioetanol, o biodiesel, o biogás, o biohidrogénio ou o DME (éter dimetilico) (Nigam e Singh, 2011).

Por sua vez, os biocombustíveis secundários dividem-se em biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração, dependendo da matéria-prima e da tecnologia necessárias à sua produção (Nigam e Singh, 2011). Os biocombustíveis de primeira geração são aqueles que geralmente são provenientes de açúcares, grãos ou sementes, e cuja obtenção do produto final requer processos relativamente simples. Por entrarem em competição direta com a indústria alimentar e serem atualmente produzidos a nível industrial em diversos países, causam um impacto global negativo no mercado de alimentos, já que provocam o aumento do custo de certas culturas e produtos alimentares. Por outro lado, a prática de desflorestação levada a cabo por alguns países, motivada pela necessidade de grandes áreas de terrenos aráveis com via a um contributo significativo à procura mundial de combustíveis, também é nociva do ponto de vista ecológico. Estas limitações favorecem a busca de fontes de biomassa que não entrem em conflito com o aprovisionamento alimentar (Ahmad *et al.*, 2011; Nigam e Singh, 2011).

Já os biocombustíveis de segunda geração, que podem ter origem termoquímica ou bioquímica, consoante o método de conversão, são produzidos a partir de fontes alternativas às culturas alimentares, sejam matérias-primas residuais (ex: óleos alimentares usados, gorduras animais), materiais lenhocelulósicos ou culturas específicas para a produção de bioenergia, geralmente em terrenos marginais para a agricultura convencional. Por não serem próprios para consumo demarcam-se do conflito com a indústria alimentar, são mais eficientes e ecológicos pois requerem uma menor

área de cultivo e produzem coprodutos que podem ser reutilizados. No entanto, também não apresentam taxas de produção capazes de suprimir a procura de combustível mundial (Ahmad *et al.*, 2011; Nigam e Singh, 2011).

Apesar da produção de biocombustíveis de segunda geração minimizar alguns impactos relativamente aos de primeira geração, continua a ser nociva a nível de recursos como a água e o solo, tornando-se a sua produção em grandes quantidades insustentável. Estes fatores conduziram ao desenvolvimento de biocombustíveis de terceira geração, que diferem dos anteriores por serem derivados de microalgas e outros microrganismos capazes de atingir elevadas produtividades com altos rendimentos oleicos. As microalgas não entram em competição com a indústria alimentar, permitem uma grande variabilidade de condições de cultivo, possuem coprodutos e subprodutos escoáveis para outros mercados e envolvem sistemas de produção eficientes que utilizam energia solar e fixam dióxido de carbono atmosférico, contribuindo assim adicionalmente para uma redução de um gás de efeito de estufa (Ahmad *et al.*, 2011; Nigam e Singh, 2011). Existem já também desenvolvimentos na tecnologia de biocombustíveis de quarta geração, que consistem em culturas que são geneticamente manipuladas para garantir que a fixação de dióxido de carbono atmosférico é superior àquele que é produzido durante o processo de produção (Demirbas, 2011).

1.3 Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível líquido, de origem renovável, composto por mono-álquil ésteres de ácidos gordos de cadeia longa, que pode ser produzido através de materiais com teor glicéridico, tais como óleos vegetais, gorduras animais e microalgas (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Hoekman *et al.*, 2012).

Apesar da sua história ter começado em 1900 quando Rudolf Diesel, criador do primeiro motor a gasóleo, utilizou óleo de amendoim como combustível, teve apenas maior foco nos anos 80 aquando do início da busca de fontes energéticas renováveis capazes de reduzir as emissões de gases de efeito de estufa (Atabani *et al.*, 2012).

Por possuir propriedades semelhantes às do gasóleo, o biodiesel figura-se como uma alternativa promissora à sua utilização, já que, além de ser um combustível biodegradável, não tóxico, com uma combustão com baixas emissões e proveniente de uma fonte renovável (Abbaszaadeh *et al.*, 2012) também pode ter, dependendo da matéria-prima de origem, um desempenho superior em propriedades como a concentração de enxofre, a eficiência de lubrificação, o número de cetano e o ponto de inflamação (Helwani *et al.*, 2009). Por outro lado, apresenta vantagens face à utilização direta de óleo vegetal uma vez que este, devido à sua alta viscosidade e baixa volatilidade, pode causar problemas no motor, como deposições ou o bloqueio do injetor. Foi este revés que conduziu ao desenvolvimento de diversos processos químicos e térmicos de conversão do óleo, de forma a diminuir a sua viscosidade, tornando-o compatível com os motores de combustão interna (Sharma e Singh, 2009).

A transesterificação (secção 1.3.2) é a reação que permite converter os glicéridos em ésteres de ácidos gordos (biodiesel). Este biocombustível permite que um motor *diesel* tenha um desempenho satisfatório, quando na presença de uma mistura gasóleo/biodiesel, não sendo necessárias quaisquer modificações a nível mecânico. Uma mistura de 20% de biodiesel é definida como a proporção ótima, capaz de melhorar em 2,5% a eficiência térmica do motor, reduzir as emissões de gases e reduzir substancialmente o consumo de energia específica necessária à travagem. As propriedades de lubricidade do biodiesel podem também diminuir o desgaste de várias partes vitais do motor, até cerca de 30% (Agarwal, 2007).

1.3.1 Matérias-primas

De uma forma geral as matérias-primas mais utilizadas para produção de biodiesel dividem-se em quatro categorias: (1) óleos vegetais alimentares; (2) óleos vegetais não alimentares; (3) óleos alimentares usados e (4) gorduras animais.

A escolha das matérias-primas depende de diversos fatores, sendo que cada uma deve ser previamente sujeita a uma análise de ciclo de vida. Esta inclui parâmetros como a disponibilidade de terreno e práticas agrícolas da região, a energia fornecida, o balanço energético e a emissão de GEE, a utilização

de pesticidas, a erosão do solo e o efeito na sua fertilidade, a contribuição para perdas de biodiversidade, os custos logísticos (transporte e armazenamento), a valorização económica (considerando possíveis coprodutos), a criação e manutenção de emprego, a necessidade e disponibilidade de água e os efeitos da exploração da matéria-prima na qualidade do ar (Atabani *et al.*, 2012)

A consideração de qualquer matéria-prima como fonte de produção de biodiesel está igualmente sujeita ao bom desempenho a nível da percentagem de óleo e da rentabilidade por hectare (Atabani *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, também as microalgas e outros microrganismos produtores de lípidos têm sido estudados como fonte alternativa de matéria-prima para a produção de biodiesel.

1.3.2 Processos de produção - transesterificação

A transesterificação, tecnologia utilizada no processo de produção de biodiesel, consiste na conversão dos triglicéridos presentes nos óleos/gorduras através da adição de um álcool, originando ésteres alquílicos de ácidos gordos (FAAE) como principal produto da reação e glicerina como coproduto.

Esta reação pode ocorrer na ausência ou presença de um catalisador, sendo este classificado quanto à fase em que se encontra em relação aos reagentes presentes na reação – homogéneo ou heterogéneo - e de acordo com o grupo funcional – ácido, básico ou enzimático. De uma forma geral, numa primeira fase dá-se a conversão dos triglicéridos em diglicéridos, seguida da transformação dos diglicéridos em monoglicéridos e, finalmente, dos monoglicéridos em glicerol - obtendo-se uma mol de éster metílico por cada glicérido convertido nas várias fases - perfazendo um consumo de 3 mol de álcool por cada mol de triglicérido convertido (Figura 1.4) (Abbaszaadeh *et al.*, 2012). No entanto, dada a reversibilidade da reação, por norma recorre-se à utilização de álcool em excesso para garantir o sucesso da conversão e o rendimento máximo da mesma (Ma e Hanna, 1999).

Os álcoois mais utilizados neste processo são geralmente álcoois de cadeia curta, como metanol, etanol, propanol ou butanol (Balat e Balat, 2010). Destes, o álcool mais utilizado atualmente a nível industrial é o metanol (MeOH), já que é vantajoso do ponto de vista físico e químico – trata-se de um álcool polar e de cadeia curta. Assim, por norma, quando se fala em biodiesel, encontra-se a designação de ésteres metílicos de ácidos gordos – *fatty acid methyl esters* (FAME) (Leung *et al.*, 2010; Ma e Hanna, 1999).

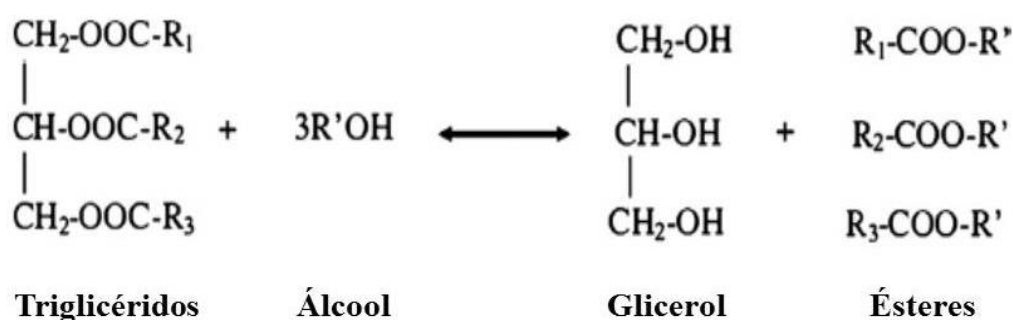


Fig. 1.4 - Esquema geral da reação de transesterificação (adaptado de Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

O processo de transesterificação é dependente de diversas variáveis, sendo as mais relevantes a matéria-prima utilizada, em particular o seu conteúdo em ácidos gordos livres e em água (Lam *et al.*, 2010), a temperatura, a razão molar álcool/óleo, a concentração e tipo de catalisador utilizado e a intensidade da agitação (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

1.3.2.1 Transesterificação química

A transesterificação de óleos com recurso a um catalisador é a forma mais desenvolvida e estabelecida para produção de biodiesel. Os catalisadores dividem-se em homogéneos, heterogéneos ou enzimáticos - sendo que os últimos podem inserir-se dentro das duas categorias anteriores, e têm o propósito de facilitar a reação. Assim, se o catalisador e os reagentes se encontrarem na mesma fase (líquida) durante a transesterificação, trata-se de uma catálise homogénea. Por outro lado, se o catalisador for sólido, gasoso ou um líquido imiscível estando, conseqüentemente, numa fase distinta, a catálise é heterogénea (Helwani *et al.*, 2009).

A escolha do catalisador apropriado é um importante parâmetro na flutuação do custo final do biodiesel obtido, já que existe uma relação direta entre a sua eficácia e determinadas características do óleo. Uma análise prévia de parâmetros como o índice de acidez, medida do conteúdo em ácidos gordos livres, é importante para que o rendimento de produto final seja satisfatório.

1.3.2.1.1 Catálise homogénea

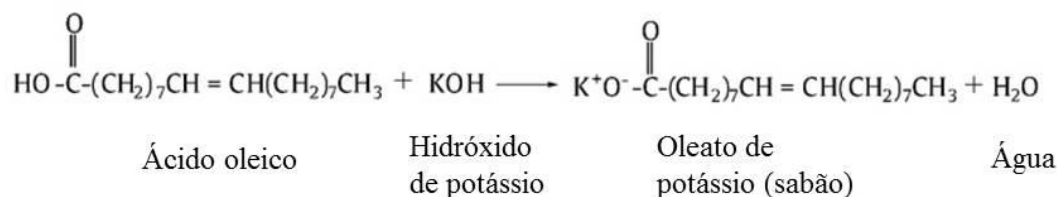
A transesterificação com catálise homogénea requer uma elevada pureza das matérias-primas e uma etapa final de separação, aumentando o custo do biodiesel final. O catalisador utilizado neste tipo de catálise pode ser ácido ou básico, de acordo com as características da biomassa em questão – mais concretamente o conteúdo em ácidos gordos livres.

A. Alcalina

Atualmente, a transesterificação com recurso a um catalisador alcalino é o método mais comum na produção de biodiesel. Os catalisadores mais utilizados incluem o hidróxido de sódio (NaOH) ou o hidróxido de potássio (KOH), ambos numa concentração de 0,4 a 2% m/m óleo, e carbonatos e alcóxidos de sódio ou potássio - tais como metóxido de sódio, etóxido de sódio, propóxido de sódio e butóxido de sódio (Ma e Hanna, 1999). Destes, o metóxido de sódio é o catalisador alcalino mais utilizado a nível industrial, com cerca de 60% de quota (Balat e Balat, 2010).

A preponderância da sua utilização à escala industrial deve-se a diversos motivos: apresenta taxas de reação muito rápidas – podendo inclusivamente ser 4000 vezes mais rápido que a transesterificação homogénea com catálise ácida – e recorre a catalisadores como o NaOH e o KOH, que são relativamente baratos, utilizados em baixas concentrações e amplamente disponíveis. Os baixos tempos de reação (tipicamente de uma hora), conjugados com o facto de ser um processo que, de uma forma geral, ocorre a temperaturas e pressões na gama dos 60-65°C e 1,4-4,2 bar, respetivamente, proporcionam um consumo energético inferior, quando comparado com outros métodos de produção (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2010)

Por outro lado, o processo ainda apresenta várias limitações, por regra relacionadas com a pureza dos reagentes, a concentração de água na matéria-prima e a sensibilidade ao teor de ácidos gordos livres. A presença de elevados teores destes favorece a formação de sabões – num processo designado de saponificação – ao invés da conversão em biodiesel (Figura 1.5). Os ácidos gordos livres reagem com o catalisador alcalino e produzem sabões que inibem o efeito de aceleração do catalisador na reação de transesterificação e podem reduzir drasticamente o rendimento de FAMEs e dificultar os subseqüentes processos de separação e purificação do biodiesel. A presença de água nos reagentes também poderá influenciar o rendimento em ésteres já que esta, particularmente a temperaturas mais elevadas, pode hidrolisar os triglicéridos em diglicéridos e formar ácidos gordos livres que, como já mencionado anteriormente, na presença de um catalisador básico originam sabões. O sabão provoca um aumento na viscosidade, um menor rendimento em ésteres e dificulta a separação da fase do glicerol (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Lam *et al.*, 2010).

Fig. 1.5 - Reação de saponificação (adaptado de Lam *et al.*, 2010).

Estes inconvenientes introduzem a necessidade de uma análise prévia da matéria-prima para a realização deste processo. Esta, tal como já referido, deve ter baixos teores de ácidos gordos livres (FFA) e água, cujos valores recomendáveis não deverão ultrapassar 1% (equivalente a um índice de acidez de 2 mg KOH/g) e 0,1%, respetivamente (Demirbas, 2011; Montefrio *et al.*, 2010).

B. Ácida

A transesterificação com catálise ácida homogénea tem como principal elemento diferenciador a sua aplicabilidade a matérias-primas com elevado teor de ácidos gordos livres. O óleo é misturado diretamente no álcool acidificado, pelo que a separação e reação ocorrem num único passo, com o álcool a agir não só como solvente, mas também como reagente de (trans)esterificação. Atualmente, os ácidos mais utilizados para esta via de produção de biodiesel são os ácidos sulfúrico, fosfórico, clorídrico e sulfónico, sendo que todos eles são catalisadores que proporcionam elevados rendimentos de conversão. Por norma é uma técnica que requiere temperaturas acima dos 100°C e tempos de reação entre as 3h e as 48h - salvo condições de altas temperaturas e pressões - necessitando de elevadas proporções molares de álcool para se obter um bom rendimento de conversão. É também mais suscetível à presença de água na biomassa (Helwani *et al.*, 2009). Estas desvantagens tornam o método pouco competitivo a nível industrial, já que, se por um lado as elevadas temperaturas e os longos tempos de reação requerem um esforço energético e financeiro muito elevado, por outro o aumento das proporções molares de álcool e catalisador também representam não só um aumento de custo a nível dos reagentes químicos, como também mais custos de remoção e reciclagem. Outras desvantagens são a maior corrosão do equipamento, a formação de produtos secundários, uma maior quantidade de resíduos provenientes da reação de neutralização do catalisador e o facto de, do ponto de vista de engenharia, se tratar de um processo mais complexo. Por outro lado, a possibilidade de esterificar os ácidos gordos livres e de combinar os passos de separação e (trans)esterificação tornam este método potencialmente promissor, em particular para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixo custo, geralmente de origem residual (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Balat e Balat, 2010).

1.3.2.1.2 Catálise heterogénea

Numa transesterificação com catálise heterogénea o catalisador, que pode ter características ácidas ou básicas, encontra-se numa fase diferente da mistura reacional. Tal torna-se vantajoso por facilitar a separação e reutilização do mesmo, eliminando fases de lavagem/recuperação do biodiesel/catalisador, envolvendo menores custos a nível energético e, consequentemente, a nível de custos de produção, quando comparada com a catálise homogénea, permitindo assim uma maior eficiência e rentabilidade do processo. São predominantes na literatura aplicações e resultados de transesterificação com recurso a catalisadores heterogéneos básicos (óxidos de metais alcalinos, óxidos de metais de transição e derivados, óxidos metálicos de hidrotalcita, resinas aniónicas e zeólitos básicos), com a utilização dos ácidos (dióxido de zircónio, dióxido de titânio, dióxido de estanho, zeólitos, resinas catiónicas, catalisadores à base de carbono sulfonado e heteropoliácidos) a ser cada vez mais foco de investigação pela capacidade que têm de realizar reações de esterificação dos ácidos gordos livres e de transesterificação dos glicéridos em simultâneo, com consequente aumento do rendimento mássico do processo global (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Chouhan e Sarma, 2011; Sampaio, 2008).

1.3.2.1.3 Transesterificação direta (*in situ*)

Uma alternativa ao processo convencional, baseado na conversão do óleo após este ter sido extraído da matéria-prima que o contém (ex: sementes oleaginosas, microalgas), é a transesterificação direta, também designada de transesterificação *in situ*. Em muitos casos, este processo facilita a conversão uma vez que ocorre diretamente na biomassa em questão, eliminando assim o passo da extração prévia do óleo com solvente. Assim, a transesterificação direta consiste na adição simultânea de um catalisador e de um álcool à biomassa, geralmente na forma seca. O álcool extrai os lípidos da biomassa e, sob a ação do catalisador, transesterifica-os, originando ésteres de ácidos gordos (Halim *et al.*, 2012). Tal como no processo convencional, o sucesso da transesterificação direta depende de vários parâmetros, com destaque para a proporção de álcool relativamente à biomassa. Enquanto no primeiro, de uma forma geral, o excesso de álcool necessário à síntese de biodiesel corresponde a uma razão molar de 6:1, quando realizado *in situ* a razão molar pode atingir os 200:1. A presença de água também aumenta a quantidade de álcool necessária para atingir boas eficiências de conversão (Haas e Wagner, 2011).

Este método pode ser particularmente vantajoso no caso da produção de biodiesel a partir de microalgas, já que a etapa de extração de lípidos microalgais tem de ser realizada através de extração com solventes, processo mais dispendioso que os métodos físicos de extração utilizados nas culturas convencionais (Figura 1.6). Pode também possibilitar a redução dos resíduos e, conseqüentemente, da poluição, associados ao processo (Ehimen *et al.*, 2010).

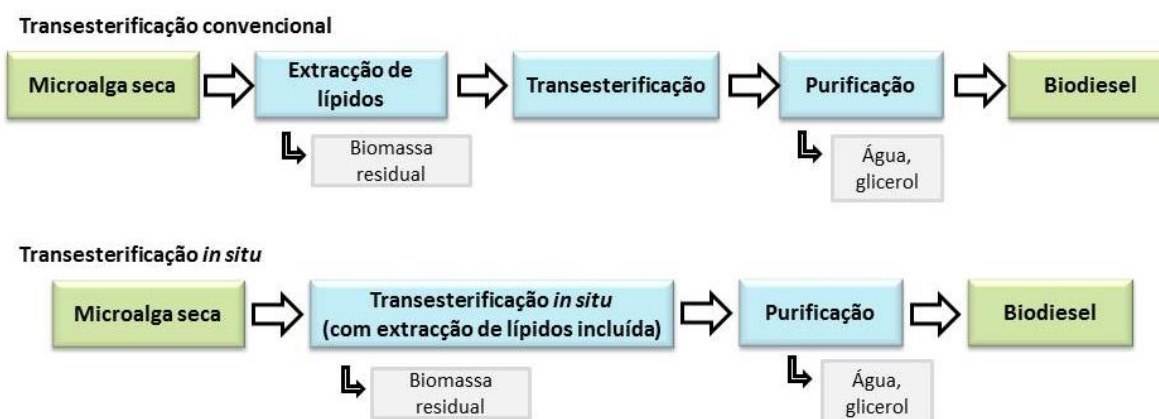


Fig. 1.6 - Comparação entre os métodos de transesterificação convencional e *in situ* (adaptado de Velasquez-Orta *et al.*, 2012).

Apesar de, no processo de transesterificação direta, os custos de remoção e recuperação das elevadas quantidades de álcool que não reagiu serem superiores aos associados ao processo convencional, é possível conferir-lhe viabilidade económica através da identificação das condições ideais de reação capazes de reduzir o volume de álcool a utilizar (Haas e Wagner, 2011). A simplificação do processo de conversão, aliado à mitigação do problema referido, confere vantagens para que este seja um potencial método para uso à escala industrial na produção de biodiesel (Ehimen *et al.*, 2010).

1.3.2.2 Transesterificação enzimática

Neste método a transesterificação decorre através do uso de lípases como catalisador da reação, sendo que o rendimento da produção de biodiesel varia com o tipo de enzima utilizada. É considerado dos métodos de produção mais eficazes, sendo que para verificar a eficiência da reação devem ser averiguados fatores como a natureza, quantidade e possibilidade de reutilização da enzima, temperatura e quantidade de água (Teixeira, 2011).

Quando comparado com a transesterificação com catálise básica apresenta vantagens como a eficiência da reação mesmo na presença de água na matéria-prima, um maior rendimento de ésteres, um processo de recuperação de glicerol mais simples e o facto de dispensar a etapa de purificação dos

ésteres. Por outro lado, o maior obstáculo deriva da maioria das lipases sofrerem inibição pelo efeito do álcool, passando a estratégia para a resolução deste problema por adicionar o álcool ao reator em três passos com uma proporção molar de 1:1 em cada. Outras desvantagens são o maior tempo de reação, quando comparado com a transesterificação básica homogênea, e o elevado custo das lipases. Neste último caso, os desenvolvimentos científicos, tais como o uso de lipases tolerantes aos solventes ou na forma imobilizada, que permitam a reutilização das enzimas e a possibilidade de utilização de lipases provenientes de matérias-primas de baixo custo, figuram-se como solução para tornar o processo economicamente viável (Balat e Balat, 2010; Helwani *et al.*, 2009).

1.3.2.3 Transesterificação na ausência de catalisadores

Como já mencionado anteriormente o processo de transesterificação com recurso a um catalisador envolve diversas etapas posteriores à conversão, como a purificação dos ésteres e a separação e recolha dos reagentes e catalisadores envolvidos. Para fazer face a estes e outros inconvenientes que o sistema convencional apresenta existem duas formas de produzir biodiesel via transesterificação sem recurso a catálise: transesterificação alcoólica supercrítica e transesterificação com recurso a co-solventes.

1.3.2.4 Transesterificação supercrítica

Uma das opções para a produção de biodiesel sem recurso a catalisadores é a transesterificação supercrítica. Esta decorre a altas temperaturas (250-400°C) e pressões, que substituem o efeito do catalisador, demonstrando ter períodos reacionais mais curtos – converte entre 50-95% dos triglicéridos nos primeiros 10 minutos (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

O processo, ao decorrer a altas pressões e temperaturas, leva a uma transformação da mistura reacional da matéria-prima com o álcool em condições supercríticas, proporcionando assim uma maior homogeneidade. Com estas alterações o solvente assume características hidrofílicas e os triglicéridos não polares podem ser solvatados pelo fluido supercrítico formando, assim, um sistema unifásico álcool/água, considerando-se estas as razões pelas quais as transesterificações em condições supercríticas apresentam maior velocidade de reação (Teixeira, 2011).

As condições supercríticas proporcionam uma melhor solubilidade, uma redução das limitações a nível de transferência de massa, melhores taxas de conversão e simplificação dos processos de separação e purificação. Também tem uma maior tolerância à presença de água na biomassa e ao teor de ácidos gordos livres, quando comparada com a transesterificação básica homogênea, permitindo, consequentemente, eficácia de conversão numa maior variedade de matérias-primas. Torna-se, portanto, proveitoso para a produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixo valor, permitindo uma redução na quota que o custo da matéria-prima representa no custo final de produção (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

Tem como desvantagem a necessidade de utilização de altas temperaturas e pressões, assim como elevadas proporções metanol/óleo, o que torna este tipo de processo supercrítico dispendioso.

Atualmente ainda é desaconselhado o seu uso dado apresentar dificuldades relacionadas com a segurança das condições reacionais e desvantagens a nível económico, já que requer materiais mais resistentes e dispendiosos que os utilizados nos reatores de catálise química homogênea (Ehimen *et al.*, 2010).

1.3.2.5 Transesterificação com recurso a co-solventes

A transesterificação recorrendo a co-solventes surge como forma de ultrapassar os longos tempos de reação provocados pela baixa solubilidade do álcool, com fim à obtenção de uma taxa de conversão dos óleos em ésteres mais célere. Através da utilização de um co-solvente solúvel em ambas as fases é possível obter uma reação mais rápida – com tempos de reação de 5 a 10 minutos – sem o inconveniente da existência de resíduos do catalisador tanto nos ésteres como no glicerol obtido. Este tipo de sistema promove ainda a conversão simultânea de ácidos gordos livres e triglicéridos, sendo

vantajosa aquando do uso em matérias-primas de baixo custo que, em regra, têm elevados índices de acidez (Abbaszaadeh *et al.*, 2012).

Os co-solventes mais utilizados são o iso-octano, o di-metoxietano, o metil iso-propil cetona (MIPK), a acetona, o n-hexano, o éter de petróleo, o ter-butanol e o tetrahidrofurano (THF). Destes destaca-se o THF, dado possuir um ponto de ebulição muito próximo do do metanol – maioritariamente utilizado nas reações de transesterificação – e em virtude do sistema requerer uma temperatura mínima de funcionamento de 30°C (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Teixeira, 2011).

Uma dos processos de transesterificação com co-solventes que mais atenção tem atraído é o BIOX. Este consiste na conversão dos triglicéridos e ácidos gordos livres num processo em dois passos, unifásico, à pressão atmosférica e temperatura ambiente, em menos de 90 minutos. É vantajoso por se poder aplicar não só em óleos vegetais, como também em óleos alimentares usados e gorduras animais, por utilizar co-solventes inertes e recuperáveis numa reação rápida e em condições PTN, e por não apresentar resíduos de catalisador, quer no biodiesel quer no glicerol obtidos. Por outro lado, tem como obstáculo a recuperação do álcool em excesso devido à proximidade dos pontos de ebulição do THF e do metanol (Abbaszaadeh *et al.*, 2012; Balat e Balat, 2010).

1.3.3 Propriedades e qualidade do biodiesel

Diversas propriedades físicas e químicas do biodiesel estão diretamente ligadas com a matéria-prima utilizada na sua produção - com destaque para a composição em ácidos gordos da mesma - e com o álcool utilizado no processo de transesterificação. O biodiesel apresenta propriedades semelhantes ao gasóleo, podendo ser usado sem alterações significativas nos motores – sendo estas inclusivamente desnecessárias para uma proporção de 5% biodiesel/combustível fóssil. Apesar disto, para que a sua utilização decorra sem danos associados é obrigatória a avaliação da sua qualidade, já que existem várias fábricas de produção de biodiesel, a diferentes escalas, cujas matérias-primas têm diferentes origens e níveis de qualidade. Para garantir que o biodiesel proveniente de todas estas fontes é de qualidade e adequado para utilização sem qualquer impedimento em motores é necessária uma padronização dos seus parâmetros. Estas especificações são estabelecidas na Europa, e, consequentemente, em Portugal, pela Norma Europeia EN 14214 (Atabani *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2009; Knothe, 2005).

De uma forma geral, a caracterização do biodiesel é feita através da análise de diversos parâmetros, como o índice de cetano, viscosidade, densidade, propriedades de frio (temperatura limite de filtrabilidade, ponto de turvação), teor de cinzas, teor de enxofre e índice de acidez. Estas características, físicas e químicas, estão diretamente ligadas e dependentes de características como o comprimento e saturação da cadeia de carbono da matéria-prima utilizada. Está também demonstrado que estas propriedades são responsáveis não só pelo desempenho do motor como também pelas emissões de gases associadas (Kumar *et al.*, 2013).

Tabela 1.1 - Parâmetros de qualidade de biodiesel e respetivos limites (EN 14214:2012).

Propriedade	Unidade	Limite	Método
Ponto de inflamação	°C	>101	EN ISO 2719
Teor de água	mg/kg	<500	EN ISO 12937
Contaminação total	mg/kg	<24	EN 12662
Viscosidade a 40°C	mm ² /s	3,50-5,00	EN ISO 3104
Densidade a 15°C	kg/m ³	860-900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Teor de ésteres	%(m/m)	>96,5	EN 14103
Teor de cinzas sulfatadas	%(m/m)	<0,02	ISO 3987
Teor de enxofre	mg/kg	<10,0	EN ISO 20846 EN ISO 20884 EN ISO 13032
Corrosão à lâmina de cobre	-	Classe 1	EN ISO 2160
Índice de cetano	-	>51,0	EN ISO 5165
Índice de acidez	mg KOH/g	<0,50	EN 14104
Estabilidade à oxidação	h	>8,0	EN 14112
Índice de iodo	g I/100 g	<120	EN 14111 EN 16300
Éster metílico de ácido linolénico	%(m/m)	<12,0	EN 14103
Ésteres metílicos polinsaturados	%(m/m)	<1	EN 15779
Teor de metanol	%(m/m)	<0,20	EN 14110
Teor de monoglicéridos	%(m/m)	<0,70	EN 14105
Teor de diglicéridos	%(m/m)	<0,20	EN 14105
Teor de triglicéridos	%(m/m)	<0,20	EN 14105
Metais do grupo I (Na+K)	mg/kg	<5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Metais do grupo II (Ca+Mg)	mg/kg	<5,0	EN 14538
Glicerol livre	%(m/m)	<0,02	EN 14105 EN 14106
Glicerol total	%(m/m)	<0,25	EN 14105
Teor de fósforo	mg/kg	<4,0	EN 14107 prEN 16294
Temperatura limite de filtrabilidade (CFPP)	°C	Dependente da localização e estação do ano	EN 116

Enquanto que o índice de cetano, o calor de combustão, o ponto de fusão e a viscosidade dos ácidos gordos aumentam com o tamanho da cadeia de hidrocarbonetos e com o grau de saturação, as emissões de NO_x diminuem. As propriedades de frio – pontos de fluxão e turvação e CFPP – também apresentam piores resultados com o aumento do grau de saturação dos ácidos gordos. Quanto à influência que o álcool usado no processo de transesterificação tem, a escolha do etanol em vez do metanol traduz-se numa melhoria das propriedades de lubrificidade, enquanto que, por outro lado, a sua substituição por isobutanol melhora as propriedades de frio (Knothe, 2005).

O biodiesel produzido a partir de biomassa microalgal tem-se revelado semelhante aos combustíveis derivados do petróleo em parâmetros como a densidade, a viscosidade, o ponto de inflamação e o CFPP, obedecendo às especificações da norma EN 14214. No entanto, o facto de os lípidos microalgais possuírem, por vezes, um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados, quando comparados com os óleos vegetais, torna-os mais suscetíveis a oxidação durante o armazenamento (Ahmad *et al.*, 2011).

1.4 Microalgas para produção de biodiesel

Microalgas são micro-organismos unicelulares, presentes tanto em água doce como em água salobra e salgada, capazes de converter luz, água e dióxido de carbono em biomassa. Várias espécies apresentam elevadas taxas de crescimento e de produtividade em biomassa, capazes de gerar grandes quantidades de lípidos, proteínas e hidratos de carbono em curtos períodos de tempo. Esta capacidade traduz-se na possibilidade de produção de diversos biocombustíveis como biodiesel, bioetanol, biohidrogénio e biometano, quer por via termoquímica, quer por via bioquímica (Demirbas, 2011).

1.4.1 Produção da biomassa microalgal

De uma forma geral, os processos de produção de biodiesel a partir de microalgas seguem uma sequência de etapas que englobam a fase de produção, na qual se procede ao cultivo das microalgas; o passo de colheita, de forma a separar a biomassa microalgal do meio de cultura em questão; a extração dos lípidos e a sua posterior conversão. Este processo encontra-se esquematicamente representado na figura 1.7.

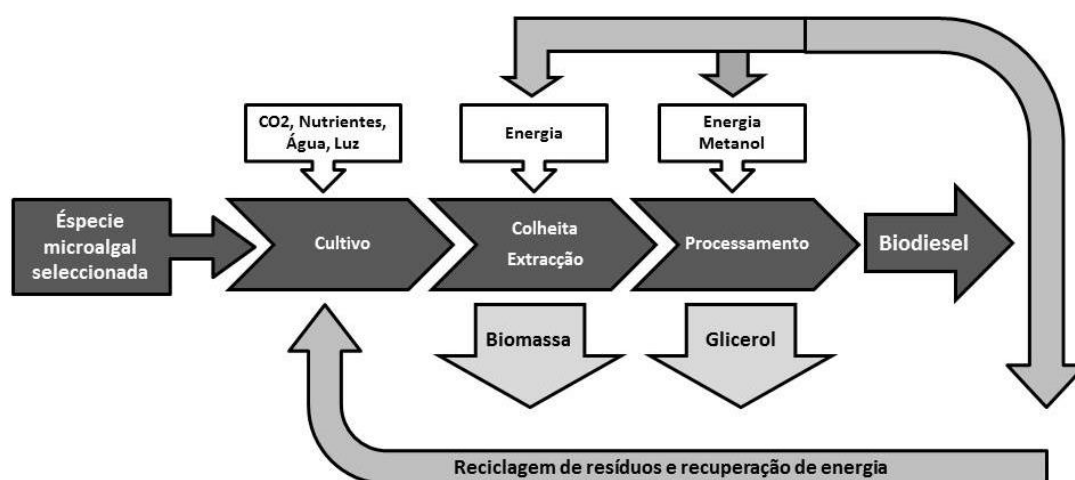


Fig. 1.7 - Representação esquemática das várias fases da produção do biodiesel (Adaptado de Amaro *et al.*, 2012).

1.4.1.1 Crescimento da biomassa microalgal: Sistemas de cultivo

Existe uma estreita relação entre as espécies de microalgas a cultivar, respetivo metabolismo e o regime de cultivo escolhido. Assim sendo, para que o crescimento da biomassa microalgal seja propício é necessária uma seleção da espécie de microalga mais adequada às condições em questão, seja em termos ambientais ou do método de produção escolhido, ou do regime de produção - autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico - dependendo da espécie.

Numa cultura fototrófica as células microalgais necessitam de luz como fonte de energia e de dióxido de carbono como fonte de carbono para se reproduzirem. Estes fatores podem tornar-se desvantagens, já que nem sempre a disponibilidade de luz e dióxido de carbono são garantidas: no caso de produção em lagoas fotossintéticas e fotobiorreactores fechados, em que a luz solar é utilizada como fonte de energia, a limitação é essencialmente o seu carácter intermitente; por outro lado, quando o cultivo decorre com recurso a iluminação artificial, o processo pode tornar-se dispendioso. Em ambos os processos, é também essencial um equilíbrio na distribuição da intensidade luminosa, já que, quando irregular, afeta a produtividade da cultura microalgal (Chen *et al.*, 2011; Suali e Sarbatly, 2012).

Tanto o regime mixotrófico como o fotoheterotrófico necessitam de luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono, sendo que a diferença entre eles reside no facto de as espécies fotoheterotróficas necessitarem de luz como fonte de energia para poderem utilizar os

açúcares como fonte de carbono enquanto que as mixotróficas podem alternar entre a utilização de luz e compostos orgânicos como fonte energética (Chen *et al.*, 2011).

As culturas heterotróficas consomem outros organismos ou crescem em águas residuais que contenham carbono orgânico como fonte energética e não dependem da existência de uma fonte luminosa, proporcionando maiores produtividades lipídicas quando comparadas com os outros regimes de culturas microalgais. Facultam também vantagens como um bom controlo do cultivo, uma diminuição no custo da colheita, proporcionada pelas densidades celulares mais elevadas associadas, e a possibilidade de manipulação do meio de cultivo e dos fatores ambientais em questão com via à obtenção de uma maior eficácia produtiva, já que o crescimento celular é significativamente influenciado por estes fatores.

O rendimento de biomassa e respetivo conteúdo em lípidos dependem do tipo de fonte de carbono e da sua concentração no meio de cultura. Duas das fontes de carbono que têm sido mais utilizadas são o glicerol e a glucose sendo que, devido à grande parcela que representa no custo de produção, o cultivo por via heterotrófica é ainda inviável economicamente para produção de biocombustíveis quando a fonte de carbono tem de ser adquirida. Por outro lado, este pode ser reduzido através da utilização de fontes de carbono menos dispendiosas - como o etanol, a frutose ou o glicerol - podendo este último advir de co-produtos de uma refinaria, já que estudos demonstram que a adição de glicerol bruto como fonte de carbono ao meio de cultura tem a capacidade de aumentar a produtividade microalgal (Amaro *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011; Suali e Sarbatly, 2012).

1.4.1.2 Colheita da biomassa microalgal

A colheita da biomassa microalgal para lípidos (óleos) deve ocorrer na fase estacionária do crescimento e envolve processos como a separação do meio de cultura, a concentração da biomassa e, por norma, a secagem. O tamanho das células microalgais, tipicamente com diâmetros entre 3 e 30 µm, em conjunto com os meios de cultura geralmente bastante diluídos, tornam esta etapa bastante dispendiosa a nível energético, podendo inclusive atingir valores de cerca de 60% do custo total de produção (Ahmad *et al.*, 2014).

A técnica ideal de colheita deve ser independente da espécie cultivada, consumir o mínimo de energia e químicos possível e não danificar os produtos extraídos no processo.

As técnicas mais utilizadas para colheita da biomassa são a sedimentação por gravidade, a centrifugação, a floculação, a flotação e a filtração (Ahmad *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2011).

1.4.1.3 Extração dos lípidos

A. Pré-tratamento

Após a colheita e, caso necessário, a secagem da biomassa microalgal, esta pode ser sujeita a processos de pré-tratamento com o propósito de melhorar a eficiência da subsequente extração de lípidos. Existem diversos processos, que atuam em uma ou mais fases, e cuja seleção depende das alterações necessárias à estrutura da biomassa (Halim *et al.*, 2012). Estes podem ser mecânicos ou não mecânicos – que, por sua vez, se dividem em físicos, químicos e enzimáticos. Os métodos mecânicos são normalmente mais utilizados pelo facto de abrangerem mais espécies de microalgas e serem menos passíveis de contaminação comprometedora da qualidade do produto final, quando comparados com processos químicos ou enzimáticos. A forma de pré-tratamento selecionada deve ser a que apresente o menor gasto energético e custo associado, assegurando a manutenção da qualidade da biomassa (Lee *et al.*, 2012).

B. Processos de extração

No processo de extração a biomassa microalgal, seca ou húmida, é exposta a um solvente capaz de extrair os lípidos da matriz celular. No caso da produção de biodiesel, por se pretender a extração preferencial dos lípidos apolares, este deve ser um solvente ou mistura de solventes com um carácter apolar ou pouco polar - como o hexano ou o clorofórmio. No entanto, caso se pretenda contabilizar os lípidos totais, para fins de caracterização da biomassa microalgal, e sendo constituídos por lípidos

polares e neutros, a escolha deve recair sobre um ou mais solventes com carácter mais polar, como o etanol ou o metanol. A separação da biomassa da solução composta pelos lípidos e pelo solvente é geralmente realizada através de uma filtração, sendo que a remoção do solvente pode ocorrer por destilação, evaporação sob vácuo ou adsorção em fase sólida. Após a separação e remoção do solvente a quantificação dos lípidos é feita por gravimetria (Halim *et al.*, 2012; Steriti *et al.*, 2014).

Existem diversos métodos a ser estudados para extração de lípidos de biomassa microalgal, como processos de extração assistida por micro-ondas e ultrassons, que combinam a quebra da parede celular e a extração num só passo, e sistemas que recorrem a altas temperaturas e pressões – como a extração subcrítica e a extração supercrítica (Halim *et al.*, 2012). Contudo, presentemente, à escala industrial, a extração com solventes é ainda o único método viável (Steriti *et al.*, 2014).

1.4.1.4 Conversão dos lípidos

Após o processo de extração dos lípidos segue-se a conversão, que pode decorrer segundo vários processos, dos quais o mais comum é a transesterificação com catálise homogénea, descrito na secção 1.3.2.1.1.

Os processos de extração e conversão de lípidos podem ser combinados num só, designado transesterificação *in situ* (secção 1.3.2.1.3). Esta técnica é especialmente relevante para a produção de biodiesel a partir de microalgas já que, ao prescindir/dispensar a extração prévia dos lípidos permite um maior aproveitamento da biomassa microalgal, que tem na sua produção a maior parcela do custo do produto final.

1.4.2 Valorização da biomassa microalgal após extração lipídica

Os maiores responsáveis pela inviabilidade comercial do biodiesel microalgal são os consumos intensivos de energia e de químicos para a produção de biomassa microalgal que, quando comparada com outras matérias-primas, origina elevadas quantidades de resíduos (Soratana *et al.*, 2014). Após a extração dos lípidos para produção de biodiesel, a biomassa microalgal residual é rica em proteínas e hidratos de carbono. Se este material não for direcionado passa a representar um resíduo, com todos os custos de eliminação inerentes a representarem um agravamento no custo do produto final. Uma das formas de transformar estes custos em benefícios económicos é através da separação das proteínas e hidratos de carbono para venda a mercados como alimentação animal, fertilização de solos e utilização como matéria-prima para outras formas de bioenergia. Também é possível reciclar a biomassa residual para o ciclo de produção, de forma a reduzir as necessidades nutritivas. No entanto, este método nem sempre é opção, já que é inviável quando a principal fonte de nutrientes são águas residuais. É importante uma análise prévia dos resíduos microalgais para determinar quais os benefícios que podem proporcionar. Vários produtos bioenergéticos podem ser produzidos através dos resíduos microalgais: estes incluem metano, calor/eletricidade, etanol celulósico e outras renováveis (Veal *et al.*, 2013). Este conceito de biorrefinaria industrial permite também ter um valor acrescentado do ponto de vista ecológico, já que pode funcionar como fonte de captação e fixação de carbono e tratamento de águas residuais (Subhadra e Edwards, 2011).

É importante uma análise prévia dos resíduos microalgais para determinar que benefícios podem proporcionar. Por exemplo, o glicerol, produto da reação de transesterificação, pode ser diretamente direcionado para as indústrias de alimentação animal e fertilização de solos, como fonte de nutrientes, reinserido no ciclo produtivo de biomassa microalgal, ou sujeito a um processo de fermentação, originando etanol (Leung *et al.*, 2010; Soratana *et al.*, 2014).

Por sua vez, os resíduos de biomassa, após a extração do óleo, podem dar origem a um novo ciclo de reutilização ao serem utilizados como matéria-prima de produção de bioetanol e biometano ou, tal como o glicerol, serem utilizados diretamente para indústrias de fertilização e rações ou reinseridos no ciclo de produção como fonte de carbono. O biometano, obtido através de um processo de digestão anaeróbia, pode ser convertido em calor e eletricidade via cogeração, sendo útil na supressão das necessidades energéticas de todos os processos envolvidos. Por sua vez, os resíduos deste processo, podem ser centrifugados, com o efluente sólido resultante a ser encaminhado para indústria de

fertilizantes e o líquido como fonte de nutrientes para o ciclo de produção. Já o bioetanol pode ser obtido através da combinação de processos de sacarificação e fermentação (S+F), seguidos por uma destilação. O CO₂ obtido como coproduto desta combinação pode ser reinserido no ciclo; os resíduos podem ser reutilizados para a digestão anaeróbia. Por fim, os resíduos da destilação podem ser também encaminhados para a indústria de alimentação animal. Estas estratégias de valorização residual estão representadas na figura 1.8. (Soratana *et al.*, 2014)

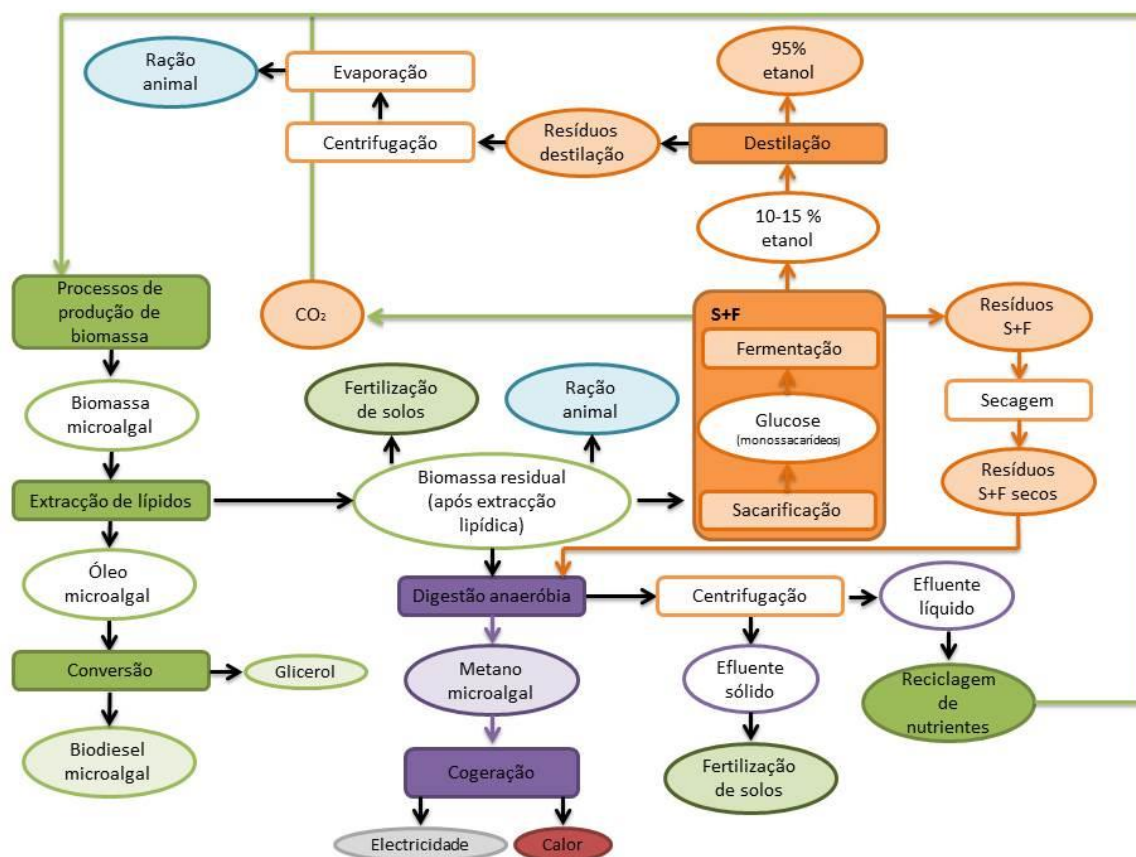


Fig. 1.8 – Diferentes combinações de sistemas de valorização da biomassa microalgal residual e dos seus co e subprodutos (adaptado de Soratana *et al.*, 2014).

1.5 Microalga *Chlorella protothecoides*

A *Chlorella protothecoides* é uma microalga caracterizada por ser unicelular e com células esféricas com finas paredes celulares. Tem sido alvo de estudo pela versatilidade que demonstra ao crescer em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (Fig. 1.9). Quando na presença de carbono exclusivamente orgânico, como por exemplo a glucose, no meio de crescimento, e sob escuridão, deixa de crescer autotroficamente, passando a crescer heterotroficamente, suprimindo o crescimento de cloroplastos e desintegrando as membranas fotossintéticas já existentes. Assim que a fonte orgânica de carbono no meio se esgota e na presença de luz e CO₂ regressa de novo ao modo autotrófico, acompanhada com o desenvolvimento de cloroplastos (Campenni' *et al.*, 2013). Esta microalga destaca-se também pela sua capacidade de produção de carotenóides e acumulação de grandes quantidades de lípidos adequados à produção de biodiesel (Santos, 2014).

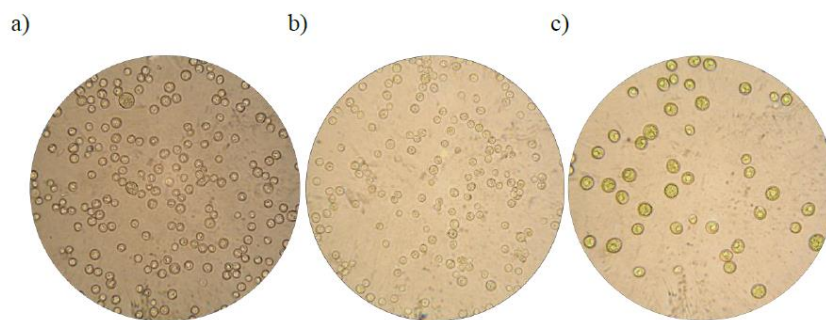


Fig. 1.9 – Células da microalga *Chlorella protothecoides* observadas com um microscópio óptico com uma ampliação de 1000x, obtidas através de: a) crescimento heterotrófico, b) crescimento mixotrófico, e c) crescimento autotrófico (Fonte: Santos, 2014).

Na tabela 1.3 apresentam-se os dados da taxa de produtividade, do peso seco e do teor de lípidos referidos em alguns estudos publicados para a *Chlorella protothecoides* heterotrófica, em função das diferentes condições de cultura utilizadas.

Tabela 1.2 – Concentração máxima de biomassa, produtividade volumétrica de biomassa e teor de lípidos obtidos no cultivo heterotrófico de *Chlorella protothecoides*.

	Concentração máxima de biomassa $X_{\text{máximo}} \text{ (gL}^{-1}\text{)}$	Produtividade volumétrica de biomassa $P_x \text{ (gL}^{-1}\text{h}^{-1}\text{)}$	Teor de lípidos %	Referência
<i>Chlorella protothecoides</i> heterotrófica	45,8	0,191	-	(Shi <i>et al.</i> , 2002)
	15,5	0,0842	55,2	(Xu <i>et al.</i> , 2006)
	51,2	0,307	50,3	(Xiong <i>et al.</i> , 2008)
	43,3	-	49,85	(Cerón-García <i>et al.</i> , 2013)

Os resultados presentes na tabela demonstram a capacidade que a *C. protothecoides* heterotrófica tem de atingir elevadas produtividades, associadas a teores significativos de lípidos. São parâmetros que influenciam diretamente o rendimento e o custo associado ao biodiesel microalgal, comprovando-se assim o seu potencial como futura fonte de produção de biodiesel a nível industrial.

O presente estudo teve como objetivo a caracterização e avaliação da capacidade de produção de biodiesel a partir da microalga *Chlorella protothecoides* heterotrófica, bem como a elaboração de um balanço preliminar energético e económico associado ao processo.

2. Materiais e métodos

2.1 Microalga

A microalga *C. protothecoides* estirpe 25 foi adquirida à algoteca UTEX, da Universidade de Austin (Texas, EUA). A alga foi mantida em meio de cultura líquido inorgânico, à temperatura ambiente e iluminação contínua e cultivada em fermentador, com recurso a um meio de cultura orgânico.

2.2 Reagentes

A lista de reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental encontra-se no Anexo I.

2.3 Meio de crescimento da microalga

Para os ensaios de fermentação a microalga foi inoculada em meio de cultura cuja composição se encontra na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Meio de fermentação da microalga *Chlorella protothecoides*.

	Meio de cultura
<i>Chlorella protothecoides</i> 1º ensaio	40g/L dextrose (glucose comercial).H ₂ O; 5g/L extrato de levedura, 3L água do mar
<i>Chlorella protothecoides</i> 2º ensaio	20g/L dextrose.H ₂ O; 3g/L extrato de levedura, 3 g/L NaCl obtido da água do mar; 3,5L de água do mar

2.4 Equipamentos

A lista dos equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental encontra-se no Anexo II.

2.5 Métodos

2.5.1 Obtenção da biomassa microalgal

A. Fermentação em reator à escala piloto

Realizaram-se dois ensaios de fermentação com a microalga *Chlorella protothecoides* num fermentador em inox, com 50 litros de capacidade (Figuras 2.1 e 2.2), tendo-se utilizado os meios de cultura descritos na tabela 2.1, para um volume final de meio de 35 litros. O procedimento experimental foi o seguinte:

1. Esterilizou-se o fermentador com vapor em linha;
2. Adicionou-se 3mL de anti-espuma, polipropileno glicerol (PPG) puro.
3. Após esterilização e arrefecimento do caldo adicionou-se uma solução de três antibióticos, previamente esterilizada por filtração: 3g de estreptomicina, 150mg de cloranfenicol e 1,86g de penicilina;
4. Acertou-se o pH do meio a 6,5 com adição automática de base (NaOH 4N) ou ácido (HCl 4N), o qual foi mantido constante ao longo da fermentação;
5. A temperatura, de 28°C, foi mantida constante através de uma camisa de aquecimento com vapor;
6. A fermentação foi seguida ao longo do tempo através da colheita de amostras que foram analisadas em termos de proporção carbono/azoto;
7. A fermentação foi dada como terminada após a biomassa atingir a fase estacionária, ou seja, ter leituras de DO constantes durante dois dias.

O fermentador foi inoculado com 3,5 litros de pré-inóculo de microalga *Chlorella protothecoides*, após crescimento de 4 dias num meio de cultura com a mesma composição, realizado numa incubadora a 28°C e com agitação orbital (120 rpm), no escuro. O cultivo em fermentador foi seguido por medição do oxigénio dissolvido e da densidade ótica a 540nm. O fluxo de ar durante o crescimento foi de 1vvm.



Fig. 2.1 - Inóculo de *Chlorella protothecoides*.



Fig. 2.2 - Fermentador BIOLAFITTE 111 Bd Robespierre 78300 POISSY.

B. Colheita da biomassa

Após se ter dado por finalizado o processo fermentativo, procedeu-se à colheita da biomassa produzida. Esta foi concentrada, utilizando um clarificador que concentrou o caldo três vezes, e colocada no frigorífico. Após uma noite no frigorífico decantou-se e centrifugou-se a biomassa, que, após ser congelada a -30°C, foi liofilizada.

2.5.2 Rutura celular da biomassa microalgal

De modo a facilitar a acessibilidade aos lípidos presentes no interior das células da microalga *Chlorella protothecoides*, realizou-se um processo de rutura celular da biomassa liofilizada utilizando um moinho de bolas. Neste processo foram mantidos constantes os parâmetros: quantidade de biomassa (0,5g), tempo de moagem (3:50 minutos) e frequência de vibração do moinho (25 Hz), tendo-se variado o tamanho e a quantidade de esferas em aço inox.

As condições utilizadas, e as respetivas designações, encontram-se apresentadas, na tabela (2.2). Na figura (2.3) pode-se ver a biomassa microalgal proveniente da segunda fermentação após moagem.

Tabela 2.2 – Diâmetro e número de esferas utilizadas na moagem com moinho de bolas e respetiva designação.

Diâmetro das esferas (mm)	Nº de esferas utilizado	Designação
10	8	8BP
15	2	2BM



Fig. 2.3 - Biomassa microalgal (*Chlorella protothecoides*) do 2º ensaio, após moagem com 2 esferas de 15mm (2BM).

A biomassa, após este pré-tratamento, foi sujeita a extração em soxhlet (secção 2.5.4.1.1.B), com o objetivo de avaliar o teor de lípidos nela presente.

Também alguns dos ensaios de transesterificação direta (secção 2.5.3) foram realizados após a biomassa ter sido sujeita a este pré-tratamento de rutura celular.

2.5.3 Produção de biodiesel: transesterificação direta da biomassa microalgal

Para a conversão dos ácidos gordos livres e glicéridos em ésteres metílicos recorreu-se a um processo de transesterificação direta. Tal como o nome indica a reação ocorre diretamente na biomassa, não sendo necessário qualquer método prévio de extração do óleo.

O procedimento experimental foi adaptado do procedimento utilizado por Whalen *et al.* (2011), tendo o método já sido utilizado no LNEG em trabalhos anteriores, permitindo bons resultados com outras microalgas (Gaivão, 2013; Marques, 2013). Os ensaios foram realizados na presença de um álcool (metanol) e de ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador ácido. O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se 100 mg de biomassa liofilizada e moída, em duplicado, para um frasco de 20mL.

2. Adicionou-se o volume de catalisador (ácido sulfúrico), seguido de metanol, na proporção em estudo.
3. Selou-se o frasco com uma tampa de alumínio com um septo de borracha, recorrendo a um encapsulador.
4. Colocou-se o frasco numa incubadora durante o período de tempo pretendido, a uma temperatura de 50°C e a uma velocidade de agitação de 200 rpm.
5. Retirou-se o frasco da incubadora e adicionou-se 5mL de água à solução anterior para parar a reação.
6. Adicionou-se 2mL de clorofórmio à solução.
7. Agitou-se o frasco, de modo a permitir a mistura das duas fases e a transferência dos ésteres metílicos para a fase orgânica, ficando este depois algum tempo em repouso para permitir a separação de fases.
8. Após a separação das duas fases transferiu-se a fase inferior (fase orgânica), recorrendo a uma micropipeta, para um tubo de vidro, passando através de uma pipeta de Pasteur, com algodão e sulfato de sódio anidro no seu interior, de modo a reter resíduos de biomassa e de água.
9. Depois de transferir a quantidade máxima/possível de fase orgânica, repetiu-se os passos de 6 a 8 duas vezes, totalizando um volume de 6mL de clorofórmio utilizado na recolha dos ésteres metílicos.
10. De seguida transferiu-se um volume conhecido, medido com uma pipeta, da fase orgânica recolhida para um outro frasco.
11. Colocou-se o frasco num banho termostático, a 80°C, dentro de uma hotte, de modo a evaporar o clorofórmio presente.
12. As amostras obtidas foram armazenadas para posterior preparação e análise cromatográfica (secção 2.5.4.2.3.B).

Realizaram-se vários ensaios de modo a avaliar a influência do tempo de incubação na conversão da fração lipídica em ésteres metílicos, permitindo selecionar o tempo de equilíbrio da reação de transesterificação.

De forma a compreender qual o impacto da parede celular da microalga no processo de conversão efetuou-se todo o processo de transesterificação aplicando a mesma metodologia de ruptura celular descrita na secção 2.5.2.A.

2.5.3.1 Efeito do teor de humidade da biomassa

Para estudar de que forma a presença de humidade na biomassa influenciava o rendimento de conversão dos lípidos em ésteres metílicos seguiu-se, novamente, o processo experimental descrito em 2.5.3, mas envolvendo duas metodologias de preparação de amostra distintas:

- a primeira consistiu na adição de água *Millipore* à biomassa liofilizada, de forma a se atingir o teor de humidade pretendido;

- a segunda baseou-se na pesagem de biomassa previamente humedecida, através de 24h de hidratação da biomassa liofilizada em água, equivalendo sempre a pesagem a 100mg de peso seco de microalga.

Associado ao efeito do teor de humidade foi também avaliado o efeito da proporção do catalisador, de modo a compreender se a quantidade deste poderia conduzir a uma alteração reacional com vista à melhoria do processo na presença de água.

Realizaram-se ainda ensaios à temperatura de 80°C, utilizando biomassa húmida, mantendo-se todos os parâmetros inicialmente definidos, para avaliar a influência da temperatura na reação de transesterificação realizada na presença de água.

2.5.4 Metodologias analíticas

2.5.4.1 Caracterização da biomassa microalgal

2.5.4.1.1 Determinação do teor de lípidos

Para avaliar o teor máximo de lípidos presentes na biomassa microalgal liofilizada foram utilizados dois processos diferentes de pré-tratamento de ruptura celular, que precederam a extração soxhlet: um processo químico (hidrólise ácida) e um processo mecânico (moinho de bolas).

A. Pré-tratamento por hidrólise ácida

A hidrólise ácida, por ser um método bastante agressivo, provoca a perda das características do óleo, impedindo assim o seu aproveitamento futuro. A sua utilização como pré-tratamento prende-se assim apenas como uma forma de quantificação do valor máximo de lípidos que é possível extrair da biomassa microalgal, possibilitando a comparação e escolha do melhor pré-tratamento mecânico a utilizar. O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se 1g de biomassa, em duplicado, para tubos de vidro de 500mL.
2. Adicionou-se 40mL de ácido clorídrico 4N.
3. Colocou-se num BLOC DIGEST 20, a 150°, durante uma hora.
4. Após arrefecimento à temperatura ambiente filtrou-se a amostra por filtro de papel de laboratório, fazendo sucessivas lavagens com água *Millipore* e sucessivas medições de pH até o valor do pH da água de lavagem, medido através de um potenciómetro, ser neutro.
5. Deixou-se o filtro, com a biomassa, secar completamente.

O filtro seco, contendo a biomassa, foi sujeito a extração soxhlet, como descrito abaixo (secção 2.5.4.1.1.B).

B. Extração e quantificação da fração lipídica

Para determinar o teor de lípidos da biomassa foram feitas extrações soxhlet. O método consiste na extração dos lípidos solúveis no solvente escolhido, no qual as impurezas são insolúveis. O procedimento seguido foi o seguinte:

1. Pesou-se 0,5g de biomassa liofilizada e moída, em duplicado, para um cartucho de extração.
2. Colocou-se um pedaço de algodão dentro do cartucho e dobraram-se as pontas, de modo a garantir que não ocorria qualquer fuga de biomassa durante o processo de extração.
3. Mediu-se e transferiu-se, aproximadamente, 170mL de solvente (hexano ou etanol) para um balão de destilação.
4. Colocou-se o cartucho dentro do extrator.
5. Fez-se a montagem do equipamento, composto pelas mantas de aquecimento, balão de destilação, extrator soxhlet, condensador e circuito de água, dentro da hotte (Figura 2.4).
6. Procedeu-se à extração durante 6 horas.

Nota: Para os casos em que se realizou o pré-tratamento de hidrólise ácida colocou-se o filtro com a biomassa liofilizada, dobrado, diretamente no cartucho de extração procedendo de igual modo nos passos seguintes (2 a 6).



Fig. 2.4 - Extração da fração lipídica em soxhlet.

Após o processo de extração filtrou-se a solução, composta pelo solvente e os lípidos, para um balão de 100mL previamente tarado (103°, 1h) para remover possíveis vestígios de biomassa. De seguida, o balão com a mistura resultante da filtração foi colocado no evaporador rotativo, a baixas pressões (235mbar para hexano, 80mbar para etanol), com um banho termostático a 40°C, de forma a remover o solvente.

Finalizado o processo de destilação colocou-se o balão na estufa, durante 1h a 103°C, de forma a eliminar qualquer vestígio de solvente. Colocou-se o balão a arrefecer num exsiccador, até atingir a temperatura ambiente. Após arrefecer pesou-se, determinando-se o teor de lípidos através da seguinte expressão:

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

na qual $m_{\text{balão+lípidos}}$ (g) representa a massa do balão juntamente com a massa dos lípidos extraídos, $m_{\text{balão}}$ (g) a massa do balão e $m_{\text{microalga}}$ (g) a massa da amostra de microalga utilizada para o processo de extração.

2.5.4.1.2 Determinação do teor de açúcares

À semelhança dos estudos efetuados para a determinação do teor de lípidos, foi necessário recorrer a um pré-tratamento que conduzisse à quebra da parede celular de forma a permitir uma eficiente extração dos açúcares presentes na biomassa da microalga, antes da sua quantificação. Neste caso, o pré-tratamento utilizado foi a hidrólise ácida quantitativa.

A. Hidrólise ácida quantitativa

O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 0,5 g de biomassa liofilizada, em duplicado, para um tubo de ensaio e adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico com uma concentração de 72% (m/m).
2. Colocou-se o tubo de ensaio num banho termostático a 30°C durante uma hora.
3. Retirou-se o tubo do banho e transferiu-se o conteúdo para um frasco rolhado de 250mL.
4. Adicionou-se 139mL de água *Millipore* para obter uma concentração de ácido sulfúrico de 4% (m/m).
5. Agitou-se a amostra.

6. Fechou-se o frasco e levou-se à autoclave durante uma hora a 120°C.
7. Retirou-se uma amostra do frasco e filtrou-se com o auxílio de um filtro com 3mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade (Acrodisc GHP, Pall).

B. Determinação colorimétrica dos açúcares totais

A determinação do teor de açúcares totais presentes na biomassa foi feita recorrendo ao método do reagente fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Neste método a amostra é atacada com ácido sulfúrico provocando a hidrólise dos polissacáridos em monossacáridos que, ao reagirem com o fenol, levam ao aparecimento de uma tonalidade alaranjada na solução. A posterior quantificação é feita indiretamente, já que é necessária a comparação com uma reta de calibração com soluções de diferentes concentrações de glucose, analisadas espectrofotometricamente a 490nm. Os ensaios foram realizados sempre em duplicado e o procedimento foi o seguinte:

1. Preparou-se uma solução aquosa de fenol com uma relação 5% (massa/volume) diluindo 5g de fenol em 100mL de água *Millipore*.
2. Preparou-se uma solução padrão de açúcar com uma concentração de 0,1 g/L.
3. Fizeram-se seis diluições a partir da solução padrão de açúcar preparada no ponto 2, com concentrações entre 0,01 g/L e 0,08 g/L, de forma a obter a reta de calibração.
4. Diluíram-se, em água *Millipore*, as amostras pré-tratadas, de modo a obter valores para a concentração de açúcares semelhantes aos valores utilizados na reta de calibração.
5. Transferiu-se 1mL de cada solução padrão e de cada amostra para um tubo de ensaio.
6. Adicionou-se 1mL da solução de fenol.
7. Adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico concentrado e agitou-se no vortex de forma a homogeneizar.
8. Deixou-se a reação a ocorrer durante 10min, à temperatura ambiente, e depois colocaram-se os tubos de ensaio dentro de um banho de água fria de modo a arrefecer.
9. Fez-se a leitura da absorvância de cada uma das soluções padrão e amostras num espectrofotómetro, a um comprimento de onda de 490nm, contra um ensaio branco em que a amostra foi substituída por água *Millipore*.

2.5.4.1.3 Determinação do teor de proteína

Para determinar o teor de proteína recorreu-se ao método de Kjeldahl. Este método, que consiste na determinação do azoto total da matéria orgânica presente nas amostras, permite quantificar de forma indireta o conteúdo total de proteína, dado que as proteínas possuem azoto na sua constituição. O processo pode ser dividido em várias fases: a fase de digestão, na qual se dá a produção de amónio a partir do azoto presente nas amostras; a fase da destilação, na qual ocorre a transferência dos iões de amónio para um recipiente com uma solução mista de indicadores através da produção de amónia; e, por fim, a análise volumétrica dos iões de amónio presentes na solução mista de indicadores. O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se, em duplicado, 200mg de biomassa liofilizada para dentro de um barquinho de pesagem.
2. Transferiu-se a amostra para um tubo de digestão com água *Millipore*.
3. Adicionou-se 50mL de reagente de digestão (solução composta por ácido sulfúrico, óxido de mercúrio e sulfato de potássio (Anexo IV)) e iniciou-se o processo de digestão. Realizou-se também um ensaio em branco.
4. Deixou-se decorrer o processo de digestão durante cerca de quatro horas, até a amostra ficar transparente.
5. Ao fim deste processo, adicionou-se cerca de 100mL de água *Millipore* e 5 gotas de fenolftaleína a cada uma das amostras e iniciou-se o processo de destilação.
6. Colocaram-se as amostras digeridas na unidade de destilação e adicionou-se aproximadamente 50mL de um reagente composto por hidróxido de sódio e tiosulfato de sódio (Anexo IV), de modo a neutralizar a acidez do ácido sulfúrico ainda presente na amostra.

7. A seguir a este passo, iniciou-se o processo de destilação para um *erlenmeyer* contendo 50mL de ácido bórico com uma solução mista de indicadores (Anexo IV).
8. Para finalizar, titulou-se esta solução com uma solução aquosa de ácido sulfúrico 0,02N (Anexo IV).

Para determinar o conteúdo em proteína começou-se por determinar o teor de azoto recorrendo à seguinte expressão:

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

De seguida, converteu-se o teor de azoto em teor de proteína:

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

sendo que V_a e V_b (mL) representam o volume de titulante necessário para titular, respetivamente, a amostra e o ensaio em branco, N_{tit} (N) a normalidade da solução aquosa de ácido sulfúrico titulante, $m_{microalga}$ (g) a massa da amostra e FCAP o fator de conversão do conteúdo de azoto em conteúdo de proteína, cujo valor utilizado foi de 6,25g/g azoto total (Mariotti *et al.*, 2008).

2.5.4.1.4 Determinação do teor de minerais

O teor de minerais foi determinado com base numa análise gravimétrica, que permitiu avaliar a quantidade de massa da amostra que a uma temperatura de 550°C não é volatilizada. O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se cerca de 0,5g de amostra, em duplicado, para um cadinho previamente tarado a 550°C.
2. Colocaram-se as amostras na mufla
3. Ligou-se a mufla a 550°C
4. Esperou-se até a temperatura atingir os 550°C e deixaram-se as amostras durante uma hora no interior da mufla
5. Retiraram-se os cadinhos da mufla para um exsiccador.
6. Após arrefecerem à temperatura ambiente, pesaram-se os cadinhos contendo os minerais.

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

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

na qual $m_{cadinho+minerais}$ (g) é a massa do cadinho com o conteúdo em minerais, $m_{cadinho}$ (g) a massa do cadinho tarado e $m_{biomassa}$ (g) a massa da amostra.

2.5.4.1.5 Determinação do teor de humidade

A determinação do teor de humidade da biomassa foi efetuada de acordo com o seguinte procedimento:

1. Pesou-se, em duplicado, para cadinhos previamente tarados, 1g de amostra (biomassa liofilizada ou húmida).
2. Colocou-se a amostra na estufa durante a noite, a 80°C.
3. Retirou-se a amostra da estufa e pesou-se, após arrefecimento em exsiccador.

4. Colocou-se novamente na estufa por mais 30 minutos. Repetiu-se o ponto 3.

A determinação do teor de humidade foi feita através da seguinte expressão:

$$\text{Humidade (\%)} = \frac{m_{\text{cadinho+amostra inicial}} - m_{\text{cadinho+amostra final}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (5)$$

na qual $m_{\text{cadinho+amostra inicial}}$ (g) corresponde à soma da massa do cadinho com a da amostra, antes de ir à estufa, $m_{\text{cadinho+amostra final}}$ (g) à soma da massa do cadinho com a da amostra, após secagem, e m_{amostra} (g) à massa da amostra.

2.5.4.2 Caracterização da fração lipídica

2.5.4.2.1 Determinação do índice de acidez

O índice de acidez de um óleo/fração lipídica é um indicador da quantidade de ácidos gordos livres que este tem, sendo a sua determinação bastante útil para a escolha do catalisador a utilizar no processo de transesterificação (secção 2.11). A sua determinação foi feita com base na norma NP EN ISO 650:2002, sendo que o método consiste na neutralização, por titulometria ácido-base, dos ácidos gordos livres contidos na amostra. O procedimento foi o seguinte:

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

A normalidade da solução etanólica é dada por:

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

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

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

$$\text{Índice de acidez (mg KOH/g)} = \frac{V_{\text{tit}} \times N_{\text{KOH}} \times 56,11}{m_{\text{fracção lipídica}}} \quad (7)$$

na qual V_{tit} (mL) representa o volume de solução etanólica de hidróxido de potássio titulante, N_{KOH} (N) a normalidade dessa solução e $m_{\text{fracção lipídica}}$ (g) a massa de fração lipídica.

2.5.4.2.2 Determinação do índice de iodo

A. Índice de iodo experimental

O índice de iodo, definido pela quantidade de halogéneo absorvido pela amostra, foi determinado de acordo com a norma EN ISO 3961:2003 e permite avaliar o grau de insaturação de misturas de ácidos gordos. O método consiste em duas fases: na primeira, no escuro, durante um determinado intervalo de tempo e à temperatura ambiente dá-se a reação entre os glicéridos e uma solução de halogéneo; na segunda o excesso de halogéneo vai oxidar uma solução de iodeto convertendo-a em iodo livre. Esta quantidade de iodo é posteriormente determinada por titulação com tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Pesou-se, em duplicado, 140mg de fração lipídica para barquinhos de pesagem.
2. Transferiu-se a amostra pesada para um *erlenmeyer* de 500mL com 20mL de solvente (composto por ciclohexano e ácido acético em partes iguais).
3. Adicionou-se 25mL de reagente de *Wijs*.
4. Tapou-se o *erlenmeyer* e agitou-se levemente, colocando-o num local escuro em repouso durante 1h.
5. Adicionou-se 20mL da solução de iodeto de potássio (10g de KI em 100mL de água) e 150mL de água.
6. Titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio 0,1N, até esta adquirir uma coloração amarelo claro.
7. Adicionou-se 0,5mL da solução indicadora de cozimento de amido (0,5g de amido em 103mL de água), continuando a titulação, sob agitação forte, até desaparecer a cor azul.

O índice de iodo da amostra é dado por:

$$II(gI_2/100g) = \frac{((V_b - V_a) \times c \times 12,69)}{m} \quad (8)$$

na qual V_b (mL) corresponde ao volume de tiosulfato de sódio gasto no ensaio em branco, V_a (mL) ao volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra, c (N) à concentração do tiosulfato de sódio e m (g) à massa da amostra de fração lipídica.

B. Índice de iodo teórico

O valor do índice de iodo também pode ser calculado teoricamente, de acordo com a norma EN 16300:2013, recorrendo à tabela com os fatores de multiplicação para os ésteres metílicos de ácidos gordos insaturados (Tabela 2.2). O índice de iodo é dado por:

$$II(gI_2/100g) = \sum FM_{FA} \times \%m/m_{FA} \quad (9)$$

na qual FM_{FA} corresponde ao fator de multiplicação de cada ácido gordo insaturado da fração lipídica microalgal e $\%m/m_{FA}$ (%) à percentagem de cada ácido gordo insaturado da fração lipídica microalgal.

Tabela 2.2 - Fator de multiplicação dos ésteres metílicos insaturados para o cálculo do índice de iodo teórico (EN 16300:2013).

Fator de multiplicação	
C14:1	1,056
C16:1	0,950
C17:1	0,899
C18:1	0,860
C18:2	1,732
C18:3	2,616
C20:1	0,782
C20:2	1,574
C20:3	2,376
C22:1	0,720
C22:2	1,448
C22:3	2,184

2.5.4.2.3 Perfil e composição em ácidos gordos

A. Preparação de ésteres metílicos de ácidos gordos

Para caracterizar qualitativa e quantitativamente a composição da fração lipídica através de análise cromatográfica é necessário converter os glicéridos e ácidos gordos livres presentes na amostra em ésteres metílicos. A conversão foi realizada segundo a norma EN ISO 5509:2000, e consistiu na transformação dos sabões em ésteres metílicos através da reação com uma solução metanólica de trifluoreto de boro. Para tal, é necessário um tratamento prévio da amostra, com uma solução metanólica de hidróxido de sódio, capaz de saponificar os glicéridos e ácidos gordos livres.

O procedimento foi o seguinte:

1. Pesou-se 100mg de fração lipídica extraída da biomassa liofilizada e moída (secção 2.5.4.1.1.B), em duplicado, para um balão.
2. Adicionou-se 4mL de solução metanólica de hidróxido de sódio 0,5M e agitou-se de forma ligeira, diluindo os lípidos na solução.
3. Colocou-se reguladores de ebulição.
4. Ligou-se o balão à parte inferior de um condensador, em contacto com um banho termostático a 80°C e ligou-se o sistema de refrigeração (Figura 2.5).
5. Deixou-se a solução a 80°C durante aproximadamente 10min, agitando de forma leve de minuto a minuto até não se verem gotas de matéria gorda.
6. Adicionou-se, através do condensador, 5mL de solução metanólica de trifluoreto de boro (15%) e prosseguiu-se a ebulição durante 3 minutos.
7. Adicionou-se, através do condensador, 3mL de iso-octano.
8. Retirou-se o balão do banho e adicionou-se 10mL de solução saturada de cloreto de sódio.
9. Agitou-se levemente e adicionou-se mais 10mL de solução saturada de cloreto de sódio, num total de 20mL.
10. Tapou-se a solução e agitou-se fortemente durante cerca de 15 segundos.
11. Adicionou-se mais solução saturada de cloreto de sódio até a solução ficar ao nível do pescoço do balão, facilitando a remoção da fase superior.
12. Transferiu-se a maior quantidade possível da camada superior, composta por iso-octano e ésteres metílicos, através do auxílio de uma micropipeta, para um tubo de vidro passando por uma pipeta de Pasteur com algodão e sulfato de sódio anidro, de forma a eliminar vestígios de água.
13. Guardou-se a amostra para posterior análise cromatográfica (secção 2.5.4.2.3.B).



Fig. 2.5- Transmetilação da fração lipídica pelo método de trifluoreto de boro.

B. Análise cromatográfica

Para a determinação do perfil e composição em ácidos gordos da fração lipídica da biomassa microalgal, após a extração e transmetilação dos lípidos, foi efetuado o seguinte procedimento:

1. Pesou-se 15 mg de padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanóico) para um *vial*.
2. Adicionou-se 1,5mL de amostra (ésteres diluídos em iso-octano).
3. Homogeneizou-se em vortex.
4. Injetou-se 1µL da amostra no cromatógrafo.
5. A identificação dos ésteres metílicos foi feita em função da análise dos tempos de retenção, comparativamente aos respetivos padrões.

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

- Temperatura da coluna: 220°C durante 16 minutos, aumentando a 20°C/min até aos 230°C e mantendo-se nesta temperatura durante 4 minutos.
- Temperatura do detetor: 250°C
- Temperatura do injetor: 250°C

A percentagem mássica de cada um dos ésteres metílicos é dada pela seguinte expressão:

$$\text{Éster metílico \% } \left(\frac{m}{m} \right) = \frac{A_i}{\sum A - A_{PI}} \times 100 \quad (10)$$

na qual $\sum A$ corresponde à área total dos picos dos ésteres metílicos, A_{PI} a área do pico do padrão interno e A_i a área do pico cuja percentagem se pretende calcular.

O teor de matéria saponificável, sob a forma de ésteres metílicos, foi determinada por:

$$\text{Éster metílico (g/100g óleo)} = \frac{\sum A - A_{PI}}{A_{PI}} \times m_{PI} \times \frac{V_{iso}}{V_R} \times 100 \quad (11)$$

na qual m_{PI} (g) corresponde à massa do padrão interno, V_{iso} ao volume adicionado de iso-octano no processo de separação e recolha dos ésteres metílicos (3mL), V_R (mL) ao volume retirado da solução composta por iso-octano e ésteres após o processo de separação de fases e $m_{amostra}$ (g) à massa da amostra de fração lipídica.

2.5.4.3 Caracterização do biodiesel

O produto resultante do processo de transesterificação direta da biomassa microalgal – biodiesel – foi apenas caracterizado em termos do teor de ésteres metílicos.

O procedimento utilizado para a análise cromatográfica dos ésteres metílicos foi o seguinte:

1. Adicionou-se 1,5mL da solução de padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanóico, dissolvido em heptano, com uma concentração de 10mg/mL) à amostra recolhida e tratada como descrito na secção 2.5.4.2.3.A.
2. Agitou-se a solução no vortex.
3. A análise cromatográfica foi efetuada de acordo com as condições descritas em 2.5.4.2.3.B.

A quantidade de ésteres metílicos convertidos a partir da biomassa é dada por:

$$\text{Éster metílico (g/100g ps)} = \frac{\sum A - A_{PI} \times m_{PI} \times \frac{V_{Clo}}{V_{R2}}}{m_{microalga}} \times 100 \quad (12)$$

na qual V_{clo} (mL) corresponde ao volume de clorofórmio adicionado no processo de separação e recolha dos ésteres metílicos, V_{R2} (mL) ao volume retirado da solução composta por clorofórmio e ésteres após a transesterificação e $m_{microalga}$ (g) à massa da amostra de microalga utilizada no processo de extração.

3. Discussão de resultados

3.1 Crescimento da microalga

No âmbito do projeto SIMBIOALGA – “Nova abordagem simbiótica para a produção integrada e verdadeiramente sustentável de microalgas dirigida para um plataforma de biorefinaria” que decorreu na Unidade de Bioenergia do LNEG foram realizados vários ensaios de crescimento da microalga *Chlorella protothecoides*, em condições exclusivamente heterotróficas, (secção 2.5.1.A), com o propósito de estabelecer os valores dos parâmetros de cultura que permitissem obter produtividades em biomassa microalgal mais elevadas.

A biomassa microalgal utilizada nos estudos de transesterificação realizados no presente trabalho foi obtida de dois ensaios fermentativos: um realizado em 2013, prévio ao trabalho em questão, cuja biomassa foi cedida já liofilizada; e um realizado em 2014, acompanhado no decorrer deste trabalho, tendo parte da biomassa final recolhida sido armazenada congelada e outra parte liofilizada.

O processo fermentativo foi seguido através da citometria de fluxo e a proporção Carbono/Azoto no caldo fermentativo foi medida periodicamente, sendo que o término da fermentação e colheita da biomassa foram determinados através das leituras da densidade ótica, considerando-se ideal a colheita quando a biomassa atingisse a fase estacionária, isto é, os valores da densidade ótica se mantivessem constantes por, pelo menos, dois dias consecutivos.

É perceptível, através da análise dos dados da tabela 2.1, que a otimização do processo decorreu através da variação das quantidades de dextrose e extrato de levedura, tendo em vista a maximização da produção de fração lipídica.

Porém, analisando apenas os dados referentes a estas duas fermentações, verifica-se que o desempenho da biomassa microalgal da segunda fermentação (junho 2014) foi inferior em praticamente todos os parâmetros analisados. Estes resultados são explicáveis pela necessidade, provocada por uma contaminação bacteriana da cultura, de terminar a fermentação antes de se atingir o tempo necessário ao crescimento, já que, dada a semelhança de valores para a taxa de crescimento de ambas as fermentações, a previsão seria de que o teor de lípidos fosse da mesma ordem de grandeza. Devido ao facto de se ter terminado o processo fermentativo antecipadamente, atingiu-se uma concentração de biomassa final (3,6g ps/L) muito inferior à que seria de esperar se a fermentação fosse prolongada o tempo necessário, tal como sucedeu na primeira (16,4g ps/L). Observou-se também uma diminuição significativa da produtividade da biomassa microalgal – de 0,058 g/(L.h) para 0,046 g/(L.h). Devido a constrangimentos técnicos, não foi possível realizar outra fermentação no período de tempo em que decorreu o trabalho experimental para a presente dissertação.

Tabela 3.1 - Caracterização da biomassa microalgal proveniente dos ensaios fermentativos.

Parâmetros	Fermentação de <i>C. p.</i> 14/5/2013	Fermentação de <i>C. p.</i> 9/6/2014
Massa de <i>C. protothecoides</i> liofilizada final (g)	550	100
Volume de cultura (L)	40	35
Tempo de fermentação (dias)	10	6
X final (g peso seco/L)	16,4	3,6
Taxa específica de crescimento μ (h ⁻¹)	0,056	0,059
Produtividade volumétrica da biomassa microalgal (g/(L.h))	0,058	0,046

3.2 Caracterização da biomassa microalgal

3.2.1 Teor de lípidos

Numa fase inicial, o teor de lípidos foi determinado sobre a biomassa liofilizada proveniente de ambas as fermentações, através da quantificação gravimétrica dos lípidos extraídos com hexano por extração soxhlet (secção 2.5.4.1.1.B.), sem que a biomassa fosse sujeita a qualquer pré-tratamento.

O teor de lípidos médio (Tabela 3.2) obtido para a extração da primeira biomassa foi de 8,33 g/100g ps, sendo o da segunda de 0,86 g/100g ps. Comparando os resultados é claro o superior teor lipídico da biomassa proveniente da primeira fermentação, sendo o seu valor cerca de dez vezes superior ao da segunda. Sendo o teor de lípidos, à partida, o principal fator para o rendimento do processo de conversão de biomassa microalgal em biodiesel é perceptível como estes resultados representam um revés para a finalidade do estudo - com destaque para a fração lipídica da biomassa do 2º ensaio - cujo valor é inferior a 1g/100g ps.

Outros estudos apontam para teores de lípidos até os 46,1% (Li *et. al.*, 2007) e os 55,2% (Xu *et al.*, 2006), sendo evidente a discordância para com os resultados obtidos. Assim, embora na análise de diversas fontes bibliográficas seja omissa qualquer indicação de necessidade de pré-tratamento para extrair de forma efetiva os lípidos presentes na biomassa microalgal liofilizada, a grande discordância de resultados conduziu à introdução de um método prévio para, através da rutura/fragilização das paredes celulares, melhorar a eficiência mássica do processo de extração.

Tabela 3.2 - Teor de lípidos da *Chlorella protothecoides* liofilizada, sem pré-tratamento de rutura celular.

	Ensaio fermentativo	Teor de lípidos (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i>	1º	8,33
	2º	0,86

3.2.1.1 Efeito do pré-tratamento

a) Pré-tratamento químico: hidrólise ácida

De modo a contabilizar os lípidos efetivamente presentes na biomassa microalgal procedeu-se a um pré-tratamento químico da biomassa, ou seja, à realização de uma hidrólise ácida com ácido clorídrico. Este processo, por ser particularmente agressivo, não permite uma futura utilização dos lípidos extraídos, mas apenas uma quantificação do total de fração lipídica presente na biomassa.

Verificou-se, com a introdução deste pré-tratamento, um aumento significativo na quantidade de lípidos extraídos – de 8,34 g/100g ps para 49,14 g/100g ps na biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo e de 0,857 g/100g ps para 12,74 g/100g no segundo ensaio (Tabela 3.3). Em concordância com os resultados já obtidos aquando da extração diretamente na biomassa liofilizada (secção 3.2), o teor de lípidos da biomassa da primeira fermentação foi muito superior ao da segunda.

Comprovou-se, para a biomassa proveniente da primeira fermentação que, sendo esta sujeita a um pré-tratamento de rutura celular, o teor de lípidos obtido é da mesma ordem de grandeza do observado por outros autores (Xiong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2006). Por outro lado, na biomassa resultante da segunda fermentação, o teor de lípidos permanece bastante baixo, considerando-se que tal é resultado dos problemas ocorridos aquando da realização deste processo fermentativo (secção 3.1), no qual não ocorreram condições propícias à síntese de lípidos.

Tabela 3.3 - Teor de lípidos, para ambos os ensaios fermentativos, após pré-tratamento com hidrólise ácida. O resultado do primeiro ensaio fermentativo corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Ensaio fermentativo	Teor de lípidos (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i>	1°	49,14 ± 0,53
	2°	12,74

b) Pré-tratamento mecânico: moinho de bolas

A biomassa microalgal foi sujeita a um pré-tratamento mecânico, num moinho de bolas, de modo a se avaliar a influência deste no teor de lípidos extraídos, tendo-se estudado simultaneamente, para a biomassa da 1ª fermentação, o efeito do tamanho e da quantidade de bolas, mantendo constantes fatores como a frequência, o tempo de moagem e a quantidade de biomassa.

Verificou-se (Tabela 3.4) que, para a biomassa do 1º ensaio fermentativo, a diferença em termos de lípidos extraídos nas condições utilizadas foi inferior a 1%, sendo que se pode considerar que, para a biomassa em estudo, é indiferente a quantidade e o tamanho de bolas utilizadas. Assim, à biomassa da 2ª fermentação foi aplicado o processo de rutura utilizando duas bolas médias, que se mostrou mais eficiente quer a nível do tempo despendido a recolher a biomassa como a nível da quantidade de biomassa que se consegue recuperar.

Tabela 3.4 - Teor de lípidos, para a biomassa de ambos os ensaios fermentativos, após pré-tratamento físico em moinho de bolas, em função da quantidade (8 ou 2) e tamanho (BP – 10mm; BM – 15mm) das bolas. Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.

	Ensaio fermentativo	Bolas	Teor de lípidos (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i>	1°	8BP	50,15 ± 1,07
		2BM	49,29 ± 1,61
	2°	2BM	12,25 ± 0,39

Comparando os três estados da biomassa liofilizada (sem pré-tratamento, com pré-tratamento por hidrólise ácida e por moinho de bolas 2BM) sujeita a extração (Figura 3.1), comprova-se a necessidade de utilização de um pré-tratamento de rutura para uma extração mais eficaz e, consequentemente, uma melhor viabilidade do processo de produção de biodiesel a partir desta matéria-prima. Conclui-se, ainda, que o processo de rutura em moinho de bolas permite extrair a totalidade da fração lipídica presente na biomassa microalgal, uma vez que os resultados são semelhantes aos obtidos para a biomassa sujeita a hidrólise ácida.

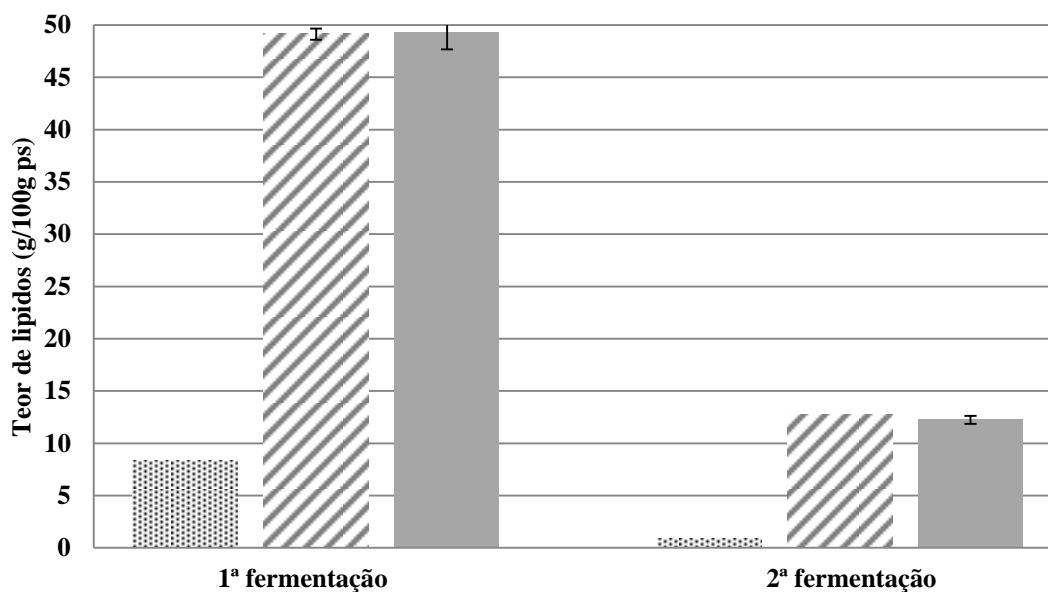


Fig. 3.1 - Teor de lípidos da biomassa liofilizada de *C. protothecoides*, obtida de ambos os ensaios fermentativos, em função do pré-tratamento: (■) moinho de bolas utilizando 2 bolas de 10mm de diâmetro (2 bolas BM), (▨) hidrólise ácida e (▤) sem pré-tratamento.

De modo a contabilizar o teor de lípidos totais presente na biomassa microalgal, e não apenas a fração lipídica saponificável extraída com hexano, utilizou-se etanol como solvente. Este difere do hexano pela sua capacidade de extrair não só os lípidos apolares como também os lípidos polares.

O método de pré-tratamento mecânico foi escolhido com base nos resultados obtidos na extração anterior (com hexano), sendo que a escolha recaiu sobre a opção moinho de bolas com 2 bolas médias (2BM).

Os resultados (Tabela 3.5) demonstram que a quantidade extraída com etanol foi superior à extraída com hexano, o que já era expectável e confirma a presença de lípidos polares na biomassa, ainda que em quantidade bastante inferior aos apolares.

Tabela 3.5 - Teor de lípidos totais após pré-tratamento físico com moinho de bolas (2BM) para o primeiro ensaio fermentativo. O resultado da extração com hexano corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Solvente	Teor de lípidos (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i> [1º ensaio]	Hexano	49,29 ± 1,61
	Etanol	58,34

3.2.2 Teor de açúcares totais

Para a determinação do teor total de açúcares presentes na biomassa foi necessário recorrer, novamente, a uma hidrólise. Em trabalhos anteriormente realizados no LNEG, com recurso a hidrólises com diferentes procedimentos, verificou-se que uma hidrólise ácida quantitativa (Hoebler *et al.*, 1989), mais agressiva e normalmente utilizada para material lenhocelulósico, apresenta a vantagem de garantir a hidrólise total da biomassa e, assim, uma extração mais eficaz dos açúcares presentes na biomassa microalgal (Marques, 2013).

Após a escolha e aplicação do pré-tratamento seguiu-se a determinação colorimétrica do teor de açúcares totais. O método, aplicado de acordo com o proposto por Dubois *et al.* (1956), permitiu obter a reta de calibração para a resposta colorimétrica, função da quantidade de glucose presente nas amostras (Anexo III).

Tabela 3.6 - Teor de açúcares totais após hidrólise ácida quantitativa para biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo. O resultado corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Teor de açúcares (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i> [1º ensaio]	17,47 ± 4,06

Assim, a biomassa microalgal tem na sua composição 17,47 g de açúcares/100g ps, encontrando-se dentro da mesma ordem de valores dos 15,43% registados por Miao e Wu (2006).

Este resultado, em conjunto com o obtido na extração da fração lipídica, demonstra que a *Chlorella protothecoides* heterotrófica é bastante mais rica em lípidos do que em açúcares, sendo por esse motivo mais adequada à produção de biodiesel do que à produção de bioetanol.

3.2.3 Teor de proteína e minerais

O teor de proteína foi determinado segundo o método de Kjeldahl, descrito em 2.5.4.1.3. O resultado obtido (Tabela 3.7) é inferior ao valor de 10.28% publicado por Miao e Wu (2006).

No entanto, o método de quantificação de proteína no estudo de Miao e Wu (2006) poderá ter sido diferente, causando a divergência de resultados.

A quantidade de minerais presentes na biomassa microalgal foi de 6,92 g/100g ps (Tabela 3.7), valor ligeiramente mais elevado que os publicados na literatura, nomeadamente por Miao e Wu (2006), para a *Chlorella protothecoides* heterotrófica (5,93%).

Tabela 3.7 - Teores de proteína e minerais da biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo. O resultado para o teor de minerais corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Teor de proteína (g/100g ps)	Teor de minerais (g/100g ps)
<i>Chlorella protothecoides</i> [1º ensaio]	6,45	6,92 ± 0,52

Com base na análise dos vários constituintes da biomassa da microalga *Chlorella protothecoides* é possível fazer uma caracterização da biomassa da mesma (Figura 3.2).

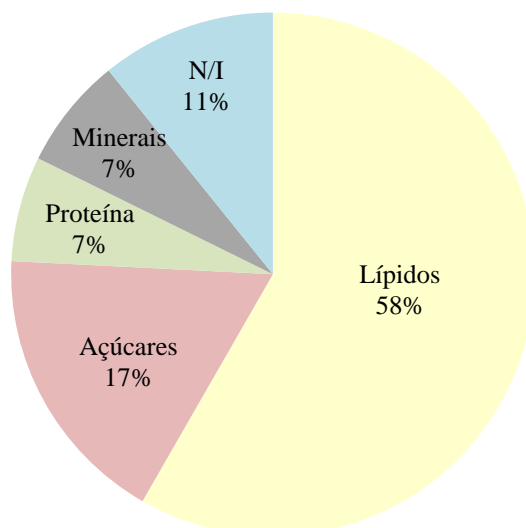


Fig. 3.2 - Composição da microalga *Chlorella protothecoides*, proveniente do primeiro ensaio fermentativo (N/I – não identificado).

Conforme se pode observar na figura 3.2, à semelhança do ocorrido noutros estudos (Xu *et al.*, 2006), não foi possível a caracterização total da biomassa microalgal, o que pode estar associado à incerteza dos resultados em alguns métodos. Por exemplo, no caso da determinação do teor de lípidos poderá haver uma contabilização por defeito dos mesmos pelo facto de não se terem testado diferentes solventes, não se sabendo assim se seria possível obter uma melhor recuperação dos lípidos presentes.

Atendendo aos resultados obtidos em termos de composição pode-se afirmar que a biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica é propícia à produção de biodiesel já que, o teor de lípidos extraídos da biomassa, quando comparados com os registados na literatura (Picardo *et al.*, 2013), apresentam valores bastante revelantes no panorama de microalgas estudadas para o efeito.

3.3 Caracterização da fração lipídica

3.3.1 Índice de acidez

A fração lipídica extraída da biomassa liofilizada, obtida no 1º ensaio de fermentação, foi caracterizada em termos do índice de acidez. A importância da determinação deste parâmetro prende-se com a escolha do tipo de catalisador a utilizar na reação de transesterificação, uma vez que, como já referido em 2.5.4.2.1, este tem efeitos diretos no rendimento mássico final do processo de conversão.

O resultado obtido de 3,96 mgKOH/g (Tabela 3.8) encontra-se acima dos 2 mgKOH/g de referência recomendado para utilização eficiente de uma catálise básica (Lam *et al.*, 2010; Atadashi *et al.*, 2012). Acima deste valor, a utilização de um catalisador alcalino pode conduzir a uma reação de saponificação dos ácidos gordos livres presentes, levando a uma diminuição do rendimento mássico do processo.

Tabela 3.8 - Índice de acidez para o primeiro ensaio fermentativo. O resultado corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Índice de acidez (mgKOH/g)
<i>Chlorella protothecoides</i> [1º ensaio]	3,96 ± 0,12

Embora o valor de índice de acidez da fração lipídica (3,96 mgKOH/g) seja bastante inferior ao obtido por Li *et al.* (2007) - (8,47 mgKOH/g) - mantém-se a necessidade de uma esterificação/transesterificação por catálise ácida ou transesterificação com catalisador básico precedida de um pré-tratamento de esterificação ácida de modo a reduzir o teor de ácidos gordos livres, pela sua conversão em ésteres.

3.3.2 Índice de iodo

A fração lipídica extraída da biomassa microalgal obtida da 1ª fermentação foi também caracterizada em termos de índice de iodo. Como já mencionado, este parâmetro mede o grau de insaturação da matéria-prima e a importância da sua determinação prende-se com a possibilidade de oxidação, formação de depósitos ou deterioração da lubricidade por parte do biodiesel dela obtido (Francisco *et al.*, 2010).

Como se pode observar na tabela 3.9, o resultado obtido para o índice de iodo determinado quer experimentalmente quer com base na composição em ácidos gordos (Tabela 3.10), é inferior a 120gI₂/100g, valor especificado na norma de qualidade do biodiesel (EN 14214) para este parâmetro.

Tabela 3.9 - Índices de iodo para o primeiro ensaio fermentativo. O valor do índice de iodo teórico corresponde à média de duas análises independentes.

	Índice de iodo _{experimental} (gI ₂ /100g)	Índice de iodo _{teórico} (gI ₂ /100g)
<i>Chlorella protothecoides</i> [1º ensaio]	85,22	91,54 ± 0,10

3.3.3 Perfil e composição em ácidos gordos

As frações lipídicas foram também caracterizadas em termos de composição em ácidos gordos através da análise cromatográfica (2.5.4.2.3.A) das amostras transesterificadas segundo o método descrito em 2.5.3. A técnica foi aplicada à fração lipídica obtida pela extração soxhlet (secção 2.5.4.1.1.B), após moagem em moinho de bolas (secção 2.5.2) e diretamente na biomassa liofilizada, ambas provenientes do primeiro ensaio fermentativo. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 3.8.

Tabela 3.10 - Composição em ácidos gordos das frações lipídicas presentes na biomassa de *Chlorella protothecoides*, proveniente do primeiro ensaio fermentativo.

Ácido gordo	Biomassa liofilizada	Fração lipídica extraída com hexano
	% (m/m)	% (m/m)
Láurico (C12:0)	0,03	0,03
Mirístico (C14:0)	1,56	1,54
Palmítico (C16:0)	14,47	13,83
Palmitoleico (C16:1)	0,77	0,78
Esteárico (C18:0)	1,44	1,50
Oleico (C18:1)	57,06	57,98
Linoleico (C18:2)	22,61	21,81
Linolénico (C18:3)	1,23	1,18
Araquídio (C20:0)	0,15	0,16
Beénico (C22:0)	Não detetado	0,04
Saturados	17,65	17,10
Insaturados	81,67	81,75
Monoinsaturados	57,83	58,76
Ésteres (g/100g fracção lipídica)	-	95,76
Ésteres (g/100g biomassa)	49,95	-

Comparando as duas análises efetuadas é perceptível a semelhança, tanto a nível de ácidos gordos presentes como das suas quantidades, o que já era expectável, dado serem duas amostras que, apesar de se encontrarem em estados diferentes, eram provenientes da mesma biomassa microalgal.

Este ensaio permitiu validar a utilização do método de trifluoreto de boro diretamente na biomassa liofilizada. Ambos os perfis lipídicos são dominados pela presença dos ácidos oleico (C18:1) – o mais significativo, com 57,06% para a biomassa liofilizada e 57,98% para o óleo - linoleico (C18:2), com valores a rondar os 22% para ambas as amostras e palmítico (C16:0), de novo com ambos os valores semelhantes e a rondar os 14%. Segundo esta análise o biodiesel produzido a partir da *Chlorella protothecoides* heterotrófica será composto maioritariamente por ácidos gordos insaturados (82%).

Ao estabelecer a comparação com estudos anteriores verifica-se uma conformidade de resultados: no estudo levado a cabo por Xu *et al.* (2006) para um fermentador de 5L também o conteúdo de ácido oleico é predominante (60,84%), seguido do ácido linoleico (17,28%) e do palmítico (12,94%), com os restantes ésteres presentes em quantidades pouco significativas; Li *et al.* (2007) demonstram que com o aumento do volume de cultura de 5L para 750L e 11000L estes resultados se alteram ligeiramente, observando-se um aumento das quantidades dos ácidos oleico e linoleico – o primeiro na ordem dos 5% (65,75%), o segundo cerca de 1% (18,33%) – enquanto que a presença de ácido palmítico sofre um decréscimo de cerca de 2% (10,1%).

Estas conclusões são fortificadas por Chen e Walker (2012), que apresentam uma composição em FAMES bastante semelhante, verificando-se igualmente a predominância do ácido oleico (59,39%) e os elevados conteúdos de ácido linoleico (19,08%) e ácido palmítico (11,67%).

No que diz respeito ao enquadramento da qualidade do biodiesel, obtido a partir da fração lipídica da *Chlorella protothecoides*, em termos dos limites estabelecidos pela norma EN 14214 para o teor de éster metílico de ácido linoléico (12%) e ácidos gordos polinsaturados (≥ 4 duplas ligações) (1%), estes requisitos são cumpridos.

Como se pode ver na Tabela 3.10, a conversão em ésteres mostra-se bastante favorável para a posterior produção de biodiesel, sendo que na análise efetuada diretamente na fração lipídica ronda os 96%, indiciando uma conversão praticamente total em ésteres. Este valor corresponde à matéria saponificável presente na fração lipídica extraída com hexano, resultado corroborado com o obtido na análise da conversão realizada diretamente na biomassa liofilizada, já que os cerca de 50g ésteres/100g de biomassa obtidos neste caso correspondem a uma conversão completa da fração lipídica (50,15 g/100g biomassa, Tabela 3.4).

3.3.4 Índice de saponificação, índice de cetano e CFPP

Para uma caracterização mais completa da fração lipídica e uma melhor perceção da qualidade do biodiesel dela obtido calcularam-se, teoricamente, os índices de saponificação e de cetano e o CFPP. Os dados tiveram como base o perfil e composição em ácidos gordos (Tabela 3.10), e os resultados foram obtidos em função de equações empíricas anteriormente utilizadas para estimar a qualidade de óleos, cuja exatidão foi testada tanto para óleos vegetais como microalgais, demonstrando que a estrutura molecular dos ácidos gordos afeta diretamente a qualidade do biodiesel produzido (Nascimento *et al.*, 2013).

A. Índice de saponificação

O índice de saponificação corresponde à massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, necessária para saponificar os ácidos gordos e glicéridos contidos num grama de amostra de óleo ou gordura.

$$IS (mg KOH / g amostra) = \sum \left((560 \times \% \frac{m}{m_{FA}}) / M_{FA} \right) \quad (13)$$

na qual $\%m/m_{FA}$ corresponde à percentagem de cada ácido gordo da fração lipídica microalgal e M_{FA} à sua massa molecular (g/mol).

Para a amostra estudada o índice de saponificação é de 189,87 mgKOH/g amostra, encontrando-se este resultado em concordância com estudos anteriores para a microalga em questão (Li *et al.*, 2007).

B. Índice de Cetano

O índice de cetano, trata-se de um dos principais indicadores da qualidade de um combustível na esfera dos motores *diesel*, indicando a sua qualidade de ignição. Conceptualmente é similar ao índice de octano utilizado para a gasolina sendo que, de forma geral, um composto que possui um baixo índice de cetano tende a ter um elevado índice de octano e vice-versa. Este parâmetro está relacionado com o tempo decorrido entre a injeção do combustível no cilindro e o início da ignição, sendo que quanto menor for este tempo maior será o seu valor (Knothe, 2005), e é dado pela expressão:

$$IC = 46,3 + (5,458/IS) - (0,225 \times II) \quad (14)$$

na qual *IS* e *II* correspondem, respetivamente, ao Índice de Saponificação (mgKOH/g amostra) e Índice de Iodo (gI₂/100g) calculados anteriormente.

No caso da amostra estudada o resultado obtido é de 54,46. Ainda que os diferentes métodos de extração do óleo e processos de conversão possam provocar algumas variações na viscosidade do biodiesel obtido e, conseqüentemente, nos valores do índice de cetano (Nascimento *et al.*, 2013), o resultado obtido encontra-se dentro dos parâmetros de qualidade da norma EN14214, já que é superior a 51 (Islam *et al.*, 2013).

C. CFPP

Um dos principais problemas associados à utilização de biodiesel, quando comparado ao gasóleo, é a *performance* a baixas temperaturas. Tal deve-se ao aumento da densidade do mesmo, espessando e agravando do fluxo do combustível com a diminuição da temperatura causando a formação de pequenos cristais que podem conduzir a um entupimento parcial ou total do filtro aquando da permanência a baixas temperaturas durante um longo período de tempo - podendo originar o bloqueio total do sistema de distribuição do combustível devido à solidificação do mesmo (Montero e Stoytcheva, 2011). Um dos parâmetros que mede as propriedades a frio do biodiesel é o CFPP que define o limite de filtrabilidade do combustível (Meher *et al.*, 2006), caracterizando-se como a temperatura mínima à qual 20mL de combustível passam por determinado filtro em 60s. A determinação deste parâmetro pode ser feita teoricamente com base na expressão:

$$CFPP \text{ (}^\circ\text{C)} = (3,1417 \times LCSF) - 16,477 \quad (15)$$

na qual *LCSF* corresponde ao fator de multiplicação dos ácidos gordos de cadeia longa e se calcula através de:

$$LCSF = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1 \times C20) + (1,5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (16)$$

O resultado obtido para o CFPP de -9,07°C demonstra o bom desempenho do biodiesel no que às propriedades a frio diz respeito já que proporciona um amplo intervalo de temperaturas para a sua utilização. Considerando que, segundo o reportado por Mittelbach e Remschmidt (Francisco *et al.*, 2010), o ácido palmítico e o ácido esteárico quando arrefecidos precipitam primeiramente, constituindo assim a principal causa do entupimento dos filtros, no presente caso, o conteúdo em ácido palmítico do biodiesel proveniente de *Chlorella protothecoides* heterotrófica (Tabela 3.10), desaconselha a sua utilização em regiões cujas temperaturas desçam abaixo da obtida para o CFPP.

Não existe especificação na norma europeia quanto ao limite do CFPP, cabendo essa decisão ao país em questão. Em Portugal, esta refere-se à utilização de biodiesel a 100% e consta de um anexo nacional à norma NP EN 14214 (Tabela 3.11).

Tabela 3.11 – Classes e CFPP correspondente, para o biodiesel, em Portugal.

Período	Classes	CFPP (°C)
1 de Abril a 14 de Outubro	B	0
1 de Março a 31 de Março e de 15 de Outubro a 30 de Novembro	C	-5
1 de Dezembro a 28/29 de Fevereiro	D	-10

O valor obtido para o CFPP ($> -9^{\circ}\text{C}$) demonstra que, em Portugal, o biodiesel proveniente da microalga *Chlorella protothecoides* poderia ser utilizado nos períodos de Abril a meados de Outubro, no mês de Março e de meados de Outubro até ao fim de Novembro. Dado ter um valor semelhante ao do período de Inverno (-10°C), eventualmente poderia também ser utilizado no seu decorrer. No entanto, ter-se-ia de ter em atenção que daí poderiam advir alguns problemas na sua utilização.

3.4 Transesterificação direta

Como alternativa ao processo convencional de extração da fração lipídica para posterior conversão desta em biodiesel testou-se qual a capacidade de conversão através de transesterificação direta, também denominada de transesterificação *in situ*. Neste caso, não é necessária uma extração prévia da fração lipídica, sendo que a biomassa reage diretamente com uma mistura de um álcool e um catalisador, eliminando perdas mássicas, económicas e energéticas associadas ao processo de extração.

A capacidade de diferentes álcoois de extrair e converter a fração lipídica tem sido objeto de diversos estudos: em Whalen *et al.*, 2011, de entre os vários álcoois estudados (metanol, etanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol) o metanol apresenta a menor eficácia; no entanto, quando na presença de 1,8% (v/v) de H_2SO_4 como catalisador o tipo de álcool utilizado deixa de ter um efeito significativo na taxa de conversão, passando o metanol de pior a melhor opção por ter um custo mais baixo; noutro estudo, referente à transesterificação *in situ* da biomassa da microalga *S. obliquus*, verifica-se que, entre os diversos solventes e combinações de solventes testadas, a combinação de metanol e clorofórmio obtém os melhores resultados à temperatura ambiente (Mandal *et al.*, 2013).

No presente trabalho, para a *Chlorella protothecoides* heterotrófica, a escolha dos reagentes recaiu sobre o metanol como álcool, e o ácido sulfúrico como catalisador ácido, tendo as quantidades utilizadas de cada um tido por base estudos anteriormente realizados no LNEG que demonstraram que 4mL de metanol e 1.2% v/v de ácido sulfúrico correspondiam às melhores condições para conversão (Gaivão, 2013).

Existem diversos parâmetros determinantes para o sucesso da conversão, sendo que para este estudo a análise passou pela avaliação do impacto no resultado final que a variação do tempo de reação, a existência de pré-tratamento de rutura celular, a humidade presente na biomassa e a quantidade de catalisador podem ter.

3.4.1 Efeito do tempo de reação

O estudo do efeito do tempo na conversão da fração lipídica presente na biomassa microalgal mostra que o processo decorre mais rapidamente nas primeiras 8 horas de reação, sendo que nesse ponto cerca de 70% da fração saponificável já se encontra sob a forma de ésteres (Figura 3.3). Ao fim de 18h a conversão é de 95%, considerando-se assim este o tempo ideal para a reação, já que não se tendo verificado uma estabilização da taxa de conversão este proporciona uma margem que garante a conversão total dos lípidos. Por esse motivo, foi o tempo de incubação estabelecido para os ensaios posteriores.

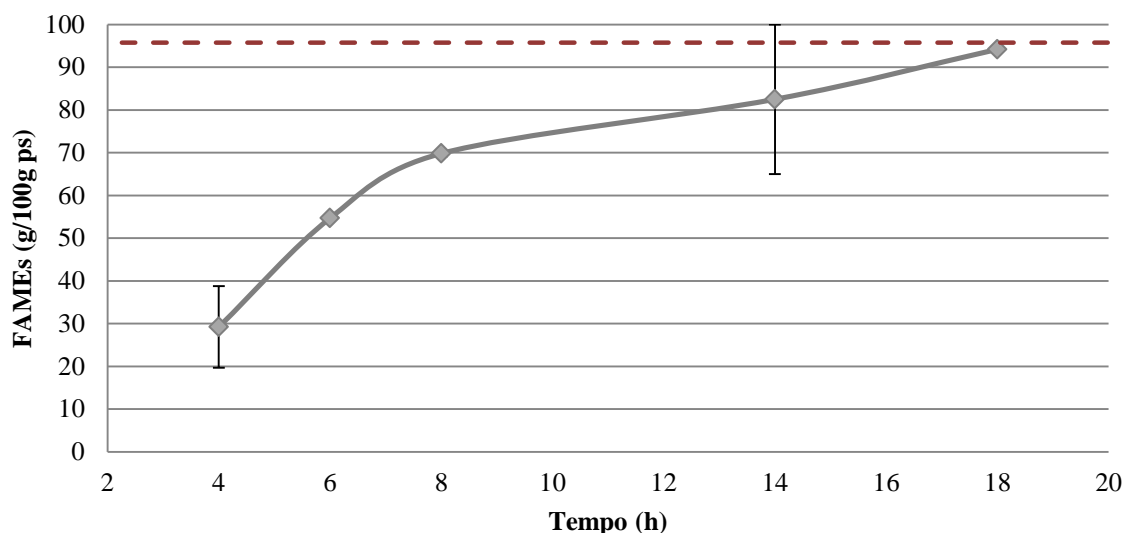


Fig. 3.3 – Influência do tempo na conversão em ésteres metílicos da fração lipídica presente na biomassa liofilizada (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H₂SO₄; 50°C; 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.

3.4.2 Efeito do pré-tratamento de rutura celular

A análise do efeito do pré-tratamento de rutura celular da biomassa microalgal na conversão em ésteres passou, de novo, pela utilização do moinho de bolas, nas condições já selecionadas (secção 2.5.4.1.1.B). Como se pode observar na figura 3.4, no caso da biomassa sujeita a pré-tratamento, não só é convertida uma maior parte da fração saponificável ao fim de 4h (cerca de 40%, contra os 29% da biomassa apenas liofilizada) como também esta superioridade é visível ao longo do tempo.

Às 18h de reação, a percentagem de ésteres convertidos é idêntica para a biomassa sujeita ou não a pré-tratamento de rutura celular, pelo que, para este tempo, a moagem da biomassa é desnecessária conseguindo-se, assim, não só uma poupança energética e, conseqüentemente, económica, como também uma menor perda de matéria-prima e de tempo despendido no processo global.

No entanto, verifica-se que o equilíbrio da reação para a biomassa moída é atingido ao fim de 14h, pelo que num posterior processo de produção deve ser analisada a rentabilidade de ambos os processos (14 horas com biomassa liofilizada moída vs. 18h com biomassa apenas liofilizada) de forma a optar por aquele que proporcione mais benefícios do ponto de vista técnico-económico.

Neste caso em concreto, por se tratar de um estudo à escala laboratorial, optou-se por evitar as perdas associadas ao processo de moagem e manter as 18h que asseguram a totalidade da conversão.

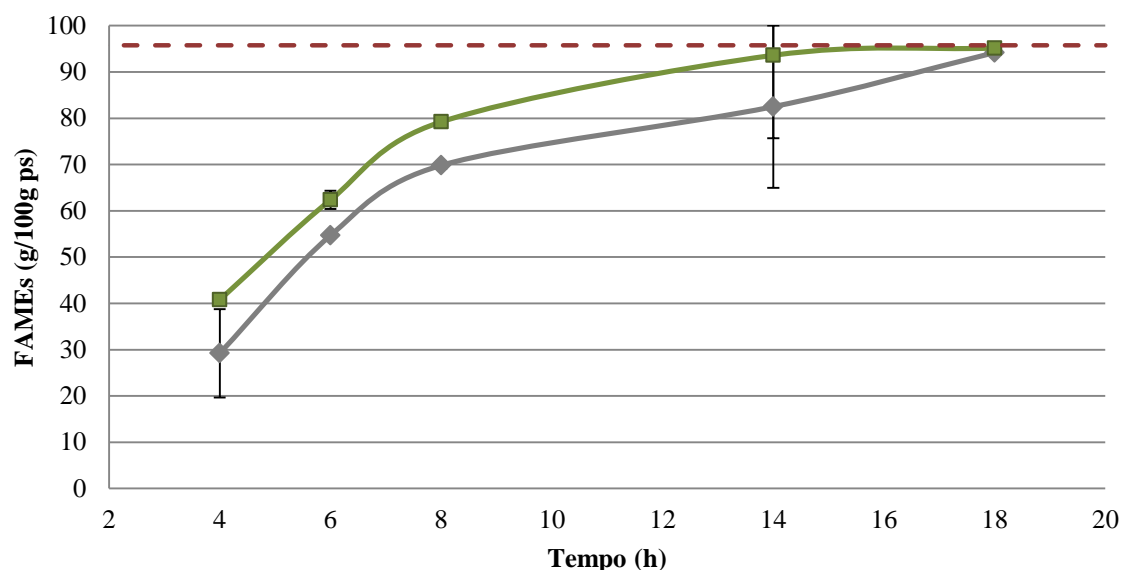


Fig. 3.4 - Influência do pré-tratamento mecânico de ruptura celular na conversão em ésteres metílicos para diferentes períodos de incubação: (◆) biomassa liofilizada, (■) biomassa moída com moinho de bolas (2BM) (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H₂SO₄; 50°C; 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.

3.4.3 Efeito da humidade

A importância deste estudo prende-se com a possibilidade de, sendo o processo de transesterificação direta eficaz para determinados teores de humidade da biomassa microalgal, evitar os elevados custos de secagem da biomassa, recorrendo a outros processos capazes de atingir os resultados pretendidos de forma menos dispendiosa, com vista à melhoria da eficiência energética e económica do processo de produção de biodiesel.

Uma vez que a biomassa disponível da primeira fermentação se encontrava liofilizada, para testar o efeito da humidade na conversão em ésteres, por transesterificação direta, foi necessário hidratar a biomassa, de acordo com a percentagem de humidade pretendida. Para tentar estimar qual a humidade, prévia ao processo de liofilização, presente nesta biomassa, recorreu-se à determinação deste parâmetro na biomassa congelada proveniente da segunda fermentação, uma vez que o processo de colheita foi o mesmo em ambos os casos. O teor de humidade obtido (Tabela 3.12) foi bastante elevado, como é usual neste tipo de processos.

Tabela 3.12 - Teor de humidade da biomassa microalgal proveniente do segundo ensaio fermentativo. O resultado obtido corresponde à média de dois ensaios independentes.

	Teor de humidade (%)
<i>Chlorella protothecoides</i> [2º ensaio]	89,43 ± 0,24

Assim, considerando como teor de humidade máximo na biomassa o valor determinado (~90%), foram realizados ensaios com diferentes quantidades de água, correspondentes aos teores de humidade a serem estudados, de modo a avaliar qual o impacto que este parâmetro teria na reação de transesterificação e, conseqüentemente, no teor de ésteres (Tabela 3.13, Figura 3.5).

Tabela 3.13 - Massa de água adicionada para o teor de humidade pretendido.

Teor de humidade [%]	Massa de água [mg]	Massa de amostra [mg]
20	25	100
30	43	100
45	82	100
60	150	100
70	233	100
90	900	100

Analisando os resultados obtidos (Figura 3.5) é notória a constante diminuição da conversão em ésteres à medida que aumenta o teor de humidade na biomassa microalgal. Para baixas percentagens de humidade (20%-30%) o processo revela-se bastante eficaz, sendo a conversão em ésteres praticamente total. No entanto, a partir dos 30% de humidade, inicia-se um declínio, bastante acentuado, na capacidade de conversão, sendo que para 60% apenas cerca de metade da fração lipídica é convertida. Destaca-se também o fraco resultado para 90% de humidade, com apenas 6,62% de conversão em ésteres, comprovando assim a ineficácia do processo de transesterificação nas condições estudadas. De salientar que, neste estudo, foram mantidas as quantidades de metanol (4mL) e de catalisador (1,2 %v/v H₂SO₄) adicionadas aos sistemas reacionais, pelo que o comportamento observado poderá estar relacionada não só com a presença de água mas também com a diminuição da concentração do álcool e do catalisador, associada ao aumento da fase aquosa.

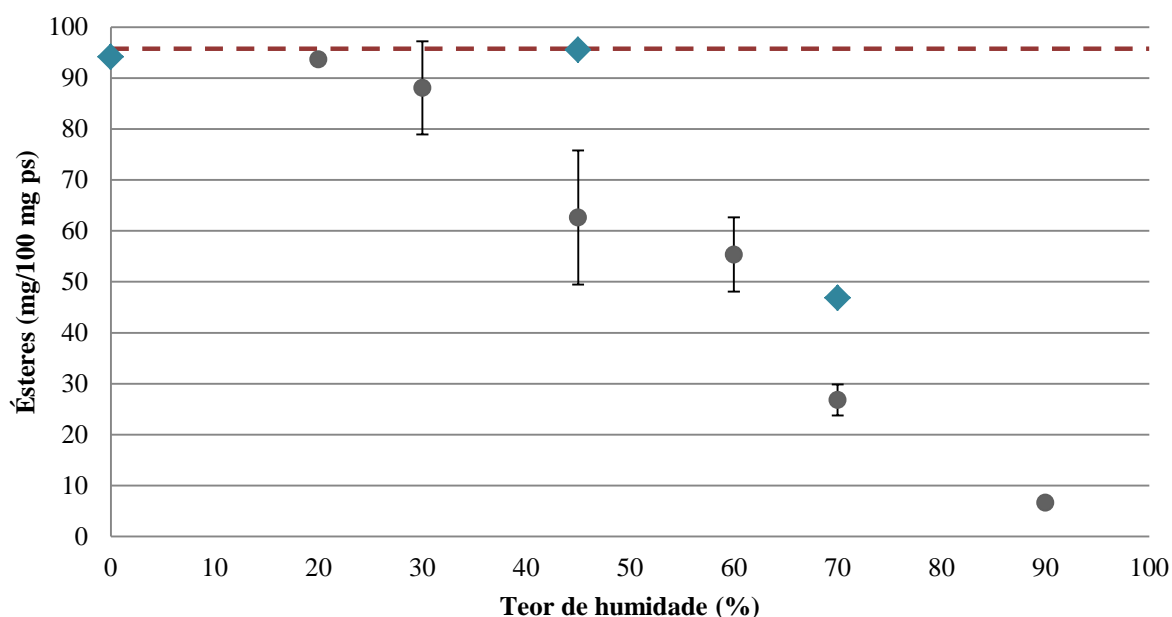


Fig. 3.5 - Influência do teor de humidade da biomassa proveniente do primeiro ensaio fermentativo na conversão em ésteres metílicos após um período de incubação de 18 horas, na presença de 4mL de metanol e (●) 1,2 %v/v de catalisador, em relação ao metanol; (◆) mesma razão catalisador/fase aquosa (condições: 50°C, 200rpm). Os resultados correspondem à média de dois ensaios independentes.

Assim, de forma a avaliar a influência da quantidade de catalisador na reação de transesterificação, na presença de diferentes teores de humidade, realizaram-se dois ensaios, para 45% e 70% de humidade, nos quais se manteve constante, relativamente ao volume de fase aquosa (contendo 4mL de metanol), a quantidade de ácido sulfúrico. Como se pode ver na figura 3.5, é notória a superioridade de ésteres

obtidos para ambos os casos, representando um aumento de 62,63 g/100g ps para 95,55 g/100g ps de ésteres para 45% de humidade e um aumento de 26,82 g/100g ps para 46,88 g/100g ps para 70% de humidade. O ainda baixo teor de ésteres para 70% da humidade sugere a realização de novos ensaios com uma quantidade mais elevada de catalisador ou mesmo mais metanol, para se conseguir atingir as conversões pretendidas, avaliando simultaneamente o efeito da humidade.

No âmbito deste estudo foi, ainda, realizada uma comparação dos resultados obtidos utilizando biomassa liofilizada sujeita a posterior hidratação e biomassa húmida (sem ter sido sujeita a qualquer pré-tratamento), uma vez que ao humedecer a biomassa liofilizada a água poderá não penetrar nas células da microalga, ficando apenas uma humidade mais superficial ao invés de uma humidade também a nível molecular. Assim, realizaram-se ensaios de transesterificação direta na biomassa proveniente da segunda fermentação, recorrendo-se a uma amostra de microalga que já se encontrava liofilizada, e que foi posteriormente humedecida (para um teor de humidade de 89%), e a uma amostra que foi congelada húmida.

Como é possível verificar pela figura 3.6 existe uma enorme discrepância entre os resultados obtidos nos ensaios realizados com as diferentes biomassas, sendo que a conversão em ésteres para a biomassa liofilizada com posterior adição de água é cerca de treze vezes superior à obtida para a biomassa húmida. Tal leva a concluir que é necessário um processo de secagem para a obtenção de melhores resultados a nível de conversão.

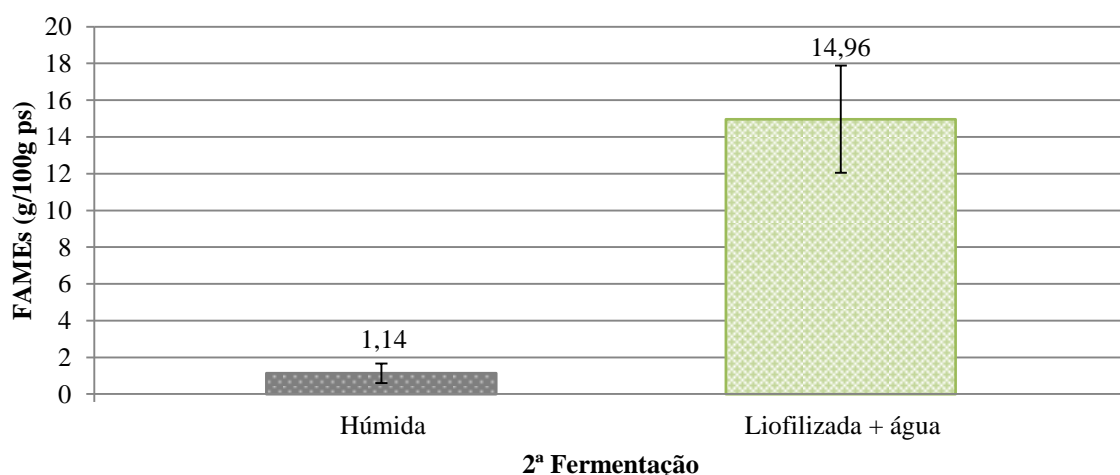


Fig. 3.6 - Comparação, para a biomassa proveniente do segundo ensaio fermentativo, da conversão em ésteres metílicos utilizando (■) biomassa húmida (com 89% de humidade) e (■) biomassa liofilizada com posterior adição de água (para 89% de humidade) (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H₂SO₄; 50°C; 200rpm).

Ainda na tentativa de melhor avaliar o efeito da humidade da biomassa microalgal na reação de transesterificação, deixou-se biomassa liofilizada da primeira fermentação a hidratar em água, durante 24 horas, sob agitação, de forma a permitir a penetração das moléculas de água na estrutura celular da microalga. Após a hidratação e uma curta centrifugação (2 minutos, 10.000 rpm) determinou-se um teor de humidade na biomassa de 36,6%.

A reação de transesterificação permitiu obter um teor de ésteres de 36,4g/100g biomassa, valor que se afasta bastante do comportamento verificado com a adição de água à biomassa liofilizada (sem tempo de hidratação) (Figura 3.5), com uma quebra da taxa de conversão para cerca de metade.

Comprova-se assim a inviabilidade de aplicação deste processo de transesterificação à biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica na presença de humidade, já reportada por Ehimen *et al.*, 2010, o qual verificou o efeito negativo da presença de água, com uma redução da taxa de conversão de lípidos de 81,7% com 0,7% de humidade para 19,5% de ésteres com 73% de humidade.

Existem diversas formas de contornar este entrave à eficácia do processo, podendo estas advir de alterações aos parâmetros reacionais – através de um aumento do volume de metanol ou da proporção de catalisador (secção 3.5.4), de utilização de extração supercrítica (Hidalgo *et. al.*, 2013) – ou da inserção de um processo prévio de secagem para a obtenção de melhores taxas de conversão. Este último apresenta mais custos inerentes que poderão ser reduzidos substituindo a liofilização por outras formas de secagem menos dispendiosas (ex: secador solar).

3.4.4 Efeito da temperatura

Estudos anteriores, tanto a nível da transesterificação convencional como da transesterificação *in situ*, demonstram que aumentando a temperatura da reação o tempo necessário para atingir a taxa máxima de conversão de lípidos diminui. Este efeito foi maioritariamente verificado em transesterificações com catálise ácida, podendo ser atribuído a um aumento da miscibilidade entre as diferentes espécies em reação. Por outro lado, temperaturas altas podem provocar uma degradação da fração lipídica (Hidalgo *et al.*, 2013).

De forma a testar se um eventual aumento da temperatura teria um impacto positivo no tempo de incubação necessário a uma conversão eficaz em ésteres metílicos, realizou-se de novo todo o processo de transesterificação com as condições reacionais inicialmente fixadas (secção 3.5), aumentando a temperatura de incubação de 50°C para 80°C.

O estudo realizou-se para a biomassa proveniente de ambas as fermentações: a primeira, liofilizada, testada para 6h e 18h de incubação; a segunda, apenas testada para 18h de incubação (Figura 3.9).

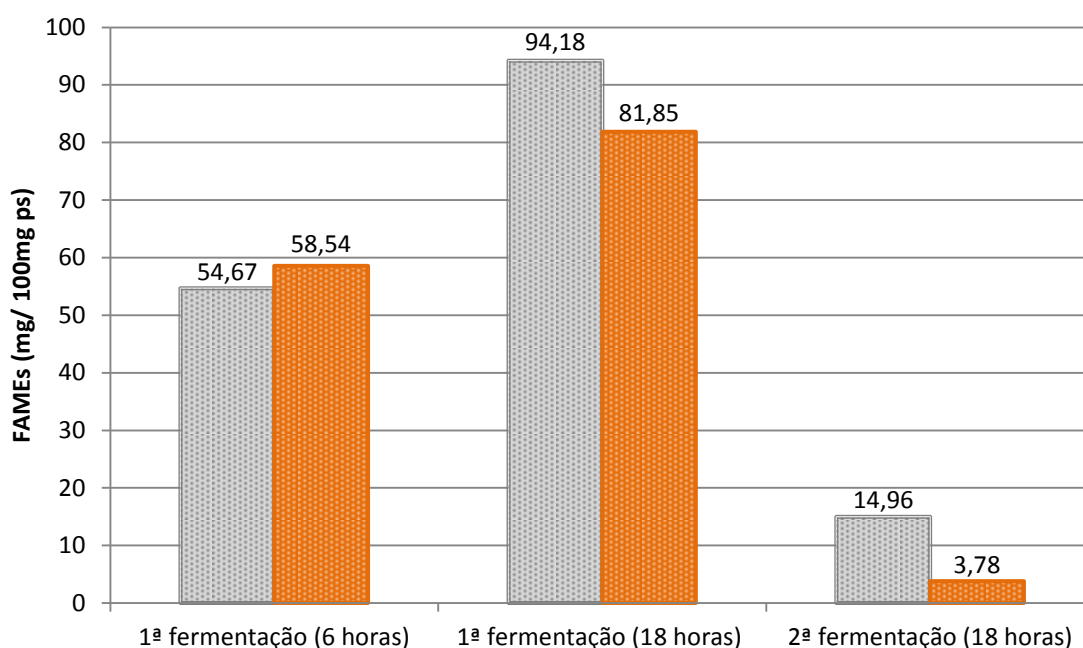


Fig. 3.7 - Influência da temperatura ((■) 50°C, (■) 80°C) na conversão em ésteres metílicos (condições: 4mL metanol; 1,2% v/v H₂SO₄; 200rpm).

Os resultados obtidos apresentam algumas incongruências já que, ao contrário do reportado anteriormente na literatura, o aumento de temperatura apenas se demonstra benéfico na conversão dos ésteres metílicos da biomassa proveniente da 1ª fermentação para um tempo de reação de 6 horas – observando-se um aumento na ordem dos 4g/100g ps. Por outro lado, quando decorridas as 18 horas consideradas ideais para uma conversão total (secção 3.5.1), verifica-se uma diminuição no FAME produzido de cerca de 12g/100g ps, resultado que é corroborado pelo também decréscimo bastante acentuado (de 14,96 g/100g ps para 3,78 g/100g ps) para a conversão da biomassa microalgal proveniente da segunda fermentação.

Em estudos anteriores (Whalen *et al.*, 2011), para outra microalga, a conversão aumenta significativamente com o aumento da temperatura, atingindo o seu pico aos 80°C, para um tempo de reação bastante inferior (10 e 20 minutos).

Esta discrepância de resultados pode ser explicada pela necessidade de utilização de uma fonte de calor/agitação diferente da utilizada aquando dos restantes ensaios experimentais, já que a tentativa de reprodução das condições anteriormente usadas pode não ter sido bem sucedida. Também o tipo de reator a utilizar poderá ter de ser diferente, uma vez que a temperatura mais elevada testada (80°C) é superior ao ponto de ebulição do metanol (60°C), o que pode ter originado condições reacionais menos propícias à conversão dos glicéridos em ésteres metílicos.

4. Aspectos energéticos e económicos

A implementação de qualquer tecnologia de produção de energia encontra-se dependente da sua viabilidade em termos económicos e de eficiência de conversão energética (razão entre a energia investida e produzida). A produção de biodiesel a partir de microalgas figura, atualmente, um potencial método de obtenção de biocombustíveis de forma limpa, representando uma alternativa bastante vantajosa aos métodos de produção convencionais. No entanto, os constrangimentos ainda existentes a nível de processos de produção, colheita e conversão da biomassa microalgal em biodiesel (secção 1.4), têm sido um impedimento à implementação, já que tornam o projeto economicamente pouco viável. No seguimento desta ideia, torna-se perceptível que a possibilidade de utilização futura dos métodos de conversão propostos neste estudo está também dependente das suas eficácias a nível energético e económico, resultando num estudo preliminar do desempenho da conversão da biomassa microalgal de *Chlorella protothecoides* heterotrófica a estes níveis.

Para determinar qual a energia proveniente do biodiesel final obtido procedeu-se ao cálculo do poder calorífico superior (PCS), recorrendo à informação obtida através do perfil e composição em ácidos gordos (secção 3.3.3). Este foi determinado através da seguinte expressão (Islam *et al.*, 2013):

$$PCS = \sum \left((46,19 - \frac{1794}{M_{FAME}} - 0,21 \times N_{FAME}) \times \%m/m_{FAME} \right) = 39,25 MJ/Kg \quad (17)$$

na qual M corresponde ao peso molecular do éster metílico (g/mol), N ao número de duplas ligações do éster metílico e %m/m_{FAME} à percentagem de cada éster metílico da fração lipídica microalgal.

Para determinar o poder calorífico inferior (PCI) foi necessário ter em conta a massa de água produzida na reação de combustão. Para tal, levou-se em consideração as características e fórmulas moleculares dos ésteres metílicos. Foi considerado o caso mais negativo e calculado através de aproximação por defeito, no qual se considerou que todos os ésteres são saturados. Tal deve-se ao facto de, neste caso, a quantidade de água produzida ser superior, traduzindo-se num decréscimo do poder calorífico inferior.



Sabendo que M(C)=12,01g/mol, M(H)=1g/mol e M(O₂)=32g/mol:

$$12x + 2x = 287,3 - 32 = 255,3 \quad (20)$$

$$x = \frac{255,3}{14} = 18,24 \text{ g/mol} \quad (21)$$

Tendo em conta o valor de x, obtém-se:



Isto significa que por cada 287,3g de ésteres se obtêm 36,48g de H₂. Por sua vez, cada átomo de hidrogénio reage com $\frac{1}{2}$ átomo de O₂, ou seja:

$$m_{O_2} = 8 \times 36,48 = 291,84g \quad (23)$$

Por fim, a massa de água consumida na reação de combustão corresponde a:

$$m_{H_2O} = m_{H_2} + m_{O_2} = 36,46 + 291,68 = 328,3g \quad (24)$$

Tendo calculado a massa de água associada à reação de combustão e sabendo que $h_v(H_2O)=2260kJ/kg$, calculou-se o PCI:

$$PCI = PCS - (h_v \times m_{H_2O}) = 39,25 - (2,26 \times 0,328) = 38,51MJ/kg \quad (25)$$

A informação do consumo energético de cada processo, dada a indisponibilidade de dados que permitam a realização de uma análise completa, provém de medições realizadas com um medidor de energia elétrica, ligado durante a operação dos equipamentos, de forma a medir os seus consumos em kWh, e de medições registadas em trabalhos anteriormente realizados no LNEG e extrapoladas para as condições deste trabalho. Foi também determinado o custo associado a cada parcela de consumo, através dos valores obtidos e do custo do kWh da rede de 0,0535€ (Ferreira *et al.*, 2013).

Os consumos obtidos, por kg de biodiesel, e a respetiva a parcela de custo, estão apresentados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Processos, equipamentos e consumos associados às etapas dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em biodiesel.

	Processo	Equipamento	Consumo [kWh/kg biodiesel]	Consumo [MJ/kg biodiesel]	Custo [€/kg biodiesel]	
Método 1 Extração + transesterificação	Liofilização	Liofilizador ⁽¹⁾	20,10	72,35	1,08	
	Pré-tratamento	Moinho de bolas	7,64	27,50	0,41	
	Extração de lípidos	Extrator soxhlet	38,06	137,02	2,04	
	Evaporação do solvente	Rota-vapor		9,67	34,81	0,52
		Estufa ⁽¹⁾		0,15	0,53	0,01
	Esterificação	Incubadora	0,50	1,78	0,03	
	Catálise básica	Incubadora	0,66	2,38	0,04	
TOTAL			76,77	276,37	4,13	
Método 2 Transesterificação direta	Liofilização	Liofilizador ⁽¹⁾	17,24	62,06	0,92	
	Transesterificação direta	Incubadora	118,21	425,56	6,32	
	Evaporação do clorofórmio	Banho termostático	13,33	47,99	0,71	
TOTAL			148,78	535,61	7,96	

⁽¹⁾ Dados provenientes de estudos anteriormente realizados no LNEG.

Através do PCI do biodiesel obtido e do consumo energético total determinou-se a eficiência das duas hipóteses em estudo (Tabela 4.2), utilizando a relação:

$$\eta = \frac{PCI}{E_{total}} \quad (26)$$

na qual PCI corresponde ao poder calorífico inferior do biodiesel microalgal (MJ/kg) e E_{total} (MJ/kg) à soma da extrapolação, por kg, dos consumos energéticos dos processos associados a cada um dos métodos em estudo.

Tabela 4.2 – Eficiência dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em biodiesel.

	Método 1 (extração + transesterificação)	Método 2 (transesterificação direta)
Eficiência	0,139	0,072

Pelos resultados obtidos observa-se que, para ambas as hipóteses, a energia necessária à conversão é muito superior à produzida pelo produto final, pelo que o processo não é energeticamente rentável ou sustentável. Também é de notar que tratando-se apenas o E_{total} , como já mencionado, da energia referente ao processo de secagem da biomassa microalgal e conversão em ésteres, caso tivesse sido possível contabilizar as necessidades energéticas de todos os processos envolvidos na obtenção de biodiesel (produção e recolha da biomassa microalgal), este valor seria passível de um agravamento.

Por outro lado, tratando-se de um processo à escala laboratorial, e cujas medições foram extrapoladas para corresponderem a 1kg de biodiesel final, representa o pior cenário possível pois não só os consumos dos equipamentos já são elevados, como também, quando comparados com consumos a nível de produção industrial (Brentner *et al.*, 2011), se mostram bastante desajustados. Este facto é especialmente evidente para o caso do tempo de incubação necessário ao método de transesterificação direta, cujo consumo (118,21kWh/kg biodiesel) é muito elevado, tornando este processo menos eficiente que o método 1.

Para a quantificação do custo total envolvido em ambos os métodos, foi também necessário calcular os custos inerentes aos reagentes utilizados no processo. Estes foram obtidos através do preço de aquisição e da extrapolação das quantidades necessárias para 1kg final de biodiesel. Apesar de ambas as hipóteses envolverem diversos reagentes, considerou-se que estes são, na sua maioria, recicláveis. Assim, para a hipótese 1 assumiu-se uma perda (por ciclo de reutilização) de 5% do hexano utilizado na extração dos lípidos e, tal como para a hipótese 2, a impossibilidade de reutilização dos catalisadores envolvidos. Os valores obtidos apresentam-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Reagentes consumidos e respetivos custos associados às etapas dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides* heterotrófica em biodiesel.

	Reagente	Custo [€/kg biodiesel]
Método 1 (Extração + transesterificação)	Hexano	13,01
	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	0,01
	Hidróxido de sódio (NaOH)	0,06
TOTAL		13,07
Método 2 (Transesterificação direta)	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	3,57
TOTAL		3,57

O custo total de consumíveis e utilidades para cada método, correspondente à soma dos custos associados aos consumos elétricos com os custos inerentes aos reagentes consumidos, está representado na tabela 4.4. Para a conversão em litro de biodiesel foi considerada a densidade do mesmo, anteriormente obtida para a *Chlorella protothecoides* heterotrófica como matéria-prima, de 0,864kgL⁻¹ (Xu *et al.*, 2006).

Tabela 4.4 – Custo total de reagentes e eletricidade, por kg e por litro, dos dois métodos em estudo para conversão da biomassa de *Chlorella protothecoides heterotrófica* em biodiesel.

	Método 1 (extração + transesterificação)	Método 2 (transesterificação direta)
Custo total [€/kg biodiesel]	17,18	11,53
Custo total [€/L biodiesel]	14,84	9,96

O método 1 revelou-se mais dispendioso, com o produto final resultante desta técnica de conversão a custar mais 5,65€/kg biodiesel, quando comparado com o método 2. A análise mostra, como se pode confirmar pela figura 4.1, que apesar de os consumos para a extração soxhlet + transesterificação alcalina serem bastante inferiores aos associados à transesterificação direta – cujo principal ativo é a incubadora, com cerca de 87% de quota de consumo – a elevada carga de custo que a perda de 5% de hexano exerce conduz a um pior desempenho a nível económico.

Por outro lado, numa abordagem ao panorama geral de produção de biodiesel, o método 2 (transesterificação direta) deverá também ser mais viável, já que, ao ser uma técnica realizada diretamente na biomassa microalgal, possui menos etapas e permite um menor desperdício mássico ao longo do processo, levando a que, neste caso, para obter 1kg de biodiesel final, se necessite de 11,81kg de biomassa húmida – contra os 13,77kg necessários ao método 1 – conduzindo a menores custos associados à fase de produção e colheita de biomassa.

De notar que uma das quotas mais representativas de consumo, para ambos os métodos de extração e conversão em ésteres, encontra-se associada à etapa de liofilização, que representou um peso de 1,43kWh/kg de biomassa húmida. No entanto, este processo de secagem não se apresenta como opção para utilização na produção de biodiesel à escala industrial dado ser muito caro e, por esse mesmo motivo, apenas apresentar viabilidade quando utilizado em produtos de aplicações nobres. Deste modo, uma das formas de diminuir o consumo energético a nível da secagem da biomassa microalgal e, conseqüentemente, diminuir o custo total de produção de biodiesel em questão, é a substituição da liofilização por outro método de secagem mais económico. Uma alternativa poderá passar pela utilização de um secador solar, já que este permite secar biomassa algal com 85% de humidade em cerca de 4 a 5 horas sem qualquer consumo energético (Sousa, 2014).

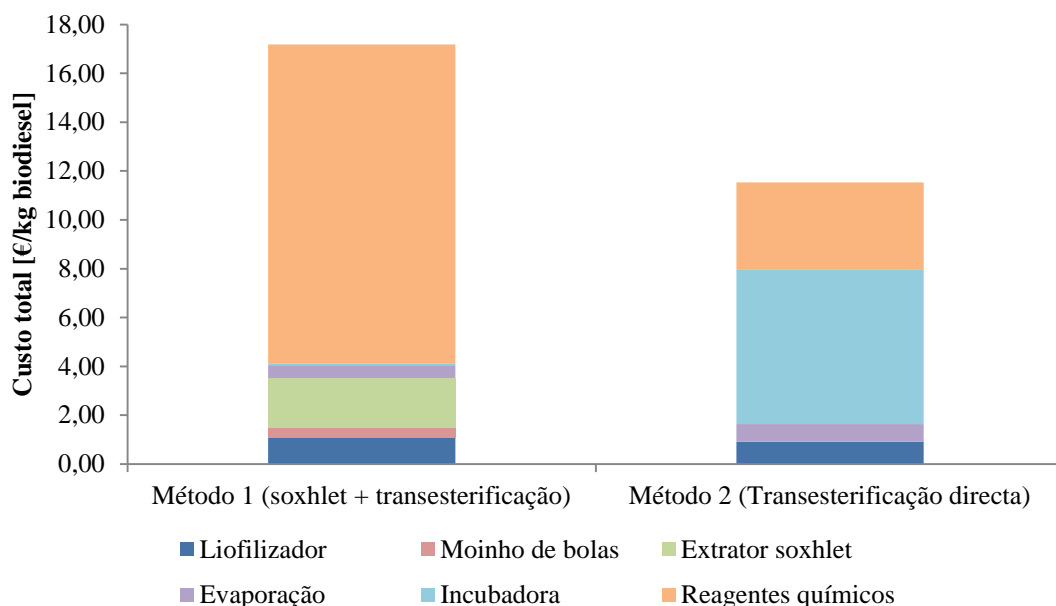


Fig. 4.1- Quotas de custo associadas a cada processo envolvido nos dois métodos de conversão estudados.

Estudos de análise energética e económica de produção de biodiesel à escala industrial apresentam consumos da ordem dos 69kWh para uma conjugação de processos de extração mecânica + extração com hexano + transesterificação e de 3190kWh para ultrasonificação + transesterificação directa-correspondendo, no entanto, a uma produção de 10^4 MJ (cerca de 260kg) (Brentner *et al.*, 2011). Já a nível de custo, para biodiesel produzido através de fotobiorreatores planos, tubulares ou lagoas fotossintéticas, este varia entre 4,15-5,96€/kg (Malcata, 2011), que, apesar de englobar os custos inerentes a todas as fases da obtenção de biomassa microalgal, se mantém bastante inferior aos obtidos neste trabalho.

Com isto é possível verificar o carácter preliminar da análise (necessariamente incompleta ao não incluir custos de utilização e amortização de equipamento, recursos humanos, entre outros fatores de custo), e como um estudo de ciclo de vida mais completo poderá ser útil para compreender de que forma os principais ativos de consumo e outras possíveis fontes de rendimento – com destaque para a valorização da biomassa residual - poderão ser contabilizados para a obtenção de uma produção superior ao consumo energético e um custo semelhante ao custo de mercado atual para o biodiesel.

5. Conclusão

Atualmente, os principais constrangimentos à produção de biodiesel a partir de microalgas à escala industrial, são essencialmente económicos. Por envolverem etapas de cultivo, colheita e conversão muito dispendiosos, o custo do produto final torna-se pouco competitivo, quando comparado com as matérias-primas convencionais de produção de biodiesel.

O trabalho desenvolvido, conducente a esta dissertação, teve como objetivo o estudo a otimização da conversão de biomassa da microalga *Chlorella protothecoides* heterotrófica em biodiesel e um estudo preliminar da sua viabilidade energética e económica.

Numa primeira fase, iniciou-se e acompanhou-se o processo fermentativo, produtor de biomassa, de forma a obter um novo lote. Devido a uma contaminação, este foi terminado abruptamente, não permitindo um crescimento ideal das células microalgais. Apesar de os valores da taxa de crescimento e produtividade de biomassa microalgal terem sido semelhantes aos obtidos numa fermentação completa, o crescimento insuficiente provocou uma quebra a nível de massa final de *C. protothecoides* – 550g para 100g, após liofilização e 16,4g ps/L para 3,6g ps/L de peso seco, respetivamente.

Numa primeira extração, o teor de lípidos relevou-se bastante baixo, com o valor de 8,33g/100g ps para o 1º ensaio fermentativo. O estudo de mecanismos de pré-tratamento de rutura celular, tendo em vista a real contabilização da fração lipídica, realizou-se com recurso a dois processos: hidrólise ácida e rutura mecânica com moinho de bolas. Para tal, realizaram-se ensaios de extração com hexano diretamente na biomassa liofilizada e na biomassa pré-tratada. Através da hidrólise ácida foi possível a contabilização da fração lipídica microalgal ($49,14 \pm 0,53$ g/100g ps), comprovando-se a eficácia da rutura mecânica com moinho de bolas ($49,29 \pm 1,61$ g/100g ps) e a necessidade de um processo prévio de rutura para uma extração completa.

A nível de composição, a biomassa estudada demonstrou ter cerca de 17,5g/100g ps de açúcares, 6,45g/100g ps de proteína e um teor de minerais de $6,92 \pm 0,52$ g/100g ps. Isto significa que a biomassa residual (pós-extração lipídica) tem potencial de valorização através da produção de bioetanol ou biohidrogénio ou de reinserção no ciclo de produção, como fonte nutricional à produção de biomassa microalgal.

A acidez da fração lipídica ($3,96 \pm 0,12$ mgKOH/g) é relativamente baixa, mantendo-se, no entanto, a necessidade de esterificação/transesterificação por catálise ácida ou transesterificação com catalisador básico precedida de um pré-tratamento de esterificação ácida.

O perfil e composição da fração lipídica indicam que esta é rica em ácidos gordos insaturados (81,67% m/m), com uma predominância de monoinsaturados (57,83% m/m). A nível de qualidade, os requisitos da norma EN 14214 são cumpridos no que respeita ao teor de éster metílico de ácido linolénico (< 12% m/m) e de ácidos gordos polinsaturados, com 4 ou mais duplas ligações (< 1% m/m).

Foram também observados valores para o índice de iodo (85,22g I₂/100g) e, para o índice de cetano (54,46), que se enquadram nos limites definidos pela norma europeia, e um valor para o CFPP (-9,07°C) cumprindo duas das três classes de classificação de CFPP em Portugal. Foi ainda determinado o índice de saponificação da fração lipídica, sendo este de 189,97 mgKOH/g.

Na conversão em ésteres, realizada por transesterificação direta, verificou-se que, para 100mg de biomassa liofilizada, 4mL de metanol e uma proporção de catalisador de 1,2%(v/v), a conversão em FAME é praticamente total às 18h – na ordem dos 47,05 mg/100mg de biomassa. Quanto aos parâmetros estudados, a utilização de um pré-tratamento de moagem na biomassa proporciona um aumento da velocidade de conversão e a presença de humidade um decréscimo acentuado na conversão em ésteres, que pode ser suavizado com um aumento da quantidade de catalisador. Já o aumento de temperatura de reação de 50°C para 80°C, neste caso, não apresentou qualquer benefício.

Por fim, através de uma análise preliminar de dois diferentes métodos de conversão da fração lipídica em ésteres, verificou-se que o processo de transesterificação direta (método 2), nas condições laboratoriais realizadas, apresenta consumos energéticos mais elevados (148,78kWh/kg biodiesel) e,

consequentemente, uma razão energia produzida/energia consumida inferior ao conseguido num processo de extração seguido de transesterificação (método 1) (0,072 contra 0,139, respetivamente). No entanto, o elevado custo proveniente da perda de 5% v/v do hexano utilizado na extração soxhlet do método 1, encarece essa via de extração, tornando o método de transesterificação direta ainda assim mais económico – 11,53€/kg biodiesel.

6. Trabalho futuro

O trabalho realizado demonstra as potencialidades que a microalga *Chlorella protothecoides* heterotrófica, no espectro da produção de biocombustíveis a partir de biomassa microalgal, tem. No entanto, as já mencionadas, e comprovadas através do estudo energético preliminar, limitações a nível de consumos energéticos excessivos, conduzem a uma necessidade de pesquisa e análise de métodos de produção, colheita e extração que possibilitem a viabilidade de ampliação a escala industrial.

Em primeiro lugar, estando comprovada a inviabilidade da utilização desta biomassa na presença de humidade, a otimização do processo poderá passar por estudos mais detalhados incidentes nos outros fatores que influenciam a reação de transesterificação direta – como o tipo e a quantidade de catalisador, o tempo e temperatura de reação – e na otimização das proporções molares dos reagentes (álcool e catalisador) envolvidos. Considerando a quota de consumo energético que o tempo de reação tem na transesterificação direta, uma das formas de rentabilizar o processo poderá passar pela manipulação destes mesmos fatores até se atingir a combinação ótima capaz de reduzir o esforço de consumo, quer energético, quer de reagentes, ao máximo. Também neste sentido, a análise de diferentes processos de secagem pós-colheita mais económicos, capazes de minorar a carga energética que a secagem tem no processo, poderá facultar melhores resultados.

Dados os elevados consumos energéticos que o processo de produção de biodiesel microalgal atualmente acarreta, o estudo de hipóteses capazes de diminuir ou até mesmo suprimir a energia elétrica consumida é pertinente. Uma abordagem obrigatória a estudar com detalhe no futuro é a de implementação plena do conceito de biorrefinaria integrando balanços de massa e energia na produção de biocombustíveis, energia (calor e electricidade) e bioprodutos com valor comercial, se possível com a ajuda de outras energias renováveis. Nesse sentido, a integração de um sistema de produção elétrica renovável como, a caso de exemplo, de energia solar concentrada (CSP) com um sistema de armazenamento de energia térmica, capaz de suprimir as necessidades energéticas de uma biorrefinaria, permite a descarbonização da fonte elétrica e uma diminuição significativa dos impactos ambientais associados a biorrefinarias de fonte microalgal (Figura 6.1) (Brownbridge *et al.*, 2014).

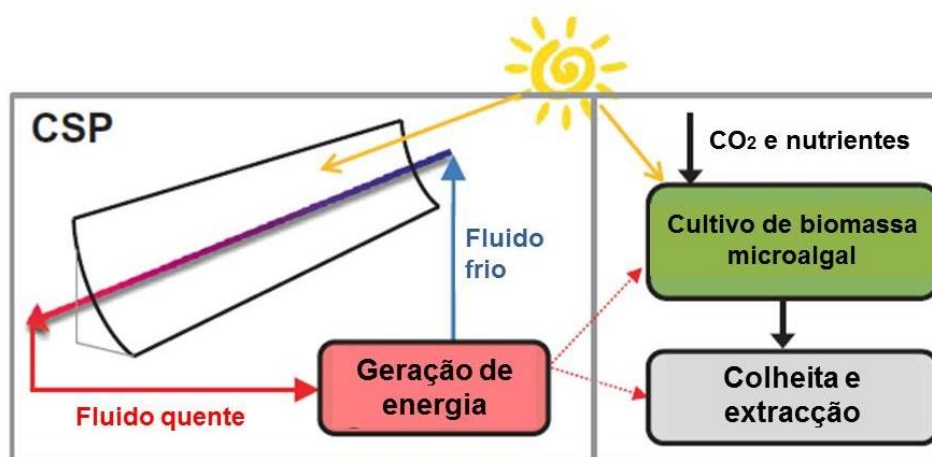


Fig. 6.1 - Esquemática da introdução de uma fonte energética renovável no processo de obtenção de biodiesel microalgal (adaptado de Brownbridge *et al.*, 2014).

Esta alteração permite não só a necessária diminuição de consumos como também uma diminuição significativa do impacto ambiental que a produção de biodiesel a partir de biomassa microalgal obtida heterotroficamente provoca, já que recorre a outra fonte energética limpa, aumentando assim a sustentabilidade do processo com as vantagens que o método de produção heterotrófica proporciona.

No mesmo sentido, também será pertinente avaliar os benefícios que a aplicação de um processo de cogeração proporciona, não só no sentido de valorização da biomassa residual (secção 1.4.2), como também como outra forma de obtenção de energia para o sistema. Simulações demonstram que, para uma biomassa microalgal proveniente de transesterificação alcalina com NaOH, 3906,87 kg/h de

resíduos, são capazes de produzir 33,33MW por cogeração, dos quais 8,22MW são energia elétrica (Rincón *et. al*, 2014).

7. Referências

- Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M. R. e Najafi, G., 2012. Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*, 63, 138–148. doi:10.1016/j.enconman.2012.02.027.
- Agarwal, A. K., 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33, 233–271. doi:10.1016/j.pecs.2006.08.003.
- Ahmad, a. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C. e Lim, J. K., 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 584–593. doi:10.1016/j.rser.2010.09.018.
- Ahmad, a. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2014). Comparison of harvesting methods for microalgae *Chlorella* sp. and its potential use as a biodiesel feedstock. *Environmental Technology*, 35(October), 2244–2253. <http://doi.org/10.1080/09593330.2014.900117>.
- Amaro, H. M., Macedo, Â. C. e Malcata, F. X., 2012. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Energy*, 44(1), 58–166. doi:10.1016/j.energy.2012.05.006.
- Atabani, a. E., Silitonga, A. S., Badruddin, I. A., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H. e Mekhilef, S., 2012. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(4), 2070–2093. doi:10.1016/j.rser.2012.01.003.
- Atadashi, I.M., Aroua, M.K. e Aziz, A.A., 2010. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 1999–2008. doi:10.1016/j.rser.2010.03.020.
- Balat, M. e Balat, H., 2010. Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*, 87(6), 1815–1835. doi:10.1016/j.apenergy.2010.01.012.
- Brentner, L. B., Eckelman, M. J. e Zimmerman, J. B., 2011. Combinatorial life cycle assessment to inform process design of industrial production of algal biodiesel. *Environmental Science and Technology*, 45, 7060–7067. doi:10.1021/es2006995.
- Brownbridge, G., Azadi, P., Smallbone, A., Bhave, A., Taylor, B. e Kraft, M., 2014. The future viability of algae-derived biodiesel under economic and technical uncertainties. *Bioresource Technology*, 151, 166–173. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.062.
- Campenni, L., Nobre, B. P., Santos, C. A., Oliveira, A. C., Aires-Barros, M. R., Palavra, A. M. F. e Gouveia, L., 2013. Carotenoid and lipid production by the autotrophic microalga *Chlorella protothecoides* under nutritional, salinity, and luminosity stress conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1383–1393. doi:10.1007/s00253-012-4570-6.
- Cerón-García, M. C., Macías-Sánchez, M. D., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F. e Molina-Grima, E., 2013. A process for biodiesel production involving the heterotrophic fermentation of *Chlorella protothecoides* with glycerol as the carbon source. *Applied Energy*, 103, 341–349. doi:10.1016/j.apenergy.2012.09.054.
- Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J. e Chang, J. S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159.
- Chen, Y. H. e Walker, T. H., 2012. Fed-batch fermentation and supercritical fluid extraction of heterotrophic microalgal *Chlorella protothecoides* lipids. *Bioresource Technology*, 114, 512–517. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.026>.

- Chouhan, A. P. S. e Sarma, A. K., 2011. Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4378–4399. doi:10.1016/j.rser.2011.07.112.
- Demirbas, M. F., 2011. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88(10), 3473–3480. doi:10.1016/j.apenergy.2011.01.059.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers e F. Smith, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry* 28:350–356, doi: 10.1021/ac60111a017.
- Ehimen, E. A., Sun, Z. F. e Carrington, C. G., 2010. Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89(3), 677–684. doi:10.1016/j.fuel.2009.10.011.
- Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., Yáñez, E. E., Castillo, E. F. e Almazan, O., 2009. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1275–1287. doi:10.1016/j.rser.2008.08.014.
- European Commission. (n.d.). 2030 framework for climate and energy policies - European Commission. Retrieved from http://ec.europa.eu/clima/policies/2030/index_en.htm
- Ferreira, A. F., Ribeiro, L. A., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., Nobre, B. P., Palavra, A. M. F., ... Silva, C., 2013. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga - Energy and CO₂ emission and economic analyses. *Bioresource Technology*, 138, 235–244. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.168.
- Francisco, É.C., Neves, D.B., Jacob-Lopes, E. e Franco, T. T., 2010. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol* 85(3):395–403, doi:10.1002/jctb.2338.
- Gaivão, J. J. R. P. de M., 2013. Aplicação de diferentes metodologias na produção de biodiesel a partir da microalga *Nannochloropsis* sp.. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Haas, M. J. e 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., Danquah, M. K. e Webley, P. A., 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 709–732. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.001.
- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Fernando, W. J. N. e Kim, J., 2009. Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review. *Fuel Processing Technology*, 90(12), 1502–1514. doi:10.1016/j.fuproc.2009.07.016.
- Helwani, Z., Othman, M. R., Aziz, N., Kim, J. e Fernando, W. J. N., 2009. Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: A review. *Applied Catalysis A: General*, 363, 1–10. doi:10.1016/j.apcata.2009.05.021.
- Hidalgo, P., Toro, C., Ciudad, G. e Navia, R., 2013. Advances in direct transesterification of microalgal biomass for biodiesel production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12, 179–199. doi:10.1007/s11157-013-9308-0.
- Hoebler, C., J.L. Barry, A. David e J. Delort-Laval, 1989. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37:360–367, doi: 10.1021/jf00086a020.
- Hoekman, S. K., Broch, A., Robbins, C., Ceniceros, E. e Natarajan, M., 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 143–169. doi:10.1016/j.rser.2011.07.143.

- Islam, M. A., Magnusson, M., Brown, R. J., Ayoko, G. A., Nabi, M. N. e Heimann, K., 2013. Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. *Energies*, 6(1v), 5676–5702. doi:10.3390/en6115676.
- Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, 86, 1059–1070. doi:10.1016/j.fuproc.2004.11.002.
- Kumar, N., Varun e Chauhan, S. R., 2013. Performance and emission characteristics of biodiesel from different origins: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 633–658. doi:10.1016/j.rser.2013.01.006.
- Lam, M. K., Lee, K. T. e Mohamed, A. R., 2010. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 500–518. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.03.002.
- Lee, A. K., Lewis, D. M. e Ashman, P. J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101. doi:10.1016/j.biombioe.2012.06.034.
- Leung, D. Y. C., Wu, X. e Leung, M. K. H., 2010. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083–1095. doi:10.1016/j.apenergy.2009.10.006.
- Li, X., Xu, H. e Wu, Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering*. doi: 10.1002/bit.21489.
- Ma, F. e M.A. Hanna, 1999. Biodiesel production: a review, *Bioresource Technology* 70:1-15, doi: 10.1016/S0960-8524(99)00025-5.
- Malcata, F. X., 2011. Microalgae and biofuels: A promising partnership? *Trends in Biotechnology*, 29(11), 542–549. doi:10.1016/j.tibtech.2011.05.005.
- Mandal, S., Patnaik, R., Singh, A. K. e Mallick, N., 2013. Comparative assessment of various lipid extraction protocols and optimization of transesterification process for microalgal biodiesel production. *Environmental Technology*, 34(December), 2009–2018. doi:10.1080/09593330.2013.827730.
- Mariotti, F., D. Tomé e P.P. Mirand, 2008. Converting nitrogen into protein – beyond 6.25 and Jones’ Factors, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48:177-184, doi: 10.1080/10408390701279749.
- Marques, R. J. F., 2013. Produção de biodiesel pelas microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis sp.*: otimização dos processos de pré-tratamento e conversão. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.
- Meher, L. C., Sagar, D. Vidya, Naik, S. N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review, *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 10:248-268, doi:10.1016/j.rser.2004.09.002.
- Miao, X., e Wu, Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97, 841–846. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.008.
- Montefrio, M. J., Xinwen, T. e Obbard, J. P., 2010. Recovery and pre-treatment of fats, oil and grease from grease interceptors for biodiesel production. *Applied Energy*, 87(10), 3155–3161. doi:10.1016/j.apenergy.2010.04.011.
- Montero, G., Stoytcheva, M., 2011. Biodiesel – Quality, Emissions and by-Products. Rijeka, Croácia: InTech.
- Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., ... Nascimento, M. A., 2013. Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and

- Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, 6, 1–13. doi:10.1007/s12155-012-9222-2.
- Nigam, P. S. e Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. doi:10.1016/j.pecs.2010.01.003.
- Parlamento Europeu e do Conselho, 2009. DIRETIVA 2009/30/CE, Jornal Oficial da União Europeia.
- Parlamento Europeu e do Conselho, 2014. DIRETIVA 2014/.../UE, Dossiê interinstitucional:2012/0288 (COD).
- Picardo, M.C., J.L. de Medeiros, J.G.M. Monteiro, R.M. Chaloub, M. Giordano e O.d.Q.F. Araújo, 2013. A methodology for screening of microalgae as a decision making tool for energy and green chemical process applications, *Clean Technologies and Environmental Policy* 15:275-291, doi: 10.1007/s10098-012-0508-z.
- Pocketbook, S. (2014). *in Figures*. <http://doi.org/10.2833/24150>.
- REN - Redes Energéticas Nacionais, 2014. www.ren.pt [Acedido em Fevereiro].
- Rincón, L. E., Jaramillo, J. J. e Cardona, C. A., 2014. Comparison of feedstocks and technologies for biodiesel production: An environmental and techno-economic evaluation. *Renewable Energy*, 69, 479–487. doi:10.1016/j.renene.2014.03.058.
- Sampaio, M. J. F., 2008. Produção de Biodiesel por Catálise Heterogénea. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior de Tecnologia e Gestão.
- Santos, C. M.A., New symbiotic approach for sustainable microalgae production: a biorefinery platform. PhD Thesis, 2014. Universidade de Lisboa, Instituto Superior Técnico, 228 pp.
- Sharma, Y. C. e Singh, B., 2009. Development of biodiesel: Current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13, 1646–1651. doi:10.1016/j.rser.2008.08.009.
- Shi, X. M., Jiang, Y. e Chen, F., 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress*, 18, 723–727. doi:10.1021/bp0101987.
- Soratana, K., Barr, W. J. e Landis, A. E., 2014. Effects of co-products on the life-cycle impacts of microalgal biodiesel. *Bioresource Technology*, 159, 157–166. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.070.
- Sousa, C. V. de, 2014. Microalgas : do Tratamento de Efluentes para a Biorrefinaria. Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia
- Steriti, A., Rossi, R., Concas, A. e Cao, G., 2014. A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 164, 70–77. doi:10.1016/j.biortech.2014.04.056.
- Suali, E. e Sarbatly, R., 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(6), 4316–4342. doi:10.1016/j.rser.2012.03.047.
- Subhadra, B. G. e Edwards, M., 2011. Coproduct market analysis and water footprint of simulated commercial algal biorefineries. *Applied Energy*, 88(10), 3515–3523. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.051.
- Teixeira, J. I. de M., 2011. Utilização de Co-solventes na Produção de Biodiesel a partir de Óleo Residual e Etanol por Catálise Enzimática. Instituto Superior de Engenharia do Porto.
- The European Commission. (2014). The 2020 climate and energy package. *The European Commission*. Retrieved from http://ec.europa.eu/clima/policies/package/index_en.htm

- Veal, M. W., Caffrey, K. R., Chinn, M. S. e Grunden, A. M., 2013. Algae for Biofuels – Economic and Environmental Costs, Southern Regional Aquaculture Center, 4310, 1–8.
- Velasquez-Orta, S. B., Lee, J. G. M. e Harvey, A., 2012. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, 94, 544–550. doi:10.1016/j.fuel.2011.11.045.
- Whalen, B.D., R.M. Willis e L.C. Seefeldt, 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae cyanobacteria and wild mixed-cultures, *Bioresource Technology* 102:2724-2730, doi: 10.1016/j.biortech.2010.11.026.
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J. e Wu, Q., 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 29–36. doi:10.1007/s00253-007-1285-1.
- Xu, H., Miao, X. e Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126, 499–507. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.05.002.

Anexo I

Lista dos reagentes utilizados ao longo do trabalho experimental.

Reagente	Pureza	Marca
Ácido acético	99,8%	Fluka
Ácido clorídrico 37%	min 37 %	Riedel-de Haën
Ácido sulfúrico	95-97 %	Merck
Ácido sulfúrico 2N	95-97 %	Sigma-Aldrich
Ciclohexano		Merck
Cloreto de sódio	99,5 %	Panreac
Clorofórmio	99,0 %	Lab-Scan
Éster metílico do ácido heptadecanóico	≥ 98%	Fluka
Etanol	99,9 %	Carlos Erba
Éter etílico	99,5 %	Absolve
Fenol	P.a.	Merck
Hidróxido de sódio	98%	Absolve
Hidróxido de potássio	86 %	Absolve
Hexano	98,5 %	Carlos Erba
Iodeto de Potássio	99%	Panreac
Indicador de cozimento de amido		Merck
Iso-Octano	99,0 %	Panreac
Metanol	99,8 %	Fluka
Reagente de <i>Wijs</i>		Riedel-de-Haën
Solução alcoólica de fenoltaleína		Panreac
Sulfato de sódio anidro	99,0 %	Merck
Solução metanólica trifluoreto de boro	13 – 15 %	Sigma-Aldrich
Tiosulfato de sódio penta hidratado (Tritisol)		Fixanal

Na preparação do meio de fermentação foram utilizados os seguintes reagentes:

- Dextrose.H₂O, Extrato de levedura, Água do mar, NaCl (obtido da água do mar);
- Anti-espuma: polipropileno glicerol (PPG) puro;
- Solução de antibióticos constituída por estreptomicina, cloranfenicol e penicilina;
- Base NaOH (4N) ou ácido HCl (4N), para acertar o pH do meio.

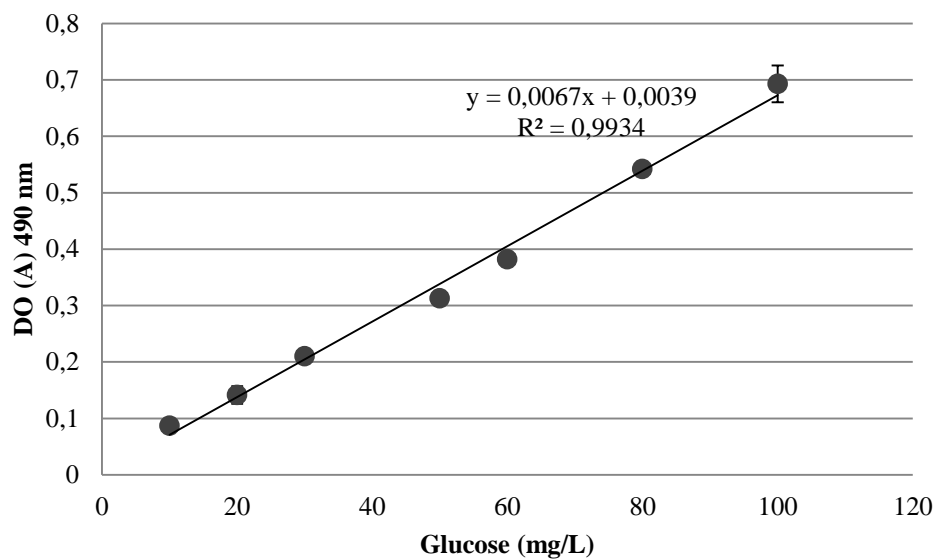
Anexo II

Lista de materiais e equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental.

Equipamento ou material	Marca e modelo
Aparelho de destilação	Büchi, Distillation Unit K-350
Aparelho de digestão	Büchi, Digestion Unit K-424
Autoclave	Newclave, HL-36AC
Balança de precisão	Mettler Toledo, AB204-S
Banho termostático	P-Selecta, Precistern
Banho termostático	Büchi, Heating Bath B-490
Bomba de vácuo	Büchi, V-500
Cadinho	
Cartucho celulose	VWR
Centrifuga	Hitashi-Koki, Himac CT15-E
Controlador bomba de vácuo	Büchi, V-800
Cromatógrafo	Varian, 3800
Digestor	BLOC DIGEST, modelo 20
Espectrofotômetro	Hitachi, U-200
Estufa	Memmert
Fermentador	BIOLAFITTE 111 Bd Robespierre 78300 POISSY
Filtro de polipropileno	Pall, Acrodisc GHP
Filtro de celulose	Ederol
Incubadora	Lab-Line, Environ-Shaker
Manta de aquecimento Soxhlet	P-Selecta
Moinho de bolas	Retsch, MM400
Mufla	Heraeus
Purificador de água	Millipore, Elix S Progard 2
Rotavapor	Büchi, R-200
Vortex	Janke & Kunkel, VF2

Anexo III

Reta de calibração da determinação colorimétrica do teor de açúcares



Anexo IV

As soluções utilizadas, já preparadas, foram baseados nos *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

- **Reagente de digestão**

134g K_2SO_4 + 650mL água + 200mL H_2SO_4 + 2g HgO/25mL H_2SO_4 6N, diluir a 1L.

- **Reagente de hidróxido de sódio-tiosulfato de sódio**

500g NaOH + 25g $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O/L$.

- **Solução indicadora mista**

Vermelho de metilo 200mg/100mL EtOH + azul de metileno 100mg/50mL EtOH.

- **Solução indicadora de ácido bórico**

20g H_3BO_3 + 10mL solução indicadora mista, diluir a 1L.

- **Solução titulante padrão de H_2SO_4 0.02N (0.54mL/L) ou 0.1N (2.66mL/L).**