

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



**Ciências  
ULisboa**

## **Microalgas: produção económica e ambientalmente sustentável**

**Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente**

Ana Filipa Lima Barata

Dissertação orientada por:  
Orientadora interna: Doutora Ana Cristina Oliveira Justino (FCUL/LNEG)  
Orientadora externa: Doutora Luísa Maria Gouveia da Silva (LNEG)



## Agradecimentos

Antes de mais, devo afirmar que poder realizar esta Tese na Unidade de Bioenergia do LNEG foi um imenso gosto para mim. Nunca irei esquecer esta etapa, que me deu valências e capacidades que me distinguirão certamente no meu futuro profissional.

Todo este trabalho não poderia ter sido realizado sem o apoio de algumas pessoas, às quais vou passar a agradecer.

Em primeiro lugar, devo agradecer profundamente às minhas orientadoras, a Doutora Cristina Oliveira e a Doutora Luísa Gouveia por todo o apoio, incentivo, boa disposição, disponibilidade, conhecimento profundo e atenção dada ao longo de todos os meses passados no laboratório e também ao longo da escrita da Tese, que muito apreciei escrever.

Agradeço também a todos os investigadores da Unidade de Bioenergia, em particular à Doutora Ana Paula Batista e à Doutora Paula Passarinho, pelo apoio dado em diversas fases experimentais, bem como pelo esclarecimento de muitas dúvidas relacionadas com a temática da bioenergia.

Não posso deixar de agradecer também à Graça Gomes e à Natércia Santos por todo o auxílio dado no laboratório e pela simpatia e estima que sempre me demonstraram, assim como a todos os que por lá passam.

Tenho também que deixar um agradecimento a todos os bolseiros e estagiários que comigo estiveram na Unidade de Bioenergia. Foram sem dúvida dos colegas mais simpáticos e dedicados que tive ao longo do percurso escolar e agradeço-vos todos os momentos de convívio e por me terem recebido tão bem. Agradeço também aos meus colegas da FCUL e amigos, pelo interesse demonstrado por esta área quase desconhecida para nós.

For fim – e não menos importante – devo agradecer a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmã, por sempre me terem apoiado e pela paciência e curiosidade que mostravam quando me punha a falar de microalgas e efluentes nas refeições em família!

A todos, muito obrigada!



## Resumo

A presente dissertação teve como principal objetivo a produção de biomassa microalgal da forma mais económica e sustentável possível. Realizaram-se diversos ensaios em *erlenmeyers* e reatores de coluna de bolha e a composição da biomassa produzida foi determinada de modo a escolher qual a aplicação mais apropriada.

A microalga principal usada no âmbito do trabalho – *S. obliquus* – obteve resultados positivos de crescimento em efluentes com elevada carga orgânica provenientes das indústrias avícola (avícola *bruto* (AB) e *floculado* (AF)) e suinícola (porco *bruto* (PB)). A matéria saponificável obtida a partir das culturas com os efluentes avícolas foi, em média, de 11 e 27 g/100 g biomassa, para os efluentes AB e AF, respetivamente. O perfil de ácidos gordos das frações lipídicas mostraram que estas eram maioritariamente constituídas pelos ácidos gordos C16:0, C18:1 e C18:2, e que respeitavam a norma europeia de qualidade de biodiesel (EN 14214) quanto ao conteúdo do ácido linolénico (C18:3) (< 12% (m/m)) e ao índice de iodo (< 120 g I<sub>2</sub>/100 g). Quanto aos açúcares totais, os melhores valores foram os associados às culturas com efluente AB (36 g/100 g biomassa (lâmpadas fluorescentes) vs. 25 g/100 g biomassa obtidos com o efluente AF (lâmpadas LED)). Não se verificaram diferenças significativas na composição das biomassas quanto à iluminação proveniente de lâmpadas fluorescentes e LEDs utilizadas nos ensaios, apesar da poupança energética de mais de 55% de custo ao uso das lâmpadas LED.

Noutro ensaio, com a perspetiva da biomitigação de CO<sub>2</sub> oriundo de fontes poluentes, adicionaram-se 5% de CO<sub>2</sub> ao ar de agitação nas culturas com efluente AB e PB; concluiu-se que esse gás funcionou como um “catalisador” do crescimento microalgal, tendo-se obtido produtividades médias cerca de três vezes superiores com os efluentes AB e PB (0,280 e 0,304 g/L.dia, respetivamente) às verificadas com o efluente AB sem adição do CO<sub>2</sub> (0,101 g/L.dia).

Quanto à bioremediação dos efluentes em estudo, obtiveram-se valores superiores a 97%, quer para o tratamento relativo ao conteúdo do ião amónio, quer para o ião fosfato; todos os valores obtidos respeitaram os limites máximos especificados na legislação portuguesa.

**Palavras-Chave:** Microalgas, *S. obliquus*, efluentes, bioremediação, CO<sub>2</sub>.



## Abstract

The main purpose of the present thesis was the production of microalgal biomass in an economical and environmental sustainable way. Several experiments were conducted in erlenmeyers and bubble column photobioreactors and the produced biomass was analyzed in order to evaluate its composition and define the most suitable application.

The main microalgae used – *S. obliquus* – achieved positive results when grown in highly contaminated industrial wastewater from the poultry (avícola *bruto* (AB) e *floculado* (AF)) and swine (porco *bruto* (PB)) industries. The saponifiable matter obtained from cultures with poultry effluent was, on average, 11 and 27 g/100 g biomass to AB and AF wastewater, respectively. The fatty acid profile was mainly composed by the C16:0, C18:1 and C18:2 fatty acids and it was within the European biodiesel quality standard (EN 14214) in terms of linolenic acid content (C18:3) (<12% (m/m)) and iodine value (<120 g I<sub>2</sub>/100 g). For total sugars, the best values were associated to the cultures using AB wastewater (36 g/100 g biomass (fluorescent lamps) vs. 23 g/100 g biomass obtained using AF wastewater (LED lamps)). The biomass composition didn't show significant differences between fluorescent or LEDs illumination. However, the use of LEDs allowed energy savings of over 55%.

In another assay, aiming the biomitigation of CO<sub>2</sub> from pollutant sources, 5% of CO<sub>2</sub> were added to the aeration gas in the cultures using AB and PB wastewater; it was concluded that this gas worked as a “catalyst” of the microalgal growth, and daily productivities three times higher using AB and PB wastewater (0,280 and 0,304 g/L.day, respectively) were obtained, comparing with those using AB wastewater without the addition of CO<sub>2</sub> (0,101 g/L.day).

The wastewater bioremediation revealed results greater than 97% for both ammonium and phosphate ions removal, and the reached values were below the maximum limit specified in national legislation.

**Keywords:** Microalgae, *S. obliquus*, wastewater, bioremediation, CO<sub>2</sub>.



## Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Simbologia e Notações.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1. Introdução e objetivos.....	1
1.2. Estrutura da dissertação.....	2
Capítulo 2 – Enquadramento energético.....	3
2.1. Panorama mundial e europeu.....	3
2.2. Biocombustíveis.....	6
Capítulo 3 – Microalgas.....	9
3.1. Definição e características.....	9
3.2. Etapas da produção de biocombustível a partir de microalgas.....	11
3.3. Biorefinaria.....	20
3.4. Microalgas estudadas no âmbito da dissertação.....	21
Capítulo 4 – Materiais e Métodos.....	23
4.1. Microalgas.....	23
4.2. Meios de cultura.....	23
4.3. Crescimento das microalgas.....	24
4.4. Colheita da biomassa microalgal.....	27
4.5. Secagem da biomassa microalgal.....	29
4.6. Metodologias analíticas.....	29
4.7. Considerações energéticas.....	38
Capítulo 5 – Resultados e Discussão.....	39
5.1. Caracterização dos efluentes.....	39
5.2. Seleção da microalga.....	42
5.3. Crescimento da microalga <i>S. obliquus</i> em meio sintético e caracterização da biomassa microalgal.....	44
5.4. Crescimento da microalga <i>S. obliquus</i> em efluentes e caracterização da biomassa microalgal.....	46
5.5. Consumos energéticos.....	65
Capítulo 6 – Conclusões e Desenvolvimentos Futuros.....	69
Referências Bibliográficas.....	71
Anexos.....	79



## Índice de Figuras

Fig. 1 – Consumo energia primária mundial, por fonte. Valores em mil milhões de tep. Adaptado de [8].	3
Fig. 2 – (a) Consumo de energia final, por sector; (b) Consumo final de cada combustível no sector dos transportes. Dados da UE-28 em 2013. Adaptados de [9].	4
Fig. 3 – Consumo de biocombustíveis para os transportes em 2014 na UE. Adaptado de [10].	4
Fig. 4 – Produção de bioetanol e biodiesel. Estimativas até 2017. Fonte: [11].	4
Fig. 5 – Consumo de energia final em Portugal (2014). Fonte: [12].	5
Fig. 6 – Produção mundial de biocombustíveis entre 2004 e 2014. Valores em Mtep. Fonte: [7].	7
Fig. 7 – Cadeia de valor das microalgas. Adaptado de [48].	11
Fig. 8 – Exemplos de reatores para o cultivo de microalgas. Fontes: (a) [50], (b) [51], (c) [52], (d) [53].	12
Fig. 9 – Reação de transesterificação. Fonte: [27].	18
Fig. 10 – Exemplo simplificado da integração de sistemas numa biorefinaria. Adaptado de [48] e [103]. As setas a verde representam os <i>inputs</i> dos sistemas.	20
Fig. 11 – Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> vista ao microscópio. Fonte: [122].	21
Fig. 12 – Efluente avícola <i>bruto</i> (esquerda) e avícola <i>floculado</i> (direita).	24
Fig. 13 – Ensaio de seleção da microalga no efluente avícola <i>bruto</i> (AB) com as diferentes microalgas.	25
Fig. 14 – Reatores com meio sintético <i>Bristol</i> (esquerda) e esquema ilustrativo da disposição das lâmpadas fluorescentes, representadas a amarelo (direita).	25
Fig. 15 – Erlenmeyers com os efluentes avícolas <i>floculado</i> (AF) e <i>bruto</i> (AB), e também meio <i>Bristol</i> não esterilizado.	25
Fig. 16 – Reatores com os efluentes avícolas <i>floculado</i> e <i>bruto</i> , usando iluminação fluorescente e LED.	26
Fig. 17 – Fotobioreatores com efluente avícola <i>bruto</i> (a) e de porco <i>bruto</i> (b); (c) esquema ilustrativo da iluminação fluorescente utilizada neste ensaio, onde se procedeu à adição de CO <sub>2</sub> no fluxo de ar.	26
Fig. 18 – (a) Centrífuga <i>Heraeus Multifuge 3SR+</i> ; (b) amostra do ensaio com meio <i>Bristol</i> esterilizado pré-centrifugação; (c) biomassa e sobrenadante, após centrifugação.	27
Fig. 19 – Biomassa húmida (a) e seca (b).	27
Fig. 20 – Eletrocoagulação do meio com a microalga (a) e do efluente avícola <i>bruto</i> (b).	28
Fig. 21 – Esquema do procedimento de EC, baseado no que foi feito no laboratório.	28
Fig. 22 – Gordura extraída do efluente avícola <i>bruto</i> após o processo de eletrocoagulação.	31
Fig. 23 – Camadas formadas pelo solvente e a gordura, e a restante matéria orgânica.	31
Fig. 24 – Equipamento de extração <i>Sohxlet</i> .	33
Fig. 25 – Cápsula e esferas usadas no pré-tratamento da microalga <i>S. obliquus</i> no moinho de bolas <i>Retsch MM400</i> .	34
Fig. 26 – (a) Frascos rolhados para realização da hidrólise ácida quantitativa; (b) Tubos de ensaio para determinação do teor de açúcares totais.	35
Fig. 27 – Resultado após centrifugação do líquido resultante do método BF <sub>3</sub> .	36
Fig. 28 – Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de uma cultura de <i>S. obliquus</i> em meio <i>Bristol</i> . Na ampliação é visível a identificação de cada ácido gordo e o tempo a que são identificados.	36
Fig. 29 – (a) Aspeto original do efluente avícola <i>bruto</i> . Resultado da EC sobre o efluente durante (b) 5 minutos e (c) 10 minutos ( $i \approx 10,94 \text{ mA/cm}^2$ ).	42
Fig. 30 – (a) Curva de crescimento das microalgas estudadas; (b) Crescimento das microalgas em termos de peso seco.	42
Fig. 31 – Aparência das culturas no final do ensaio de seleção da microalga, que se encontram na seguinte ordem: (da esquerda para a direita) <i>S. obliquus</i> , <i>C. protothecoides</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>N. oleoabundans</i> e <i>Spirogyra</i> sp.	43
Fig. 32 – Variação do valor de pH das diferentes culturas em efluente avícola <i>bruto</i> .	43

Fig. 33 – Curva de crescimento relativa à absorvância (a) e ao peso seco (b) da cultura ao longo do tempo, no ensaio com meio de crescimento <i>Bristol</i> .....	44
Fig. 34 – Distribuição dos FAME presentes na biomassa do ensaio com meio <i>Bristol</i> esterilizado. ....	45
Fig. 35 – (a) Curva de crescimento da <i>S. obliquus</i> nas amostras do ensaio com meio <i>Bristol</i> modificado; (b) Variação do pH nas mesmas amostras. 160 e 220 corresponde à quantidade de ião amónio adicionada ao meio sintético [mg/L]. ....	46
Fig. 36 – (a) Curva logarítmica da absorvância e (b) variação do peso seco, das culturas do ensaio com a <i>S. obliquus</i> e os efluentes avícolas <i>bruto</i> (AB – efluente <i>tal e qual</i> ; AB (Cent) – efluente após centrifugação; AB (pós-EC) – efluente após electrocoagulação) e <i>floculado</i> (AF – efluente <i>tal e qual</i> ; AF (1/2) – efluente diluído de 1/2), juntamente com o meio <i>Bristol</i> não esterilizado. ....	47
Fig. 37 – Perfis de ácidos gordos das amostras do ensaio com a <i>S. obliquus</i> e os efluentes avícolas <i>bruto</i> (AB – efluente <i>tal e qual</i> ; AB (Cent) – efluente após centrifugação; AB (pós-EC) – efluente após electrocoagulação) e <i>floculado</i> (AF – efluente <i>tal e qual</i> ; AF (1/2) – efluente diluído de 1/2), juntamente com o meio <i>Bristol</i> não esterilizado. ....	48
Fig. 38 – Curvas de crescimento, em termos de DO, da <i>S. obliquus</i> nos efluentes avícolas <i>floculado</i> (AF (1/2)) e <i>bruto</i> (AB) e em meio <i>Bristol</i> , sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs). ....	49
Fig. 39 – Variação do peso seco das culturas nos ensaios com efluentes avícolas <i>bruto</i> (AB) e <i>floculado</i> (AF (1/2)), e em meio <i>Bristol</i> , sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs). ....	49
Fig. 40 – Curva de crescimento relativa ao peso seco das culturas nos ensaios com o efluente avícolas <i>bruto</i> (AB) e <i>floculado</i> (AF (1/2)), e em meio <i>Bristol</i> , sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs). ....	49
Fig. 41 – Taxa média e máxima diária de crescimento relativa aos valores de absorvância das culturas com o efluente avícola <i>bruto</i> (AB) e <i>floculado</i> (AF (1/2)) e o meio sintético <i>Bristol</i> , sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).....	50
Fig. 42 – Taxa média e máxima diária de crescimento relativa aos valores de peso seco das culturas com o efluente avícola <i>bruto</i> (AB) e <i>floculado</i> (AF (1/2)) e o meio sintético <i>Bristol</i> sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).....	50
Fig. 43 – Produtividade média e máxima diária das culturas com o efluente avícola <i>bruto</i> (AB) e <i>floculado</i> (AF (1/2)) e o meio sintético <i>Bristol</i> , sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs). ....	51
Fig. 44 – Amostra 30 minutos após 15 minutos de EC (esquerda) e após uma noite na câmara frigorífica (direita).....	51
Fig. 45 – Resultado da EC durante 1, 5, 10 e 15 minutos (da esquerda para a direita). Adaptado de [47]. ....	52
Fig. 46 – Perfis de ácidos gordos existentes nas amostras do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação (fluorescente vs. LED) no crescimento da <i>S. obliquus</i> (AF (1/2) – efluente avícola <i>floculado</i> com diluição 1/2; AB – efluente avícola <i>bruto</i> sem diluição). ....	53
Fig. 47 – Teor do ião amónio do sobrenadante ao longo do ensaio, nas duas iluminações estudadas. ....	55
Fig. 48 – Curva de crescimento, relativamente à absorvância (a) e ao peso seco (b), das culturas com os efluentes avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> ) e porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> ), iluminadas com lâmpadas fluorescentes (e adição de CO <sub>2</sub> ). ....	57
Fig. 49 – Variação do pH das culturas com os efluentes avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> ) e porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> ) no ensaio com adição de CO <sub>2</sub> e iluminação fluorescente. ....	57
Fig. 50 – (a) Taxa média e máxima diária de crescimento e (b) Produtividade média e máxima diária das amostras do ensaio para estudar o efeito da adição de CO <sub>2</sub> ao fluxo de ar de agitação, associadas ao peso seco.....	58
Fig. 51 – Perfil de ácidos gordos das amostras do ensaio realizado na presença de 5% de CO <sub>2</sub> , sob iluminação fluorescente.....	59
Fig. 52 – Variação do teor do ião amónio das culturas sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO <sub>2</sub> . ....	60

Fig. 53 – Curva de crescimento das culturas sujeitas a iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>, AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>, relativamente à absorvância..... 61

Fig. 54 – Variação do pH das culturas sob iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>; AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>. ..... 62

Fig. 55 – Curva logarítmica do peso seco das amostras sujeitas a iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>; AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>. ..... 62

Fig. 56 – Perfil de ácidos gordos das amostras com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto*, com e sem a adição de CO<sub>2</sub>, sob iluminação fluorescente. .... 62

Fig. 57 – Tratamento biológico da *S. obliquus* sobre os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto* (com e sem a adição de CO<sub>2</sub>) sob iluminação fluorescente..... 63

Fig. 58 – Meio de cultura avícola *floculado* cultivado com iluminação fluorescente após 15 minutos de EC ( $i \approx 1,92 \text{ mA/cm}^2$ ) (esquerda) e quantidade de meio após-EC sujeito a posterior centrifugação (direita). ..... 65

Fig. 59 – Variação da eficiência de recuperação da biomassa de *Nannochloropsis* sp. com o tempo de operação (tempos de repouso de 30 min e 24 h). Fonte: [47]..... 66

Fig. 60 – Esquema ilustrativo (esquerda) do secador solar SECMAD (direita). Fonte: [89]..... 67

Fig. 61 – Consumos energéticos de algumas etapas da cadeia de valor da *S. obliquus*. ..... 67

Fig. 62 – Ampliação da altura a partir da qual o nível do ião amónio cumpre o requisito legal imposto no DL n°236/98 de 1 de agosto, no ensaio com adição de CO<sub>2</sub> às culturas com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto*, sujeitas a iluminação fluorescente. .... 81

Fig. 63 – Ampliação do momento a partir do qual o nível do ião amónio se tornou legal de acordo com o DL n°236/98 de 1 de agosto, nas culturas com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto* (com e sem a adição de CO<sub>2</sub>) sob iluminação fluorescente..... 81



## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Incorporação obrigatória de biocombustíveis, em teor energético, em Portugal. Fonte: [28].	7
Tabela 2 – Alguns parâmetros de avaliação da qualidade do biodiesel, segundo a EN 14214 (2012). Adaptado de: [29].	8
Tabela 3 – Comparação de várias matérias-primas para a produção de biodiesel. Fontes: [35], [6].	10
Tabela 4 – Valores limite de emissão para a descarga de águas residuais. Fonte: [70].	14
Tabela 5 – Composição das microalgas estudadas em % (m/m).	21
Tabela 6 – Composição do meio sintético <i>Bristol</i> .	23
Tabela 7 – Fatores de multiplicação de cada éster metílico. Adaptada de [136].	37
Tabela 8 – Teor de sólidos dos efluentes avícola <i>bruto</i> , avícola <i>floculado</i> e porco <i>bruto</i> .	40
Tabela 9 – Conteúdo inicial de NH <sub>4</sub> -N, PO <sub>4</sub> -P, e NO <sub>3</sub> -N dos efluentes avícola <i>bruto</i> e avícola <i>floculado</i> .	40
Tabela 10 – Conteúdo de CQO, de azoto total e amoniacal e de fósforo no efluente de porco <i>bruto</i> .	41
Tabela 11 – Teor de ésteres metílicos de ácidos gordos na biomassa de <i>S. obliquus</i> , produzida em meio <i>Bristol</i> esterilizado.	45
Tabela 12 – Valores iniciais e finais do teor de ião amónio.	46
Tabela 13 – Valores iniciais e finais das absorvâncias [A] das amostras com efluente avícola ( <i>floculado</i> – AF (1/2) e <i>bruto</i> (AB)) sob os dois tipos de iluminação (fluorescente e LED) e eficiências de recuperação da biomassa microalgal.	52
Tabela 14 – Distribuição dos ácidos gordos identificados por cromatografia gasosa na biomassa do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação (fluorescente vs. LED) no crescimento da <i>S. obliquus</i> (AF (1/2) – efluente avícola <i>floculado</i> com diluição 1/2; AB – efluente avícola <i>bruto</i> sem diluição).	54
Tabela 15 – Quantidade de açúcares totais presentes na biomassa do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação no crescimento da <i>S. obliquus</i> .	54
Tabela 16 – Quantidades iniciais e finais de ião amónio [mg/L] presente no sobrenadante das culturas sujeitas aos dois tipos de iluminação com efluente <i>floculado</i> (AF (1/2)) e <i>bruto</i> (AB), da indústria avícola. Eficiência do tratamento biológico da <i>S. obliquus</i> nos efluentes.	56
Tabela 17 – Quantidades iniciais e finais de fosfatos [mg/L] presentes no sobrenadante das culturas sujeitas aos dois tipos de iluminação com efluente <i>floculado</i> (AF (1/2)) e <i>bruto</i> (AB), da indústria avícola. Eficiência do tratamento biológico da <i>S. obliquus</i> nos efluentes.	56
Tabela 18 – Distribuição dos ácidos gordos na biomassa produzida e matéria saponificável existente na mesma. Ensaio realizado na presença de 5% de CO <sub>2</sub> .	59
Tabela 19 – Quantidade de açúcares totais existentes na biomassa do ensaio realizado na presença de 5% de CO <sub>2</sub> , sob iluminação fluorescente.	59
Tabela 20 – Quantidades iniciais e finais de ião amónio [mg/L] presente no sobrenadante das culturas com efluente avícola <i>bruto</i> e porco <i>bruto</i> sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO <sub>2</sub> . Eficiência do tratamento biológico da <i>S. obliquus</i> nesses meios de cultura.	60
Tabela 21 – Quantidades iniciais e finais de ião fosfato [mg/L] presentes no sobrenadante das culturas com efluente avícola <i>bruto</i> e porco <i>bruto</i> sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO <sub>2</sub> . Eficiência do tratamento biológico da <i>S. obliquus</i> nesses meios de cultura.	60
Tabela 22 – Eficiência do tratamento biológico da <i>S. obliquus</i> nos efluentes avícola <i>bruto</i> e porco <i>bruto</i> , com e sem a adição de 5% de CO <sub>2</sub> . As culturas foram sujeitas a iluminação fluorescente.	63
Tabela 23 – Biomassa produzida, matéria saponificável, quantidade de açúcares totais presentes na biomassa produzida e Índice de iodo (teórico) de cada amostra dos ensaios com e sem a adição de CO <sub>2</sub> .	64
Tabela 24 – Composição da solução de elementos-traço.	79

Tabela 25 – Meio de conservação <i>Chlorella</i> .....	79
Tabela 26 – Meio de conservação <i>Neochloris oleoabundans</i> , correspondente ao meio <i>Bristol</i> . 79	
Tabela 27 – Meio de conservação <i>Spirogyra</i> .....	79
Tabela 28 – Consumos energéticos de alguns equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental. Fontes: [150], [151].....	80

## Simbologia e Notações

AB	Efluente avícola <i>bruto</i>
AF	Efluente avícola <i>floculado</i>
CQO	Carência química de oxigénio
DHA	Ácido docosahexaenóico
DL	Decreto-Lei
DO	Densidade ótica
EC	Eletrocoagulação
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FAME	Éster metílico de ácido gordo ( <i>Fatty acid methyl ester</i> )
FER	Fonte de energia renovável
GEE	Gás de efeito de estufa
I&D	Investigação & Desenvolvimento
LCA	Análise de ciclo de vida ( <i>Lifecycle analysis</i> )
LED	Díodo emissor de luz ( <i>Light emitting diode</i> )
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
n.d.	Não detetado
OAU	Óleo alimentar usado
PB	Efluente de porco <i>bruto</i>
ps	Peso seco
PUFA	Ácido gordo polinsaturado ( <i>Polyunsaturated fatty acid</i> )
SD	Desvio padrão ( <i>Standard deviation</i> )
SECMAD	Secador solar construído no LNEG
SFE	Extração por fluidos supercríticos ( <i>Supercritic Fluid Extraction</i> )
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
SV	Sólidos Voláteis
tep	Toneladas equivalentes de petróleo
TOC	Carbono Orgânico Total ( <i>Total organic carbon</i> )
UE	União Europeia
VLE	Valor limite de emissão



## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1. Introdução e objetivos

Nas últimas décadas, os combustíveis fósseis tornaram-se parte integrante da sociedade. São incinerados para produzir energia para os transportes e para gerar eletricidade, fundamentais na melhoria da qualidade de vida, bem como no progressivo desenvolvimento tecnológico a que se tem assistido. No entanto, são combustíveis considerados não-renováveis à escala de vida humana, pelo que o seu fornecimento é limitado [1]. Para além disso, os maiores produtores são normalmente países de grande instabilidade política, o que compromete a segurança do abastecimento [2]. Levantam também inúmeras questões ambientais, como a emissão dos GEE (Gases de Efeito de Estufa) decorrentes da sua queima (principalmente o CO<sub>2</sub> [3]), que contribuem para o aquecimento global e todas as inerentes consequências [1].

Segundo Bilanovic *et al.* (2009), as alterações climáticas estão associadas ao aumento da temperatura média global, a perturbações nos regimes de precipitação e na sua distribuição geográfica, à consequente redução da produção agrícola, ao derretimento dos glaciares, ao aumento do nível médio das águas do mar, à extinção de espécies e a outros problemas ambientais que só serão visíveis no futuro [4].

Devido ao crescimento da população mundial, à melhoria do seu nível de vida e à rápida industrialização, principalmente em algumas zonas do globo, uma grave crise energética começa a instalar-se, pelo que a procura de fontes energéticas mais *limpas* e renováveis poder-se-á tornar no maior desafio deste século. Dessa forma, pretende-se estimular o desenvolvimento de um futuro energeticamente sustentável [1].

Com a necessidade urgente de reduzir as emissões de GEE para a atmosfera e devido à limitação iminente dos combustíveis convencionais, os biocombustíveis parecem ser a fonte energética alternativa mais viável [5]. Comparativamente às outras fontes renováveis de energia, os biocombustíveis podem ser armazenados, transportados [5] e usados em veículos com poucas ou nenhuma alteração; podem ser misturados com os combustíveis tradicionais ou substituí-los [6]. É considerado que possam vir a promover o desenvolvimento de zonas rurais, reduzir as emissões dos GEE, substituir os combustíveis fósseis, incrementar a descarbonização do sector dos transportes e aumentar a segurança do abastecimento de energia [6].

Na União Europeia, o principal biocombustível produzido é o biodiesel – maioritariamente a partir de soja ou colza, ambas culturas importantes na indústria alimentar. Contudo, as culturas alimentícias não são a única fonte de óleos ou lípidos; existem outras matérias-primas, como algumas culturas não alimentares, as gorduras animais ou as microalgas. No caso das microalgas, estas contêm teores de óleo muito superiores a qualquer outra planta terrestre, para além da ampla gama de produtos de elevado valor comercial passíveis de serem extraídos destes microrganismos.

É a partir desta premissa que surge o presente trabalho, cujo propósito foi a produção o mais económica- e ambientalmente sustentável possível de biomassa microalgal, de forma a usufruir de todos os co-produtos presentes. A parte principal do trabalho laboratorial consistiu na execução de vários ensaios de crescimento microalgal com diferentes condições operacionais que pretendiam otimizar uma produção mais sustentável. Essas condições operacionais compreendiam o uso de efluentes industriais de características distintas, bem como a utilização de diferentes fontes de iluminação (lâmpadas fluorescentes *vs.* LED) e o uso de CO<sub>2</sub> como nutriente adicional para o crescimento das microalgas. Para além destes fatores, foram analisadas várias metodologias de colheita e secagem e procedeu-se à análise da composição da biomassa; o objetivo final foi a escolha da melhor estratégia de produção, combinada com as melhores metodologias e produtos a extrair, de modo a tornar o processo global mais económico e ambientalmente favorável.

## **1.2. Estrutura da dissertação**

Esta dissertação está dividida em seis capítulos, cujo resumo será descrito de seguida.

No presente capítulo (Capítulo 1 – Introdução), encontra-se uma breve introdução aos temas estudados ao longo da realização da dissertação e dos objetivos a alcançar;

No Capítulo 2 – Enquadramento energético, apresenta-se a revisão da literatura sobre os temas-base abordados ao longo da dissertação, incluindo o enquadramento energético mundial e o panorama português relativo ao consumo de energia, algumas características referentes aos biocombustíveis (biodiesel, principalmente) e as normas europeias/portuguesas que regulam o mercado dos mesmos;

No Capítulo 3 – Microalgas, analisa-se ao pormenor toda a cadeia de valor associada às microalgas, que começa no seu crescimento e culmina no aproveitamento da biomassa produzida para diversos fins. Descrevem-se as principais etapas estudadas na parte experimental (meios de cultivo, colheita, secagem, extração dos produtos derivados das microalgas e seu aproveitamento), para que se possam comparar os resultados obtidos com os existentes na literatura;

No Capítulo 4 – Materiais e Métodos, relata-se detalhadamente os materiais e procedimentos usados na parte experimental da dissertação;

No Capítulo 5 – Resultados e Discussão, apresentam-se os resultados alcançados a partir do trabalho experimental e conduz-se à comparação de alguns fatores com os obtidos após estudos similares encontrados na literatura;

Finalmente, no Capítulo 6 – Conclusões e Desenvolvimentos Futuros, sintetizam-se as principais conclusões retiradas deste trabalho e apresentam-se também algumas propostas de trabalhos futuros, para que se dê continuidade à investigação e desenvolvimento inerentes ao tema.

## Capítulo 2 – Enquadramento energético

Antes de iniciar a pesquisa bibliográfica relativa ao tema-base deste trabalho, é necessário abordar certos aspetos igualmente importantes, sem os quais não seria possível entender a atenção dada atualmente às microalgas como matéria-prima para a produção não só de biodiesel, como também dos outros co-produtos de elevado valor que delas advêm.

Neste capítulo será analisado o panorama energético (mundial e europeu) e aspetos gerais relacionados com o tema dos biocombustíveis (particularmente o biodiesel), como a preocupação relativa à procura de energias alternativas e a legislação existente na UE, que Portugal tem por base. Serão também analisadas as características principais do biodiesel e as origens deste biocombustível.

### 2.1. Panorama mundial e europeu

Em 2014, o consumo de energia primária mundial foi de 12 928,4 Mtep [7]. Os combustíveis fósseis providenciaram 86,3% dessa energia (sendo os principais combustíveis o petróleo (32,6%), o carvão (30%) e o gás natural (23,7%)). A energia nuclear produziu 4,44% da energia consumida e as energias renováveis – incluindo a hídrica – 9,25% [7]. Esta tendência para o consumo de combustíveis fósseis não é recente, e com os avanços tecnológicos referentes à exploração de reservas não convencionais (de gás natural, por exemplo), foi estimado, em 2014, que os combustíveis fósseis ainda continuam disponíveis durante um período considerável de tempo (110, 54 e 53 anos para carvão, gás natural e petróleo, respetivamente [7]), permanecendo os pilares do panorama energético mundial. Na Fig. 1 encontra-se o crescimento do consumo de energia primária por fonte energética, desde 1965, fazendo-se também uma projeção até 2035 [8].

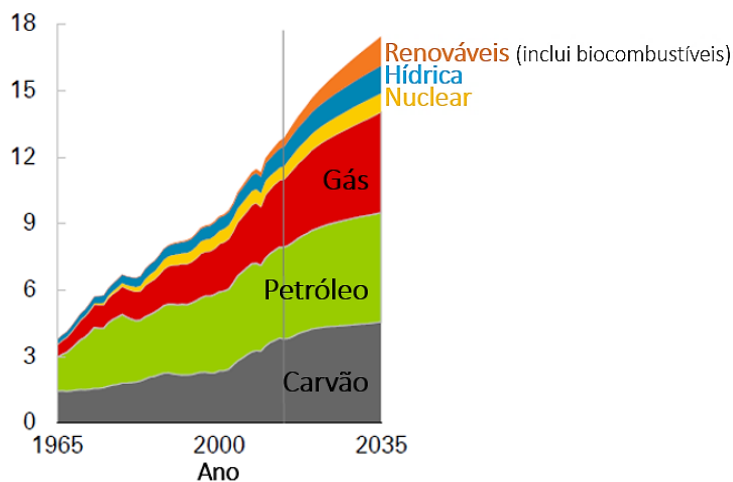


Fig. 1 – Consumo energia primária mundial, por fonte. Valores em mil milhões de tep. Adaptado de [8].

O consumo de energia final por sector evidencia a importância da mudança para combustíveis mais *limpos*, uma vez que o sector dos transportes representou, em 2013, cerca de 32% da energia final consumida na UE-28 [9] (cf. Fig. 2 (a)).

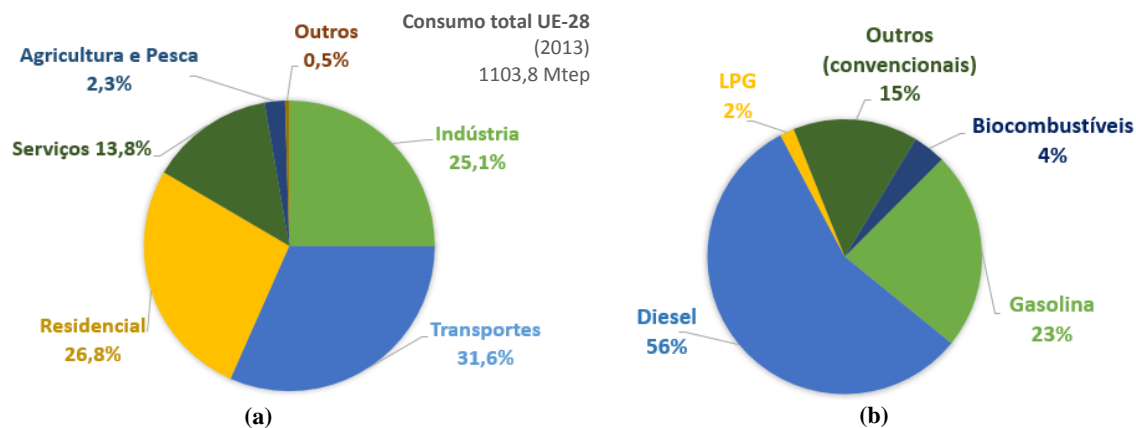


Fig. 2 – (a) Consumo de energia final, por sector; (b) Consumo final de cada combustível no sector dos transportes. Dados da UE-28 em 2013. Adaptados de [9].

Dentro do sector dos transportes, pode também ser feita a repartição entre os tipos de combustíveis usados na UE-28, como se ilustra na Fig. 2 (b). Atualmente, a frota de veículos europeus usa maioritariamente gasóleo, o que não acontecia em 1995, onde o consumo de *diesel* e de gasolina era praticamente igual [9].

Quanto aos biocombustíveis mais utilizados na UE-28, pode verificar-se na Fig. 3 que cerca de 80% do mercado dos biocombustíveis é dominado pelo biodiesel, o que comprova o maior investimento da União Europeia em tecnologias de produção do mesmo.

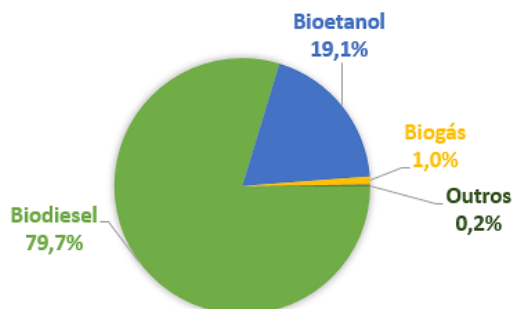


Fig. 3 – Consumo de biocombustíveis para os transportes em 2014 na UE. Adaptado de [10].

Ao contrário do que se passa na UE, a frota automóvel nos EUA ou no Brasil, por exemplo, é dominada por veículos a gasolina, pelo que nesses países o principal biocombustível produzido é o bioetanol, como se pode verificar na Fig. 4. O bioetanol é maioritariamente produzido utilizando culturas de 1ª geração como o milho ou a cana-de-açúcar, nos EUA e no Brasil, respetivamente [11].

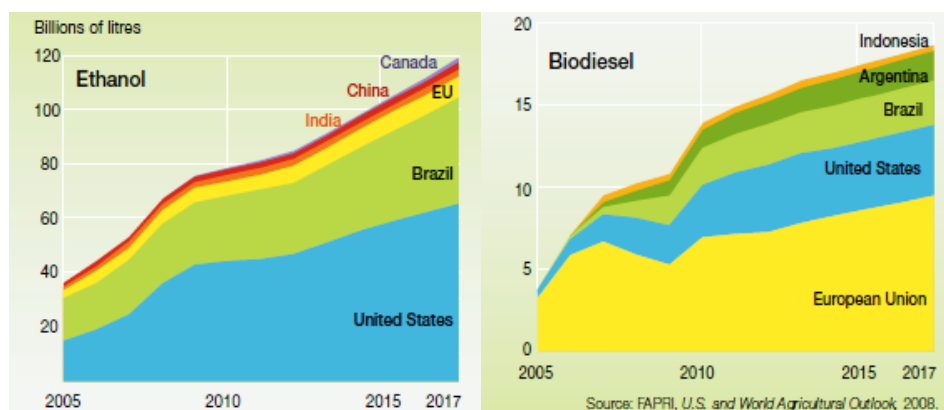


Fig. 4 – Produção de bioetanol e biodiesel. Estimativas até 2017. Fonte: [11].

Relativamente ao consumo de energia final em Portugal, pode verificar-se na Fig. 5 que as energias renováveis contribuíram, em 2014, em cerca de 30% do consumo português. Dessa percentagem, 45% corresponde à biomassa e 6% ao consumo de biocombustíveis [12]. Excluindo a biomassa, as maiores fatias de energia consumida provêm da energia hídrica e eólica, duas fontes energéticas renováveis que têm vindo, na última década, a cimentar a sua posição como base do *mix* energético português, sendo as maiores contribuições para atingir as metas de incorporação de FER na produção de eletricidade, por exemplo [13].

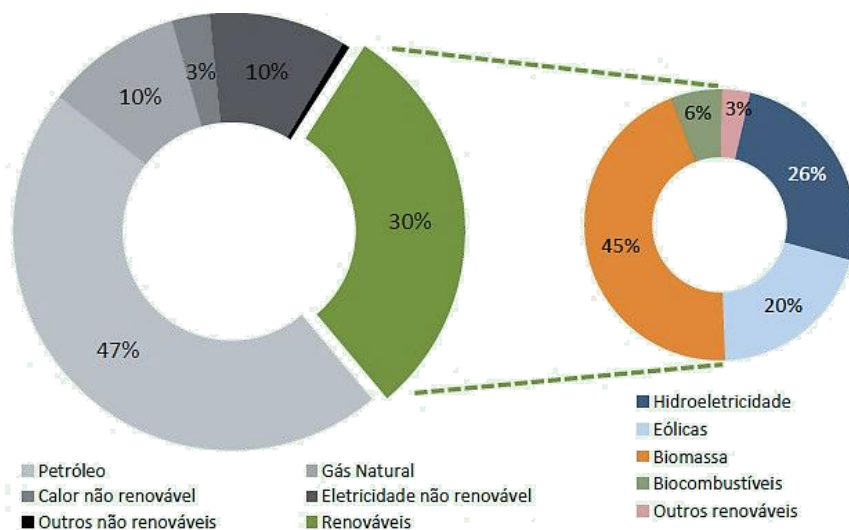


Fig. 5 – Consumo de energia final em Portugal (2014). Fonte: [12].

Portugal segue a mesma tendência que a UE, tendo tido, em 2013, um consumo de energia final destinado aos transportes de 40,5%. Dessa percentagem, 61,7% corresponde a um consumo de gásóleo/gás e 18,9% de gasolina. No mesmo período, o consumo nacional de biocombustíveis foi de 264 ktep (maioritariamente biodiesel – 96,6%) [9].

Como já foi referido, associado ao uso dos combustíveis fósseis está o aumento das emissões de gases poluentes, como o CO<sub>2</sub>, com efeitos nefastos para o ambiente. Verifica-se que desde a década de 70 tem havido um aumento constante das emissões deste GEE, com a intervenção do carvão e do petróleo como principais poluentes [14]. A queima de combustíveis fósseis ocorre maioritariamente nos sectores da energia (onde se inclui a produção e transformação de energia), da indústria e dos transportes; em Portugal, em 2012, estes sectores foram os maiores emissores dos principais GEE (25,3%, 10,9% e 24,7%, respetivamente) [13].

O aumento das emissões de origem antropogénica de CO<sub>2</sub>, devido à utilização em grande escala dos combustíveis convencionais em sectores como o dos transportes e da indústria, tem sido importante no desenvolvimento de técnicas e políticas de redução das emissões de GEE, de forma a minimizar os impactos negativos das alterações climáticas [15]. A implementação do Protocolo de Quioto (1997) foi uma dessas políticas. Outras estratégias passam pelo aumento da eficiência energética de processos ou serviços, do aumento do uso de *energia fóssil limpa* (aumentando o uso desses combustíveis agregado a técnicas de separação de CO<sub>2</sub> e da sua injeção para reservatórios subterrâneos) e também do incremento na utilização de energias renováveis [16]. Dentro das energias renováveis, prevê-se que os biocombustíveis sejam a opção mais viável para a progressiva diminuição do consumo dos combustíveis convencionais, uma vez que constituem uma alternativa sustentável para a sua substituição [1], sem a necessidade de alteração de infraestruturas.

## 2.2. Biocombustíveis

Segundo Nigam & Singh (2011), os biocombustíveis são definidos como os combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos que derivam de matéria orgânica. Dividem-se em biocombustíveis primários e secundários, sendo que os primários são usados de uma forma não-processada para cozinhar, aquecer e para a geração de eletricidade (madeira e resíduos florestais, por exemplo). Já os biocombustíveis secundários são categorizados em três gerações, diferindo entre cada uma delas parâmetros como a tecnologia de processamento, o tipo de matéria-prima e o seu nível de desenvolvimento [17].

As culturas alimentícias são o maior exemplo quanto à produção de biocombustíveis de 1ª geração. Podem ser divididas em três categorias: as culturas de açúcar (cana-de-açúcar, beterraba), de amido (milho, trigo) e as oleaginosas (soja, colza, girassol). São culturas muito conhecidas, mas a sua exploração para produção de biocombustíveis acarreta muitos problemas, como o facto de terem um ciclo de crescimento longo e de serem necessárias grandes áreas de terra arável para o seu cultivo, e também a competição com a sua produção para fins alimentares [18]. São culturas que usam grandes quantidades de fertilizantes, pesticidas e água para irrigação, o que contribui para problemas ambientais [19]. Segundo Wang (2013), o facto de se produzir biocombustíveis de 1ª geração poderia resolver a “crise energética” a partir da implementação de uma “crise alimentar” [18].

No caso dos biocombustíveis de 2ª geração, onde são utilizadas culturas lenhocelulósicas [18] (que contêm celulose, hemicelulose e lenhina [20]), o problema da competição com a agricultura tradicional já não se faz sentir, uma vez que são aproveitadas todas as partes das plantas não usadas na indústria alimentar, bem como resíduos da agricultura, de limpeza de florestas, da indústria da madeira (folhas, ramos, palha) [21], cascas de sementes ou resíduos orgânicos, por exemplo [22], principalmente para a produção de bioetanol [17]. Contudo, e apesar dos preços mais baixos das matérias-primas lenhocelulósicas e do alto teor de celulose que nelas existe, o custo de produção de biocombustíveis de 2ª geração é ainda muito elevado [23]. É também estudado o uso de algumas plantas não comestíveis para a produção de biodiesel, como a *jatropha*, a mamona ou o cardo, dado terem teores de óleo nas suas sementes na ordem de grandeza dos existentes nas culturas alimentares, com a vantagem de poderem ser cultivadas em terrenos marginais e de serem de fácil propagação [24]. Para além destas culturas, podem ser também usados óleos alimentares usados (OAU) e gorduras animais como matéria-prima para a produção de biodiesel de 2ª geração.

É então nesta perspetiva que surgem os biocombustíveis de 3ª geração, cuja matéria-prima é liderada pelas microalgas, pelo seu alto conteúdo em óleos e/ou açúcares, entre outros compostos de alto valor. Como será analisado no Capítulo 3 – Microalgas, estes organismos têm grande capacidade de absorção de carbono (atmosférico ou de fontes poluentes), possuem elevadas taxas de crescimento e requerem condições de crescimento simples [18]. O óleo extraído das microalgas pode ser convertido em biodiesel e os hidratos de carbono que contêm podem ser utilizados como fonte de carbono ou como substrato para a fermentação [25], produzindo assim bioetanol. Outra das vantagens do cultivo de microalgas é a diminuição drástica na área de terreno arável necessária para as produzir e o consumo de água potável [18], que não é obrigatório, uma vez que se podem usar águas salobras, salinas ou até mesmo efluentes de várias origens.

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres de ácidos gordos obtida por transesterificação de óleos ou gorduras, que têm origem animal ou vegetal, e são compostos por 90-98% de triglicéridos, pequenas quantidades de mono- e diglicéridos, ácidos gordos livres e quantidades vestigiais de fosfolípidos, fosfatídeos, carotenóides, tocoferóis, compostos sulfurosos e água [26]. Comparativamente ao *diesel* fóssil, é um combustível não-tóxico, biodegradável e associado a menores emissões de GEE [27].

Juntamente com o bioetanol, o biodiesel faz parte dos biocombustíveis mais produzidos mundialmente, como se verifica na Fig. 6, onde estão indicados os maiores produtores de cada

região, em 2014. A utilização de matérias-primas de 2ª ou 3ª geração permite também a produção de outros biocombustíveis, nomeadamente o biogás (biometano) e o biohidrogénio.

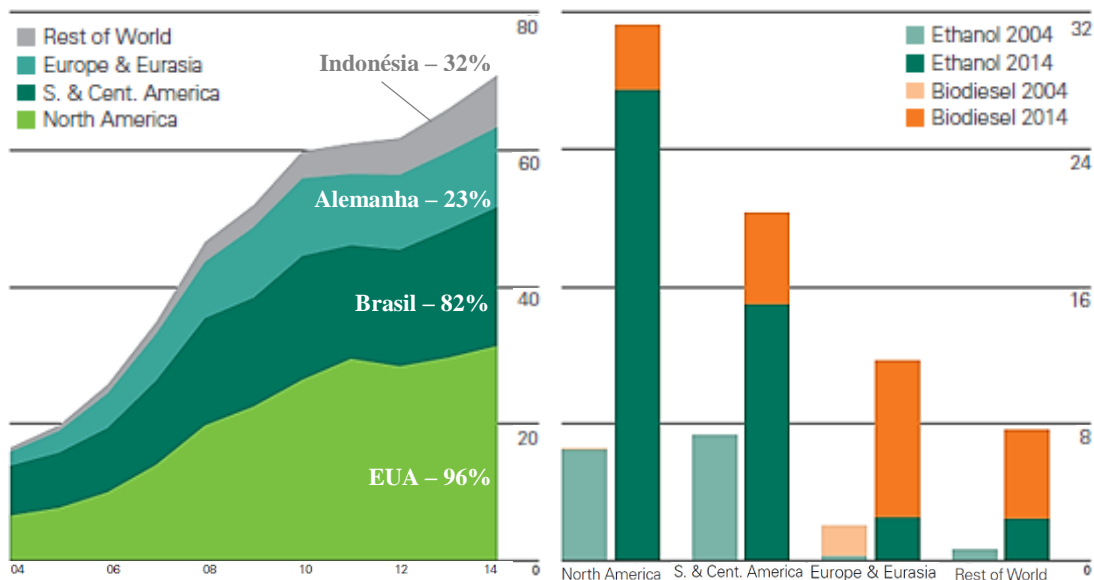


Fig. 6 – Produção mundial de biocombustíveis entre 2004 e 2014. Valores em Mtep. Fonte: [7].

De forma a normalizar os procedimentos relacionados com a incorporação de biodiesel e de bioetanol no gasóleo e na gasolina convencionais, respetivamente, a UE tem vindo a criar metas na última década, que fazem com que todos os países integrantes possam cumprir a legislação referente ao consumo de biocombustíveis na frota rodoviária e obter benefícios com a produção dos mesmos.

Em Portugal, a preocupação em aumentar progressivamente o uso de biocombustíveis começou em 2006, com o enquadramento do Decreto-Lei nº 62/2006 de 21 de março, que consistiu na transposição para a ordem jurídica nacional da chamada *Diretiva dos biocombustíveis* (Diretiva nº 2003/30/CE), publicada pela União Europeia. O objetivo deste DL foi criar mecanismos para promover a colocação no mercado de quotas mínimas de biocombustíveis, em substituição dos combustíveis fósseis, regulamentar a produção e comercialização dos biocombustíveis e estabelecer condições favoráveis para pequenos produtores dedicados [28].

O DL nº 117/2010 transpôs para o caso português as diretivas 2009/28/CE e 2009/30/CE; estabeleceu os critérios de sustentabilidade para a produção e utilização de biocombustíveis e biolíquidos e definiu os limites de incorporação obrigatória de biocombustíveis para o período entre 2011 e 2020, como se verifica na Tabela 1. O mesmo Decreto-Lei estabeleceu que, a partir de 2015, começaria a ser obrigatória a incorporação de bioetanol na gasolina (2,5%) [28]. Visto que Portugal não produz atualmente este biocombustível, tem de o importar. A importação de bioetanol iniciou-se em 2011 e em 2015 (até outubro) foram incorporadas cerca de 18640 toneladas na gasolina convencional [12].

Tabela 1 – Incorporação obrigatória de biocombustíveis, em teor energético, em Portugal. Fonte: [28].

Anos	Incorporação de biocombustíveis (%)
2011-2012	5
2013-2014	5,5
2015-2016	7,5
2017-2018	9
2019-2020	10

Para que seja usado a 100% ou em mistura com o gasóleo tradicional, o biodiesel tem de respeitar as especificações descritas na norma europeia EN 14214 (2012). Os teores de ésteres metílicos e do éster metílico do ácido linolénico, o índice de iodo e o conteúdo de água são exemplos dos parâmetros que constam na referida norma de qualidade do biodiesel [29]. A Tabela 2 apresenta alguns parâmetros de qualidade desse biocombustível, os limites impostos na norma, o método de ensaio correspondente a cada um e uma pequena explicação do objetivo de cada análise.

Tabela 2 – Alguns parâmetros de avaliação da qualidade do biodiesel, segundo a EN 14214 (2012). Adaptado de: [29].

Parâmetro	Valor limite	Método de Ensaio	Nota
Ésteres metílicos	> 96,5 % (m/m)	EN 14103	Permite avaliar a pureza do biodiesel
Éster metílico do ácido linolénico	< 12 % (m/m)	EN 14103	Permite avaliar a presença do FAME C18:3, responsável pela corrosão e rutura de elastómeros
Ésteres metílicos polinsaturados	< 1 % (m/m)	EN 15779	Permite calcular a percentagem dos FAMES com 4 ou mais duplas ligações, que contribuem para a insaturação do biodiesel
Índice de acidez	< 0,50 mg KOH/g	EN 14104	Avalia a quantidade de ácidos gordos livres presente na amostra
Índice de iodo	< 120 g I <sub>2</sub> /100g	EN 14111	Avalia o grau de insaturação do biodiesel. Quanto maior for este valor, mais facilmente o biodiesel tenderá a degradar-se
Teor de água	< 500 mg/kg	EN ISO 12937	Um valor elevado pode provocar o aumento da acidez, por hidrólise dos FAME, influenciando a estabilidade do biodiesel [30]
Estabilidade à oxidação a 110°C	> 8 horas	EN 15751; EN 14112	Propriedade que afeta o biodiesel em períodos longos de armazenamento [31]. Pode comprometer a qualidade do biodiesel e o funcionamento dos motores de combustão [32]
Densidade a 15°C	860 < ρ < 900 kg/m <sup>3</sup>	EN ISO 3675; EN ISO 12185	Fator diretamente relacionado com a estrutura das moléculas do biodiesel. A presença de impurezas também poderá influenciar a densidade do biodiesel [33]
Índice de cetano	> 51	EN ISO 5165	Indica a capacidade do biodiesel para se autoinflamar quanto injetado num motor [34]

Neste trabalho será abordado em mais detalhe a produção de biodiesel, mas será também analisada a capacidade de produção de outros biocombustíveis, dependendo da composição das microalgas estudadas.

## Capítulo 3 – Microalgas

De modo a fazer face à constante procura de combustíveis principalmente por parte dos setores energético e dos transportes, a investigação científica tem incidido cada vez mais na procura de soluções renováveis e consequentemente mais *verdes* e sustentáveis. A utilização de várias espécies de microalgas, não só para a produção de biodiesel, mas também para a produção de co-produtos de alto valor acrescentado é um exemplo dessa preocupação de I&D.

### 3.1. Definição e características

As microalgas são microrganismos procarióticos ou eucarióticos capazes de se desenvolver rapidamente e de viver em condições não favoráveis para outros tipos de seres vivos. Isto deve-se principalmente ao facto de serem organismos unicelulares ou terem uma estrutura multicelular simples [6]. Apesar de utilizarem o mecanismo da fotossíntese como as plantas de maior porte, a conversão da energia solar que realizam é mais eficiente devido à sua estrutura celular simplificada [35], tendo eficiências 10 a 50 vezes superiores às plantas terrestres ([36], [37]). Para além disso, como crescem num meio aquoso, têm acesso mais facilitado e eficiente a água, CO<sub>2</sub> e outros nutrientes [35].

O interesse em usar estes microrganismos na área das energias renováveis começou a florescer nos anos 70 do séc. XX durante a primeira crise do petróleo, mas foi na década anterior, no Japão, que se implementou a primeira cultura em larga escala de *Chlorella* [38]. A volatilidade atual no preço do petróleo, juntamente com as projeções futuras de aumento desses mesmos preços, a preocupação ambiental para reduzir as emissões poluentes dos GEE e a instabilidade política dos países exportadores tem vindo a criar um novo interesse para produzir biodiesel a partir de microalgas; são cada vez mais as empresas empenhadas em produzir o chamado *algaol* ou *oilgae*. Atualmente essa produção não é economicamente comparável à extração do gásóleo fóssil sem qualquer subsídio estatal. Contudo, à medida que as reservas fósseis vão diminuindo e os preços vão aumentando, outras alternativas têm de ser estudadas e desenvolvidas, de modo a que possam ser implementadas num futuro próximo [6].

Como já foi mencionado, as microalgas podem servir de matéria-prima para a produção de diferentes tipos de biocombustíveis. O biodiesel microalgal, à semelhança do biodiesel de 1ª geração, não contém enxofre e pode ser utilizado como *diesel* convencional, reduzindo assim as emissões para a atmosfera de monóxido de carbono (CO), partículas, hidrocarbonetos e óxidos de enxofre (SO<sub>x</sub>). Contudo, as emissões de óxidos de azoto (NO<sub>x</sub>) podem ser mais elevadas quando se utiliza biodiesel [39]. A sua utilização pode também ter outros propósitos/vantagens, tais como a mitigação de CO<sub>2</sub> em gases de exaustão industriais (através da biofixação) ou o tratamento de efluentes (na eliminação principalmente de azoto e fósforo, mas também de metais pesados), processo conhecido como bioremediação [40]. Depois da extração dos lípidos, a biomassa microalgal pode servir como alimento para animais, ser usada como fertilizante agrícola, para a produção de biogás e biohidrogénio, ou simplesmente incinerada para que se gere energia em instalações de cogeração [15].

Como diferentes espécies de microalgas se adaptam a diferentes condições climáticas, é necessário encontrar a espécie mais indicada para crescer em áreas de características impróprias para a agricultura, não competindo assim com solos aráveis e, se possível, utilizando águas residuais, para que não seja usada água potável [6]. Atendendo ainda ao facto das microalgas necessitarem de menores quantidades de água comparativamente às culturas terrestres, o uso de água potável torna-se então limitado ou inexistente [41]. Para além destas vantagens, as microalgas possuem na sua composição compostos de valor acrescentado, como os ácidos gordos polinsaturados ( $\omega 3$  e/ou  $\omega 6$ ), pigmentos naturais, açúcares, lípidos, antioxidantes, compostos bioativos, proteínas e outros químicos de alto valor, podendo assim ser utilizadas em áreas tão

distintas como na indústria farmacêutica e cosmética, para aditivos nutricionais (*nutracêuticos*), em aquacultura e também para a prevenção da poluição ([37], [42], [43]). O cultivo de microalgas apresenta ainda a vantagem de decorrer durante todo o ano, sem a necessidade de herbicidas ou pesticidas, podendo a colheita ser diária, evitando custos de armazenamento, e apenas sendo necessários nutrientes simples facultados por águas residuais, por exemplo.

As microalgas são organismos com rápidas taxas de crescimento e produtividades, quando comparadas com outras culturas agrícolas para alimentação humana ou animal, ou até com algumas plantas aquáticas; por isso, necessitam de menos área de cultivo comparativamente a outras culturas que visam a produção de biodiesel [35]. Para atingir maiores produtividades, as microalgas podem sofrer modificações genéticas, facto que tem despertado alguma atenção, já que esses organismos transgénicos podem ser considerados ameaças para o ecossistema em que são inseridos [44]. Para que se potencie ao máximo o conteúdo em lípidos, é necessário avaliar o perfil genético de cada espécie e encaminhar o seu cultivo para as condições ótimas de crescimento/síntese lipídica. Para tal, existem diversos fatores passíveis de ser adaptados, capazes de interferir no aumento do teor de lípidos presente nas microalgas – principalmente de caráter nutricional (ex.: controlo dos níveis de azoto) e luminoso (ex.: LEDs vs. lâmpadas fluorescentes), assim como a temperatura, a salinidade, o pH e as concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> nas culturas.

Como consta na Tabela 3, o teor de óleo de cada cultura é bastante diverso, consoante a matéria-prima analisada. Segundo Chisti (2007), as microalgas com baixo teor de óleo (30% m/m), podem produzir cerca de 130 vezes mais óleo do que a soja, muito utilizada para a produção de biodiesel e 10 vezes mais do que a palma (de acordo com os dados da Tabela 3), que é considerada a oleaginosa mais eficiente para a produção de biodiesel de 1<sup>a</sup> geração [24]. A microalga *Nannochloropsis* sp. é um exemplo, uma vez que contém cerca de 28,7% m/m de óleo [45]. A produtividade em biodiesel é consequentemente muito diferente, podendo por isso atingir as 52 toneladas de biodiesel por hectare ([6], [35]). Quanto à área de terreno necessária para o cultivo da matéria-prima, pode verificar-se que as microalgas apenas requerem uma pequena fração de área comparativamente às culturas de 1<sup>a</sup> geração, podendo inclusivamente usar-se terrenos marginais impróprios para essas culturas.

Tabela 3 – Comparação de várias matérias-primas para a produção de biodiesel. Fontes: [35], [6].

Cultura	Teor de óleo [L óleo/ha.ano]	Área usada [m <sup>2</sup> /kg biodiesel]	Produtividade [kg biodiesel/ha]
Milho	172	66	152
Soja	446	18	562
<i>Jatropha</i>	1892	15	656
Colza	1190	12	862
Girassol	1070	11	946
Óleo de palma	5950	2	4747
Microalgas (baixo teor de óleo)	58700	0,2	51927
Microalgas (médio teor de óleo)	97800	0,1	86515
Microalgas (alto teor de óleo)	136900	0,1	121104

Apesar dos pontos positivos já mencionados, existem algumas desvantagens relativamente ao uso e cultivo das microalgas, relacionados com as suas características e com os processos de colheita e processamento da biomassa. A primeira desvantagem está relacionada com a baixa concentração de biomassa na cultura aquosa, que tipicamente se situa entre 1 e 5 g/L [37], o que torna a sua colheita indispensável e cara. Por outro lado, o cultivo em reservatórios abertos facilita a contaminação por predadores e a perda de água por evaporação, que pode até equiparar-se à perda das culturas terrestres [19]. Outro fator considerado não vantajoso é a instabilidade do biodiesel produzido a partir desta biomassa, aquando da presença de ácidos gordos polinsaturados na mesma [46]. Para além destes fatores, a produção em larga escala de microalgas acarreta grandes gastos energéticos para a colheita e secagem da biomassa. Este facto foi comprovado por Matos

*et al.* (2013), que verificaram que para realizar a colheita de biomassa microalgal, a combinação dos métodos de centrifugação e eletrocoagulação (EC) representava uma energia consumida cerca de 12 vezes menor do que o cenário onde só se procedia à centrifugação da cultura. A posterior secagem da biomassa depende da eficiência dos processos de colheita, pelo que os gastos com esta fase podem ser diminuídos se uma colheita eficiente for realizada [47].

É então fundamental o investimento no desenvolvimento científico, de modo a que novas técnicas mais económica- e energeticamente sustentáveis sejam colocadas em prática nas indústrias dos biocombustíveis e dos co- e subprodutos das microalgas.

### 3.2. Etapas da produção de biocombustível a partir de microalgas

A cadeia de valor das microalgas reflete todas as fases que culminam na utilização da biomassa microalgal, iniciando-se na produção em maior ou menor escala dos microrganismos e passando pelo processamento da sua biomassa. A Fig. 7 ilustra a cadeia de valor que inclui as várias etapas para o caso do biodiesel, e para cada etapa, algumas alternativas.

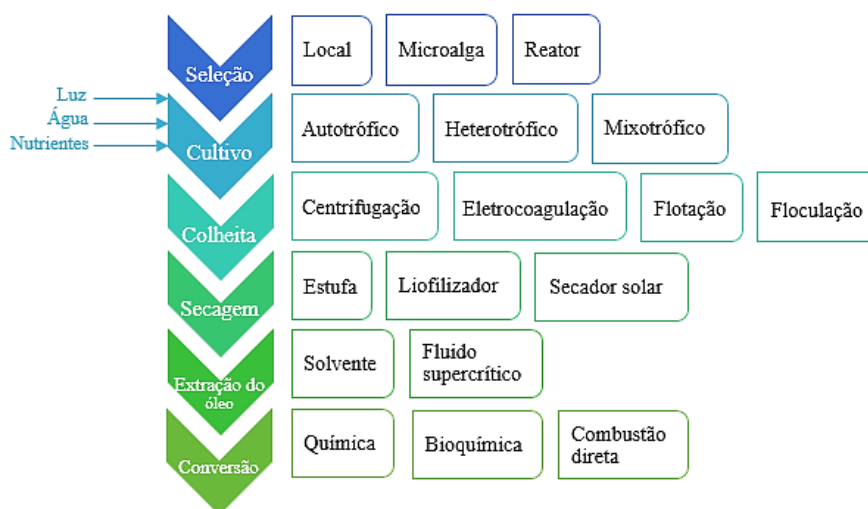


Fig. 7 – Cadeia de valor das microalgas. Adaptado de [48].

#### 3.2.1. Produção de biomassa microalgal

Sob condições naturais de crescimento, os microrganismos fototróficos, como as microalgas, absorvem a luz solar e assimilam o CO<sub>2</sub> da atmosfera e os nutrientes de que necessitam do *habitat* aquático que os rodeia. A produção de biomassa de forma artificial deve tentar replicar as condições naturais, de modo a que se potencie o crescimento das microalgas [41].

No entanto, estas condições otimizadas não se verificam durante todo o ano/dia, pelo que se torna necessário encontrar soluções que permitam alcançar maiores produtividades e produções mais constantes. A iluminação artificial é uma dessas soluções, bem como a utilização de águas residuais que contêm nutrientes ideais para o crescimento das microalgas, e a incorporação de unidades de crescimento em centros industriais emissores de CO<sub>2</sub> – que funciona como um “catalisador” do crescimento das microalgas. Os parâmetros abióticos de cultivo devem então ser estudados em pormenor, para que se maximize a qualidade – e quantidade – do produto final que se quer obter. Alguns exemplos desses parâmetros são os reatores onde as microalgas são cultivadas, a agitação da cultura, a iluminação (natural ou artificial), a temperatura, o pH, a salinidade e os nutrientes do meio de crescimento.

### 3.2.1.1. Reatores

Um sistema de cultivo de microalgas deve ser comercialmente apelativo. Para tal, deve ser capaz de originar altas produtividades em termos de área e volume, ser económico (relativamente ao investimento e manutenção), proporcionar o controlo fácil dos parâmetros de cultivo e ser fiável [49].

Existem vários tipos de reatores de diferentes características, que se dividem em duas categorias principais: os reatores abertos (reservatórios naturais ou artificiais) (Fig. 8 (a)) e os fotobioreatores fechados (FBRs – de tipo tubular (Fig. 8 (b)), coluna (Fig. 8 (c)) ou *flat plate* (Fig. 8 (d))). Os reservatórios abertos são relativamente mais baratos e de fácil manutenção e limpeza, mas o seu uso é limitado a algumas espécies de microalgas e necessitam de grandes áreas de implementação. Por estarem em contacto com o ar, as culturas podem ser facilmente contaminadas, o que dificilmente acontece com os FBRs, que têm maiores áreas de iluminação e podem também ser colocados sob a radiação solar. Dependendo do tipo escolhido, os fotobioreatores fechados podem ser de construção mais dispendiosa e sofisticada que os reatores abertos, e é normalmente mais difícil a implementação em larga escala [41].

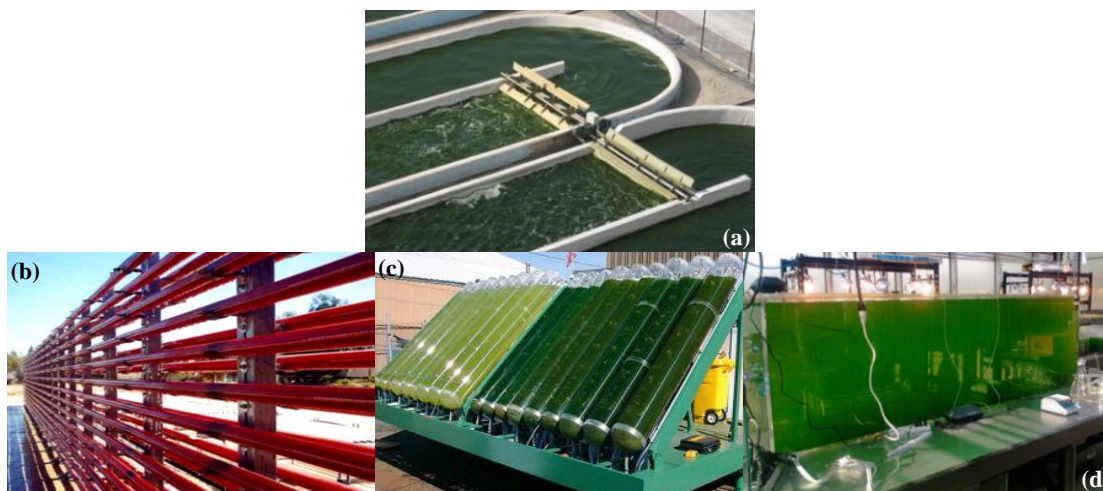


Fig. 8 – Exemplos de reatores para o cultivo de microalgas. Fontes: (a) [50], (b) [51], (c) [52], (d) [53].

Para que se maximize o potencial dos fotobioreatores, deve-se tentar combinar alguns parâmetros de *design* e de *scale-up*. Os parâmetros que influenciam mais na construção dos FBRs são a utilização eficiente de luz e de  $\text{CO}_2$ , a agitação mais adequada, o tipo de material de que é construído o FBR e o facto de se poder implementar em larga escala [40].

A luz é o fator mais limitante, podendo variar consoante a localização do sistema de cultivo e as condições meteorológicas. O ciclo natural dia/noite ou o ciclo imposto às culturas tem muita influência no crescimento e na composição da biomassa [40].

O nível de  $\text{CO}_2$  e a agitação são também fulcrais para o bom desenvolvimento da cultura microalgal. Valores abaixo ou acima do nível considerado ótimo podem inibir o crescimento das microalgas ou até levá-las à morte. Para que se amplie a escala do sistema de cultivo é usual proceder ao aumento do número de unidades individuais de produção – método dispendioso, já que se teria de incrementar na mesma medida o controlo individual dos fatores de cada unidade. Pode também aumentar-se o comprimento ou diâmetro das ditas unidades individuais e da luz que incide nos FBRs, caso em que deverá ser dada especial atenção ao material usado na construção dos mesmos, que deve ser duradouro, barato, não-tóxico, de fácil limpeza e o mais transparente possível [40].

### 3.2.1.2. Nutrientes

Segundo Mata *et al.* (2010), a produção de biodiesel e outros co-produtos a partir de microalgas pode ser economicamente rentável e ambientalmente sustentável se estiver associada a processos favoráveis a nível económico e ambiental, como a bioremediação de águas residuais e/ou a mitigação de CO<sub>2</sub> proveniente de gases de combustão industriais [6].

Neste subcapítulo serão abordados três aspetos relacionados com o carácter nutricional dos meios de crescimento das microalgas: a privação (propositada) de nutrientes nos mesmos, o uso de águas residuais e a utilização de CO<sub>2</sub> como nutriente adicional.

A produção de microalgas necessita de nutrientes simples, nomeadamente o azoto – sob a forma de iões nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) [1], amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – e o fósforo, na forma de orto-fosfatos [54]. A sílica é também considerada um elemento importante [55]. O azoto é tido como o elemento essencial, podendo ser assimilado diretamente do ar (sob a forma de NO<sub>x</sub>) ([56], [57]) ou proveniente de outra fonte como ureia [58] ou nitratos. A principal função do azoto (orgânico ou inorgânico) é a síntese de aminoácidos. O fósforo é usado para funções celulares (transferências de energia e a síntese de ácido nucleico) [59], e apesar de ser necessário em pequenas quantidades, tem de existir em excesso no meio de crescimento, uma vez que os iões fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) se ligam a iões metálicos e não estão por isso todos disponíveis [35]. A importância da sílica está relacionada com o crescimento de algumas espécies de algas, como as diatomáceas [60]. Para além destes três nutrientes principais, as microalgas necessitam de outros elementos, em menor quantidade, como sódio, potássio, enxofre e magnésio – considerados macronutrientes – e alguns micronutrientes, como ferro, cobre, cálcio, manganês, boro e zinco. O ferro é importante nos mecanismos de respiração, fotossíntese, síntese de ADN e na fixação de azoto, enquanto o enxofre é necessário para a síntese de proteínas e para o próprio crescimento microalgal [54].

A **limitação** de alguns **nutrientes** fundamentais leva à síntese de certos compostos (ex.: lípidos), optando-se muitas vezes por essa estratégia com o intuito de aumentar a sua produção, para que se beneficie completamente a cadeia de valor. O azoto, por exemplo, é preferido pelas microalgas quando está sob a forma de amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Se os três elementos (amónio, nitratos e nitritos) estiverem presentes no meio de crescimento, os microrganismos utilizarão primeiro o amónio (até à sua completa depleção), seguido dos nitratos e por fim os nitritos [61]. Apesar de o amónio ser o nutriente preferencial, o seu excesso pode prejudicar o crescimento microalgal, pelo que os nitratos são os mais usados no cultivo de microalgas [62]. A limitação deste nutriente pode fazer com que as células microalgais armazenem mais carbono e, assim, se produzam mais lípidos ou hidratos de carbono, dependendo da microalga ([63],[64]). Podem também ocorrer mudanças no teor de pigmentos existente nas células. Quando se pretende maximizar o teor de lípidos presentes na biomassa, é frequente adotar uma técnica de dois passos, onde as microalgas crescem com azoto suficiente até que uma quantidade significativa de biomassa seja produzida, seguido da privação desse mesmo elemento para acumular lípidos nas células das microalgas [65]. A limitação de fósforo pode também afetar a produção de biomassa. Como acontece com a privação de azoto, pode ocorrer um aumento na quantidade de lípidos ou hidratos de carbono produzidos e alterações na clorofila e nos carotenóides [66]. Uma deficiência na quantidade de sílica pode diminuir a capacidade fotossintética das células das diatomáceas, o que vai fazer cessar a síntese de proteínas, ADN e clorofila, por exemplo [54].

É usual recorrer-se a fertilizantes químicos para o cultivo de microalgas, uma vez que contêm os nutrientes fundamentais para o seu crescimento [1]. No entanto, uma análise de ciclo de vida (LCA) concluiu que o uso de fertilizantes não naturais corresponde a 50% do uso total de energia e das emissões de GEE [67], facto que torna cada vez mais inviável a utilização de fertilizantes de origem industrial no cultivo de microalgas.

Por isso, o uso de **águas residuais** para cultivar microalgas parece uma alternativa atraente do ponto de vista ambiental e económico, já que os nutrientes que contêm seriam usados como alimento para as microalgas, que por sua vez purificariam os efluentes [1]. As microalgas

conseguem realizar uma limpeza biológica, usando compostos orgânicos como o azoto e o fósforo disponíveis nas águas residuais industriais que não contêm metais pesados ou radioisótopos, prejudiciais aos microrganismos [6].

Como o uso de efluentes não é compatível com as culturas terrestres por conterem muitos nutrientes que se impregnariam facilmente no solo e causariam a eutrofização dos aquíferos superficiais [68], a utilização de efluentes (municipais, industriais ou da agricultura) é considerada parte da solução para amenizar a atual crise energética, utilizando águas residuais para a produção de biomassa microalgal e gerar assim bioenergias alternativas e renováveis [1]. Uma análise de ciclo de vida de Yang *et al.* (2011) avaliou o impacto ambiental do uso de água e nutrientes para a produção de biodiesel, e concluiu que para produzir 1 L de biodiesel seriam necessários 3726 kg de água, 0,33 kg de azoto e 0,71 kg de fosfatos. Nesta análise é referido que, se se reciclasse a água após a colheita da biomassa, se reduziria o uso de água e nutrientes em 84% e 55%, respetivamente. Por outro lado, se se usassem águas residuais, a necessidade de água reduziria para 90% e provavelmente não seriam precisos nutrientes adicionais [69].

As águas residuais são naturalmente ricas em material orgânico e inorgânico, sendo por isso necessário proceder ao seu tratamento para que possam ser libertadas, de forma a proteger as águas que as recebem de eutrofização e de acumulação de nutrientes indesejados. O azoto e o fósforo são os nutrientes básicos que necessitam ser removidos [59].

Em Portugal, existem requisitos relativos à descarga de águas residuais para o ambiente. São parâmetros definidos no Decreto-Lei nº236/98 de 1 de agosto e estabelecem valores limite de emissão (VLE) para a CQO, fósforo total, nitratos e azoto total (cf. Tabela 4), entre outros.

Tabela 4 – Valores limite de emissão para a descarga de águas residuais. Fonte: [70].

Parâmetro	VLE
Azoto amoniacal	10 mg/L NH <sub>4</sub>
Azoto total	15 mg/L N
Cheiro	Não detetável na diluição 1:20
Cor	Não detetável na diluição 1:20
CQO	150 mg/L O <sub>2</sub>
Fósforo total	10 mg/L P
Mercúrio total	0,05 mg/L Hg
Nitratos	50 mg/L NO <sub>3</sub>
pH	6,0 - 9,0

As águas residuais apresentam composições muito variadas, são suscetíveis à contaminação por parte de bactérias ou vírus e podem conter substâncias inibidoras do crescimento microalgal, fatores que podem limitar a produção de biomassa. É possível, então, ter de se concentrar ou diluir os efluentes utilizados, de modo a que os componentes em falta e/ou os inibidores correspondam aos níveis mais adequados para o crescimento microalgal [71]. Segundo Yang *et al.* (2011), o facto de se utilizar águas residuais pode não significar desconsiderar totalmente o uso de água potável, já que pode ser necessária para regularizar as perdas de água por evaporação dos reatores ou para diluir os efluentes de modo a possuírem um valor nutricional recomendável [69].

Neste trabalho será explorado o uso de efluentes industriais para o crescimento de microalgas, de forma a diminuir drasticamente o uso de água potável e reutilizar por completo um efluente considerado poluente, produzindo biomassa para fins energéticos.

O **carbono** é um elemento necessário para a síntese de moléculas orgânicas, como hidratos de carbono e lípidos [54]. As microalgas realizam a separação entre o CO<sub>2</sub> e os restantes gases da atmosfera de uma forma natural. Schenk *et al.* (2008) consideram que o armazenamento de CO<sub>2</sub> a longo prazo numa forma mais estável (ex.: biodiesel microalgal) poderia agregar a biomitigação desse GEE (quer o atmosférico, quer o emitido por centrais poluentes) e a produção de biocombustíveis *neutra* em CO<sub>2</sub> [19], não obstante o facto de ainda se poder integrar no processo

o tratamento de águas residuais. De acordo com Chisti (2007), ao produzir 1 kg de biomassa microalgal pode ser fixado 1,8 kg de CO<sub>2</sub> [35].

Estudos publicados indicam que as microalgas conseguem tolerar níveis de CO<sub>2</sub> mais de 400 vezes superiores ao que existe na atmosfera ([4], [72]) ( $\approx 0,036\%$ ). Torna-se por isso promissora a fixação de dióxido de carbono proveniente de gases de exaustão de centrais geradoras de energia, que podem conter mais de 15% de CO<sub>2</sub> na sua composição [73]. Contudo, é necessário proceder a uma escolha minuciosa da espécie de microalga a utilizar para que se realize a biofixação do CO<sub>2</sub>. Alguns dos parâmetros relevantes para essa escolha são as elevadas taxas de crescimento, a elevada tolerância a elementos existentes nos gases de combustão (por exemplo SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>), a facilidade na colheita da biomassa – analisando as características de sedimentação natural da espécie –, e a elevada tolerância à temperatura da água que arrefece os gases de exaustão. Outro fator importante é verificar se é possível a utilização da microalga em análise para a bioremediação de águas residuais. Não existe uma espécie que respeite todos estes parâmetros, mas algumas estirpes de microalgas têm apresentado resultados favoráveis, como a *Chlorella* sp., a *Chlorella vulgaris* ou a *S. obliquus* [41]. De Moraes & Costa (2007) mostraram que as espécies de microalgas *S. obliquus* e *C. kessleri*, isoladas de efluentes duma central termoelétrica no Brasil, eram capazes de crescer num meio com 18% (v/v) de CO<sub>2</sub> [74]. Como demonstraram Sakai *et al.* (1995), algumas espécies de *Chlorella* isoladas de nascentes de água quente – tolerantes a temperaturas elevadas ( $\approx 42^\circ\text{C}$ ) – são eficazes na fixação de CO<sub>2</sub> vindo de gases de combustão contendo até 40% de dióxido de carbono [75].

Porém, a injeção de CO<sub>2</sub> com a finalidade de incrementar o crescimento microalgal pode ter alguns inconvenientes, como o aumento da emissão de GEE devido ao gasto intensivo de energia durante o cultivo das microalgas, no caso de serem utilizados FBRs que requerem a bombagem contínua de ar e CO<sub>2</sub> (para aumentar a mistura dos gases com a cultura e a taxa de transferência de CO<sub>2</sub> para a água) ([76], [77]). A acidificação do meio de cultura com CO<sub>2</sub> é outra das desvantagens; se um tampão não puder ser utilizado para regular permanentemente o pH do meio, uma das soluções passa por injetar periodicamente CO<sub>2</sub> de modo a baixar o valor de pH, que vai aumentando à medida que as microalgas crescem [54]. Algumas formas de obviar os problemas relacionados com o uso de CO<sub>2</sub> para crescimento microalgal são, por exemplo, o uso de reatores abertos, a implementação das unidades produtoras de microalgas em centrais poluentes e até a junção dos reatores contendo as culturas em plataformas produtoras de outros tipos de biomassa [1].

Brennan & Owende (2009) consideram a biomitigação das emissões de CO<sub>2</sub> um processo a explorar, econômica- e ambientalmente, para que se utilizem as microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel [41]. Mata *et al.* (2010), por sua vez, identificaram a bioremediação de águas residuais como uma das áreas a desenvolver para otimizar a produção de biomassa microalgal. Segundo os autores, os avanços realizados com esses simples procedimentos irão aumentar a disponibilidade da biomassa para outras aplicações (como a indústria alimentar, a medicina e a agricultura) e contribuir assim para a sustentabilidade e competitividade da indústria associada às microalgas [6].

No âmbito deste trabalho foi realizado um ensaio onde se injetou um teor conhecido de CO<sub>2</sub> no fluxo de ar para agitação, de modo a analisar as eventuais diferenças no crescimento da microalga em estudo num efluente industrial.

### 3.2.2. Colheita

Devido à baixa densidade de biomassa no meio de crescimento e às pequenas dimensões das células das microalgas (entre 2-20  $\mu\text{m}$ ) [37], os custos relacionados com a colheita da biomassa e a energia consumida nesse passo são problemas que requerem especial atenção quando se projeta um sistema de produção de microalgas. Segundo Mata *et al.* (2010), o custo da colheita da

biomassa presente no meio de crescimento pode representar entre 20% e 30% do custo total de produção [6].

A colheita da biomassa é feita em duas etapas: primeiro separam-se as microalgas do meio aquoso, de forma a concentrar as células (normalmente recorre-se à floculação, flotação, sedimentação gravítica ou eletrocoagulação); depois concentram-se essas células – através de técnicas de centrifugação, filtração ou agregação ultrassónica –, etapa que é geralmente associada a maiores gastos energéticos [40].

A **centrifugação** é uma técnica amplamente usada, eficiente e fiável, e é utilizada quando as pequenas partículas do meio de crescimento não alteram muito a densidade da fase líquida. É, contudo, um método associado a grandes dispêndios energéticos [48], como é evidenciado, por exemplo, num estudo de Milledge & Heaven (2013) para produção de FAMES, no qual apenas o uso da centrífuga representaria cerca de 2,5 vezes mais energia do que aquilo que se poderia produzir com a biomassa microalgal [78]. Conclui-se que é de facto um método eficaz, mas proibitivo aquando da produção de co-produtos considerados de baixo valor. No entanto, a centrifugação após um método eficaz de concentração da biomassa pode tornar a colheita economicamente sustentável.

A **floculação** consiste no método onde partículas dispersas em suspensão são agregadas pela ação de um floculante, para que se formem partículas maiores que facilmente assentam pela ação da gravidade [79]. Normalmente, os floculantes são iões positivos ou polímeros ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , por exemplo). Segundo Abdelaziz *et al.* (2013), este método tem algumas desvantagens, tais com a contaminação da biomassa colhida, o facto de os floculantes serem eficientes apenas com algumas espécies de microalgas e de serem usualmente necessárias grandes quantidades destes agentes [48].

A **flotação** é um método gravimétrico de separação das células das microalgas, onde bolhas de ar – ou de outro gás – são impostas à mistura. Através desta agitação propositada, as células agregam-se e são levadas para a superfície, onde podem ser recolhidas [48].

A **eletrocoagulação** (EC) envolve o uso de mecanismos físico-químicos para separar a biomassa microalgal do meio de crescimento. Isto acontece porque as microalgas são capazes de se mover num campo elétrico [80]. Durante o processo de EC, o metal dos elétrodos dissolve-se no meio, o que leva à formação de catiões metálicos do mesmo elemento (ex.:  $\text{Al}^{3+}$ ). A interação desses catiões com as células das microalgas carregadas negativamente – que se estão a movimentar em direção ao ânodo – resulta na coagulação. Como também ocorre a hidrólise da água, dá-se a libertação de hidrogénio e oxigénio, que levam consigo as partículas agregadas para a superfície [81], assim como na flotação. Os elétrodos de alumínio são considerados mais eficientes que os de ferro para a recuperação da biomassa [82].

Este é um método de colheita que necessita de uma quantidade mínima de energia e que não carece da adição de químicos. As principais desvantagens são a necessidade periódica de substituir os elétrodos e a possível contaminação da biomassa pelos iões metálicos que os compõem [83]. Os elétrodos (material, configuração, distância entre eles), a intensidade da corrente, o tempo de operação, a temperatura, o pH, a condutividade do meio e o tamanho das microalgas são os fatores que mais influenciam a EC ([81], [84]). A biomassa “eletrocoagulada” é depois colhida e sujeita a uma centrifugação, desta vez de um volume muito menor de amostra.

A **sedimentação gravítica** é um processo em que se usa a gravidade para separar líquidos e/ou sólidos de outro líquido, de diferentes densidades. Não contamina a biomassa e recupera eficazmente a água usada no cultivo, para que possa ser reutilizada ou libertada para o ambiente. No entanto, é uma técnica que requer muito espaço e tempo, sendo este último o fator limitante, já que quando as densidades dos componentes que se querem separar são muito semelhantes, o processo pode ser muito lento [48].

Pode também ocorrer a **autofloculação** das células, se a espécie de microalgas for capaz de induzir a floculação. Algumas espécies realizam ainda este processo quando se imprime alguma

alteração no meio de crescimento, como uma mudança no pH ou algum *stress* induzido (ex.: alterações nutricionais de azoto ou carbono) [85]. O oxigênio dissolvido produzido na fotossíntese pode também levar à **autoflotação** das células, método natural que se tem demonstrado eficiente e rápido [86].

Neste trabalho foram realizados os processos de centrifugação e eletrocoagulação (seguida de centrifugação da biomassa aglomerada à superfície e no fundo do recipiente).

### 3.2.3. Secagem

Ao contrário do que acontece com as culturas terrestres, a secagem da biomassa microalgal é essencial para a maior parte dos processos, uma vez que a presença de água na biomassa irá afetar os passos seguintes na cadeia de valor das microalgas, nomeadamente a extração de lípidos e a transesterificação [1]. Para se proceder à secagem da biomassa produzida, pode recorrer-se a estufas, liofilizadores, *spray-dryers*, assim como métodos menos dispendiosos em termos energéticos, como a secagem solar.

A secagem em estufa consiste em impor à biomassa um fluxo de ar quente durante um determinado período de tempo, de forma a evaporar a água presente na mesma [87]. A liofilização da biomassa consiste em desidratar as amostras após o seu congelamento (-40°C) e submetê-las a baixas pressões (1 kPa), permitindo que os cristais de gelo formados anteriormente sublimem. É um método de secagem apenas utilizado para obtenção de produtos de elevado valor acrescentado, visto que é um processo lento e dispendioso em termos energéticos ([87], [88]). A secagem solar não tem quaisquer gastos energéticos, já que apenas se utiliza a radiação solar como meio para retirar a humidade presente na biomassa. No entanto, pode não ser viável em países de clima temperado, devido à radiação limitada em certas alturas do ano [1]. Um exemplo de sucesso foi o protótipo concebido no LNEG, o SECMAAD, que tem um volume de 0,28 m<sup>3</sup> e uma superfície de coletor solar de 0,8 m<sup>2</sup>. Está equipado com uma ventoinha de potência 20W, que pode ventilar o ar de forma artificial, conduzindo assim a intervalos de tempo de secagem menores [89].

Neste trabalho foram usados a estufa e o liofilizador, como se indicará mais adiante.

### 3.2.4. Extração de lípidos

Os processos de produção de biodiesel exigem que os lípidos sejam libertados de dentro das células microalgais, cuja parede é muito resistente [90]. Para tal é necessário realizar, antes da sua extração, alguma técnica de ruptura celular – mecânica, física, química ou enzimática [88]. Segundo Lee *et al.* (2012), as técnicas mecânicas são amplamente utilizadas, uma vez que não comportam qualquer risco de contaminação da biomassa e são facilmente implementadas em larga escala. Os autores consideram, no entanto, que são técnicas energeticamente ineficientes, já que a energia despendida no processo é muito maior do que a energia recuperável da biomassa [88]. Por outro lado, a hidrólise é um processo agressivo para a parede celular das microalgas, promovendo a ruptura da mesma como resultado da interação entre a biomassa e um ácido ou base (ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio, por exemplo). Existe também a hidrólise enzimática, processo em que se usam enzimas para fragilizar/permeabilizar as células, onde se encontram os lípidos.

Vários métodos de extração de lípidos têm sido descritos, sendo os mais comuns a extração por solvente, a extração por fluidos supercríticos (SFE) e as técnicas de ultrassons [48].

A extração por **solvente** permite a extração dos lípidos presentes na biomassa a partir da adição de um solvente como o hexano ou a acetona, após a quebra das paredes celulares dos

microrganismos. O solvente é depois separado dos lípidos, através de um processo de destilação, que pode ser realizada múltiplas vezes [48].

A extração com **fluidos supercríticos** usa altas pressões e temperaturas para quebrar as células das microalgas [91] e extrair os lípidos e outros compostos de alto-valor acrescentado nelas contidos. É um procedimento muito eficiente e não tem efeitos negativos na quantidade de compostos extraídos. É no entanto uma tecnologia cara [92].

Na extração por **ultrassons**, as células são expostas a uma onda ultrassónica de alta intensidade; originam-se pequenas bolhas de cavitação, que colapsam e emitem ondas de choque à volta das células, quebrando as paredes celulares e libertando os óleos. Será difícil a sua implementação em larga escala devido ao elevado custo e consumo energético [93].

Para extrair os lípidos da biomassa, na parte experimental desta dissertação foram realizados os procedimentos de hidrólise ácida seguida de extração por solvente (denominada extração *Sohxlet*). Para além da extração de lípidos, a hidrólise (ácida quantitativa) foi também efetuada com o objetivo da extração e quantificação do teor de açúcares totais.

### 3.2.5. Produção de biodiesel

Como já foi referido no subcapítulo 2.2, o biodiesel é uma combinação de diversos compostos, maioritariamente glicéridos (ésteres constituídos por uma, duas ou três moléculas de ácidos gordos e uma molécula de glicerol).

O método mais comum de produção de biodiesel é a transesterificação direta dos triglicéridos existentes nos óleos ou gorduras, que reagem com um álcool (normalmente o metanol ou o etanol) na presença de um catalisador, cuja função é acelerar a reação (KOH ou NaOH são exemplos dos catalisadores homogéneos básicos mais utilizados) [94]. Na reação de transesterificação, os triglicéridos sofrem sucessivas reações reversíveis: são convertidos em diglicéridos e estes em monoglicéridos, que por sua vez se convertem em ésteres de ácidos gordos e glicerol (como um subproduto) [90]. Em cada uma dessas reações é formado um éster, pelo que, a partir de uma molécula de triglicérido são formadas três de ésteres, no final da transesterificação [95], como se verifica na Fig. 9. Quando na presença de ácidos gordos livres, ocorre a esterificação destes, que reagem com o álcool, na presença de um catalisador [90], para formar ésteres metílicos (caso seja utilizado o metanol) de ácidos gordos. Como são reações reversíveis, é adicionado álcool em excesso, para que o equilíbrio da reação ocorra no sentido da produção de ésteres [95].

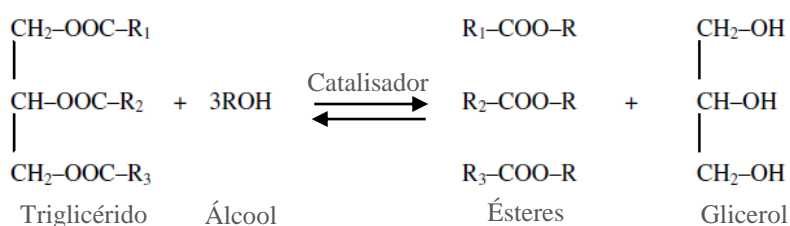


Fig. 9 – Reação de transesterificação. Fonte: [27].

Pode também realizar-se a transesterificação *in-situ* que simplifica o processo descrito anteriormente e elimina a necessidade da etapa de extração dos lípidos [90], uma vez que a extração lipídica e a transesterificação têm lugar ao mesmo tempo, ao juntar à biomassa diretamente o catalisador e o álcool [1].

Os catalisadores utilizados podem ser homogéneos ou heterogéneos, sendo que a principal diferença reside no facto de os primeiros estarem na mesma fase do substrato. Dentro dessas duas categorias encontram-se os catalisadores ácidos e básicos, e nos heterogéneos existem ainda os

catalisadores enzimáticos (que podem ser reutilizados). Na reação de transesterificação com catalisadores homogéneos, há maior possibilidade de ocorrência de saponificação, mas é geralmente mais célere do que se se utilizassem catalisadores heterogéneos; por outro lado, estes acarretam maiores custos, mas o glicerol formado é mais facilmente separado dos ésteres e evita-se a saponificação [96], que é um dos principais problemas na produção de biodiesel.

Quanto ao álcool utilizado, o etanol é preferível ao metanol, uma vez que pode ter origem renovável e, em termos biológicos, ser menos nocivo que o metanol. Contudo, este é mais usado nos processos industriais de produção de biodiesel devido ao seu baixo custo e a certas propriedades físico-químicas que possui (álcool de cadeia curta e polar) [97].

### 3.2.6. Subprodutos e suas aplicações

O biodiesel não é o único biocombustível passível de ser produzido a partir de biomassa microalgal; estes microrganismos podem também ser a matéria-prima para bioetanol, biometano – conhecido como biogás –, biohidrogénio e também para a produção de *jet-fuel*.

O bioetanol é um biocombustível produzido através da fermentação do amido existente na biomassa microalgal, a partir de processos como a *fermentação no escuro* ou fermentação com leveduras. A *fermentação no escuro* é um processo simples onde as microalgas consomem o próprio amido anaerobiamente e produzem bioetanol; já na fermentação convencional, leveduras fermentam a biomassa microalgal ou o amido já extraído da mesma [98] por processos de hidrólise enzimática, por exemplo [99]. Uma das vantagens da produção de bioetanol é o facto de poder ser anexada à produção de biodiesel, através da fermentação dos resíduos de biomassa originários da extração do óleo. O CO<sub>2</sub> produzido na fermentação pode também ser reciclado pelas microalgas [48].

O biogás (composto por 60%-70% de metano [48]) pode ser produzido a partir da digestão anaeróbia quer dos resíduos da biomassa, quer da própria biomassa não sujeita a qualquer processamento [100]. Um consórcio natural de microrganismos quebra a matéria orgânica da biomassa microalgal em monómeros simples, que depois são convertidos em biogás, rico em metano. A sua produção pode ser acoplada à produção de biodiesel, após a extração dos lípidos, e contribuir para um processo neutro de carbono, se o biogás produzido fornecer energia para as etapas de produção e processamento das microalgas. Se os resíduos decorrentes da digestão anaeróbia forem reprocessados podem servir como fertilizantes [48].

Outro co-produto da biomassa microalgal é o biohidrogénio, produzido por microalgas ou cianobactérias a partir do uso direto da radiação, na fotossíntese, para converter água em bio-H<sub>2</sub> – a chamada biofotólise. A biomassa microalgal, após colheita e secagem, pode também ser usada como substrato para a produção deste gás na *fermentação no escuro* por bactérias anaeróbias [101]. Segundo Schenk *et al.* (2008), uma importante vantagem da produção deste gás é o facto de que o bio-H<sub>2</sub> não se acumula na cultura, sendo rapidamente libertado para a fase gasosa, ao contrário do que acontece com outros produtos que também sofrem fermentação, que podem até assumir níveis tóxicos. A produção de biohidrogénio pode ser acoplada à biomitigação de CO<sub>2</sub>, bem como à dessalinização da água [19].

Excluindo as aplicações energéticas, os subprodutos das microalgas podem ser divididos, segundo Pires *et al.* (2012), em cinco categorias: nutrição humana, alimentação animal e aquacultura, cosméticos, farmacêuticos e químicos. As microalgas são uma boa fonte de proteínas e hidratos de carbono, encontrados sob a forma de glucose ou açúcares [3]. São inúmeras as propriedades benéficas dos co-produtos utilizados na área da saúde, como o facto de conterem ácidos gordos ω<sub>3</sub> provenientes dos ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) EPA e DHA, que têm efeitos anti-inflamatórios, propriedades neuro-protetoras e contribuem para a saúde cardiovascular [3]. As microalgas são ricas em vitaminas, sendo usadas na alimentação animal e no cultivo de vários tipos de zooplâncton que alimentam crustáceos ou *alevins* de peixes maiores. Na indústria

cosmética, os extratos de microalgas são utilizados em produtos rejuvenescedores ou regenerativos para a pele, entre outros [3]. Existem algumas estirpes de cianobactérias capazes de produzir metabolitos com propriedades biológicas, nomeadamente antibacteriana, antiviral, antifúngica e antialgal [102].

### 3.3. Biorefinaria

A relação entre o desenvolvimento das tecnologias para a produção de biodiesel e a influência que a expansão do mercado do mesmo tem nas aplicações tradicionais das microalgas é controversa. Numa publicação onde se pretendia estudar um panorama inovador de uma biorefinaria a partir de biomassa microalgal, Zhu (2015) questiona se a produção de microalgas com fins energéticos (biodiesel, particularmente) irá causar a depleção ou diminuição das aplicações típicas desta biomassa [103].

A biorefinaria surge então como a solução para esses problemas de integração da produção de biodiesel com os co-produtos de alto valor. Pode ser definida como um processo industrial onde biomassa é convertida numa vasta quantidade de produtos bioquímicos, materiais e energéticos. É um processo análogo às refinarias de petróleo, onde são obtidos diversos produtos finais a partir de uma matéria-prima inicial, o combustível fóssil [104]. O objetivo de uma biorefinaria é produzir vários compostos (úteis em diversas áreas) e maximizar os lucros que advêm de cada co-produto originado. Assim, produtos de menor valor (como o biodiesel) e produtos de elevado valor (como os usados nas indústrias cosmética e farmacêutica) podem ser produzidos em simultâneo numa biorefinaria. Devido às diferentes composições da biomassa, os bioprodutos extraídos nos processos de uma biorefinaria serão diferentes, dando assim origem a co-produtos com aplicações e preços variados [103].

Para além dos produtos de elevado valor e do biodiesel, pode também ser produzido biometano, bioetanol e bio-H<sub>2</sub>. Outra perspetiva atual, não só da maximização dos lucros, mas também da maximização dos produtos finais vindos da digestão anaeróbia (cf. Fig. 10) é a reciclagem de nutrientes, tais como azoto e fósforo, e também de CO<sub>2</sub>, para o cultivo de mais microalgas ou fertilizantes. O mesmo se passa com a reciclagem de água ([105]–[108]).

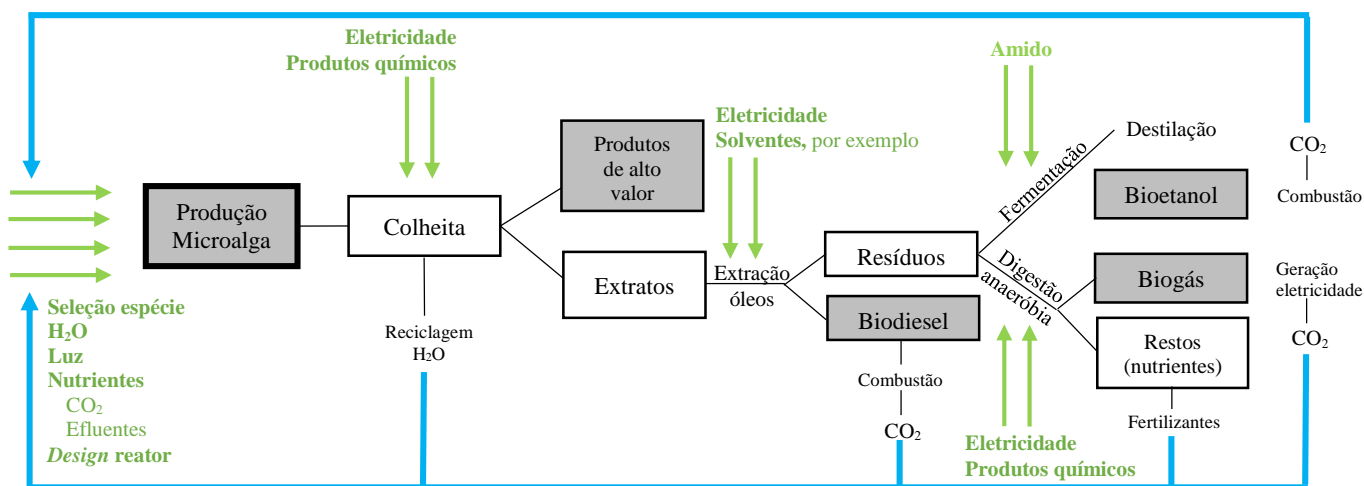


Fig. 10 – Exemplo simplificado da integração de sistemas numa biorefinaria. Adaptado de [48] e [103]. As setas a verde representam os *inputs* dos sistemas.

O conceito de biorefinaria é considerado como a solução promissora relativamente à integração de processos que culminam na maximização do uso (e dos lucros) dos bioprodutos oriundos da biomassa microalgal, promovendo as aplicações tradicionais, o que se opõe ao questionado por Zhu (2015) no início da sua investigação [103]. Segundo Pacheco *et al.* (2015), é também expectável que contribua para a criação de fontes energéticas inovadoras, para a substituição do

uso dos combustíveis fósseis e para a produção de uma variada gama de co-produtos (químicos e materiais) com interesse económico [89]. Contudo, é ainda necessária a investigação em técnicas mais económicas a montante do processo, como na colheita e processamento (secagem, extração dos lípidos) da biomassa, para além da averiguação de outros fatores importantes, como a escolha da microalga/consórcio, as condições climáticas existentes no local de produção e a disponibilidade de nutrientes [59].

### 3.4. Microalgas estudadas no âmbito da dissertação

Embora atualmente se conheçam entre trinta e cinquenta mil espécies de microalgas, cerca de 100 foram já objeto de estudo e apenas 5-6 já são comercializadas ([85], [109]). Neste trabalho foram utilizadas cinco microalgas diferentes (Tabela 5), que segundo a literatura apresentam teores de lípidos e perfis de ácidos gordos distintos.

Tabela 5 – Composição das microalgas estudadas em % (m/m).

Microalga	Proteína	Hidratos de Carbono	Lípidos	Referência
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	[110]
<i>Chlorella protothecoides</i>	55	11	15-58	[111], [6]
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	[110]
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29	33	37	[112]
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21	[110]

As microalgas do género *Scenedesmus* e do género *Chlorella* são microalgas verdes (pertencentes à classe *Chlorophyceae* do filo *Chlorophyta*), comuns em águas doces, sendo a *Neochloris oleoabundans* uma microalga de água salgada. A *Spirogyra* sp. é também uma microalga verde, filamentosa, muito comum em águas doces.

A *S. obliquus* (visível na Fig. 11) é considerada uma microalga resistente e versátil que consegue crescer em ambientes inóspitos, facto comprovado pelos resultados positivos do crescimento desta microalga para bioremediação de águas residuais ([113], [114]) e efluentes industriais [115], e também para a biomitigação de CO<sub>2</sub> ([74], [116], [117]). Para além destas investigações, a *S. obliquus* já foi também estudada para a produção de vários biocombustíveis: biodiesel ([45], [118]), bioetanol ([119], [101]), biogás [120] e biohidrogénio [121].

Segundo Gouveia & Oliveira (2009), se se pretendesse produzir biodiesel a partir de uma espécie, esta microalga verde apresentaria o perfil de ácidos gordos mais adequado, principalmente em relação ao ácido linolénico e aos ácidos gordos polinsaturados [45].

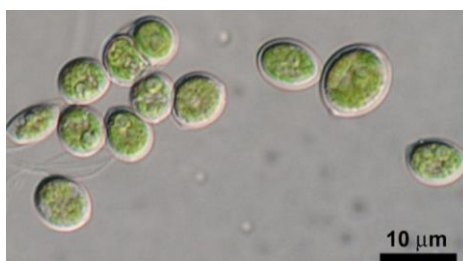


Fig. 11 – Microalga *Scenedesmus obliquus* vista ao microscópio. Fonte: [122].

Foram também estudadas duas microalgas do género *Chlorella*: *C. protothecoides* e *C. vulgaris*. A *C. vulgaris* foi a primeira microalga descoberta (1890) com núcleo bem definido e é utilizada atualmente para diversos fins, como para tratamentos médicos (possui propriedades benéficas

contra certas doenças) ou para a produção de biodiesel, já que é capaz de acumular quantidades significativas de lípidos – especialmente quando sujeita a uma limitação de azoto – e possui um perfil adequado de ácidos gordos [123]. Contudo, diversos autores encontraram diferentes concentrações lipídicas provenientes da biomassa produzida a partir desta microalga, como foi o caso de Gouveia & Oliveira (2009), que obtiveram apenas 5,1% (m/m) de óleos na biomassa da *C. vulgaris* [45].

A *C. protothecoides* pode crescer hetero- ou fotoautotroficamente sob diferentes condições de cultivo. É uma importante fonte de alimentação para aquacultura, suplementos de nutrição humana e produtos farmacêuticos, para além de ser considerada uma boa candidata para a produção de biocombustíveis [124].

A *N. oleoabundans* é uma microalga conhecida pela sua acumulação de triglicéridos, sendo assim adequada para a produção de biodiesel [125]. Em investigações de Tornabene *et al.* (1983) e Gouveia *et al.* (2009), a *N. oleoabundans* produziu entre 35% e 56% (m/m) de lípidos. Essa acumulação aconteceu quando a microalga cresceu num meio com carência de azoto ([125], [126]). Num estudo de Li *et al.* (2008) com a mesma microalga, obteve-se um teor de lípidos totais de 40% sob limitação de nitratos e uma produtividade diária desses lípidos de 0,133 kg/m<sup>3</sup> [42].

Quanto à *Spirogyra* sp., estima-se que estejam identificadas cerca de 400 espécies em todo o mundo [127]. Esta microalga contém clorofila *a* e *b*, mas sob certas condições de *stress* consegue produzir carotenóides, onde se inclui a astaxantina. É uma microalga com elevadas produtividades e capaz de acumular grandes quantidades de açúcares, o que a torna uma matéria-prima atrativa para a produção de bioetanol e bio-H<sub>2</sub> [89].

## Capítulo 4 – Materiais e Métodos

Após a descrição de alguns parâmetros importantes referidos na literatura relativos ao cultivo e processamento de biomassa microalgal, neste capítulo serão descritos os materiais e métodos utilizados ao longo deste trabalho.

### 4.1. Microalgas

A principal microalga escolhida para a realização deste trabalho, *Scenedesmus obliquus* (*S. obliquus*) é proveniente da algoteca da Universidade de Coimbra, Portugal (ACOI 204/07). Foi conservada no meio nutricional *Bristol* (esterilizado) e repicada periodicamente, para que fosse crescendo e continuasse ativa. Adicionalmente foram usadas 4 microalgas (*Chlorella protothecoides* (estirpe 25 da algoteca UTEX (Universidade de Austin, Texas, EUA)), *Chlorella vulgaris* (INETI 58, LNEG\_UB, Portugal), *Neochloris oleoabundans* (UTEX #1185 da algoteca UTEX, Universidade de Austin, Texas, EUA) e *Spirogyra* sp. (adquirida à Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG) da Universidade de Göttingen, com a referência SAG 170.80. Esta microalga foi isolada em 1975 na Irlanda (SAG, 2011)). Os meios de conservação destas microalgas encontram-se especificados no Anexo I.

### 4.2. Meios de cultura

#### 4.2.1. Meio *Bristol*

A microalga *S. obliquus* foi inoculada no meio propício ao seu crescimento denominado meio *Bristol*, que foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos, a 121°C e cerca de 1 bar. A composição do meio *Bristol* está exibida na Tabela 6.

Tabela 6 – Composição do meio sintético *Bristol*.

Reagente	Concentração
NaNO <sub>3</sub>	250 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 mg/L
CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	33 mg/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg/L
NaCl	25 mg/L
Fe-EDTA	60 mg/L
Elementos-traço (composição no Anexo I)	10 mL/L (sem diluição)

#### 4.2.2. Efluentes

Um dos principais objetivos desta dissertação foi analisar o crescimento da microalga *S. obliquus* em efluentes que não poderiam ser descarregados sem qualquer pré-tratamento (devido ao seu elevado teor de azoto, fósforo, CQO, etc.), e averiguar se a microalga purificava/tratava eficazmente os efluentes de modo a que pudessem ser libertados no meio ambiente.

Para fazer crescer a microalga, foram utilizados dois efluentes originários da mesma empresa, a Avibom. Os efluentes eram muito distintos, não só em termos visuais, mas também compositionais. O efluente avícola *bruto* (AB) consiste na água de cozedura de todos os restos das aves que não são vendidos para consumo final, como as patas, cabeças, penas, peles, entranhas, etc. Todos esses resíduos são aproveitados novamente para a produção de rações, mas a água é descartada e depois submetida a uma estabilização em lagoa aberta, onde são adicionados agentes flocculantes (polímeros orgânicos), que realizam a floculação do meio (brevemente descrita no subcapítulo 3.2.2) e promovem assim a descontaminação do efluente. Daí resulta uma camada de gordura que é comprimida e descartada, e um efluente líquido, que foi também utilizado neste trabalho, designado efluente avícola *floculado* (AF). Em condições normais, este efluente seria submetido a digestão anaeróbia e só depois libertado para os cursos de água. As diferenças aparentes entre os dois efluentes podem ser verificadas na Fig. 12. O efluente avícola *bruto* (AB) era heterogéneo, de cor vermelha e com precipitados. Pelo contrário, o efluente avícola *floculado* (AF), que foi sujeito à limpeza prévia com custos diários avultados para a empresa, era transparente, incolor e homogéneo; não possuía qualquer cheiro, ao contrário do efluente AB.



Fig. 12 – Efluente avícola *bruto* (esquerda) e avícola *floculado* (direita).

Os dois efluentes foram caracterizados em termos de minerais (sólidos), da composição em azoto e fósforo (na forma de amónio, nitratos e fosfatos) e CQO, como será descrito na secção 4.6.1.3. O efluente AB foi também sujeito ao processo de eletrocoagulação (EC), e a matéria orgânica que se separou do meio líquido foi depois caracterizada relativamente ao seu teor de gorduras. Foi calculada a CQO do dito meio líquido, para se verificar se o processo de EC interferia na quantidade de contaminantes existentes no efluente pós-EC; este meio líquido foi utilizado posteriormente como meio de crescimento da microalga, numa fase mais avançada do trabalho.

Para além dos dois efluentes do ramo avícola, foi também utilizado num ensaio um efluente da indústria suína, designado porco *bruto* (PB), originário da ETAR SIMLIS (Saneamento Integrado dos Municípios do Lis, SA), em Leiria, que trata resíduos urbanos e resíduos provenientes de suiniculturas. O efluente de porco *bruto* só foi utilizado no ensaio onde se procedeu à adição de CO<sub>2</sub> no ar de agitação das culturas.

### 4.3. Crescimento das microalgas

Ao longo deste trabalho, foram realizados diversos ensaios, sob condições diferentes, de forma a otimizar o crescimento da(s) microalga(s) utilizada(s) nos vários casos.

**1) Seleção da microalga:** na primeira experiência foi analisado o crescimento (em *erlenmeyers*) de várias microalgas no efluente avícola *bruto* sem diluição (Fig. 13), já que este seria o ideal em termos económicos e nutricionais. Esta experiência teve lugar numa incubadora aberta (Controlled Environment Incubator Shaker da marca *New Brunswick Scientific*), onde existiam 4 lâmpadas fluorescentes (*Phillips Master TL-D 18W/865*). Neste ensaio, as microalgas utilizadas foram *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* e *Spirogyra* sp.



Fig. 13 – Ensaio de seleção da microalga no efluente avícola *bruto* (AB) com as diferentes microalgas.

2) **Crescimento da microalga *S. obliquus* em meio sintético (*Bristol*):** a experiência seguinte consistiu num estudo de crescimento da microalga *S. obliquus* em meio *Bristol* esterilizado. Os fotobioreatores (neste trabalho usaram-se reatores de coluna de bolha) foram colocados entre duas fileiras de lâmpadas fluorescentes, uma delas com 3 lâmpadas – *Phillips TL-D 36W/54-765* – e a outra com 4, como se apresenta na Fig. 14.

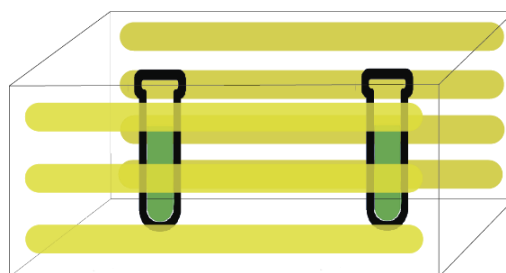


Fig. 14 – Reatores com meio sintético *Bristol* (esquerda) e esquema ilustrativo da disposição das lâmpadas fluorescentes, representadas a amarelo (direita).

3) **Crescimento da microalga *S. obliquus* em meio *Bristol* modificado:** foi de seguida realizado um ensaio no mesmo tipo de reatores, onde se fez variar a concentração de ião amónio e se retiraram os iões nitrato existentes no meio *Bristol* convencional, para simular as concentrações desses elementos no efluente avícola *bruto*. Os nitratos (na forma de  $\text{NaNO}_3$ ) presentes originalmente no meio *Bristol* foram então retirados e foi acrescentada amónia (mais propriamente o ião amónio –  $\text{NH}_4^+$ ) associada a dois aniões distintos ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Este ensaio foi realizado para três concentrações diferentes: 160 mg/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 220 mg/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 160 mg/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A iluminação foi idêntica à do ensaio de crescimento da *S. obliquus* em meio *Bristol* (ilustrada na Fig. 14).

4) **Crescimento da microalga *S. obliquus* em efluentes:** utilizaram-se os efluentes avícolas para o crescimento da mesma microalga, em *erlenmeyers*, na incubadora do primeiro ensaio. Neste caso, foi usado o efluente *bruto* (AB) sem diluição, após centrifugação e após eletrocoagulação, e o efluente *floculado* (AF) sem diluição e diluído de 1/2. Também foi estudado o crescimento da cultura num *erlenmeyer* com meio *Bristol*, desta vez sem ser esterilizado (Fig. 15). O objetivo deste ensaio era avaliar, em pequena escala, o crescimento da microalga *S. obliquus*, e estudar o seu potencial para implementação numa escala maior.



Fig. 15 – Erlenmeyers com os efluentes avícolas *floculado* (AF) e *bruto* (AB), e também meio *Bristol* não esterilizado.

**5) Estudo do efeito do tipo de iluminação:** os melhores resultados do ensaio preliminar do crescimento da *S. obliquus* com os efluentes avícolas foram transpostos para reatores de coluna de bolha, com iluminação por 3 lâmpadas fluorescentes (*Phillips TL-D 36W/54-765*) e 3 lâmpadas LED (*Master LED Tube T8 19W/865*), como se ilustra na Fig. 16, para avaliar diferenças no crescimento da cultura consoante a luz incidente, e averiguar, assim, se se poderia poupar em termos energéticos. Este ensaio foi realizado com os dois efluentes avícolas (AF e AB), procedendo-se a uma diluição do efluente *floculado* (1/2) e utilizando-se o efluente *bruto* sem qualquer diluição. Para comparação de resultados, foi tido também em consideração um ensaio realizado nas mesmas condições, com meio *Bristol* não esterilizado. As lâmpadas estavam a uma distância de cerca de 18 cm dos reatores, enquanto estes distavam de aproximadamente 8 cm entre si (cf. Fig. 16).

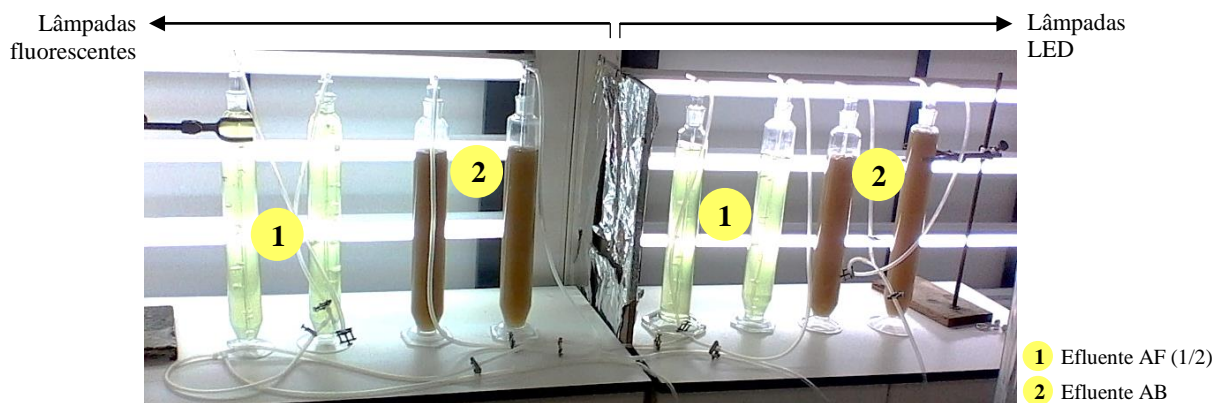


Fig. 16 – Reatores com os efluentes avícolas *floculado* e *bruto*, usando iluminação fluorescente e LED.

**6) Estudo do efeito da adição de CO<sub>2</sub>:** este ensaio foi semelhante ao ensaio com efluente avícola *bruto* sem diluição e com injeção de ar comprimido para agitação da amostra. A diferença residiu no facto de, em vez de 100% de ar comprimido, ter sido injetado 5% de CO<sub>2</sub> na mistura com o ar. Neste ensaio, foram utilizadas 4 lâmpadas fluorescentes *Phillips TL-D 18W/54-765* nas duas fileiras à volta dos FBRs, como se ilustra na Fig. 17. Para além do efluente AB sem diluição, neste ensaio foram também estudados dois fotobioreatores contendo efluente porco *bruto* (PB) a 5%, isto é, com uma diluição de 1/20, testado noutros trabalhos realizados no LNEG. O objetivo foi comparar o crescimento da microalga *S. obliquus* em dois efluentes muito distintos, assim como a bioremediação dos nutrientes presentes nos mesmos pela microalga, na presença de CO<sub>2</sub>.

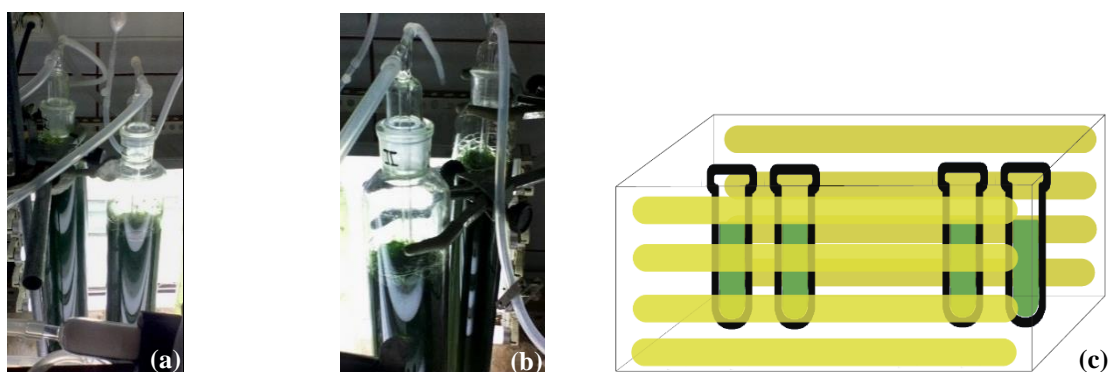


Fig. 17 – Fotobioreatores com efluente avícola *bruto* (a) e de porco *bruto* (b); (c) esquema ilustrativo da iluminação fluorescente utilizada neste ensaio, onde se procedeu à adição de CO<sub>2</sub> no fluxo de ar.

É importante ainda referir que:

- todos os ensaios foram realizados em duplicado;

- a temperatura não foi controlada, isto é, as culturas em reatores estiveram sempre sujeitas à temperatura ambiente ( $T \approx 25^{\circ}\text{C}$ ). Por outro lado, nos ensaios em *erlenmeyers* que decorreram na incubadora aberta, a temperatura era de aproximadamente de  $28^{\circ}\text{C}$ ;

- a agitação por ar comprimido, que arejava as culturas, foi controlada manualmente no caso dos fotobioreatores (leitor de fluxo *Aalborg Mass Flow Meter GFM17*); os *erlenmeyers* foram agitados a cerca de 100 rpm dentro da incubadora aberta. Os níveis de  $\text{CO}_2$  injetados juntamente com o ar comprimido foram lidos com o sensor *SERVOMEX SERVOFLEX MiniMP 5200*;

- a iluminação foi constante (24 horas), em todos os ensaios. A intensidade luminosa (lida com recurso ao luxímetro *Phywe*) foi de cerca de 2,37 klx e 1,53 klx, no caso dos ensaios em “aquários” com lâmpadas fluorescentes e na sala aberta (ponto 5) da secção 4.3) com os dois tipos de iluminação, respetivamente;

- o crescimento das culturas em meio esterilizado ou com os efluentes foi avaliado diariamente através da leitura da densidade ótica (DO) a 540 nm num espectrofotómetro *Hitachi U-2000*, dado ser um parâmetro indireto para determinar o crescimento de uma cultura, relacionando a intensidade da luz incidente na amostra com a intensidade luminosa transmitida através da suspensão de células microalgais [128]. As amostras foram diluídas quando o valor de DO se encontrava acima de 1. Foram também analisados diariamente os valores de pH das amostras retiradas (*WTW Inolab – pH Level 1*) e o peso seco (em g/L) foi analisado, em média, três vezes por semana.

## 4.4. Colheita da biomassa microalgal

Para a colheita da biomassa foram executados dois processos distintos: a centrifugação e a eletrocoagulação, seguida de centrifugação.

### 4.4.1. Centrifugação

A centrifugação teve lugar numa centrífuga *Heraeus Multifuge 3SR+* (Fig. 18 (a)), durante 10 minutos, a 10000 rpm, e temperatura de cerca de  $4^{\circ}\text{C}$ . A biomassa colhida foi depois colocada em caixas de Petri – previamente taradas – e de seguida seca/liofilizada, como ilustra a Fig. 19.

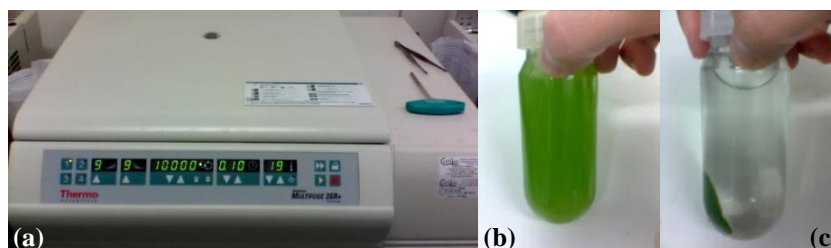


Fig. 18 – (a) Centrífuga *Heraeus Multifuge 3SR+*; (b) amostra do ensaio com meio *Bristol* esterilizado pré-centrifugação; (c) biomassa e sobrenadante, após centrifugação.



Fig. 19 – Biomassa húmida (a) e seca (b).

## 4.4.2. Eletrocoagulação

Para tentar otimizar em termos energéticos o processo de colheita da biomassa, realizaram-se vários ensaios de eletrocoagulação, com eléctrodos de alumínio e o máximo de corrente que a fonte de alimentação utilizada (*Mastech DC Power Supply HY3005D*) permitia – entre 0,10 e 0,20 A no ensaio com o meio de cultura e  $\approx 0,70$  A no ensaio com o efluente avícola *bruto*.

O recipiente contendo a amostra foi posicionado sobre uma placa de agitação *Fisher Bioblock Scientific 10517*, após ter sido também colocado no seu interior uma barra magnética para agitação das amostras. Foram mergulhados dois eléctrodos de alumínio com as mesmas dimensões, colocados paralelamente como mostra a Fig. 20 (b), ligados à fonte de tensão DC (visível na Fig. 20 (a)). No momento em que a corrente foi desligada, a agitação também foi cessada, permitindo assim a sedimentação da microalga em solução (Fig. 20 (a)), ou da ascensão do material gorduroso, no caso da EC do efluente avícola *bruto* (Fig. 20 (b)).

Foram realizados diversos ensaios, pelo que a área submersa dos dois eléctrodos dependeu do volume usado na eletrocoagulação (entre 0,500L e 0,650L); a distância entre eles também não foi constante (dependeu do adaptador de espuma usado e variou entre 1 cm e 4 cm). Foram utilizados eléctrodos com 1 mm de espessura, 16 cm de altura e 3 cm de largura.

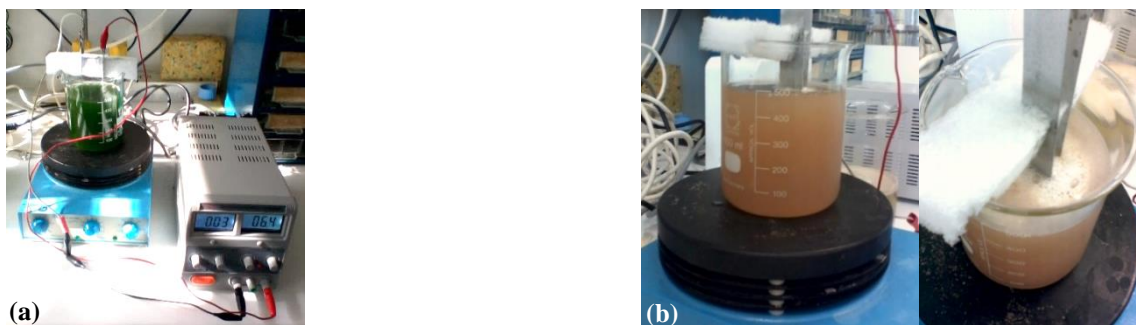


Fig. 20 – Eletrocoagulação do meio com a microalga (a) e do efluente avícola *bruto* (b).

Para melhor se conseguir visualizar a montagem da Fig. 20, na Fig. 21 encontra-se um esquema representativo do processo de EC.

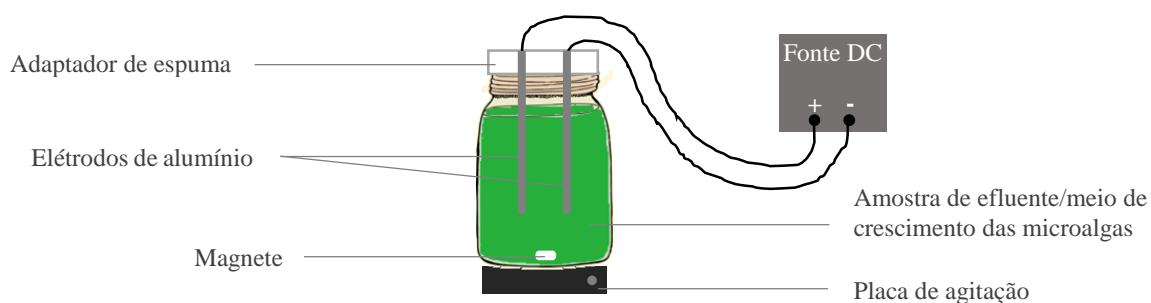


Fig. 21 – Esquema do procedimento de EC, baseado no que foi feito no laboratório.

Foi determinada a eficiência de recuperação da biomassa após a eletrocoagulação. Para isso, foram recolhidas amostras da mistura antes da eletrocoagulação (cerca de 2 mL) e 30 minutos após a mesma, retirados abaixo da camada de microalgas que se encontrava floculada em suspensão no recipiente. Foi analisada a DO dessas amostras ( $\lambda = 540$  nm), para que se calculasse então a eficiência de recuperação da biomassa microalgal, a partir da Equação (1). Os subscritos i e f designam, respetivamente, a DO lida antes do processo de EC e após 30 minutos de repouso.

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

A biomassa aglomerada após a eletrocoagulação foi depois recolhida, para se proceder à sua centrifugação, colocação em caixas de Petri previamente taradas e posterior secagem/liofilização.

## 4.5. Secagem da biomassa microalgal

Para a secagem da biomassa recolhida foram utilizados dois métodos diferentes. O primeiro equipamento de secagem utilizado foi uma estufa *Memmert*, na qual a biomassa húmida foi colocada durante cerca de 20 horas a 70°C. A biomassa seca na estufa foi a resultante do ensaio com os dois FBRs onde a microalga *S. obliquus* cresceu em meio *Bristol* esterilizado.

Apesar de ser um procedimento dispendioso, como já foi referido no subcapítulo 3.2.3, parte da biomassa microalgal foi também liofilizada (Heto PowerDry LL 3000 Freeze Dryer da *Thermo Scientific*). Este procedimento durou aproximadamente 48 horas. A biomassa liofilizada foi a decorrente dos ensaios onde se utilizaram os efluentes avícolas e suíno para o crescimento da *S. obliquus* para estudar o efeito do tipo de iluminação e o efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao ar de agitação.

Para efeitos de poupança energética, o secador solar SECMAD [89] poderia também ser usado para secar a biomassa microalgal. No presente trabalho não foi utilizado, mas alguns resultados decorrentes dessa utilização serão descritos brevemente no Capítulo 5 – Resultados e Discussão.

## 4.6. Metodologias analíticas

### 4.6.1. Caracterização dos efluentes

#### 4.6.1.1. Determinação do teor de sólidos

A definição de sólidos refere-se à matéria suspensa ou dissolvida presente nas amostras, e a sua determinação nos efluentes foi baseada no Método 2540 – Determinação de Sólidos, que contém os parâmetros que permitem caracterizar em termos minerais tanto águas residuais como água para consumo (humano ou industrial) [129].

O teor de sólidos totais (ST) foi calculado de acordo com o procedimento seguinte: uma toma de efluente de 50 mL foi seca em estufa a 105°C durante cerca de 24 horas, em cadinho de porcelana previamente pesado depois de calcinado em mufla a 550°C durante 1 hora. Após arrefecimento em exsiccador, pesou-se o resíduo da secagem. Na Equação (2),  $m_a$  representa o peso do cadinho com resíduo seco (g),  $m_b$  o peso do cadinho (g) e  $V$  o volume da toma de amostra (mL).

$$ST (g/L) = \frac{m_a - m_b}{V} \times 1000 \quad (2)$$

Para o cálculo dos sólidos voláteis (SV), aproveitou-se o resíduo resultante do procedimento anterior. Este resíduo foi calcinado em mufla a 550°C durante aproximadamente 1 hora. Após arrefecimento em exsiccador, o cadinho contendo o resíduo calcinado foi pesado. A equação que permite calcular os sólidos voláteis é idêntica à Equação (2), onde, neste caso,  $m_a$  representa o peso do cadinho com resíduo seco (g),  $m_b$  o peso do cadinho com resíduo calcinado (g) e  $V$  o volume da toma de amostra (mL).

Para calcular os sólidos suspensos totais (SST), uma toma de 10 mL de efluente foi sujeita a filtração sob vácuo, ficando o seu resíduo retido num filtro de fibra de vidro previamente lavado e calcinado em mufla durante 1 hora a 550°C. O filtro contendo o resíduo foi seco a 105°C durante 1 hora e pesado após arrefecimento em exsiccador. A equação que permite calcular os sólidos suspensos totais é idêntica à Equação (2), onde, neste caso,  $m_a$  representa o peso do filtro seco com resíduo (g),  $m_b$  o peso do filtro (g) e  $V$  o volume da toma de amostra filtrada (mL).

Finalmente, para os sólidos suspensos voláteis (SSV), calcinou-se em mufla a 550°C durante 1 hora o filtro com o resíduo resultante do procedimento descrito para os SST, que foi depois arrefecido em exsiccador e seguidamente pesado. A equação que permite calcular os sólidos suspensos voláteis é, mais uma vez, idêntica à Equação (2), em que  $m_a$  representa o peso do filtro com resíduo seco (g),  $m_b$  o peso do filtro com resíduo calcinado (g) e  $V$  o volume da toma de amostra filtrada (mL).

Foi também possível determinar, para os casos dos SV e dos SSV, o valor do conteúdo das amostras em sólidos fixos, a partir da Equação (3), em que  $m_a$  representa o peso do cadinho ou do filtro calcinado (g) e  $m_b$  o peso do cadinho ou do filtro (g).

$$SF (g) = m_a - m_b \quad (3)$$

Cada um destes procedimentos foi realizado em duplicado e os equipamentos utilizados foram a estufa e a mufla da marca *Heraeus*, a balança *Mettler Toledo* e os filtros de fibra de vidro *VWR* (diâmetro = 47 mm; porosidade = 1,2  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.6.1.2. Determinação dos teores de azoto e fósforo

Para a determinação do ião amónio (mg/L  $\text{NH}_4^+$ ), foi usado um eletrodo seletivo de iões (*Crimson MM41*). Por cada 10 mL de amostra foi adicionado 1 mL de uma solução de ajuste de força iónica, ISA ( $\text{MgSO}_4$  1M).

Para a determinação do teor de ião nitrato (mg/L  $\text{NO}_3^-$ ) presente nas amostras, foi usado o método *Nitrate Cell Test 1.14542* (utilizando *kits* de teste *Spectroquant*, da *Merck*). A leitura dos valores do ião nitrato foi realizada num espectrofotómetro *HACH DR/2010*, a 525 nm.

Para a determinação da quantidade do ião fosfato (mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ ) presente nas amostras foi usado também um *kit Phosver 3* (em pó) para diluir e fazer posteriormente a leitura no espectrofotómetro *HACH DR/2010*, a 890 nm.

#### 4.6.1.3. Determinação da Carência Química de Oxigénio

A carência química de oxigénio (CQO) define-se como a quantidade de um oxidante específico (como o oxigénio presente no ião dicromato –  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) que reage com a amostra sob condições controladas. O resultado indica a quantidade de oxigénio dissolvido na amostra consumido pelos contaminantes, o que significa que quanto maior for a CQO, mais contaminantes tem a amostra.

O método usado para a determinação da CQO dos efluentes avícolas *bruto* e *floculado* foi o chamado *Método de Refluxo Aberto*, válido para uma gama de concentrações entre 50 e 800 mg de oxigénio consumido por litro de amostra [130], e foi utilizado um *BlocDigest20*, da *P Selecta*. Como já foi mencionado, foi igualmente calculada a CQO para o meio líquido do efluente avícola *bruto* após eletrocoagulação.

#### 4.6.1.4. Determinação do teor de gordura

Foi determinado o teor de gordura (a 30°C) do material em suspensão (Fig. 22) decorrente do processo de eletrocoagulação do efluente avícola *bruto*. Este procedimento foi adaptado de Vázquez-Roncero *et al.* (1974) [131].



Fig. 22 – Gordura extraída do efluente avícola *bruto* após o processo de eletrocoagulação.

A técnica de ensaio foi a seguinte: para um *erlenmeyer* pesou-se cerca de 5 g da referida amostra ( $m_{amostra}$ ) de gordura húmida e adicionaram-se 15 mL de n-hexano; o *erlenmeyer* foi colocado na incubadora *Lab-line Orbit Environ-Shaker*, a 30°C com agitação, durante 15 minutos. Procedeu-se depois à extração do líquido da camada superior (visível na Fig. 23), com uma pipeta, para um copo de vidro.



Fig. 23 – Camadas formadas pelo solvente e a gordura, e a restante matéria orgânica.

Adicionaram-se novamente 15 mL de n-hexano e repetiu-se o processo, durante 15 minutos, extraindo-se de seguida a parte superior para o mesmo copo de vidro. Repetiu-se mais uma vez o procedimento, durante 20 minutos, deixando-se depois a extração a realizar durante a noite. O líquido extraído foi depois evaporado num rotavapor *Büchi Heating Bath (B-490)* – a uma pressão de cerca de 235 mbar –, depois de ser colocado num balão adequado previamente seco, arrefecido e pesado (a 103°C durante 30 minutos, na estufa *Memmert*) ( $m_{balão}$ ). Pesou-se o balão (na balança *Mettler Toledo*) depois do solvente ter sido evaporado e após ter sido colocado na estufa durante 30 minutos a 103°C, para evaporar eventuais traços de n-hexano ainda presentes, e arrefecido em exsicador ( $m_{balão+gorduras}$ ). Este procedimento foi realizado em duplicado.

O teor de gorduras determina-se gravimetricamente de acordo com a Equação (4).

$$Gorduras (30^{\circ}C)(\%) = \frac{m_{balão+gorduras} - m_{balão}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (4)$$

## 4.6.2. Avaliação do crescimento das culturas

### 4.6.2.1. Determinação do peso seco

A determinação do peso seco das culturas foi realizada filtrando-se um volume conhecido de amostra num filtro de fibra de vidro 693 da *VRW* (diâmetro = 47 mm e porosidade = 1,2 µm), previamente tarado – na estufa Schutzart DIN 40050-IP20, da *Memmert*, durante no mínimo 4 horas, a 80°C –, e pesado (balança *Mettler Toledo*). Os filtros foram novamente secos e pesados, de modo a verificar a diferença de peso correspondente ao crescimento da microalga.

O filtrado obtido em cada uma das determinações foi guardado no frigorífico para posterior análise, de modo a verificar a eficiência da microalga no tratamento dos efluentes.

### 4.6.2.2. Determinação do teor de azoto e fósforo: análise periódica dos meios de cultura

Para que se acompanhasse a depleção de alguns contaminantes nos meios de cultura, foram analisados periodicamente os teores de amónio ( $\text{NH}_4^+$ ) e os valores iniciais e finais de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), a partir da parte filtrada refrigerada, aquando da amostragem para determinação do peso seco de cada cultura.

O teor de iões amónio foi lido com recurso ao eléctrodo seletivo de iões *Crimson MM41* e o teor de iões fosfato presente nas amostras foi analisado com recurso aos *kits* Vario Powder Pack Phos 3 da *Lovibond*, que permitiram a leitura do teor de  $\text{PO}_4^{3-}$  no espectrofotómetro *HACH DR/2010* (a 890 nm). Foi também utilizado para a determinação do fósforo (que permite a quantificação em termos de fosfatos) um procedimento baseado no Método 4500-P C., denominado Método colorimétrico do ácido vanadomolibdofosfórico. Os valores do teor de fósforo das amostras foram obtidos a partir da construção de curvas de calibração por diluição de uma solução-mãe padrão de dihidrogenofosfato de potássio, e depois corrigidos tendo em conta o volume da toma inicial de amostra [132].

Para além destes dois parâmetros, foi analisado – periodicamente – o teor de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) presente no meio de crescimento *Bristol*, aquando do ensaio com os efluentes e com lâmpadas fluorescentes e LEDs. Para tal, foi usado o método *Nitrate Cell Test 1.14542* (utilizando *kits* de teste *Spectroquant*, da *Merck*). A concentração do ião nitrato determinou-se fotometricamente (espectrofotómetro *HACH DR/2010*, a 525 nm).

## 4.6.3. Caracterização da biomassa microalgal

### 4.6.3.1. Determinação do teor de lípidos

A hidrólise ácida é um procedimento químico agressivo para a parede celular das microalgas, promovendo a rutura da mesma, para que se possa quantificar a percentagem de lípidos presente na amostra, gravimetricamente. Pode ser associada a uma extração *Soxhlet*, que consiste em retirar de uma amostra sólida os componentes que sejam solúveis no solvente utilizado, não aproveitando os restantes componentes, que são insolúveis no mesmo. Com este procedimento (hidrólise ácida + extração *Soxhlet*) pretendeu-se quantificar o teor de lípidos neutros da biomassa decorrente do ensaio de crescimento padrão da *S. obliquus* com meio sintético *Bristol*.

**Procedimento:**

Pesaram-se 500 mg de biomassa seca ( $m_{amostra}$ ) e adicionaram-se 40 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) (4N), preparada a partir de uma solução aquosa de ácido clorídrico 37%. A mistura foi colocada num BlocDigest20 (*P Selecta*), cujo banho se encontrava à temperatura de 150°C, durante 1 hora. Após arrefecer à temperatura ambiente, filtrou-se a amostra com água *Millipore* até o valor de pH da água de lavagem ficar neutro e a água não ter qualquer vestígio de cor. Os valores de pH foram medidos, aproximadamente, com papel indicador de pH (*BDN full range pH 1-14*). O filtro (*Albet*, diâmetro 110 mm) foi deixado a secar durante a noite, à temperatura ambiente.

O filtro já seco foi então colocado dentro de um cartucho de extração de celulose (diâmetro = 20 mm; comprimento = 100 mm, da *Filter-Lab*), juntamente com um pouco de algodão; as pontas do cartucho foram depois dobradas, para que não saísse biomassa durante a extração. Transferiram-se de seguida 150 mL de n-hexano para dentro de um balão de destilação. O cartucho com o filtro contendo a biomassa foi colocado dentro do extrator (visível na Fig. 24) e procedeu-se então à montagem de todo o equipamento, dentro da *hotte*. Foram ligados os sistemas de ventilação e o circuito de água, e seguidamente o sistema de aquecimento, estabelecendo a potência de modo a se ter uma ebulição moderada. Aguardou-se o tempo de extração (6 horas) e desligaram-se todos os sistemas, sendo o último o sistema de arrefecimento, cerca de 25 minutos depois. Filtrou-se a amostra contendo n-hexano e os lípidos da biomassa microalgal com um filtro (*Albet*, diâmetro = 110 mm) para um balão de evaporação de 100 mL (previamente seco em estufa (*Memmert*; 45 minutos a 103°C) e pesado ( $m_{balão}$ )) para remover possíveis vestígios de biomassa provenientes do cartucho de extração.

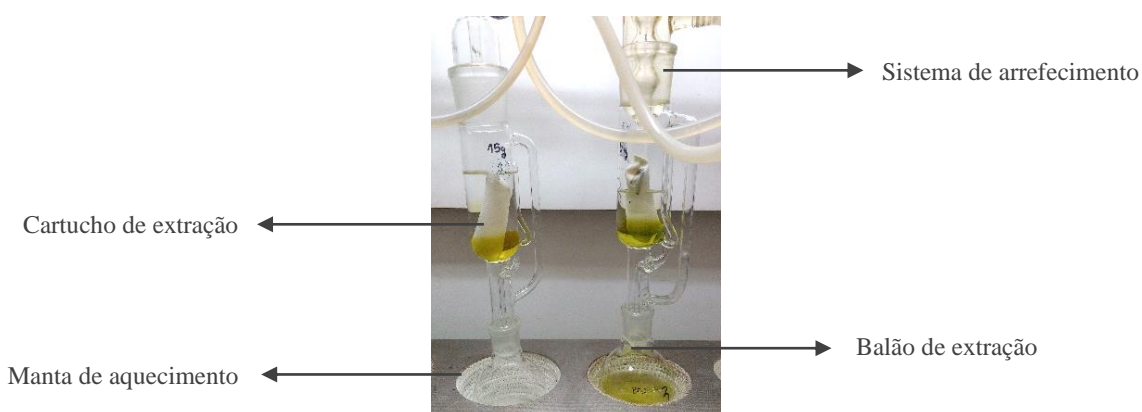


Fig. 24 – Equipamento de extração Soxhlet.

O balão de evaporação foi então colocado num rotavapor (*Büchi Heating Bath B-490*) com um banho termostático a 40°C, para iniciar a destilação do solvente. Foi usada uma pressão de aproximadamente 235 mbar, adequada ao solvente presente na amostra. Esta fase durou cerca de 20 minutos. O balão foi retirado do rotavapor e colocado na estufa (103°C), para retirar eventuais traços do solvente, durante 1 hora. Por fim, foi colocado no exsiccador para que arrefecesse, e após 1 hora pesou-se (na balança *Mettler Toledo*, usada em toda a experiência) ( $m_{balão+lípidos}$ ). O teor de lípidos pôde ser calculado através da Equação (5).

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{m_{balão+lípidos} - m_{balão}}{m_{amostra}} \times 100 \quad (5)$$

Embora o pré-tratamento por hidrólise ácida seja um processo eficiente para a contabilização dos lípidos presentes na microalga, não o é quando se pretende recuperar esses mesmos lípidos para posterior caracterização e/ou transformação. Assim, foram também realizados dois ensaios onde a biomassa (proveniente do ensaio nos FBRs com os efluentes avícolas sujeitos aos dois tipos de iluminação) foi pré-tratada num moinho de bolas (*Retsch MM400*, durante 3 minutos e 50 segundos a uma frequência de 25 Hz, utilizando esferas metálicas com 15 mm de diâmetro (Fig.

25)), para fragilizar/romper a parede celular das microalgas e assim conseguir uma eficiente contabilização, pela extração *Soxhlet*, dos lípidos nelas contidos. Os resultados obtidos foram comparados com os do pré-tratamento com hidrólise ácida e com os resultantes da utilização direta da biomassa na transesterificação pelo método do  $\text{BF}_3$  (secção 4.6.4.1), de modo a validar a utilização deste ao longo do trabalho.



Fig. 25 – Cápsula e esferas usadas no pré-tratamento da microalga *S. obliquus* no moinho de bolas *Retsch* MM400.

#### 4.6.3.2. Determinação do teor de açúcares totais

Para extrair os açúcares presentes nas células das microalgas, procedeu-se novamente a uma hidrólise ácida. Neste caso, o procedimento adotado baseou-se numa técnica usada geralmente para a degradação de material lenhocelulósico – a chamada hidrólise ácida quantitativa, descrita por Hoebler *et al.* (1989) [133]. Com este procedimento pretendia-se determinar o teor de açúcares totais da biomassa microalgal colhida após os ensaios da influência do tipo de iluminação e da adição de  $\text{CO}_2$  ao fluxo de ar de agitação.

##### Procedimento:

Pesaram-se 500 mg de biomassa liofilizada para um tubo de ensaio e adicionaram-se 1,6 mL de água *Millipore* e 3,4 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) de concentração 96% (m/m). Colocou-se o tubo de ensaio num banho termostático a 30°C durante 1 hora e de seguida transferiu-se o conteúdo do tubo para um frasco rolhado de 250 mL (como se mostra na Fig. 26 (a)). Adicionaram-se então 139 mL de água *Millipore*, para que a concentração de ácido sulfúrico atingisse os 4% (m/m), agitando-se depois a amostra. Fechou-se o frasco rolhado e autoclavou-se a amostra a 120°C, durante 1 hora. Finalmente retirou-se uma amostra do frasco, centrifugou-se (utilizando para tal a centrífuga VWR CT 15E da marca *Hitachi*, durante 5 minutos, a 15000 rpm) e por fim filtrou-se a amostra com um filtro de PTFE (*Chromafil* Xtra PTFE-20/25) de 25 mm de diâmetro e 0,20  $\mu\text{m}$  de porosidade.

Para fazer a determinação colorimétrica do teor de açúcares totais, utilizou-se o método do reagente fenol-sulfúrico, descrito por Dubois *et al.* (1956) [134].

O procedimento foi o seguinte: preparou-se uma solução aquosa de fenol ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ) 5% (m/m), diluindo-se 5 g de fenol em 100 mL de água *Millipore*, e uma solução padrão de açúcar de concentração 0,1 g/L. A partir dessa solução padrão fizeram-se cinco diluições (para construir uma reta de calibração), entre 0,005 e 0,08 g/L. As amostras pré-tratadas foram depois diluídas (1/20) para que se obtivessem valores de concentração de açúcares semelhantes aos valores usados para a reta de calibração. Transferiu-se 1 mL de cada solução padrão e de cada amostra para um tubo de ensaio, adicionou-se 1 mL da solução de fenol e agitou-se no vórtex. Adicionaram-se ao tubo de ensaio 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (96% (m/m)) e agitou-se novamente no vórtex. Deixaram-se as misturas reagir durante 10 minutos e agitaram-se mais uma vez os tubos. A aparência final das amostras está ilustrada na Fig. 26 (b). Colocaram-se depois os tubos num banho de água fria, para que arrefecessem, durante 15 minutos. Fez-se a leitura da absorvância (DO) de cada uma das amostras no espectrofotómetro *Hitachi* U-2000, a um comprimento de onda de 490 nm, contra um ensaio branco preparado aquando dos restantes, onde a amostra foi substituída por água *Millipore*.

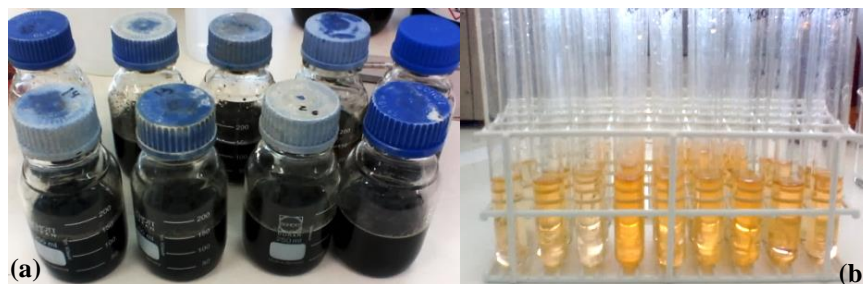


Fig. 26 – (a) Frascos rolhados para realização da hidrólise ácida quantitativa; (b) Tubos de ensaio para determinação do teor de açúcares totais.

#### 4.6.4. Caracterização da fração lipídica

##### 4.6.4.1. Perfil e composição em ácidos gordos

O método para avaliar a composição da biomassa em termos de ácidos gordos foi baseado na norma NP EN ISO 5508:1996 e tem como principal objetivo obter, a partir da análise por cromatografia em fase gasosa, a percentagem de cada ácido gordo presente na amostra.

Antes de se proceder à análise cromatográfica, a amostra tem de ser preparada de acordo com a norma EN ISO 5509:2000 [135], que tem como princípio a adição de uma solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH), para que ocorra saponificação dos glicéridos, seguida da adição de uma solução de trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3$ ), para que ocorra a conversão dos sabões em ésteres metílicos.

##### Preparação da amostra:

Ligou-se o banho termostático para que aquecesse até aos  $85^\circ\text{C}$ . Prepararam-se as soluções necessárias para o procedimento, nomeadamente uma solução metanólica de hidróxido de sódio, dissolvendo-se 2 g de NaOH em 100 mL de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), e a solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), dissolvendo-se NaCl em água *Millipore*, até que a solução ficasse saturada. Pesaram-se para um balão de destilação de 50 mL, 200 mg de biomassa seca/liofilizada (pesados na balança *Mettler Toledo*). Adicionaram-se 4 mL da solução metanólica de hidróxido de sódio (NaOH) e reguladores de ebulição, após o que se colocou o balão em refluxo e imerso no banho, durante 5 a 10 minutos. Agitou-se o balão a cada minuto, para evitar formação de um anel de NaOH à volta do mesmo. Adicionaram-se, através do tubo refrigerante, 5 mL de  $\text{BF}_3$  e deixou-se em ebulição durante 3 minutos, após o que se adicionou, pelo mesmo tubo refrigerante, 3 mL de isooctano ( $\text{C}_8\text{H}_{18}$ ). O balão foi depois retirado do calor e, ainda quente, adicionaram-se 20 mL da solução saturada de NaCl através do refrigerante. Foi retirado do suporte, tapado e agitado fortemente durante 15 segundos, aproximadamente. Adicionou-se depois mais solução saturada de NaCl até ao “pescoço” do balão. Caso não ocorresse a total separação das fases procedeu-se a uma centrifugação (3900 rpm, 10 minutos, na centrífuga *Sigma 2-6E Sartorius*). Como ilustrado na Fig. 27, a fase superior continha a fração lipídica extraída da biomassa microalgal, que foi transferida, com o auxílio de uma micropipeta, para um tubo de vidro, fazendo-a passar por uma pipeta de *Pasteur* contendo algodão e sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), para retirar quaisquer resíduos de água da amostra. A amostra filtrada foi depois analisada por cromatografia em fase gasosa.



Fig. 27 – Resultado após centrifugação do líquido resultante do método BF<sub>3</sub>.

Nos casos em que se pretendeu analisar o teor de ésteres metílicos na fração lipídica, adicionou-se cerca de 15 mg de padrão interno (éster metílico do ácido heptadecanóico, C17:0) a 1,5 mL da amostra filtrada acima referida (fase do isooctano), procedendo-se depois a análise cromatográfica, cujo resultado está apresentado na Fig. 28.

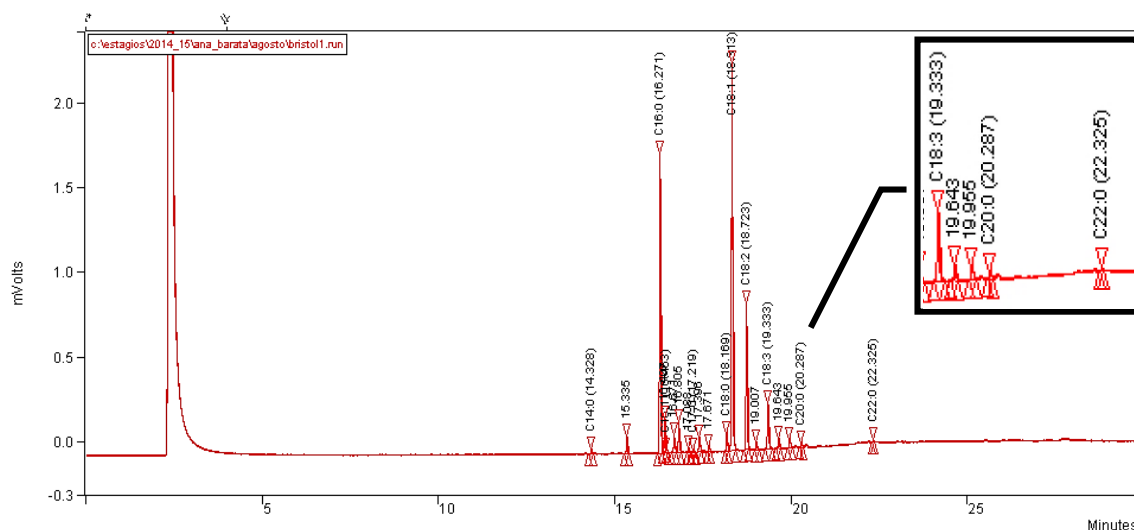


Fig. 28 – Cromatograma referente à análise da fração lipídica da biomassa obtida de uma cultura de *S. obliquus* em meio *Bristol*. Na ampliação é visível a identificação de cada ácido gordo e o tempo a que são identificados.

### Análise cromatográfica:

As amostras foram analisadas num cromatógrafo (*Varian 3800*), equipado com detetor de ionização à chama (FID) e coluna capilar (*Supelcowax 10*, comprimento 30 m, diâmetro interno 0,32 mm e espessura de filme 0,25 µm) nas seguintes condições: temperatura inicial da coluna – 60°C (2 min); taxa de aquecimento de 10°C/min até 200°C, seguida de taxa de aquecimento de 5°C/min até 240°C (7 min); temperatura do injetor – 250°C; temperatura do detetor – 250°C; pressão do gás de arrasto (hélio (N50)) – 6,0 psi; volume de injeção – 1 µL.

A percentagem relativa de cada um dos ésteres metílicos de ácidos gordos foi calculada através da Equação (6).

$$\% \text{ Éster metílico}_i \text{ (m/m)} = \frac{A_i}{\sum A - A_{PI}} \times 100 \quad (6)$$

onde  $\sum A$  representa a área total dos picos dos vários ésteres metílicos,  $A_{PI}$  a área do pico que corresponde ao padrão interno utilizado e finalmente  $A_i$  é a área do pico do qual se pretende calcular a percentagem.

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos foi feita por comparação com o obtido para uma solução padrão, analisada nas mesmas condições cromatográficas.

O teor de ésteres metílicos de ácidos gordos na fração lipídica foi calculado através da Equação (7).

$$\% \text{ Éster metílico (g/100 g biomassa)} = \frac{\sum A - A_{PI} \times m_{PI} \times \frac{V_{\text{isooctano},i}}{V_{\text{isooctano},f}}}{m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (7)$$

onde  $m_{PI}$  é a massa do padrão interno (C17:0) [mg],  $V_{\text{isooctano},i}$  é o volume total de isooctano usado no método  $\text{BF}_3$  (3 mL),  $V_{\text{isooctano},f}$  representa o volume de isooctano/ésteres metílicos usado para a análise cromatográfica [mL] e  $m_{\text{biomassa}}$  é a massa de biomassa pesada para o processo de transesterificação (método  $\text{BF}_3$ ) [mg].

#### 4.6.4.2. Índice de Iodo

O índice de iodo é outro dos parâmetros importantes para a comercialização do biodiesel. Permite avaliar o grau de insaturação de um óleo (ou já do próprio biodiesel). É calculado teoricamente de acordo com a EN 16300 [136], ou experimentalmente, segundo a EN 14111 [137].

Como a amostra de biomassa era muito limitada, neste trabalho foi apenas calculado o índice de iodo teórico, que corresponde ao somatório dos valores resultantes da multiplicação dos fatores presentes na Tabela 7 (correspondentes apenas aos FAME insaturados) pela percentagem dos FAME obtida a partir da análise cromatográfica. A expressão que permite calcular o índice de iodo teórico encontra-se explicitada na Equação (8).

Tabela 7 – Fatores de multiplicação de cada éster metílico. Adaptado de [136].

Ésteres metílicos de ácidos gordos insaturados		Fator Multiplicativo
Miristoleato de metilo	C14:1	1,056
Palmitoleato de metilo	C16:1	0,950
Heptadecenoato de metilo	C17:1	0,899
Oleato de metilo	C18:1	0,860
Linoleato de metilo	C18:2	1,732
Linolenato de metilo	C18:3	2,616
Eicosenoato de metilo	C20:1	0,782
Eicosadienoato de metilo	C20:2	1,574
Eicosatrienoato de metilo	C20:3	1,376
Docosenoato de metilo	C22:1	0,720
Docosadienoato de metilo	C22:2	1,448
Docosatrienoato de metilo	C22:3	2,184

$$\text{Índice}_{\text{Iodo}} (\text{g I}_2/\text{100g}) = \sum (\%FAME \times \text{Fator}_{\text{multiplicativo}}) \quad (8)$$

#### **4.7. Considerações energéticas**

Como nesta dissertação se pretendia realizar a produção/crescimento de microalgas de uma forma energeticamente (e economicamente) sustentável, foram tidos em conta os valores de consumos energéticos de alguns equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental.

Esses consumos foram retirados de alguns trabalhos já realizados no LNEG, que utilizaram os mesmos aparelhos. Na Tabela 28 (Anexo II) encontram-se os consumos energéticos de alguns dos referidos equipamentos, juntamente com o trabalho experimental onde foram utilizados e a sua marca e modelo.

Os consumos energéticos foram averiguados com um medidor de energia elétrica Ecowatt *Chacon* KGS 01-01.

## Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Neste capítulo serão discutidos os principais resultados obtidos durante o trabalho experimental, assim como serão feitas algumas comparações com trabalhos existentes na literatura.

Este capítulo está dividido em secções relacionadas com os diferentes ensaios realizados, cujas características foram descritas no subcapítulo 4.3 do Capítulo 4 – Materiais e Métodos. Nessas secções, para além da análise do crescimento da(s) microalga(s), são também apresentados os resultados da caracterização da biomassa microalgal e da bioremediação dos efluentes, nos ensaios em que esses estudos ocorreram.

### 5.1. Caracterização dos efluentes

A caracterização prévia dos efluentes permite compreender, por um lado, em que medida os mesmos podem ser utilizados como meio de crescimento de uma cultura microalgal, e por outro, em que medida as microalgas são eficientes no seu tratamento. Convém referir que, devido à natureza dos efluentes analisados, que contêm grandes quantidades de matéria orgânica deteriorável, esta caracterização apenas corresponde às amostras recolhidas de efluentes de um mesmo dia, que depois foram usadas ao longo dos ensaios.

Para efluentes deste tipo, que têm cargas orgânicas consideráveis, devem ser realizadas análises imediatamente antes da sua utilização, para que seja tida em conta a sua caracterização real e se exporte essa informação para os fins desejados.

Quanto ao efluente de porco *bruto*, apenas figuram nesta dissertação os valores da sua caracterização obtidos a partir de outro trabalho realizado no LNEG; a comparação entre os efluentes avícola *bruto* (AB), avícola *floculado* (AF) e porco *bruto* (PB) será apenas referente ao conteúdo em sólidos e à caracterização iónica (azoto e fósforo).

#### 5.1.1. Teor de sólidos

A determinação dos sólidos de um efluente é considerada uma análise simples pois consiste apenas na realização de filtração, secagem, calcinação e pesagem das amostras. Apesar disso, permite conhecer de forma primordial as partículas que fazem parte dos efluentes, quer em relação ao tamanho (sólidos suspensos ou dissolvidos), quer à natureza química (sólidos fixos ou inorgânicos, e voláteis ou orgânicos). Ter conhecimento destes parâmetros é importante porque o aumento dos sólidos em suspensão num rio, por exemplo, aumenta a turbidez da água, o que leva à diminuição da penetração da luz solar e por conseguinte irá afetar o crescimento dos organismos fotossintéticos, comprometendo a produção de nutrientes para toda a cadeia alimentar, bem como a produção de O<sub>2</sub> necessária à vida aquática [138].

O teor de sólidos dos efluentes avícolas estudados foi determinado e os resultados estão apresentados na Tabela 8. O efluente avícola *bruto*, heterogéneo e com muitos precipitados em suspensão, apresentou valores mais elevados do que o efluente *floculado* em todos os parâmetros analisados.

Tabela 8 – Teor de sólidos dos efluentes avícola *bruto*, avícola *floculado* e porco *bruto*.

	Efluente		
	Avícola <i>bruto</i> (AB)	Avícola <i>floculado</i> (AF)	Porco <i>bruto</i> (PB)
SST [g/L]	1,42 ± 0,08	0,06 ± 0,01	7,43 ± 0,19
ST [g/L]	2,03 ± 0,04	0,67 ± 0,003	13,25 ± 0,07
SV [g/L]	1,35 ± 0,03	0,11 ± 0,001	6,24 ± 0,17
SSV [g/L]	1,17 ± 0,06	0,03 ± 0,01	4,51 ± 0,21

Estes valores representam a média ± desvio padrão de 2 (efluente avícola) e 5 (efluente suíno) repetições

Ao comparar os efluentes de aves (AB e AF) e o de porco (PB), é clara a diferença entre os sólidos neles existentes. Este facto denota a necessidade de haver uma diluição significativamente maior do efluente de origem suína nos ensaios de crescimento da microalga.

### 5.1.2. Teor de azoto, fósforo e CQO

Outro parâmetro importante na análise de efluentes é a quantidade de certos iões presentes nos mesmos, que limita a descarga das águas residuais para o meio ambiente. No âmbito desta dissertação foi analisado o conteúdo dos dois efluentes avícolas em termos de azoto, na forma de amónio (NH<sub>4</sub>-N) e nitrato (NO<sub>3</sub>-N), fósforo, na forma de fosfato (PO<sub>4</sub>-P) e de carência química de oxigénio (CQO) (Tabela 9), de modo a perceber se os efluentes seriam apropriados, ou se se teria de realizar alguma diluição/concentração destes como meio de cultura para as microalgas. Relativamente à caracterização do efluente de porco (PB), foi determinado o conteúdo em azoto total, azoto amoniacal (NH<sub>4</sub>-N), fósforo e CQO (Tabela 10).

Como se pode verificar na Tabela 9, os valores para os dois efluentes avícolas (AB e AF) são muito distintos, principalmente quanto ao teor de NH<sub>4</sub>-N e de CQO. É notória a diferença entre a CQO dos efluentes avícolas *bruto* e *floculado*: o efluente AB contém quase sete vezes mais contaminantes do que o efluente AF, valor já esperado devido às diferentes aparências físicas dos efluentes.

Tabela 9 – Conteúdo inicial de NH<sub>4</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, e NO<sub>3</sub>-N dos efluentes avícola *bruto* e avícola *floculado*.

	Efluente	
	Avícola <i>bruto</i> (AB)	Avícola <i>floculado</i> (AF)
CQO [g O <sub>2</sub> /L]	3,70 ± 0,72	0,55 ± 0,51
NH <sub>4</sub> -N [mg/L]	122,71 ± 1,91	259,27 ± 9,18
PO <sub>4</sub> -P [mg/L]	27,90 ± 1,62	23,41 ± 0,81
NO <sub>3</sub> -N [mg/L]	0,18	n.d.

“n.d.” – não detetado. Estes valores representam a média ± desvio padrão de 2 (AB) e 3 (AF) repetições

Na Tabela 10, pode-se verificar que o efluente proveniente da indústria suína contém uma elevada quantidade de contaminantes, apresentando uma CQO cerca de quatro vezes superior à do efluente de aves mais contaminado. O valor de azoto amoniacal é de aproximadamente 2500 mg/L, valor muito mais elevado do que o considerado ideal para o crescimento de qualquer microalga (na ordem de 100 mg/L).

Tabela 10 – Conteúdo de CQO, de azoto total e amoniacal e de fósforo no efluente de porco *bruto*.

Efluente porco <i>bruto</i> (PB)	
CQO [g O <sub>2</sub> /L]	14,16 ± 1,25
Azoto total [mg/L]	3171
NH <sub>4</sub> -N [mg/L]	2472,4 ± 1,98
PO <sub>4</sub> -P [mg/L]	6,98 ± 0,63

Estes valores representam a média ± desvio padrão de 5 (CQO) e 2 (P total e N amoniacal) repetições

Comparando os valores da caracterização efetuada com os existentes na literatura, conclui-se que são semelhantes para efluentes vindos da indústria aviária, que reportam valores de azoto amoniacal entre 96-802 mg/L e de fósforo total de 30-50 mg/L [139]. Este é um ramo da indústria animal associado a níveis de nutrientes mais baixos do que os descritos para o setor suíno, cujos efluentes podem chegar a ter conteúdos de azoto amoniacal de 1290-2430 mg/L e de fósforo total de 264-324 mg/L [139].

Quanto à CQO destes dois tipos de águas residuais, a publicação de autoria de Zhu *et al.* (2013) reporta valores de 3,7 g O<sub>2</sub>/L (efluente do ramo suíno) [106], valor significativamente mais baixo do que o existente no efluente de porco *bruto* utilizado nesta dissertação. Relativamente ao efluente avícola, a literatura indica valores entre 1,753 e 12,052 g O<sub>2</sub>/L para um efluente derivado do estrume dos animais [140]. Se se considerarem valores de CQO de efluentes provenientes de resíduos urbanos após tratamento primário (0,060–0,137 g O<sub>2</sub>/L) analisados por Batista *et al.* (2015) [121], conclui-se que os efluentes avícola e suíno têm cargas orgânicas muito superiores comparativamente ao oriundo de resíduos urbanos.

Uma vez que o valor recomendado para o crescimento das microalgas é de cerca de 120 mg/L NH<sub>3</sub>-N [141] ( $\approx 155$  mg/L NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), chegou-se à conclusão que se poderia utilizar o efluente avícola *bruto* sem qualquer diluição e o avícola *floculado* com uma diluição de 1/2, feita com água potável. Devido ao elevado conteúdo de azoto amoniacal, o efluente de porco *bruto*, usado no ensaio com adição de CO<sub>2</sub>, seria diluído a 5%, o que significa que teria de ser realizada uma diluição de 1/20 para que fosse atingido um teor de azoto amoniacal aceitável para a(s) microalgas(s). A partir desta informação conclui-se que, pelo maior gasto de água potável, este efluente torna-se menos sustentável do que os efluentes avícolas.

### 5.1.3. Eletrocoagulação do efluente avícola *bruto*

De maneira a testar o processo de eletrocoagulação (EC) no efluente com maior quantidade de precipitados (avícola *bruto*), realizou-se este método num volume conhecido de efluente, cuja aparência original está ilustrada na Fig. 29 (a). O sobrenadante foi depois analisado relativamente ao seu teor de gorduras e o meio líquido, já sem a maior parte dos contaminantes sólidos, foi usado como meio de crescimento microalgal num ensaio realizado posteriormente.

Não foi calculada a eficiência de remoção da matéria orgânica sólida, mas é visualmente perceptível a partir das Fig. 29 (b) e (c), que esses contaminantes foram eficazmente separados do meio. Realizaram-se alguns ensaios com a mesma corrente imposta ( $\approx 10,94$  mA/cm<sup>2</sup>), mas diferentes períodos de tempo (5 e 10 minutos), e após o mesmo tempo de repouso de 30 minutos, concluiu-se que 10 minutos de EC (Fig. 29 (c)) seria o período de tempo mais adequado (ainda é considerado um tempo reduzido, com bons resultados de separação). Obteve-se um meio líquido ainda com alguma cor, mas translúcido, e constatou-se que apesar da remoção satisfatória dos sólidos existentes no efluente, o cheiro ainda permanecia, evidenciando assim que continuaria a ser necessário o tratamento biológico do mesmo, por parte da(s) microalga(s).

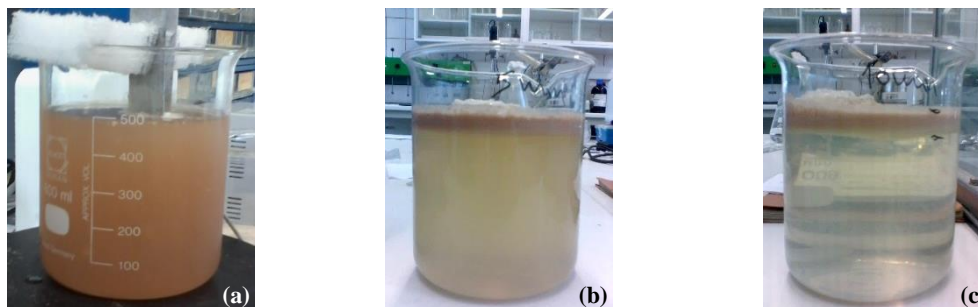


Fig. 29 – (a) Aspeto original do efluente avícola *bruto*. Resultado da EC sobre o efluente durante (b) 5 minutos e (c) 10 minutos ( $i \approx 10,94 \text{ mA/cm}^2$ ).

Foi avaliada a CQO do meio líquido após o processo de EC, tendo-se verificado que o valor para este “novo” meio era de  $1,26 \pm 0,15 \text{ g/L}$ , cerca de 3 vezes menor do que a do efluente avícola *bruto* sem qualquer tratamento (Tabela 9).

A matéria agregada à superfície após a eletrocoagulação do efluente avícola *bruto* foi analisada em termos do teor de gorduras, sendo o valor de  $0,625 \pm 0,078\%$  (m/m). Esta análise foi realizada com o intuito de uma eventual recuperação da gordura para posterior conversão em biodiesel. Em face do valor obtido, esta hipótese não será muito atrativa, mas conduz a um efluente límpido para o cultivo de microalgas, o que indica que este método pode ser utilizado em alternativa à floculação realizada pela Avibom, com vantagens económicas, energéticas e ambientais.

## 5.2. Seleção da microalga

O primeiro ensaio teve como objetivo escolher a microalga que melhor se adaptasse às condições de crescimento no efluente avícola *bruto*, dado este ter sido considerado o mais económica- e ambientalmente favorável, devido ao seu baixo custo e ao seu carácter nutricional. Assim, as cinco microalgas (*S. obliquus*, *C. protothecoides*, *C. vulgaris*, *N. oleoabundans* e *Spirogyra* sp.) foram inoculadas no efluente AB, que não foi sujeito a qualquer esterilização ou diluição, sendo utilizado exatamente como veio da empresa e apenas armazenado sob refrigeração.

O ensaio decorreu durante 30 dias e, como se pode verificar a partir da Fig. 30, o crescimento das microalgas foi bastante irregular, não se observando o crescimento logarítmico expectável para este tipo de microrganismos. Contudo, pode considerar-se que ocorreu um período de adaptação mais curto para a *S. obliquus* do que para as outras microalgas, o que depois se transformou num crescimento claramente maior (em termos de absorvância) para essa microalga.

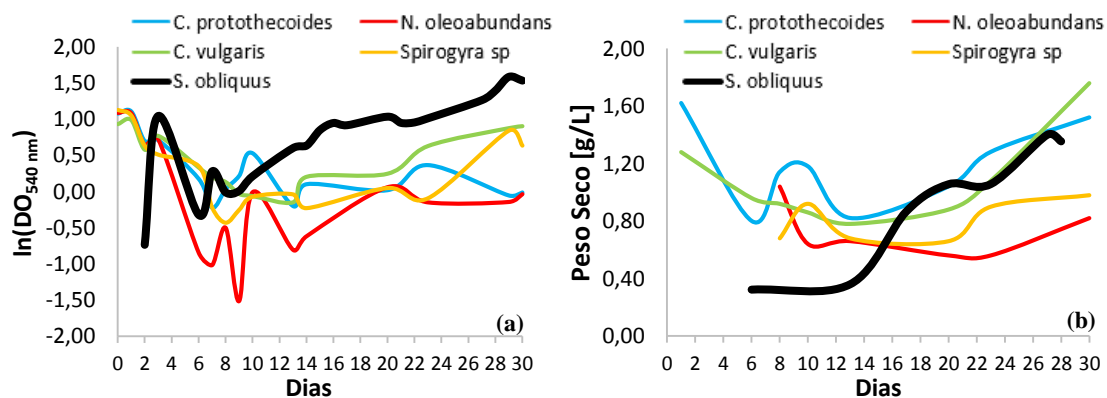


Fig. 30 – (a) Curva de crescimento das microalgas estudadas; (b) Crescimento das microalgas em termos de peso seco.

Quando a análise é feita em termos de peso seco (Fig. 30 (b)), verifica-se que a *S. obliquus* e, particularmente, as espécies do género *Chlorella*, parecem apresentar crescimentos interessantes. Pode considerar-se que o valor absoluto de peso seco calculado não vai estar correto, uma vez que nele se incluem todos os sólidos inicialmente presentes no efluente; contudo, em termos relativos pode fazer-se comparações entre os valores obtidos para as diferentes espécies de microalgas, tornando nítido, ainda assim, o crescimento de algumas delas. Visualmente, no final do ensaio, os *erlenmeyers* contendo as amostras de *Chlorella* apresentavam um aspeto baço, de cor verde/castanho com precipitados, ao contrário do *erlenmeyer* com a *S. obliquus*, que exibía a cor verde típica destes microrganismos, num meio homogéneo, como se verifica na Fig. 31. É importante assinalar também que os meios de cultura das microalgas *N. oleoabundans* e *Spirogyra* sp. se apresentaram floculados e de cor castanha, o que indica que os microrganismos não se adaptaram muito bem às condições a que foram sujeitos.



Fig. 31 – Aparência das culturas no final do ensaio de seleção da microalga, que se encontram na seguinte ordem: (da esquerda para a direita) *S. obliquus*, *C. protothecoides*, *C. vulgaris*, *N. oleoabundans* e *Spirogyra* sp..

O pH é um indicador do estado das culturas e permite averiguar se os microrganismos estão ou não a prosperar no meio de cultura em que estão inseridos. Como se apresenta na Fig. 32, após um período de adaptação, o valor do pH da *S. obliquus* começa a aumentar progressivamente até valores típicos destas culturas ( $\approx 10$ ) e o contrário acontece com as outras espécies, que no final do ensaio tinham um valor de pH de aproximadamente 6, muito baixo para a progressão normal destas microalgas.

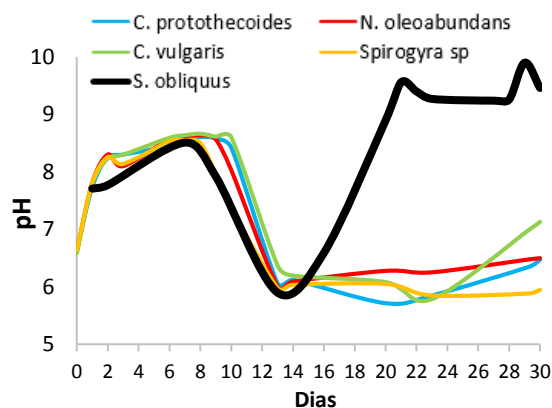


Fig. 32 – Variação do valor de pH das diferentes culturas em efluente avícola bruto.

É importante referir que os parâmetros ilustrados nas Fig. 30-Fig. 32 (principalmente o peso seco) só foram analisados a partir do momento em que se verificou visualmente um crescimento das microalgas, o que justifica a ausência de alguns dados nos gráficos no início dos ensaios.

Dado que a *Scenedesmus obliquus* mostrou as melhores *performances* de crescimento no efluente avícola bruto, foi a microalga escolhida para os ensaios posteriores.

Todos os ensaios decorreram até ser atingida a fase estacionária de crescimento, uma vez que segundo a literatura é nessa fase que se formam mais lípidos neutros, associados ao armazenamento de energia dentro da célula [142]. Os glicéridos (mono-, di- e tri-) são formados

por ácidos gordos e por isso constituem exemplos de lípidos neutros [142]. São os mais usados para a produção de biodiesel porque o processo de transesterificação básica à escala industrial está otimizado para processar esses glicéridos e tem eficiências baixas no processamento de outras frações lipídicas, como os ácidos gordos livres ou os lípidos polares ([143], [144]).

### 5.3. Crescimento da microalga *S. obliquus* em meio sintético e caracterização da biomassa microalgal

#### 5.3.1. Meio *Bristol*

##### (a) *Crescimento*

Com a seleção da *S. obliquus* como a microalga a estudar no restante trabalho experimental, foi necessário conhecer o seu crescimento num meio favorável: o meio sintético *Bristol*. Este ensaio, realizado durante 14 dias, permitiu conhecer o comportamento/crescimento da microalga *S. obliquus* num meio esterilizado, através da análise de absorvância (a 540 nm), do peso seco e do valor de pH ao longo do ensaio.

É possível verificar na Fig. 33 (a) que a curva de crescimento segue o comportamento esperado para culturas de microrganismos, apresentando um crescimento logarítmico. No entanto, neste caso, não se verificou a fase de latência inicial, correspondente à adaptação dos mesmos ao meio de cultura, exatamente porque este é o meio mais favorável para esta microalga. Observa-se, logo desde o primeiro dia, a fase exponencial, onde ocorre um aumento constante do número de células na cultura; a partir do dia 7 verifica-se que a cultura entra na fase estacionária.

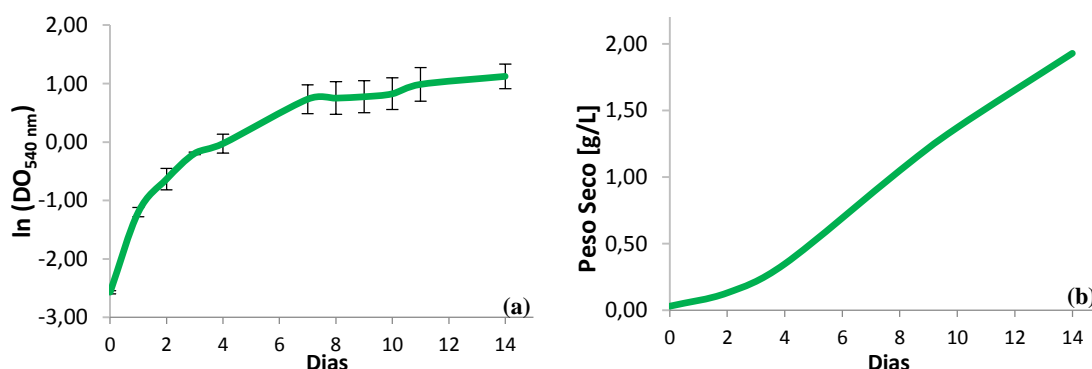


Fig. 33 – Curva de crescimento relativa à absorvância (a) e ao peso seco (b) da cultura ao longo do tempo, no ensaio com meio de crescimento *Bristol*.

Quanto ao peso seco (Fig. 33 (b)), o valor máximo obtido foi de 1,93 g/L num dos reatores, no último dia do ensaio, um valor também tipicamente normal para a *S. obliquus* e maior do que o considerado possível em reatores abertos para a produção de biomassa [145].

O valor de pH variou em média entre  $6,27 \pm 0,03$  e  $10,70 \pm 0,01$ , o que corresponde a valores típicos para o crescimento normal desta microalga em meio *Bristol* [118].

##### (b) *Caracterização da biomassa: teor de lípidos e perfil de ácidos gordos*

Foi determinado o teor de lípidos presente na biomassa microalgal de *S. obliquus* cultivada no meio *Bristol*, conforme o procedimento descrito em 4.6.3.1. Obteve-se um valor de cerca de 30% (m/m) para o teor de lípidos neutros, que correspondem aos lípidos solúveis em hexano e que efetivamente podem ser transformados em FAME.

Quanto à composição dos lípidos em termos de ácidos gordos, pode verificar-se, a partir da Tabela 11 e da Fig. 34, que as maiores percentagens correspondem aos ácidos gordos C16:0 e C18:1 (ácidos palmítico e oleico, respectivamente), perfil muitas vezes referido para os lípidos sintetizados pela microalga *S. obliquus*. Segundo os resultados de Gouveia & Oliveira (2009), por exemplo, esta microalga apresenta como maioritários os ácidos C16:0, C18:1 e C18:2 (cada um deles com uma percentagem de aproximadamente 20% m/m) e um conteúdo em ácidos gordos insaturados bastante elevado ( $\approx 55\%$  m/m) [45]. No presente trabalho, também se verificou uma percentagem muito significativa de ácidos gordos insaturados ( $\approx 66\%$  m/m), sendo que o teor de C18:3 (ácido linolénico) cumpre a especificação da norma de qualidade de biodiesel EN 14214 ( $< 12\%$  m/m) [29]. Também os ácidos gordos com quatro ou mais duplas ligações não foram identificados na biomassa em estudo, pelo que, em princípio, também este parâmetro cumpre os requisitos exigidos ( $< 1\%$  m/m) [29]. Diante destas observações, pode concluir-se que a utilização destes lípidos microalgais como matéria-prima para a produção de biodiesel é viável, devendo, no entanto, ser dada alguma atenção às propriedades de frio do biocombustível, atendendo ao teor de ácidos gordos saturados (26,5 % m/m).

Tabela 11 – Teor de ésteres metílicos de ácidos gordos na biomassa de *S. obliquus*, produzida em meio *Bristol* esterilizado.

FAME	% (m/m)
C14:0	0,46
C16:0	22,03
C16:1	1,16
C17:0	1,36
C18:0	2,28
C18:1	44,73
C18:2	10,12
C18:3	9,67
C20:0	0,37
<b>Outros</b>	<b>7,80</b>
<b>Saturados</b>	<b>26,50</b>
<b>Insaturados</b>	<b>65,70</b>

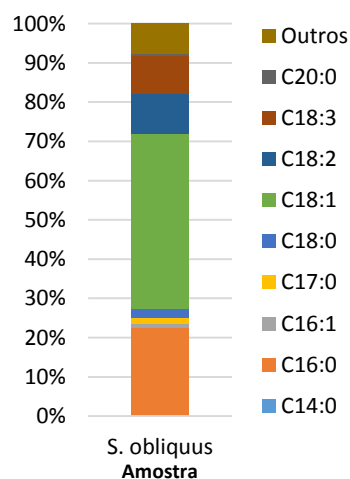


Fig. 34 – Distribuição dos FAME presentes na biomassa do ensaio com meio *Bristol* esterilizado.

### 5.3.2. Meio *Bristol* modificado

Neste ensaio, usou-se como fonte de azoto o ião amónio, em substituição do ião nitrato presente no meio *Bristol*, de modo a simular o conteúdo do efluente avícola *bruto* em relação a este parâmetro. O objetivo deste ensaio, cuja duração foi de 13 dias, foi analisar o comportamento da microalga num meio controlado e esterilizado (meio *Bristol* modificado), na presença de diferentes quantidades de ião amónio ligado a dois aniões distintos ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). No meio líquido obtido no final do ensaio, analisou-se o teor de ião amónio, para se apurar se as microalgas tinham ou não consumido esta fonte de azoto adicionada ao meio de cultura.

Como se ilustra na Fig. 35 (a), o crescimento da microalga foi quase inexistente, o que juntamente com a constante diminuição do pH das amostras, como é exibido na Fig. 35 (b), pode significar que os nitratos – neste caso,  $\text{NaNO}_3$  – excluídos do meio sintético *Bristol* são importantes para o crescimento da microalga, e que a quantidade de ião amónio não é relevante para o seu desenvolvimento, neste caso.

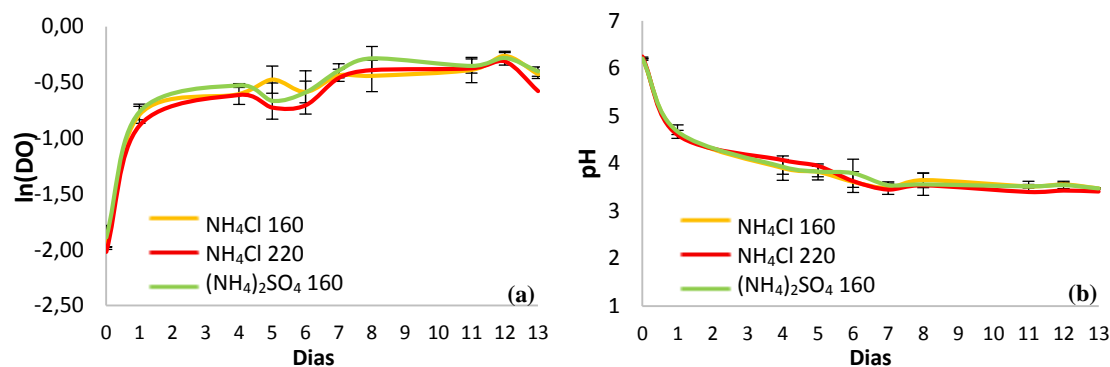


Fig. 35 – (a) Curva de crescimento da *S. obliquus* nas amostras do ensaio com meio *Bristol* modificado; (b) Variação do pH nas mesmas amostras. 160 e 220 corresponde à quantidade de ião amónio adicionada ao meio sintético [mg/L].

Outra confirmação do insucesso deste ensaio traduz-se no facto de, a partir do quinto dia, os meios de cultura terem começado a formar flóculos de microalga, à medida que o meio ficava mais translúcido, mesmo após agitação manual dos fotobioreatores; ao dia 11 do mesmo ensaio, o meio de cultura começou a aparentar um aspeto baço e a ganhar uma cor amarelada, sinal de contaminação do meio, ou devido à falta de iões nitrato e à existência de iões amónio a mais no meio sintético modificado. Os valores de peso seco foram muito irregulares e inferiores a 0,35 g/L, um valor notoriamente baixo comparado com o obtido para o meio *Bristol*.

Como se confirma na Tabela 12, após a análise do sobrenadante final, atestou-se que não houve alterações na leitura do teor de ião amónio, o que significa que a microalga não consumiu qualquer quantidade deste composto adicionado ao meio *Bristol* modificado.

Tabela 12 – Valores iniciais e finais do teor de ião amónio.

Fonte de ião amónio	Teor $\text{NH}_4^+$ [mg/L]	
	Inicial	Final
$\text{NH}_4\text{Cl}$	160	$161,38 \pm 6,14$
	220	232,34
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	160	$155,95 \pm 1,46$

Estes valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 ensaios (160 mg/L  $\text{NH}_4^+$ )

## 5.4. Crescimento da microalga *S. obliquus* em efluentes e caracterização da biomassa microalgal

### 5.4.1. Efeito do tipo de efluente

#### (a) Crescimento

Como a quantidade de ião amónio presente no efluente avícola *bruto* era apropriada ao desenvolvimento da microalga *S. obliquus*, utilizou-se este efluente sem qualquer diluição como meio de crescimento; no caso do efluente avícola *floculado*, optou-se por se fazer uma diluição (1/2), ao mesmo tempo que se analisava o crescimento da microalga nesse efluente sem diluição.

Ao longo da duração total do ensaio (29 dias), essas escolhas provaram ser acertadas (cf. Fig. 36). Como é visível na Fig. 36 (a), a microalga presente no meio avícola *bruto* (AB) foi a que obteve melhores resultados, havendo um período de adaptação até ao dia 8. Isto aconteceu devido ao choque inicial que a microalga sentiu ao ser posta em contato com um meio com muito mais contaminantes do que aquele em que estava inoculada. No entanto, após essa fase de adaptação, o seu crescimento foi constante, até ao final do ensaio.

A amostra com meio *Bristol* teve um comportamento regular e semelhante ao exibido no ensaio realizado anteriormente (secção 5.3.1 (a)) com esse meio sintético.

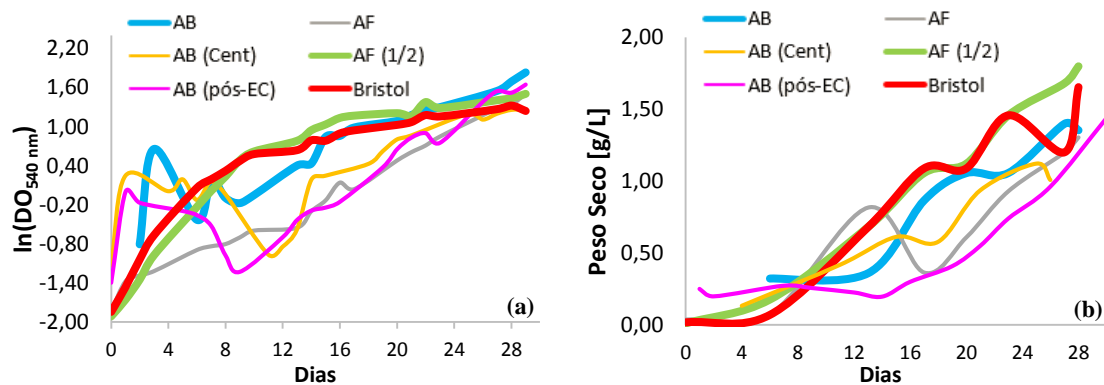


Fig. 36 – (a) Curva logarítmica da absorvância e (b) variação do peso seco, das culturas do ensaio com a *S. obliquus* e os efluentes avícolas *bruto* (AB – efluente *tal e qual*; AB (Cent) – efluente após centrifugação; AB (pós-EC) – efluente após eletrocoagulação) e *floculado* (AF – efluente *tal e qual*; AF (1/2) – efluente diluído de 1/2), juntamente com o meio *Bristol* não esterilizado.

Pode igualmente verificar-se na Fig. 36 (a) que o efluente AF diluído (AF (1/2)) foi muito favorável ao crescimento da microalga *S. obliquus*, seguindo o comportamento observado no meio *Bristol*, muito distinto do que aconteceu com o efluente AF sem diluição (AF), onde a excessiva quantidade de ião amónio (aproximadamente o dobro do valor ideal para estes microrganismos) pode ter inibido o crescimento da microalga.

Após centrifugação do efluente avícola *bruto*, estudou-se o crescimento da microalga no sobrenadante decorrente desse processo (AB (Cent)). Foi um crescimento irregular (cf. Fig. 36 (a)) e a própria aparência do meio não foi a desejada – a partir do dia 11, o meio tornou-se quase incolor e formaram-se flóculos de microalga, o que pode significar que o facto de se centrifugar o efluente antes de o utilizar como meio de cultura lhe retira certos nutrientes favoráveis ao crescimento da microalga. O crescimento da microalga no sobrenadante do efluente AB após eletrocoagulação (AB (pós-EC)) revelou uma *lag phase* de cerca de 8 dias. Vários fatores poderão ser apontados como geradores deste resultado, nomeadamente a falta de nutrientes disponíveis, uma vez que tanto a centrifugação como a eletrocoagulação poderão ter removido esses mesmos nutrientes do meio de cultura, a presença do metal do eléctrodo no meio, ou mesmo a degradação do efluente inicial.

Na Fig. 36 (b) encontra-se ilustrada a variação de peso seco de cada cultura, ao longo do tempo; verifica-se que houve um aumento regular da biomassa das amostras AB (pós-EC), AF (1/2) e *Bristol*, havendo também um aumento significativo do peso seco da amostra AB.

### (b) Caracterização da biomassa: perfil de ácidos gordos

Na Fig. 37 estão apresentados os perfis de ácidos gordos das frações lipídicas extraídas das diferentes biomassas microalgais obtidas em 5.4.1 (a); apurou-se que, em todos os casos, os ácidos gordos predominantes foram o C16:0 e o C18:1. É também de referir que no ensaio com meio *Bristol*, a distribuição dos FAME foi semelhante à da Fig. 34, correspondente à biomassa produzida em meio esterilizado.

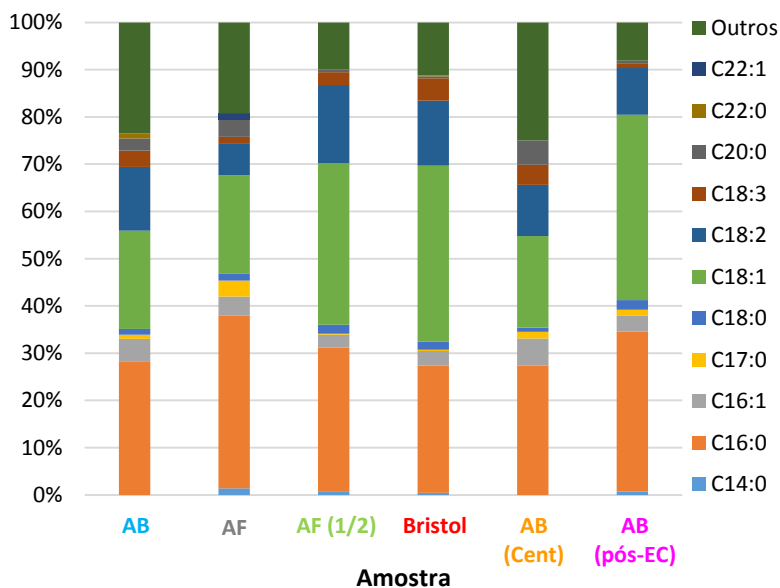


Fig. 37 – Perfis de ácidos gordos das amostras do ensaio com a *S. obliquus* e os efluentes avícolas bruto (AB – efluente *tal e qual*; AB (Cent) – efluente após centrifugação; AB (pós-EC) – efluente após eletrocoagulação) e floculado (AF – efluente *tal e qual*; AF (1/2) – efluente diluído de 1/2), juntamente com o meio Bristol não esterilizado.

Como o objetivo era apurar quais os melhores resultados para o aumento de escala, escolheram-se o efluente avícola bruto sem diluição – AB – e o efluente avícola floculado diluído – AF (1/2) –, uma vez que foram os meios de cultivo com os quais se obtiveram as melhores *performances* de crescimento e podem ser usados *tal e qual* como são recolhidos na empresa (bastando apenas uma diluição para o efluente AF).

## 5.4.2. Efeito do tipo de iluminação

Após analisados os dados de crescimento nos diferentes efluentes, a microalga *S. obliquus* foi inoculada nos efluentes avícola bruto (sem diluição) e avícola floculado (diluição 1/2), sob diferentes condições de iluminação e semelhantes fluxos de ar para agitação, para que se estudasse o efeito da fonte de iluminação (lâmpadas fluorescentes vs. LEDs) no crescimento das culturas. Como é conhecido, as lâmpadas LED permitem uma elevada poupança energética relativamente às fluorescentes, com a vantagem adicional de serem mais duradouras, de gerarem menor calor e de conseguirem reduzir o *stress* devido ao excesso de iluminação que por vezes ocorre no cultivo de microalgas [146].

Estes ensaios decorreram durante 31 dias, em reatores de coluna de bolha. Para além do crescimento microalgal, a biomassa obtida após eletrocoagulação seguida de centrifugação foi analisada em termos de ácidos gordos, matéria saponificável e açúcares totais. Neste ensaio foi também avaliado o crescimento da microalga *S. obliquus* em meio Bristol não-esterilizado, sob as mesmas condições de iluminação, apesar de não ter sido analisada a biomassa proveniente desse crescimento. O filtrado decorrente da análise do peso seco foi caracterizado relativamente à depleção de iões amónio (analisado periodicamente) e fosfato (analisado no início e no final do ensaio).

### (a) Crescimento

Na Fig. 38 ilustram-se as curvas de crescimento da microalga *S. obliquus* relativamente à absorvância. Verifica-se que existe um desenvolvimento regular da microalga no efluente avícola floculado (AF (1/2)) e no meio Bristol, quer seja com lâmpadas fluorescentes ou LEDs. O mesmo

não acontece para o crescimento no efluente avícola *bruto* (AB) devido a possuir no início do ensaio propriedades que não permitiam uma leitura totalmente correta da DO, como a opacidade e a presença de impurezas em suspensão. Contudo, após o início da fase estacionária (dia 7 para as amostras AF (1/2) e *Bristol*), a absorvância das amostras com o efluente AB foi sempre superior às restantes, já com uma produção visível de microalgas.

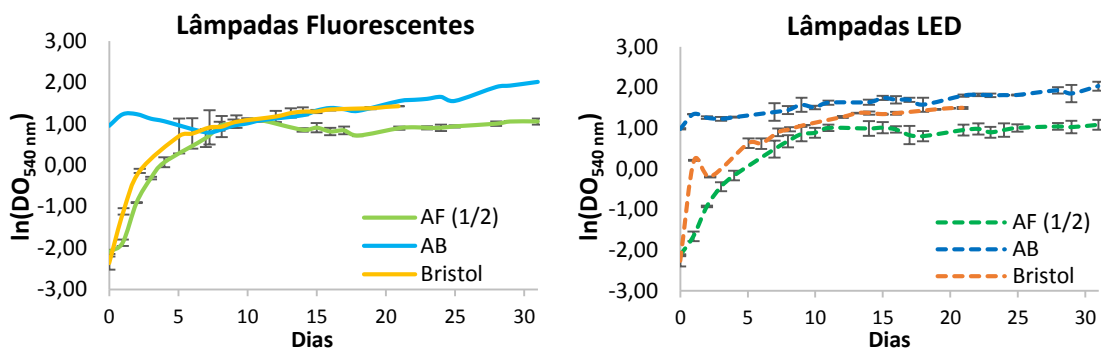


Fig. 38 – Curvas de crescimento, em termos de DO, da *S. obliquus* nos efluentes avícolas *floculado* (AF (1/2)) e *bruto* (AB) e em meio *Bristol*, sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

Quanto ao peso seco das amostras (Fig. 39), conclui-se uma vez mais que o efluente AB apresenta os melhores resultados, tendo atingido no final do ensaio entre 3-4 g de biomassa por litro de meio. Os dois tipos de iluminação corroboram este facto; verificou-se ainda que nos crescimentos em meio *Bristol* se obtiveram melhores resultados do que os realizados em efluente AF (1/2).

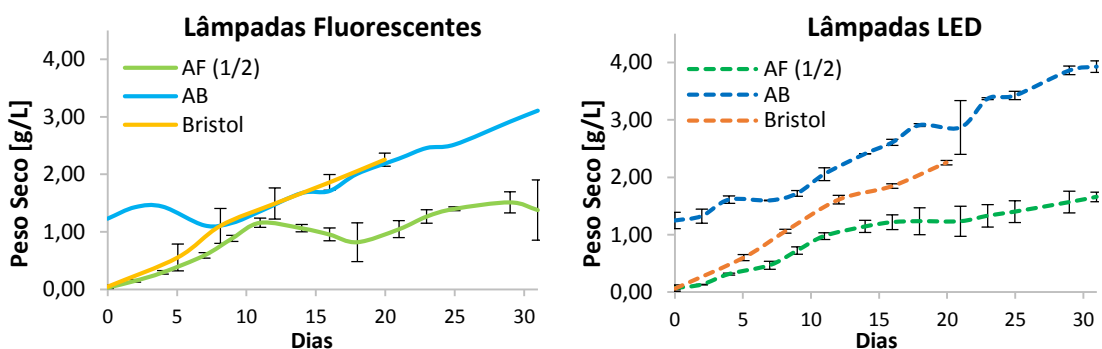


Fig. 39 – Variação do peso seco das culturas nos ensaios com efluentes avícolas *bruto* (AB) e *floculado* (AF (1/2)), e em meio *Bristol*, sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

Verificou-se que o efluente AB teve logo desde o início um peso seco elevado, o que não significa que esse valor correspondesse a biomassa produzida pela *S. obliquus*. Torna-se necessário analisar a função logarítmica imposta aos valores de peso seco, para averiguar, em termos relativos, se ocorreu ou não algum crescimento da microalga. Esses resultados encontram-se na Fig. 40.

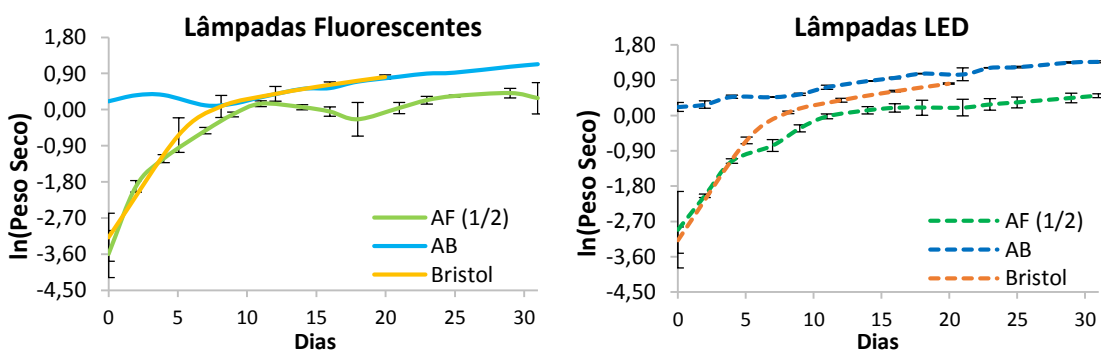


Fig. 40 – Curva de crescimento relativa ao peso seco das culturas nos ensaios com o efluente avícolas *bruto* (AB) e *floculado* (AF (1/2)), e em meio *Bristol*, sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

Analisando o crescimento logarítmico das amostras através dos gráficos da Fig. 40, conclui-se que de facto as taxas de crescimento associadas ao efluente avícola *bruto* são muito menores do que as do efluente avícola *floculado* e do meio *Bristol*. Isto não impede que a *S. obliquus* cresça favoravelmente no efluente AB (os valores de peso seco são expressivamente superiores); apenas significa que como à partida este efluente tem maior quantidade de partículas em suspensão – que contribuem para o valor de peso seco – a microalga pode ter maiores dificuldades em adaptar-se, que se traduzem em produtividades e taxas de crescimento inferiores.

Constata-se, na Fig. 41, que as taxas média e máxima diária de crescimento são mais elevadas nas culturas com meio *Bristol*, seguidas das amostras com efluente AF diluído. Isto deve-se a estes serem os meios de crescimento mais límpidos, permitindo assim a melhor penetração da luz; os dois tipos de iluminação permitiram melhores taxas de crescimento com o meio *Bristol*. Quanto ao efluente AB, verifica-se que as taxas de crescimento são diminutas. Devido à composição inicial dos efluentes, os reatores com efluente AF (1/2) puderam crescer mais e de forma mais célere do que os com efluente AB (que inicialmente tinha muitos precipitados, era opaco e de cor avermelhada). Esse crescimento mais regular e estável nos ensaios com efluente AF (1/2), logo desde o início do ensaio, já foi ilustrado na Fig. 38 (variação da absorvância).

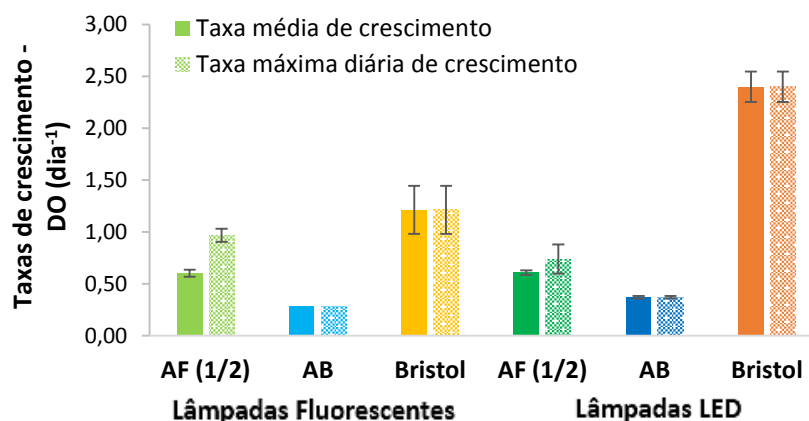


Fig. 41 – Taxa média e máxima diária de crescimento relativa aos valores de absorvância das culturas com o efluente avícola *bruto* (AB) e *floculado* (AF (1/2)) e o meio sintético *Bristol*, sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

A Fig. 42 corresponde às taxas (média e máxima diária) de crescimento, mas desta vez relativas ao peso seco das amostras. A conclusão que se retira deste parâmetro é a mesma das taxas de crescimento relativas à DO estudadas anteriormente, sendo que o desenvolvimento foi mais constante nas amostras com efluente *floculado* e meio *Bristol*, conclusão que se traduz em valores de crescimento quase logarítmico do peso seco. Contudo, existe aqui uma diferença: nos ensaios com efluente AF (1/2) obtiveram-se valores mais elevados de peso seco do que os obtidos nos ensaios cujo meio de crescimento foi o meio sintético *Bristol*.

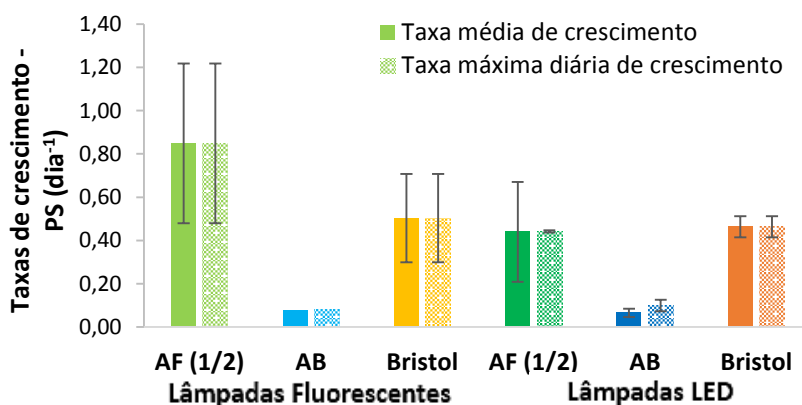


Fig. 42 – Taxa média e máxima diária de crescimento relativa aos valores de peso seco das culturas com o efluente avícola *bruto* (AB) e *floculado* (AF (1/2)) e o meio sintético *Bristol* sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

Na Fig. 43, também referente ao peso seco, observam-se as produtividades da *S. obliquus* em cada ensaio. É necessário relembrar que nestes valores está inserido o peso das impurezas existentes nos efluentes, e não só o peso da biomassa.

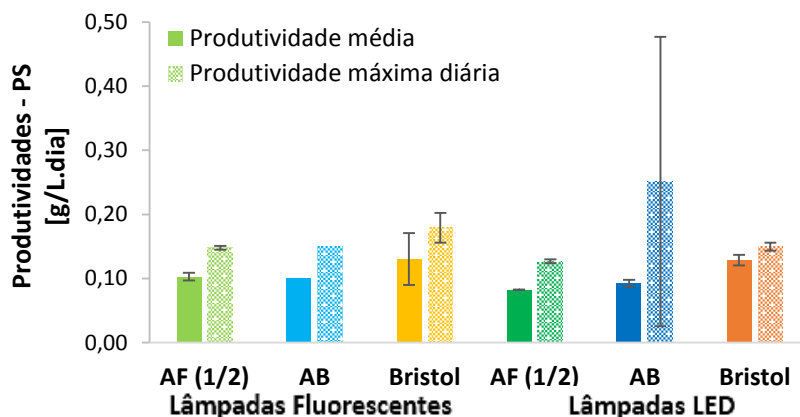


Fig. 43 – Produtividade média e máxima diária das culturas com o efluente avícola *bruto* (AB) e *floculado* (AF (1/2)) e o meio sintético *Bristol*, sob os dois tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs).

### (b) Colheita da biomassa por eletrocoagulação

Como já foi referido na revisão bibliográfica, a eletrocoagulação é um método promissor e eficaz na separação da biomassa microalgal do meio de cultura. Ao contrário do que ocorreu noutros trabalhos já realizados no LNEG e na eletrocoagulação do efluente avícola *bruto* (secção 5.1.3), este processo de separação da biomassa não decorreu como esperado nos outros ensaios realizados, mesmo com um tempo de EC superior. Por conseguinte, foi sempre necessário proceder a uma posterior centrifugação dos meios de cultura, após o repouso na câmara frigorífica.

É visível na Fig. 44 que, mesmo após uma noite de repouso, a biomassa não sedimentou nem emergiu à superfície, comprovando a ineficiência da EC nos ensaios com a microalga. Esta ineficiência na remoção da biomassa pode ser devida a uma eventual baixa condutividade do meio. Assim, para testar o meio de cultura, realizou-se um ensaio no qual progressivamente se adicionou sal, para que se avaliasse se a fonte de alimentação DC estava ou não a analisar corretamente os valores de intensidade de corrente. Uma outra hipótese justificativa da ineficiência da remoção pode ter sido devido a uma avaria na fonte de alimentação, que não permitiu atingir-se intensidades de corrente mais elevadas (com as culturas deste ensaio apenas se conseguiram atingir intensidades de corrente de cerca de 3,04 mA/cm<sup>2</sup>).



Fig. 44 – Amostra 30 minutos após 15 minutos de EC (esquerda) e após uma noite na câmara frigorífica (direita).

A eficiência de recuperação da biomassa do ensaio de crescimento da *S. obliquus* onde se estudou o efeito do tipo de iluminação foi calculada. As culturas dos reatores em duplicado foram coletadas e efetuou-se leitura dos valores de DO inicial (antes da eletrocoagulação) e final das culturas (depois de 30 minutos de repouso após a EC), a 540 nm, e procedeu-se ao cálculo da

eficiência de recuperação da biomassa produzida. A partir dos valores da Tabela 13, pode de facto concluir-se que a eletrocoagulação, neste trabalho, não decorreu como descrito na literatura, o que resultou em eficiências de recuperação da biomassa muito mais baixas do que as calculadas no estudo de Matos *et al.* (2013), por exemplo [47].

Tabela 13 – Valores iniciais e finais das absorvâncias [A] das amostras com efluente avícola (*floculado* – AF (1/2) e *bruto* (AB)) sob os dois tipos de iluminação (fluorescente e LED) e eficiências de recuperação da biomassa microalgal.

Amostra	Tipo de iluminação	DO <sub>540nm</sub> (inicial)	DO <sub>540nm</sub> (após 30 minutos)	$\eta$ recuperação da biomassa
AF (1/2)	Fluorescente	3,42	1,85	46%
AB	Fluorescente	8,22	5,91	28%
AF (1/2)	LED	3,75	2,28	39%
AB	LED	10,70	4,46	58%

Segundo esses autores, as eficiências de recuperação da biomassa são quase sempre superiores a 90% para as condições otimizadas (para uma cultura de *Nannochloropsis* sp., obtiveram eficiências de 96% após 10 minutos de EC) [47]. Na Fig. 45 exemplifica-se o resultado de uma eletrocoagulação bem-sucedida. Na figura é visível a separação entre a biomassa microalgal e o sobrenadante; as amostras foram sujeitas a diferentes períodos de EC – entre 1 e 15 minutos – com uma intensidade de corrente de 8,3 mA/cm<sup>2</sup>. A figura mostra os resultados depois de 30 minutos de repouso. A intensidade de corrente aplicada, a área dos elétrodos e o tempo de execução da EC são fatores determinantes na eficiência de recuperação da biomassa; no entanto o período de repouso após a EC é também fundamental. A título de exemplo pode ser mencionado o caso estudado por Matos *et al.* (2013), em que uma eletrocoagulação realizada durante apenas 5 minutos (2º copo de vidro na Fig. 45) permitiu uma eficiência de remoção de 95%, mas após 24 horas de sedimentação [47].



Fig. 45 – Resultado da EC durante 1, 5, 10 e 15 minutos (da esquerda para a direita). Adaptado de [47].

Voltando à Tabela 13, verifica-se que não se encontrou uma correlação entre o tipo de efluente/iluminação usado e as diferentes eficiências de recuperação, uma vez que enquanto na iluminação fluorescente a maior remoção ocorreu na amostra com efluente AF (1/2), na iluminação com lâmpadas LED foram as culturas com o efluente AB que obtiveram eficiências superiores. Isto pode estar relacionado com os problemas ocorridos aquando da realização da eletrocoagulação – como a pouca intensidade de corrente imposta às amostras – ou então porque a própria biomassa é diferente de caso para caso.

### (c) Caracterização da biomassa microalgal

#### (c).1. Teor de ácidos gordos e matéria saponificável

O perfil de ácidos gordos da biomassa obtida neste ensaio foi analisado para cada amostra consoante o tipo de efluente/tipo de iluminação. O outro propósito desta análise foi quantificar a matéria saponificável, ou seja, dos lípidos (FAME) existentes qual a matéria realmente passível de ser convertida em biodiesel.

Na Fig. 46, que ilustra a distribuição dos FAMES identificados por cromatografia gasosa, verifica-se que o perfil de ácidos gordos presentes em cada amostra apresenta algumas diferenças, sendo que os FAME predominantes continuam a ser o C16:0 e o C18:1.

Ao analisar também a Tabela 14, conclui-se que nas amostras com efluente AF (1/2), prevalece o ácido oleico (C18:1), correspondente a cerca de 40% (m/m) dos ácidos identificados. Em todas as amostras, o conteúdo relativo ao ácido palmítico (C16:0) é de aproximadamente 20% (m/m). Nas amostras correspondentes ao efluente AB, existe uma distribuição mais equilibrada dos diferentes ácidos gordos; nota-se, no entanto, que nestas amostras a quantidade de “Outros” ácidos gordos não identificados é mais do que o dobro existente nas amostras com efluente AF (1/2). Verificou-se também que todas as amostras estão dentro do limite imposto pela EN 14214 quanto ao teor do ácido linolénico (C18:3), já que as quantidades são menores do que o valor de 12% (m/m) estipulado na norma europeia [29].

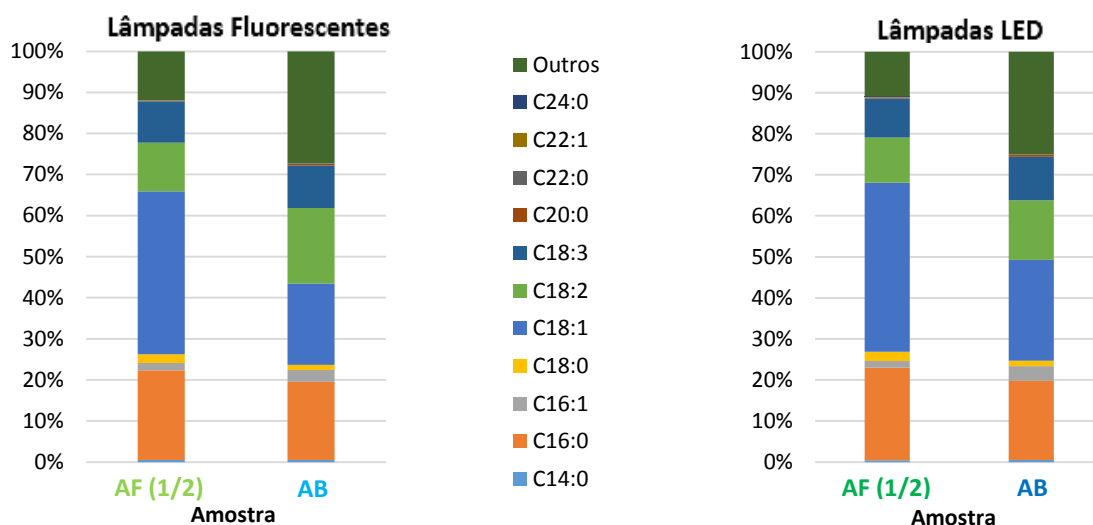


Fig. 46 – Perfis de ácidos gordos existentes nas amostras do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação (fluorescente vs. LED) no crescimento da *S. obliquus* (AF (1/2) – efluente avícola *floculado* com diluição 1/2; AB – efluente avícola *bruto* sem diluição).

Analisando ainda o final da Tabela 14, verificou-se que as amostras com o efluente AF (1/2) têm cerca do dobro da matéria saponificável ou seja, de lípidos passíveis de ser convertidos em ésteres, relativamente às amostras com o efluente AB. Se se comparar os dois tipos de iluminação imposta às amostras, confirmam-se algumas diferenças: a matéria saponificável presente nas amostras sujeitas a lâmpadas fluorescentes foi sempre menor quando comparada com as amostras iluminadas com LEDs, independentemente do efluente usado.

Tabela 14 – Distribuição dos ácidos gordos identificados por cromatografia gasosa na biomassa do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação (fluorescente vs. LED) no crescimento da *S. obliquus* (AF (1/2) – efluente avícola *floculado* com diluição 1/2; AB – efluente avícola *bruto* sem diluição).

Tipo de iluminação FAME [% (m/m)]	Amostra			
	Fluorescente		LED	
	AF (1/2)	AB	AF (1/2)	AB
C14:0	0,50	0,53	0,44	0,51
C16:0	21,81	19,03	22,55	19,24
C16:1	1,81	2,84	1,60	3,63
C18:0	2,16	1,27	2,29	1,33
C18:1	39,67	19,80	41,21	24,56
C18:2	11,84	18,35	11,00	14,47
C18:3	10,00	10,36	9,52	10,65
C20:0	0,14	0,40	0,18	0,47
C22:0	0,12	0,08	0,15	0,07
C22:1	n.d.	n.d.	0,05	n.d.
C24:0	n.d.	n.d.	0,06	n.d.
<b>Outros</b>	<b>11,95</b>	<b>27,33</b>	<b>10,96</b>	<b>25,10</b>
<b>Saturados</b>	<b>24,73</b>	<b>21,31</b>	<b>25,66</b>	<b>21,59</b>
<b>Insaturados</b>	<b>63,32</b>	<b>51,35</b>	<b>63,38</b>	<b>53,31</b>
<b>Matéria saponificável [g/100g biomassa]</b>	<b>24,48</b>	<b>9,93</b>	<b>29,25</b>	<b>11,38</b>

“n.d.” – não detetado

(c). 2) *Teor de açúcares totais*

O conteúdo de lípidos, proteínas, pequenas moléculas bioativas e hidratos de carbono representa a totalidade da composição destes microrganismos [147]. O intuito deste trabalho era não só fazer uma prospeção para a produção de biodiesel, mas também analisar se a(s) microalga(s) escolhida(s) era(m) favorável(is) à produção de outro biocombustível, como o bio-H<sub>2</sub> e/ou o bioetanol. O teor de açúcares totais na biomassa é igualmente um fator importante para a seleção do biocombustível a produzir.

Na Tabela 15 encontram-se os resultados obtidos após a realização de uma hidrólise ácida quantitativa, seguida do método do fenol-sulfúrico para quantificação dos açúcares totais existentes na biomassa produzida.

Tabela 15 – Quantidade de açúcares totais presentes na biomassa do ensaio que pretendeu estudar a influência do tipo de iluminação no crescimento da *S. obliquus*.

Tipo de iluminação	Amostra			
	Fluorescente		LED	
	AF (1/2)	AB	AF (1/2)	AB
<b>Açúcares totais [% (m/m)]</b>	21,60 ± 0,56	36,21 ± 0,37	24,77 ± 0,18	31,90 ± 2,64

Estes valores representam a média ± desvio-padrão de, pelo menos, 2 repetições

A partir dos valores da Tabela 15, conclui-se que a biomassa de *S. obliquus* produzida contém mais açúcares comparativamente com a quantidade de matéria saponificável já apresentada para este ensaio. Este facto indica que com estes efluentes industriais a microalga é capaz de produzir tanto lípidos quanto açúcares. Os resultados mostram que com o efluente AF (1/2), a *S. obliquus*

produz cerca de 20% (m/m) de açúcares totais. No caso do efluente AB, esse valor sobe para mais de 30 g/100g biomassa. Quanto ao tipo de iluminação que expõe os melhores resultados, nota-se que não existiu aqui uma correlação, já que a maior quantidade de açúcares associadas ao efluente AB ocorreu nas amostras sujeitas a lâmpadas fluorescentes, e no caso do efluente AF (1/2) foi a iluminação com lâmpadas LED que permitiu um teor de açúcares totais mais elevado.

(d) *Avaliação do tratamento dos efluentes pela microalga*

A bioremediação de efluentes por parte das microalgas é considerada como parte integrante de um crescimento económica- e ambientalmente sustentável. Como já foi mencionado, o sector dos resíduos comporta muitos gastos económicos, para além de, se não for gerido eficazmente, poder trazer problemas graves para o meio ambiente, em particular para os cursos de água superficiais.

No âmbito desta dissertação analisou-se o tratamento biológico das microalgas sobre os efluentes *floculado* e *bruto* (provenientes de um aviário). O objetivo era diminuir os valores analisados (iões amónio e fosfato) até aos limites impostos no DL n.º236/98 de 1 de agosto [70].

Ao analisar a Fig. 47, é possível constatar a progressiva diminuição da quantidade de ião amónio presente nos efluentes, devido ao tratamento biológico por parte da *S. obliquus*. Verificou-se que, sob iluminação fluorescente, o ensaio com efluente avícola *bruto* (AB) demora mais tempo (18 dias) a mitigar as elevadas quantidades de ião amónio que contém, ao mesmo tempo que a amostra com efluente avícola *floculado* (AF (1/2)) demorou metade desse tempo. O que aconteceu nos ensaios iluminados com lâmpadas LED foi exatamente o mesmo: 16 dias para o ensaio com o efluente AB e 9 dias para o ensaio com efluente AF (1/2) atingir o limite máximo de azoto amoniacal imposto no DL n.º236/98 (10 mg NH<sub>4</sub>-N/L [70] ou seja, 13 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L). O facto das concentrações do ião amónio serem rapidamente diminuídas para valores inferiores aos especificados na legislação indica que a partir dessa altura, relativamente ao teor do ião amónio, o efluente poderia ser libertado para qualquer curso de água sem tratamentos adicionais.

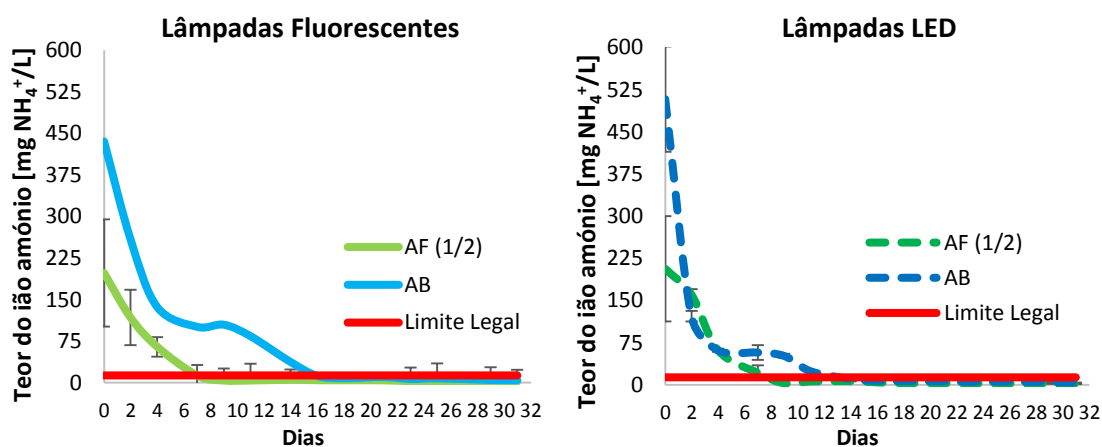


Fig. 47 – Teor do ião amónio do sobrenadante ao longo do ensaio, nas duas iluminações estudadas.

Na Tabela 16, que permite conhecer as eficiências da bioremediação dos efluentes, constata-se que se obtiveram valores entre 98-99%. Verificou-se, que, apesar de a diferença ser ténue, os valores da bioremediação relativos às lâmpadas LED são um pouco superiores aos das lâmpadas fluorescentes, e também que este processo de descontaminação é melhor sucedido e mais célere nas amostras com o efluente AF (1/2).

Tabela 16 – Quantidades iniciais e finais de ião amónio [mg/L] presente no sobrenadante das culturas sujeitas aos dois tipos de iluminação com efluente *floculado* (AF (1/2)) e *bruto* (AB), da indústria avícola. Eficiência do tratamento biológico da *S. obliquus* nos efluentes.

Amostra	Tipo de iluminação	Teor NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (dia 0)	Teor NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (dia 31)	η <sub>bioremediação</sub>	Valor limite de emissão [70]
AF (1/2)	Fluorescente	197,82 ± 16,12	2,02 ± 0,030	98,98%	10 mg NH <sub>4</sub> -N/L
AB	Fluorescente	435,44	4,54	98,96%	
AF (1/2)	LED	206,35 ± 72,66	1,74 ± 0,14	99,16%	
AB	LED	508,36 ± 96,66	3,59 ± 0,15	99,29%	

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

Estes resultados indiciam que a *S. obliquus* é capaz de “tratar” os efluentes de uma forma rápida e eficiente, levando entre 9-18 dias sob iluminação fluorescente e 9-16 dias sob lâmpadas LED para atingir o limite legal para o ião amónio.

Pode da mesma forma verificar-se que o teor de fosfatos fica praticamente nulo (Tabela 17), comparando os valores iniciais e finais. Quanto a este parâmetro, os valores obtidos após o tratamento biológico da *S. obliquus* estão de acordo com a literatura ([114], [148]), e confirmam que o efluente no final do ensaio cumpre este requisito legal. Na Tabela 17, observa-se ainda que a eficiência do tratamento da *S. obliquus* sobre os dois efluentes, em ambas as iluminações, foi quase total.

Tabela 17 – Quantidades iniciais e finais de fosfatos [mg/L] presentes no sobrenadante das culturas sujeitas aos dois tipos de iluminação com efluente *floculado* (AF (1/2)) e *bruto* (AB), da indústria avícola. Eficiência do tratamento biológico da *S. obliquus* nos efluentes.

Amostra	Tipo de iluminação	Teor PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (dia 0)	Teor PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (dia 31)	η <sub>bioremediação</sub>	Valor limite de emissão [70]
AF (1/2)	Fluorescente	25,75 ± 1,77	0,15 ± 0,14	99,42%	10 mg P/L
AB	Fluorescente	43,50 ± 0,35	0,15	99,66%	
AF (1/2)	LED	26,50 ± 1,41	0,75	97,17%	
AB	LED	41,75 ± 1,77	0,69 ± 0,27	98,35%	

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

### 5.4.3. Crescimento da microalga *S. obliquus* em efluente avícola e suinícola, com adição de CO<sub>2</sub>

#### (a) Crescimento

No último ensaio (que durou 28 dias), à agitação com ar comprimido foram adicionados 5% de CO<sub>2</sub>, de modo a estudar o comportamento da *S. obliquus* perante este nutriente adicional, no efluente de aves *bruto* (neste ensaio designado AB<sub>CO2</sub>) e no efluente de porco *bruto* (PB<sub>CO2</sub>), com iluminação fluorescente.

À semelhança do que aconteceu com a biomassa produzida no ensaio anterior, foi analisado o perfil de ácidos gordos, o teor de açúcares totais e a matéria saponificável relativos à biomassa microalgal produzida. Como já foi mencionado, os meios de cultura derivados deste ensaio foram

apenas centrifugados, após terem repousado uma noite na câmara frigorífica. A bioremediação (ião amónio e fosfatos) dos efluentes foi averiguada de forma similar.

Nos gráficos seguintes (Fig. 48 e Fig. 49) apresentam-se os resultados referentes ao acompanhamento periódico das amostras em termos de absorvância, peso seco e pH.

A partir da Fig. 48 (a) verifica-se uma vez mais o favorável crescimento da *S. obliquus* no efluente avícola bruto ( $AB_{CO_2}$ ) e também no novo efluente originário da indústria suína (porco bruto ( $PB_{CO_2}$ )). Como seria de esperar, e devido à grande quantidade de precipitados existente no efluente do ramo avícola, o crescimento foi menor (cf. Fig. 48 (a)) comparativamente ao desenvolvimento da microalga no efluente de porco bruto que, como referido na secção 4.3, se encontrava diluído de 1/20; neste efluente, a *S. obliquus* exibiu um crescimento regular e típico, desde a fase de crescimento logarítmico até à fase estacionária. O crescimento da microalga no efluente avícola bruto foi superior ao ocorrido no efluente de porco bruto, atingindo-se no final da experiência, em média, um valor de DO de 12, valor nunca verificado ao longo de todos os outros ensaios.

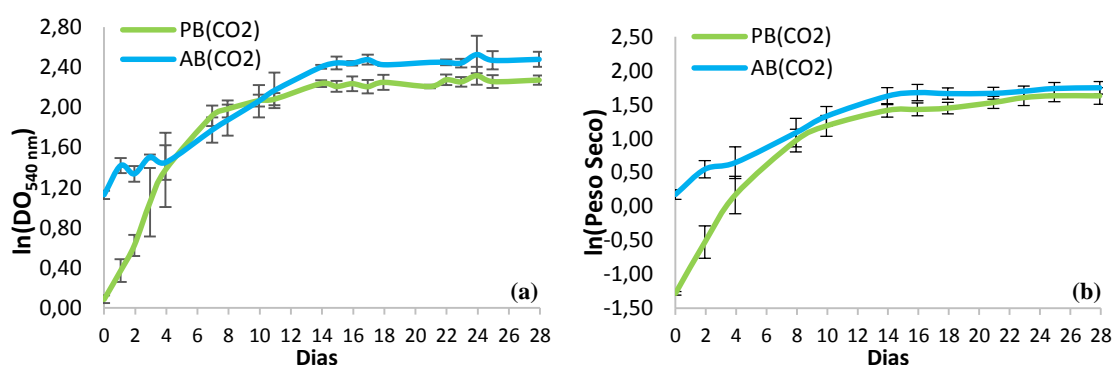


Fig. 48 – Curva de crescimento, relativamente à absorvância (a) e ao peso seco (b), das culturas com os efluentes avícola bruto ( $AB_{CO_2}$ ) e porco bruto ( $PB_{CO_2}$ ), iluminadas com lâmpadas fluorescentes (e adição de  $CO_2$ ).

A Fig. 48 (b) ilustra a curva de crescimento referente ao peso seco. A cultura com efluente de porco bruto exhibe um desenvolvimento regular e quase logarítmico e, comparando com os resultados obtidos nos ensaios anteriores (secção 5.4.2 (a)), onde não se procedeu à adição de  $CO_2$ , conclui-se que os valores de peso seco atingidos pelas culturas foram muito superiores, comprovando a influência benéfica do  $CO_2$  como nutriente adicional e “catalisador” do crescimento da microalga *S. obliquus*. As culturas atingiram valores para peso seco na ordem dos 4,8 g/L e 5,6 g/L, com os efluentes de porco bruto e avícola bruto, respetivamente, sendo que o peso seco máximo foi atingido por uma das amostras com efluente avícola bruto (mais de 6 g/L).

O pH manteve-se, inicialmente, em valores a rondar 7, como se verifica na Fig. 49, subindo depois para valores de pH mais básicos, mas apenas até cerca de 9. As culturas não terão ficado mais alcalinas devido à existência do  $CO_2$  no ar de agitação que, pelo seu carácter ácido, não permitiu a subida do pH do meio de crescimento para valores mais básicos.

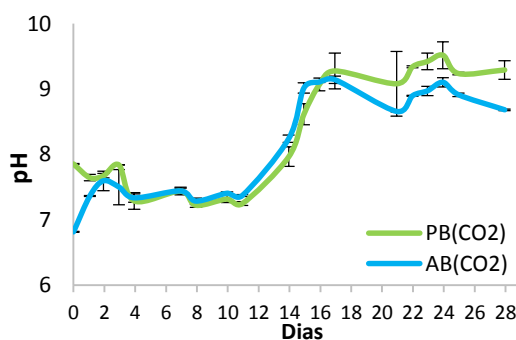


Fig. 49 – Variação do pH das culturas com os efluentes avícola bruto ( $AB_{CO_2}$ ) e porco bruto ( $PB_{CO_2}$ ) no ensaio com adição de  $CO_2$  e iluminação fluorescente.

A Fig. 50 (a) corresponde às taxas (média e máxima diária) de crescimento relativas ao peso seco das amostras. A conclusão que se retira deste parâmetro prende-se com a observação de que o desenvolvimento foi mais “típico” nas culturas com efluente de porco *bruto* (PB<sub>CO2</sub>), obtendo por conseguinte taxas de crescimento maiores. Quanto às produtividades das culturas nos dois efluentes (Fig. 50 (b)), verifica-se que são semelhantes, uma vez que o efluente avícola *bruto* (AB<sub>CO2</sub>) conseguiu alcançar valores superiores de peso seco.

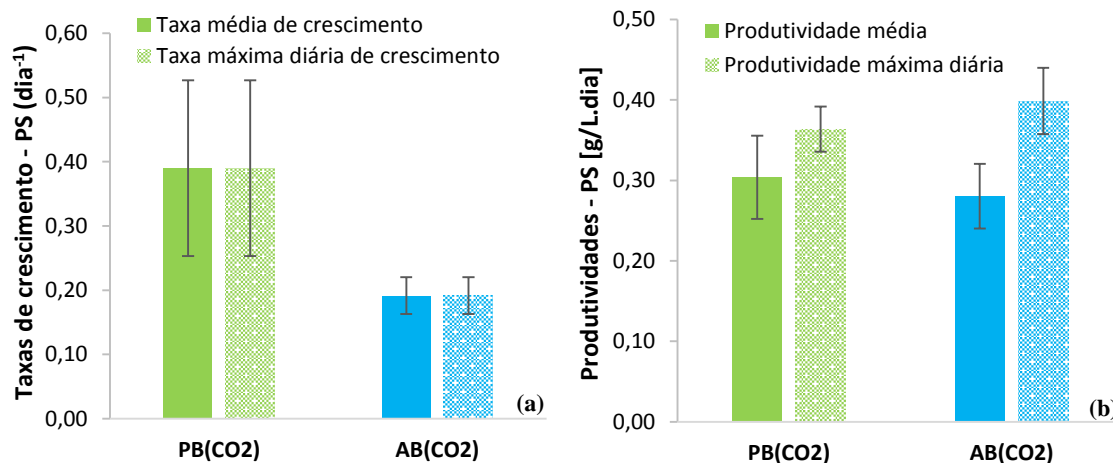


Fig. 50 – (a) Taxa média e máxima diária de crescimento e (b) Produtividade média e máxima diária das amostras do ensaio para estudar o efeito da adição de CO<sub>2</sub> ao fluxo de ar de agitação, associadas ao peso seco.

### (b) Caracterização da biomassa microalgal

#### (b). 1) Teor de ácidos gordos e matéria saponificável

Na Tabela 18, bem como na Fig. 51, encontra-se a distribuição dos ácidos gordos na biomassa produzida no ensaio com adição de CO<sub>2</sub> ao ar de agitação. Verifica-se que os ácidos gordos predominantes continuam a ser o C16:0 e o C18:1, sendo que nas amostras com o efluente avícola *bruto* (AB<sub>CO2</sub>) existe uma percentagem significativa do ácido gordo C18:2 (ácido linoleico) e um maior valor associado aos ácidos gordos não identificados. Quanto ao teor de ácido linolénico (C18:3), verifica-se que os valores obtidos neste ensaio estão também dentro do limite especificado na EN 14214 para o biodiesel (<12% (m/m)) [29]. A partir da Tabela 18, observa-se que a matéria saponificável obtida nas amostras com efluente de porco *bruto* é mais elevada do que com o efluente avícola *bruto*, que por sua vez se mantém na mesma ordem de grandeza da observada na secção 5.4.2 (c). 1).

Tabela 18 – Distribuição dos ácidos gordos na biomassa produzida e matéria saponificável existente na mesma. Ensaio realizado na presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

Tipo de iluminação	Amostra	
	Fluorescente	
FAME [% (m/m)]	Porco bruto (PB <sub>CO2</sub> )	Avícola bruto (AB <sub>CO2</sub> )
C14:0	0,37	0,49
C16:0	23,63	24,45
C16:1	1,45	1,68
C18:0	2,43	2,12
C18:1	35,65	19,78
C18:2	18,62	25,27
C18:3	5,68	5,76
C20:0	0,25	0,45
C22:0	0,07	0,07
<b>Outros</b>	<b>11,87</b>	<b>19,93</b>
<b>Saturados</b>	<b>26,74</b>	<b>27,58</b>
<b>Insaturados</b>	<b>61,39</b>	<b>52,49</b>
<b>Matéria saponificável [g/100g biomassa]</b>	<b>23,33</b>	<b>13,78</b>

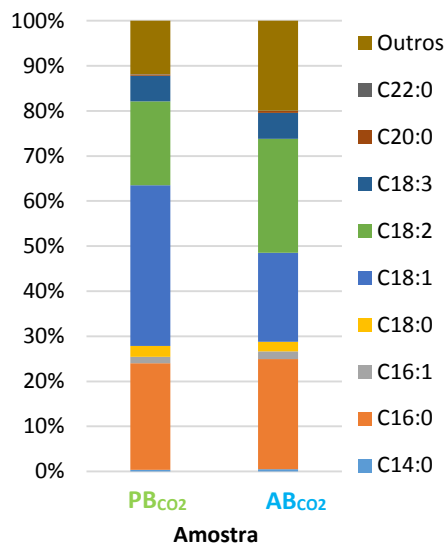


Fig. 51 – Perfil de ácidos gordos das amostras do ensaio realizado na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, sob iluminação fluorescente.

(b). 2) *Teor de açúcares totais*

Relativamente à quantidade de açúcares totais, também analisados para a biomassa produzida neste ensaio, observa-se, na Tabela 19, uma grande disparidade entre as amostras dos dois efluentes: com o efluente de origem aviária (AB<sub>CO2</sub>), a *S. obliquus* conseguiu produzir aproximadamente o dobro dos açúcares do que com o efluente proveniente da indústria suína (PB<sub>CO2</sub>). Para além disso, o teor de açúcares totais para as culturas com efluente AB<sub>CO2</sub> foi superior ao obtido no ensaio sem adição de CO<sub>2</sub> com o mesmo efluente (avícola bruto) e o tipo de iluminação (fluorescente). São valores bastante elevados, que comprovam novamente a vantagem da utilização do CO<sub>2</sub> como “catalisador” do crescimento microalgal.

Tabela 19 – Quantidade de açúcares totais existentes na biomassa do ensaio realizado na presença de 5% de CO<sub>2</sub>, sob iluminação fluorescente.

Tipo de iluminação	Amostra	
	Fluorescente	
	Porco bruto (PB <sub>CO2</sub> )	Avícola bruto (AB <sub>CO2</sub> )
<b>Açúcares totais [% (m/m)]</b>	23,61 ± 5,25	41,42 ± 1,69

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

(c) *Análise do tratamento dos efluentes*

Torna-se visível, a partir da Fig. 52, que o tratamento biológico dos efluentes pela microalga *S. obliquus* foi bem-sucedido, pois bastaram entre 8 e 10 dias para que o limite imposto pelo DL n°236/98 [70] relativamente à quantidade do ião amónio fosse atingido. Na Fig. 62 (Anexo III)

exibe-se uma ampliação do momento a partir do qual o teor de ião amónio existente nos efluentes permite a descarga legal dos mesmos.

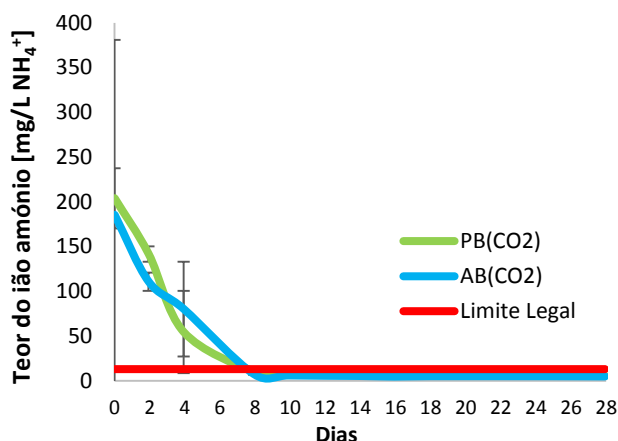


Fig. 52 – Variação do teor do ião amónio das culturas sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO<sub>2</sub>.

Os resultados decorrentes da bioremediação dos iões amónio e fosfato apresentam-se na Tabela 20 e na Tabela 21, respetivamente. Verifica-se que inicialmente o teor do ião amónio é superior no efluente de porco *bruto*; o contrário acontece com o conteúdo em ião fosfato – o efluente de avícola *bruto* contém um teor três vezes superior. Contudo, os níveis de eficácia na remoção deste contaminante pela microalga são muito semelhantes para ambos os efluentes – sempre superiores a 99%.

Tabela 20 – Quantidades iniciais e finais de ião amónio [mg/L] presente no sobrenadante das culturas com efluente avícola *bruto* e porco *bruto* sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO<sub>2</sub>. Eficiência do tratamento biológico da *S. obliquus* nesses meios de cultura.

Amostra	Tipo de iluminação	Teor NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (dia 0)	Teor NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (dia 28)	η <sub>bioremediação</sub>	Valor limite de emissão [70]
Porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> )	Fluorescente	203,88	5,26 ± 0,004	97,42%	10 mg NH <sub>4</sub> -N/L
Avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> )		185,39	4,55 ± 0,24	97,54%	

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

Tabela 21 – Quantidades iniciais e finais de ião fosfato [mg/L] presentes no sobrenadante das culturas com efluente avícola *bruto* e porco *bruto* sujeitas a iluminação fluorescente, no ensaio onde ao ar de agitação foi adicionado 5% de CO<sub>2</sub>. Eficiência do tratamento biológico da *S. obliquus* nesses meios de cultura.

Amostra	Tipo de iluminação	Teor PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (dia 0)	Teor PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (dia 28)	η <sub>bioremediação</sub>	Valor limite de emissão [70]
Porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> )	Fluorescente	23,00 ± 0,71	0,22 ± 0,09	99,06%	10 mg P/L
Avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> )		74,00 ± 0,71	0,32 ± 0,04	99,57%	

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

Na literatura, são muitos os casos de sucesso de bioremediação de águas residuais e consequente produção de biomassa microalgal viável para a síntese de biodiesel. Shen *et al.* (2015) examinaram o crescimento e a remoção de nutrientes pela microalga *S. obliquus* num efluente, variando o teor total de carbono orgânico (TOC) e as concentrações de CO<sub>2</sub> injetadas na cultura. As remoções de azoto total, fósforo total e TOC foram de 97,8%, 95,6% e 59,1%, respetivamente [114]. A mesma microalga conseguiu remover de um efluente urbano 100% do ião amónio e 98% de fósforo, num período de cerca de 4 e 8 dias, respetivamente [113]. A microalga *S. acutus*, do mesmo género que a *S. obliquus*, também foi estudada em relação à remoção de nutrientes do efluente usado para o seu cultivo. Foram removidos 66% de fósforo e 94% de azoto orgânico, após um pré-tratamento do efluente [149].

#### 5.4.4. Comparação do crescimento microalgal na presença e ausência de CO<sub>2</sub>, com os efluentes *brutos* das indústrias aviária e suína

Neste subcapítulo far-se-á a comparação entre os ensaios com os efluentes das indústrias avícola e suína, com e sem adição de CO<sub>2</sub> no ar da agitação, sob iluminação fluorescente. Será comparado o conteúdo em açúcares totais, a matéria saponificável, o perfil de ácidos gordos, a bioremediação dos efluentes e o índice de iodo, para além dos parâmetros de crescimento já analisados anteriormente (DO, pH e ps). Por isso, nos gráficos deste subcapítulo, para além dos resultados relativos ao ensaio com adição de CO<sub>2</sub> (nesta secção denominados AB<sub>CO2</sub> e PB<sub>CO2</sub>) serão também incluídos os da cultura com o efluente avícola *bruto* sujeito a iluminação fluorescente (AB), para efeitos comparativos.

Na Fig. 53 apresentam-se os dados relativos ao crescimento nas diferentes condições; para além dos valores substancialmente mais elevados, o desenvolvimento da microalga aparenta um aspeto mais constante quando é usado dióxido de carbono. Ao analisar-se as diferenças entre as absorvâncias obtidas nos dois ensaios, concluiu-se também que devido à influência do CO<sub>2</sub> adicionado, a DO lida chegou a cerca de 10 e 12, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> e AB<sub>CO2</sub>, respetivamente, ao passo, que no caso em que não se utilizou CO<sub>2</sub> adicional, o valor máximo de DO foi de cerca de 7 (na cultura AB).

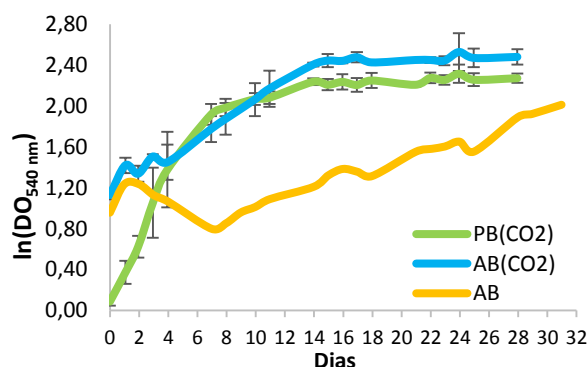


Fig. 53 – Curva de crescimento das culturas sujeitas a iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>, AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>, relativamente à absorvância.

Contudo, os dados apresentados na Fig. 54, referentes à variação do pH das culturas, mostram que a presença de CO<sub>2</sub> adicional limita o aumento do pH para níveis mais tolerantes pela *S. obliquus*, já que este gás torna o meio de cultura mais ácido.

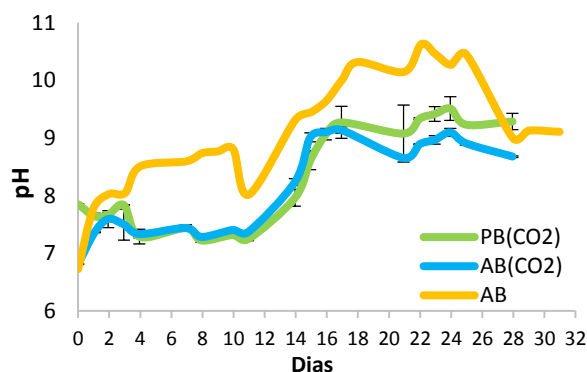


Fig. 54 – Variação do pH das culturas sob iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>; AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>.

A biomassa produzida aquando da adição de CO<sub>2</sub> foi cerca de duas vezes superior à produzida no ensaio onde apenas se utilizou ar comprimido para agitação das culturas; os valores máximos de peso seco obtidos foram de  $5,13 \pm 0,63$  g/L,  $5,77 \pm 0,53$  g/L e 3,1 g/L para os ensaios com os efluentes porco *bruto* (PB<sub>CO2</sub>), avícola *bruto* (AB<sub>CO2</sub>) e avícola *bruto* (AB), respetivamente. A curva logarítmica do peso seco, apresentada na Fig. 55, foi também mais constante nos ensaios com adição de CO<sub>2</sub>.

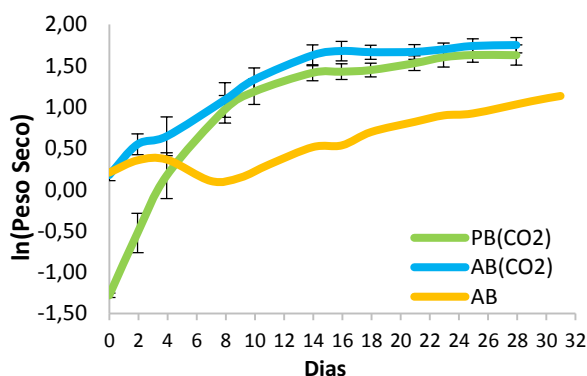


Fig. 55 – Curva logarítmica do peso seco das amostras sujeitas a iluminação fluorescente, com os efluentes PB<sub>CO2</sub> – porco *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>; AB – avícola *bruto* e AB<sub>CO2</sub> – avícola *bruto* com adição de CO<sub>2</sub>.

Relativamente ao perfil de ácidos gordos (Fig. 56), não se observaram diferenças significativas nas três amostras aqui comparadas; os ácidos gordos C16:0, C18:1 e C18:2 continuam a ser os mais abundantes, notando-se uma maior quantidade de ácidos gordos não identificados (“Outros”) na amostra que não foi sujeita à presença de CO<sub>2</sub> na agitação.

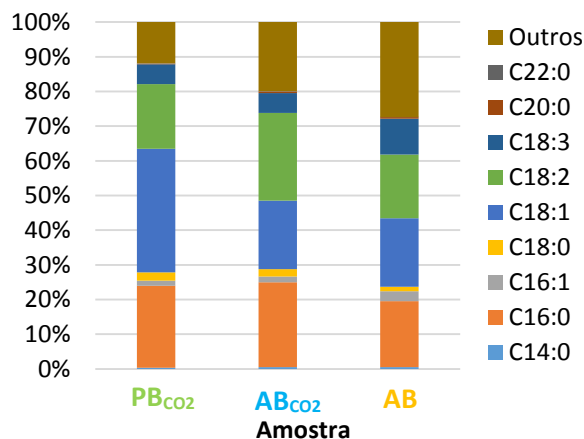


Fig. 56 – Perfil de ácidos gordos das amostras com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto*, com e sem a adição de CO<sub>2</sub>, sob iluminação fluorescente.

O tratamento biológico, ilustrado na Fig. 57, mostra que a adição de CO<sub>2</sub> torna o tratamento mais célere: demorou entre 7 e 8 dias no ensaio com CO<sub>2</sub> e cerca de 16 dias no ensaio sem CO<sub>2</sub> até atingir o VLE referente ao ião amónio. Na Fig. 63 (Anexo III) exhibe-se uma ampliação do momento a partir do qual o teor de ião amónio existente nos efluentes permite a descarga legal dos mesmos.

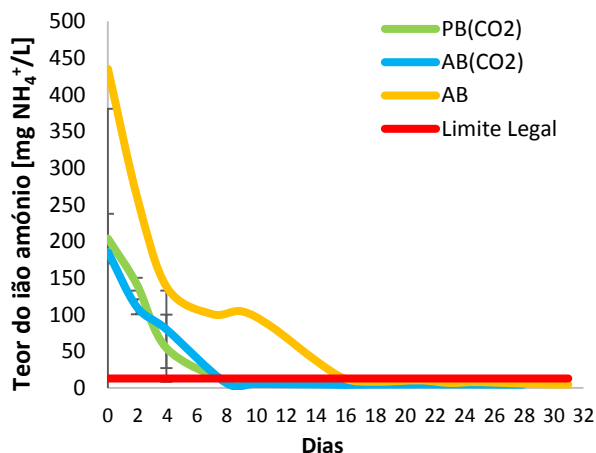


Fig. 57 – Tratamento biológico da *S. obliquus* sobre os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto* (com e sem a adição de CO<sub>2</sub>) sob iluminação fluorescente.

As eficiências do tratamento biológico das amostras em termos de ião amónio e fosfatos (Tabela 22) foram semelhantes, ocorrendo uma remoção quase total de ambos.

Tabela 22 – Eficiência do tratamento biológico da *S. obliquus* nos efluentes avícola *bruto* e porco *bruto*, com e sem a adição de 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram sujeitas a iluminação fluorescente.

Amostra	Tipo de iluminação	$\eta$ bioremediação (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	$\eta$ bioremediação (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
Porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> )		97,42%	99,06%
Avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> )	Fluorescente	97,54%	99,57%
Avícola <i>bruto</i> (AB)		98,96%	99,66%

Para finalizar, a Tabela 23 mostra a comparação entre as culturas crescidas nos dois efluentes (avícola e suíno), nos diferentes tipos de iluminação (lâmpadas fluorescentes e LEDs), e na presença ou ausência de CO<sub>2</sub> adicionado.

Tabela 23 – Biomassa produzida, matéria saponificável, quantidade de açúcares totais presentes na biomassa produzida e Índice de iodo (teórico) de cada amostra dos ensaios com e sem a adição de CO<sub>2</sub>.

Tipo de iluminação	Amostra					
	Ensaio SEM adição de CO <sub>2</sub>				Ensaio COM adição de CO <sub>2</sub>	
	Fluorescente		LED		Fluorescente	
	Avícola <i>floculado</i> (AF (1/2))	Avícola <i>bruto</i> (AB)	Avícola <i>floculado</i> (AF (1/2))	Avícola <i>bruto</i> (AB)	Porco <i>bruto</i> (PB <sub>CO2</sub> )	Avícola <i>bruto</i> (AB <sub>CO2</sub> )
<b>Biomassa produzida</b> [g]	2,57	2,80	2,71	3,41 ± 0,41	3,84 ± 0,69	4,45 ± 0,64
<b>Matéria saponificável</b> [g/100 g biomassa]	24,48	9,93	29,25	11,38	23,33	13,78
<b>Açúcares totais</b> [g/100 g biomassa]	21,60 ± 0,56	36,21 ± 0,37	24,77 ± 0,18	31,90 ± 2,64	23,61 ± 5,25	41,42 ± 1,69
<b>Índice de Iodo (teórico)</b> [g I <sub>2</sub> /100 g]	80,82	78,62	80,95	77,50	96,52	106,15

Estes valores correspondem à média ± desvio-padrão de 2 repetições

É notório que a adição de CO<sub>2</sub> favorece o crescimento microalgal, obtendo-se maior quantidade de biomassa produzida; observa-se também que as amostras com efluente avícola *bruto* resultaram sempre em maiores quantidades de biomassa. Para além disso, a iluminação com lâmpadas LED parece promover a produtividade em biomassa, nos casos onde não é adicionado CO<sub>2</sub> ao ar de agitação.

A matéria saponificável apresentou valores mais elevados nas amostras com efluente avícola *floculado* (24,5-29 g/100 g biomassa), sem adição de CO<sub>2</sub>. Nas culturas onde este gás foi adicionado, a quantidade de lípidos convertível em biodiesel foi mais elevada com a utilização do efluente de porco *bruto*. É possível verificar que a adição de CO<sub>2</sub> provocou um pequeno aumento na matéria saponificável no ensaio com o efluente avícola *bruto* com a mesma iluminação, ficando sempre na ordem dos 13-14 g/100 g biomassa. O valor associado às amostras com efluente de porco *bruto* (23 g/100 g biomassa) é semelhante aos das amostras com o efluente avícola *floculado* no ensaio em que não foi adicionado CO<sub>2</sub>.

Relativamente à quantidade de açúcares totais presentes na biomassa analisada, concluiu-se que o efluente avícola *bruto* permite uma produção maior de açúcares por parte da *S. obliquus*, com ambos os tipos de iluminação. Contudo, a presença de CO<sub>2</sub> no ar de agitação faz aumentar em cerca de 13% o valor obtido para os açúcares totais no efluente avícola *bruto*, quando comparado com o caso idêntico sem CO<sub>2</sub> adicional (e com iluminação fluorescente). O teor de açúcares totais nas amostras com o efluente avícola *floculado* assemelha-se novamente ao obtido com o efluente de porco *bruto* (na ordem dos 21-24 g/100g biomassa).

Os índices de iodo, calculados a partir das percentagens dos vários ácidos gordos identificados, mostram que a biomassa produzida em ambos os ensaios respeita esse parâmetro da EN 14214, que tem o valor máximo de 120 g I<sub>2</sub>/100 g [29] para um biodiesel de qualidade. Nos ensaios sem adição de CO<sub>2</sub>, os valores foram de cerca de 80 g I<sub>2</sub>/100 g biomassa para qualquer um dos efluentes avícolas (*floculado* ou *bruto*). Nos ensaios em que foi adicionado 5% de CO<sub>2</sub>, os valores obtidos para o índice de iodo foram superiores (cerca de 106 g I<sub>2</sub>/100 g com o efluente avícola *bruto* e 96 g I<sub>2</sub>/100 g com o efluente de porco *bruto*), o que está de acordo com o teor de ácidos

gordos insaturados observado em cada caso. Os valores deste índice, relacionado com a degradação do biodiesel, foram sempre superiores aos indicados por Gouveia & Oliveira (2009) para a *S. obliquus* (69 g I<sub>2</sub>/100 g) cultivada em meio esterilizado [45], o que indicia que a utilização de efluentes industriais para o cultivo de microalgas pode fazer aumentar o grau de insaturação dos lípidos e, portanto, o índice de iodo.

## 5.5. Consumos energéticos

Neste subcapítulo serão expostos alguns dos consumos energéticos associados ao trabalho experimental realizado. Como não se efetuaram medições relativas aos consumos dos equipamentos utilizados, os dados-base presentes neste subcapítulo foram extraídos de outros trabalhos realizados também no LNEG. Esses dados-bases foram então adaptados aos ensaios realizados no âmbito desta tese, para que se pudesse ter uma ideia da energia consumida/poupança energética nas várias etapas do processo global.

Na Tabela 28 (Anexo II) encontram-se os respetivos dados de consumos energéticos de alguns dos equipamentos usados no trabalho experimental, juntamente com as referências de onde foram retirados.

Em primeiro lugar, pode ser analisada a energia gasta ao longo do **crescimento** da cultura microalgal, referente ao tipo de iluminação utilizada – lâmpadas fluorescentes vs. LED.

Sabe-se que cada lâmpada fluorescente (*Phillips TL-D 36W/54-765*) usada teve um consumo de 3,1 kWh/dia, enquanto as lâmpadas LED (*Master LED Tube T8 19W/865*) consumiram 1,4 kWh/dia. Como o ensaio cujo propósito foi estudar o efeito do tipo de iluminação decorreu durante 31 dias, o consumo total de iluminação foi de 96,1 kWh com as lâmpadas fluorescentes e 43,4 kWh com as lâmpadas LED. Nesta situação, a utilização das lâmpadas LED permitiu uma poupança de energia de aproximadamente 55%.

A **colheita** da biomassa microalgal é um passo na cadeia de valor associado a grandes consumos energéticos, constituindo a principal fatia de energia despendida em todo o processo de produção das microalgas. Nesta dissertação foram usados dois métodos de colheita, a centrifugação, e a eletrocoagulação seguida de centrifugação (de um volume muito inferior, cerca de 1/4 – 1/5 do volume inicial de meio, como se verifica na Fig. 58). É importante referir que o volume da cultura proveniente do efluente avícola *bruto* sob iluminação de LEDs foi dividido ao meio, sendo que uma das partes foi sujeita apenas a uma centrifugação e a outra ao processo de EC, seguido de centrifugação.

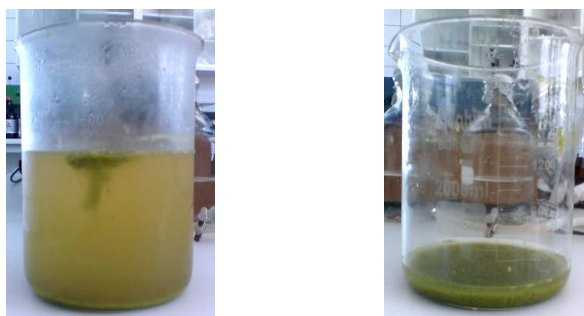


Fig. 58 – Meio de cultura avícola *floculado* cultivado com iluminação fluorescente após 15 minutos de EC ( $i \approx 1,92$  mA/cm<sup>2</sup>) (esquerda) e quantidade de meio após-EC sujeito a posterior centrifugação (direita).

No processo de centrifugação, consumiram-se no total, cerca de 0,390 kWh (no ensaio com adição de CO<sub>2</sub>) e 0,098 kWh (ensaio para estudar o efeito do tipo de iluminação, sem CO<sub>2</sub> adicional – metade da amostra com meio avícola *bruto* com iluminação LED). O total de energia consumida foi de 0,488 kWh.

O consumo associado ao método de eletrocoagulação é de apenas 0,011 kWh/amostra. Neste caso, em que apenas se realizou a eletrocoagulação no ensaio de variação do tipo de iluminação, consumiram-se aproximadamente 0,044 kWh. No processo seguinte, que consistiu na centrifugação do meio concentrado com a biomassa de *S. obliquus* após-EC, consumiram-se aproximadamente 0,139 kWh. O consumo total de energia dos dois processos acoplados foi de 0,183 kWh. Em suma, conclui-se que a realização da eletrocoagulação antes da centrifugação permite uma poupança energética de quase 63%.

É importante também mencionar, que, segundo alguns trabalhos, consumir mais energia não significa necessariamente remover maiores quantidades de biomassa. Isto quer dizer que a eficiência máxima de recuperação de biomassa pode ser atingida em pouco tempo, não havendo assim a necessidade de prolongar o consumo energético da fonte de alimentação (embora seja de baixo valor). Este facto pode ser visualizado na Fig. 59, que mostra que a eficiência de recuperação máxima foi atingida (após de 24 horas de sedimentação) aproximadamente aos 5 minutos de eletrocoagulação; a partir daí, apesar de se consumir mais energia, não há uma remoção maior da biomassa presente no meio de cultura [47]. É necessário então otimizar o processo de remoção de biomassa para cada microalga/meio de cultura, para ser usado em maior escala, com a maior poupança energética possível.

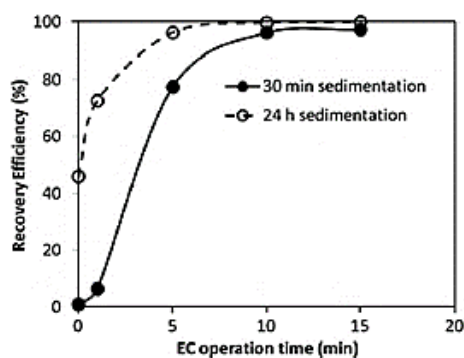


Fig. 59 – Variação da eficiência de recuperação da biomassa de *Nannochloropsis* sp. com o tempo de operação (tempos de repouso de 30 min e 24 h). Fonte: [47].

Outro parâmetro importante que comporta um gasto significativo de energia é a **extração lipídica**, neste caso a extração *Sohxlet*. A manta de aquecimento, o conjunto do rotavapor e do banho térmico, e a estufa para evaporação de vestígios de solvente têm consumos de 0,35 kWh, 0,05 kWh e 0,6 kWh, respetivamente (total = 1 kWh) [150]. Se apenas se tivesse usado este método para extrair os lípidos da biomassa microalgal, o consumo total (só dos ensaios com os reatores de coluna de bolha) seria de 9 kWh.

Finalmente, pode também ser analisado o dispêndio de energia relativo à **secagem** da biomassa microalgal, depois de cultivada e colhida. A secagem é um processo a considerar, já que pode alterar os resultados aquando da posterior extração de lípidos – no caso da extração SFE, a presença de água na biomassa pode facilitar o processo de extração lipídica [1]. No âmbito desta dissertação, foi apenas utilizada a estufa e o liofilizador para desidratar a biomassa, mas será também mencionado o exemplo do secador solar SECMAD [89] como equipamento de secagem.

Segundo os dados consultados de trabalhos realizados no LNEG, a secagem em estufa, tem um consumo energético de 0,3 kWh, após 4 horas (a 70°C). No caso da secagem em estufa decorrente deste trabalho, que demorou cerca de 20 horas, o consumo energético seria de 1,5 kWh.

O consumo energético associado ao liofilizador é muito superior ao da estufa – em 24 horas de utilização, consumiria cerca de 8,73 kWh. Neste caso, o equipamento foi utilizado durante 48 horas, pelo que a desidratação da biomassa produzida nos ensaios da influência do tipo de iluminação e da adição de CO<sub>2</sub> com recurso ao liofilizador constituiu um consumo energético de 17,46 kWh. Aqui não se contabiliza o consumo energético relativo ao congelamento prévio das amostras, necessário antes da sua passagem para o liofilizador.

A secagem de biomassa microalgal com recurso ao secador solar SECMAD tem obtido valores muito positivos, segundo publicações de Pacheco *et al.* (2015) e Sousa (2014) ([89], [151]). Este secador solar construído no LNEG (Fig. 60) não tem qualquer consumo energético, mas permite a utilização de uma pequena ventoinha com potência de 20W, que pode aumentar a passagem do fluxo de ar pela câmara de secagem. A temperatura máxima no seu interior varia, em média, entre 55,3°C e 63°C e, segundo a publicação de Pacheco *et al.* (2015), consegue reduzir o teor de humidade de 1-2 kg biomassa de 85% para 5% em cerca de 3-4 horas [89], caso seja usada a ventoinha que força a ventilação, cujo consumo energético é de apenas 0,06 kWh.

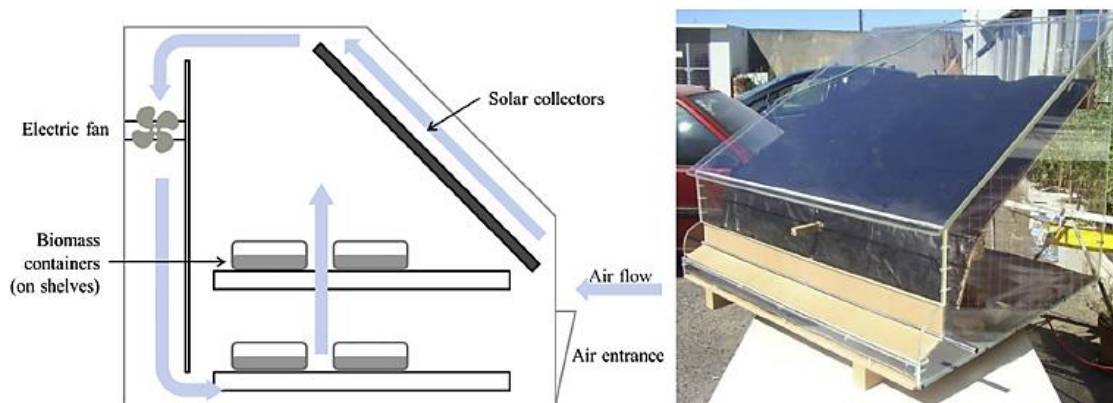


Fig. 60 – Esquema ilustrativo (esquerda) do secador solar SECMAD (direita). Fonte: [89].

Na Fig. 61, encontram-se esquematizados os consumos energéticos associados às várias etapas do processo (cultivo, colheita e secagem) dos ensaios cujo intuito era o estudo da influência do tipo de iluminação e da adição de CO<sub>2</sub>.

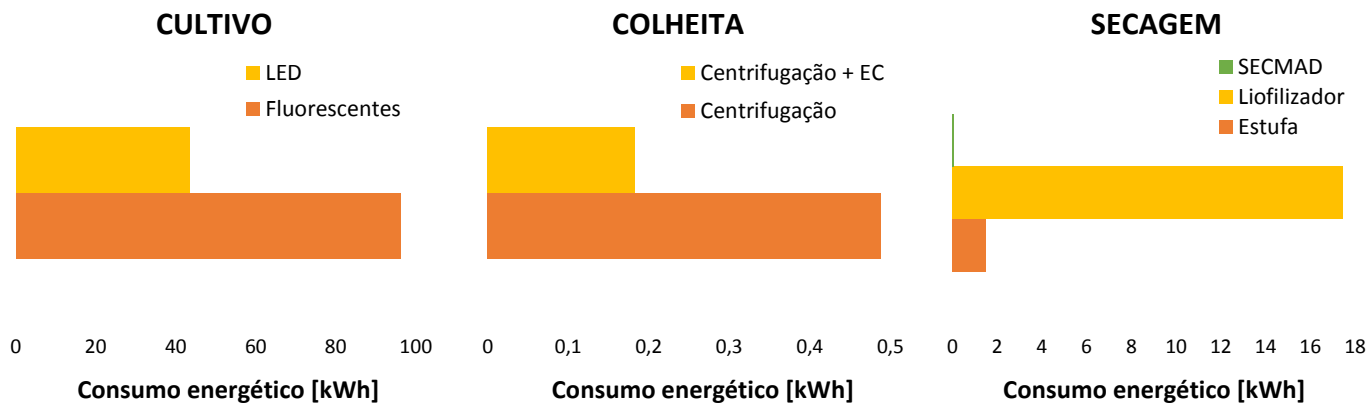


Fig. 61 – Consumos energéticos de algumas etapas da cadeia de valor da *S. obliquus*.

Nota-se uma diferença bastante significativa entre os métodos de cada etapa da cadeia de valor das microalgas, comprovando que de facto existem alternativas mais económica- e energeticamente vantajosas, a partir da implementação de determinados procedimentos e da utilização de certos equipamentos.

Estes dados corroboram também a necessidade de refletir acerca das fases de valorização da biomassa microalgal antes de iniciar um projeto, o que se irá converter em poupanças energéticas muito expressivas e aumentar, assim, o valor passível de extrair destes microrganismos.



## Capítulo 6 – Conclusões e Desenvolvimentos Futuros

Neste trabalho pretendia-se produzir biomassa microalgal da forma mais económica e ambientalmente sustentável possível, ao mesmo tempo que se procedia ao tratamento de efluentes líquidos (provenientes das indústrias avícola e suína) e gasosos (CO<sub>2</sub>).

Após a análise do crescimento de diversas microalgas no efluente considerado à partida mais sustentável, selecionou-se a microalga a usar nos restantes ensaios – a *Scenedesmus obliquus*.

As taxas de crescimento e as produtividades das culturas em que se usou efluente avícola *bruto* (AB) foram bastante menores do que nos casos em que se usou o efluente avícola *floculado* (AF (1/2)); isto deve-se ao facto de o efluente AB ter na sua composição uma grande quantidade de precipitados, que dificultam a penetração da luz, e que não existem no efluente AF (1/2). Verificou-se também que não ocorreram diferenças consideráveis entre o crescimento microalgal com utilização de lâmpadas fluorescentes vs. LEDs. No entanto, a iluminação LED representou uma poupança energética de cerca de 55% face ao uso de lâmpadas fluorescentes, pelo que se torna benéfica a sua utilização neste tipo de experiência.

Quanto à composição da fração lipídica presente na biomassa obtida nos diferentes ensaios, verificou-se que cumpria, em todos os casos, os requisitos especificados na EN 14214 analisados no trabalho, nomeadamente o teor de ácido linolénico (< 12%) e o índice de iodo (< 120 g I<sub>2</sub>/100g). Observou-se que não ocorreram diferenças no perfil de ácidos gordos com o tipo de iluminação utilizado. A matéria saponificável foi ligeiramente superior na biomassa obtida nas culturas iluminadas com lâmpadas LED e foi o efluente AF (1/2) que permitiu que se obtivesse um teor de matéria saponificável quase três vezes superior ao obtido com o efluente AB (29 vs. 11 g/100g biomassa, respetivamente, na iluminação LED). Quanto ao teor de açúcares totais, verificou-se que nas culturas com o efluente AF (1/2) o maior valor obtido foi de 25 g/100g biomassa, ao passo que com o efluente AB os resultados foram superiores (36 g/100g biomassa). Não se verificou, no entanto, nenhuma correlação face à iluminação utilizada.

No tratamento biológico dos efluentes, as culturas com AF (1/2) atingiram resultados de remoção do teor de amónio mais rápidos – cerca de metade do tempo do efluente AB. As eficiências de remoção obtidas foram, em média, de 99%. Quanto ao teor de fosfato das culturas, comprovou-se que a *S. obliquus* também foi capaz de tratar os dois efluentes, tendo sido obtidas eficiências de remoção semelhantes.

Para o ensaio com a adição de CO<sub>2</sub> nos efluentes avícola *bruto* (AB<sub>CO2</sub>) e porco *bruto* (PB<sub>CO2</sub>), verificou-se que as culturas com meio AB<sub>CO2</sub> obtiveram melhores resultados do que os alcançados com efluente PB<sub>CO2</sub>, relativamente ao peso seco e à DO, apesar de as taxas de crescimento terem sido superiores no efluente PB<sub>CO2</sub> (diluição 1/20), novamente devido à presença de mais precipitados (que também impediam a maior penetração da luz) no efluente AB<sub>CO2</sub> (sem diluição).

A matéria saponificável presente na biomassa microalgal foi de cerca de 14 e 23 g/100g biomassa, com os efluentes AB<sub>CO2</sub> e PB<sub>CO2</sub>, respetivamente. Já no que diz respeito ao conteúdo em açúcares totais, nas culturas com efluente PB<sub>CO2</sub> obteve-se 24 g/100g biomassa; o resultado relativo às culturas com efluente AB<sub>CO2</sub> foi superior a este (41 g/100 g biomassa) e ao obtido no ensaio com efluente AB sem a adição de CO<sub>2</sub> (36 g/100 g biomassa).

Com a realização desta dissertação pôde concluir-se que o uso de efluentes industriais – dos ramos avícola e suínico – dá origem a melhores crescimentos e produtividades da *S. obliquus*, ao mesmo tempo que se poupa no uso de nutrientes e água potável para o seu cultivo, aliado à vantagem ambiental de obtenção de uma água tratada a partir de efluentes. Para além disso, a utilização de apenas 5% de CO<sub>2</sub> no ar de agitação das culturas fez aumentar o crescimento microalgal, otimizando assim a produção de biomassa de *S. obliquus*. O uso de metodologias de poupança energética, onde se inclui a escolha de lâmpadas LED em detrimento de lâmpadas fluorescentes contribui também para a sustentabilidade económica de todo o processo. A

utilização do efluente avícola *bruto* com a adição de CO<sub>2</sub> (AB<sub>CO2</sub>), testado com iluminação fluorescente, corresponde às condições mais propícias para produção de bioetanol, uma vez que a biomassa produzida foi mais rica em açúcares. Por outro lado, o efluente AF (1/2), em qualquer um dos dois tipos de iluminação testados sem a adição de CO<sub>2</sub> é mais favorável para a produção de biodiesel, pelo maior conteúdo em óleos que possui. O efluente de origem suína com adição de CO<sub>2</sub> (PB<sub>CO2</sub>) pode também indiciar a propensão para a produção de biodiesel, já que o teor de matéria saponificável foi semelhante ao obtido com o efluente AF (1/2).

Para que se possa comercializar o(s) biocombustível(is) de origem microalgal, existem ainda muitos desafios a superar, como a otimização das condições de cultivo para alcançar maiores produtividades em biomassa, o uso da engenharia genética para a obtenção de microalgas mais produtivas e resistentes, uma colheita da biomassa mais eficaz e energeticamente menos exigente, uma extração mais eficiente, o aproveitamento de efluentes (líquidos e gasosos) e a reciclagem de nutrientes. Este estudo da *S. obliquus* como matéria-prima para a produção de biocombustíveis e para o tratamento de efluentes revelou-se promissor e verificaram-se melhorias significativas do seu crescimento sob condições inóspitas e inicialmente desfavoráveis. Outra vantagem desta dissertação, virada para o futuro, é a sua utilidade para outras investigações, devido à sua fácil continuidade e adaptabilidade.

## Referências Bibliográficas

- [1] M. K. Lam and K. T. Lee, "Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 673–690, 2012.
- [2] L. P. Koh and J. Ghazoul, "Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities," *Biol. Conserv.*, vol. 141, no. 10, pp. 2450–2460, 2008.
- [3] J. C. M. Pires, M. C. M. Alvim-Ferraz, F. G. Martins, and M. Simões, "Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 5, pp. 3043–3053, 2012.
- [4] D. Bilanovic, A. Andargatchew, T. Kroeger, and G. Shelef, "Freshwater and marine microalgae sequestering of CO<sub>2</sub> at different C and N concentrations - Response surface methodology analysis," *Energy Convers. Manag.*, vol. 50, no. 2, pp. 262–267, 2009.
- [5] J. Singh and S. Gu, "Commercialization potential of microalgae for biofuels production," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 9, pp. 2596–2610, 2010.
- [6] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, "Microalgae for biodiesel production and other applications: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 217–232, 2010.
- [7] British Petroleum, "BP Statistical Review of World Energy 2015," 2015.
- [8] British Petroleum, "BP Energy Outlook 2035." BP, 2015.
- [9] European Union, *EU Energy in Figures - Statistical Pocketbook - Energy*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015.
- [10] EurObserv'ER, "Biofuels Barometer," 2015.
- [11] United Nations Environment Programme, *Biofuels Vital Graphics: Powering a Green Economy*. Paris, France, 2011.
- [12] Direcção Geral de Energia e Geologia, "Renováveis - Estatísticas Rápidas nº 132 - outubro 2015," 2015.
- [13] Agência Portuguesa do Ambiente, "Relatório de Estado do Ambiente 2014," 2014.
- [14] International Energy Agency, *Key World Energy STATISTICS 2014*. Paris, France: OECD/IEA, 2014.
- [15] B. Wang, Y. Li, N. Wu, and C. Q. Lan, "CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 79, no. 5, pp. 707–718, 2008.
- [16] Energy Policy Platform, *Climate Change: Solution in Sight: A Dutch Perspective*. Energy Policy Platform, 2000.
- [17] P. S. Nigam and A. Singh, "Production of liquid biofuels from renewable resources," *Prog. Energy Combust. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 52–68, 2011.
- [18] Y. Wang, "Microalgae as the Third Generation Biofuel: Production, Usage, Challenges and Prospects," Uppsala University, 2013.
- [19] P. M. Schenk, S. R. Thomas-Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, and B. Hankamer, "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production," *BioEnergy Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 20–43, 2008.
- [20] Biotech Biofuels 4, "First Generation vs. Second Generation," 2013. [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/biotechbiofuels4/first-generation-vs-second-generation>. [Accessed: 25-Sep-2015].
- [21] A. Moore, "Biofuels are dead: long live biofuels(?) – Part one," *N. Biotechnol.*, vol. 25, no. 1, pp. 6–12, 2008.

- [22] University of Edinburgh, “Generations of Biofuels,” *Energy from waste and wood*. [Online]. Available: <http://energyfromwasteandwood.weebly.com/generations-of-biofuels.html>. [Accessed: 25-Sep-2015].
- [23] R. Sims, M. Taylor, J. Saddler, and W. Mabee, “From 1st to 2nd Generation Biofuel Technologies: An overview of current industry and RD&D activities,” 2008.
- [24] C. Oliveira, “Apontamentos das aulas de Energia da Biomassa,” in *Energia da Biomassa, 2ª Aula*, 2014.
- [25] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde, and M. K. Danquah, “Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 1037–1047, 2010.
- [26] K. Bozbas, “Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 12, no. 2, pp. 542–552, 2008.
- [27] A. Demirbas, “Progress and recent trends in biodiesel fuels,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 50, no. 1, pp. 14–34, 2009.
- [28] Direcção Geral de Energia e Geologia, “Energia Renováveis - Biocombustíveis - Situação em Portugal - Legislação,” 2015. [Online]. Available: <http://www.dgeg.pt/>. [Accessed: 30-Sep-2015].
- [29] EN 14214, “Automotive fuels - Fatty acid methyl esters (FAME) for biodiesel engines - Requirements and test methods (EN14214).” 2012.
- [30] L. P. Ramos, A. K. Domingos, K. T. Kucek, and H. M. Wilhelm, “Biodiesel - Um projeto de sustentabilidade económica e sócio-ambiental para o Brasil,” *Rev. Biotechnol. Ciência Desenvolv.*, vol. 31, pp. 28–37, 2003.
- [31] G. Knothe, “Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters,” *Fuel Process. Technol.*, vol. 86, no. 10, pp. 1059–1070, 2005.
- [32] A. Bouaid, M. Martinez, and J. Aracil, “Production of biodiesel from bioethanol and Brassica carinata oil: Oxidation stability study,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 7, pp. 2234–2239, 2009.
- [33] I. P. Lôbo, S. L. C. Ferreira, and R. S. da Cruz, “Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos,” *Quim. Nova*, vol. 32, no. 6, pp. 1596–1608, 2009.
- [34] J. Van Gerpen, “Cetane Number Testing of Biodiesel,” *Third Liq. Fuel Conf. "Liquid Fuels Ind. Prod. from Renew. Resour.*, pp. 197–206, 1996.
- [35] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 25, no. 3, pp. 294–306, 2007.
- [36] S. A. Khan, Rashmi, M. Z. Hussain, S. Prasad, and U. C. Banerjee, “Prospects of biodiesel production from microalgae in India,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 13, no. 9, pp. 2361–2372, 2009.
- [37] Y. Li, M. Horsman, N. Wu, C. Q. Lan, and N. Dubois-Calero, “Biofuels from Microalgae,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 24, no. 1, pp. 815–820, 2008.
- [38] P. Spolaore, C. Joannis-Cassan, E. Duran, and A. Isambert, “Commercial applications of microalgae,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 101, no. 2, pp. 87–96, 2006.
- [39] M. A. Delucchi, “A lifecycle emissions model (LEM): lifecycle emissions from transportation fuels, motor vehicles, transportation modes, electricity use, heating and cooking fuels, and materials,” Davis, CA, USA, 2003.
- [40] G. Dragone, B. Fernandes, A. A. Vicente, and J. A. Teixeira, “Third generation biofuels from microalgae,” *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.*, vol. 2, pp. 1355–1366, 2010.
- [41] L. Brennan and P. Owende, “Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 557–577, 2010.

- [42] Y. Li, M. Horsman, B. Wang, N. Wu, and C. Q. Lan, "Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 81, no. 4, pp. 629–636, 2008.
- [43] J. N. Rosenberg, G. A. Oyler, L. Wilkinson, and M. J. Betenbaugh, "A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 19, no. 5, pp. 430–436, 2008.
- [44] O. Pulz and W. Gross, "Valuable products from biotechnology of microalgae," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 65, no. 6, pp. 635–648, 2004.
- [45] L. Gouveia and A. C. Oliveira, "Microalgae as a raw material for biofuels production," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 2, pp. 269–274, 2009.
- [46] A. Demirbas, "Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems," *Appl. Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3541–3547, 2011.
- [47] C. T. Matos, M. Santos, B. P. Nobre, and L. Gouveia, "Nannochloropsis sp. biomass recovery by Electro-Coagulation for biodiesel and pigment production," *Bioresour. Technol.*, vol. 134, pp. 219–226, 2013.
- [48] A. E. M. Abdelaziz, G. B. Leite, and P. C. Hallenbeck, "Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels," *Environ. Technol.*, vol. 34, no. 13–14, pp. 1807–1836, 2013.
- [49] M. Olaizola, "Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace," *Biomol. Eng.*, vol. 20, no. 4–6, pp. 459–466, 2003.
- [50] NC State University, "Engineering Challenges at the Energy Frontier: Biofuels from Algae." NC State University, 2007.
- [51] M. G. Richard, "15 Algae Biofuels Startups to Watch," 2008. [Online]. Available: <http://www.treehugger.com/corporate-responsibility/15-algae-biofuels-startups-to-watch.html>. [Accessed: 06-Oct-2015].
- [52] University of Nebraska State Museum, "Sunday with a Scientist - Biofuel," 2012. [Online]. Available: <http://museum.unl.edu/sundaywithascientist/sept2012.html>. [Accessed: 06-Oct-2015].
- [53] J. J. Milledge, "Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review," *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, vol. 10, no. 1, pp. 31–41, 2011.
- [54] A. E. M. Abdelaziz, G. B. Leite, and P. C. Hallenbeck, "Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply," *Environ. Technol.*, vol. 34, no. 13–14, pp. 1783–1805, 2013.
- [55] I. S. Suh and C.-G. Lee, "Photobioreactor engineering: Design and performance," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 8, no. 6, pp. 313–321, 2003.
- [56] D. T. Welsh, M. Bartoli, D. Nizzoli, G. Castaldelli, S. A. Riou, and P. Viaroli, "Denitrification, nitrogen fixation, community primary productivity and inorganic-N and oxygen fluxes in an intertidal *Zostera noltii* meadow," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 208, pp. 65–77, 2000.
- [57] J. Moreno, M. Á. Vargas, H. Rodriguez, J. Rivas, and M. G. Guerrero, "Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Anabaena* sp. ATCC 33047," *Biomol. Eng.*, vol. 20, no. 4–6, pp. 191–197, 2003.
- [58] C.-H. Hsieh and W.-T. Wu, "Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 17, pp. 3921–3926, 2009.
- [59] I. Rawat, V. Bholá, R. R. Kumar, and F. Bux, "Improving the feasibility of producing biofuels from microalgae using wastewater," *Environ. Technol.*, vol. 34, no. 13–14, pp. 1765–1775, 2013.
- [60] V. Martin-Jézéquel, M. Hildebrand, and M. A. Brzezinski, "Silicon metabolism in diatoms: Implications for growth," *J. Phycol.*, vol. 36, no. 5, pp. 821–840, 2000.
- [61] S. Y. Maestrini, J.-M. Robert, J. W. Leftley, and Y. Collos, "Ammonium thresholds for

- simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae,” *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 102, no. 1, pp. 75–98, 1986.
- [62] L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, vol. 81, no. 4. Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group, 2006.
- [63] M. Piorreck, K.-H. Baasch, and P. Pohl, “Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes,” *Phytochemistry*, vol. 23, no. 2, pp. 207–216, 1984.
- [64] M. Borowitzka, “Fats, oils and hydrocarbons,” in *Micro-algal biotechnology*, M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, Eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1988, pp. 257–287.
- [65] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, and M. R. Tredici, “Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 102, no. 1, pp. 100–112, 2009.
- [66] F. P. Healey, “Phosphate,” in *The Biology of Cyanobacteria*, N. G. Carr and B. A. Whitton, Eds. Berkeley, CA, USA: University of California Presse, 1982, pp. 105–124.
- [67] A. F. Clarens, E. P. Resurreccion, M. A. White, and L. M. Colosi, “Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 44, no. 5, pp. 1813–1819, 2010.
- [68] E. J. Martijn and M. Redwood, “Wastewater irrigation in developing countries - Limitations for farmers to adopt appropriate practices,” *Irrig. Drain.*, vol. 54, no. SUPPL. 1, pp. 63–70, 2005.
- [69] J. Yang, M. Xu, X. Zhang, Q. Hu, M. Sommerfeld, and Y. Chen, “Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 159–165, 2011.
- [70] Diário da República nº176/98 - I Série A, “Decreto-Lei nº236/98 de 1 de Agosto.” Ministério do Ambiente, pp. 3676–3722, 1998.
- [71] M. K. Lam and K. T. Lee, “Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production,” *Appl. Energy*, vol. 94, no. C, pp. 303–308, 2012.
- [72] S.-Y. Chiu, C.-Y. Kao, M.-T. Tsai, S.-C. Ong, C.-H. Chen, and C.-S. Lin, “Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 2, pp. 833–838, 2009.
- [73] A. Kumar, S. Ergas, X. Yuan, A. Sahu, Q. Zhang, J. Dewulf, F. X. Malcata, and H. van Langenhove, “Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 7, pp. 371–380, 2010.
- [74] M. G. de Moraes and J. A. V. Costa, “Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 48, no. 7, pp. 2169–2173, 2007.
- [75] N. Sakai, Y. Sakamoto, N. Kishimoto, M. Chihara, and I. Karube, “*Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO<sub>2</sub>,” *Energy Convers. Manag.*, vol. 36, no. 6–9, pp. 693–696, 1995.
- [76] H. H. Khoo, P. N. Sharratt, P. Das, R. K. Balasubramanian, P. K. Naraharisetti, and S. Shaik, “Life cycle energy and CO<sub>2</sub> analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 5800–5807, 2011.
- [77] A. L. Stephenson, E. Kazamia, J. S. Dennis, C. J. Howe, S. A. Scott, and A. G. Smith, “Life-Cycle Assessment of Potential Algal Biodiesel Production in the United Kingdom: A Comparison of Raceways and Air-Lift Tubular Bioreactors,” *Energy & Fuels*, vol. 24, no. 7, pp. 4062–4077, 2010.
- [78] J. J. Milledge and S. Heaven, “A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production,” *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology*, vol. 12, no. 2, pp. 165–178, 2013.
- [79] N. Uduman, Y. Qi, M. K. Danquah, G. M. Forde, and A. Hoadley, “Dewatering of Microalgal Cultures: a Major Bottleneck to Algae-Based Fuels,” *J. Renew. Sustain. Energy*, vol. 2, no. 1, p.

- 15, 2010.
- [80] A. B. Aragón, R. B. Padilla, and J. A. F. R. de Ursinos, "Experimental study of the recovery of algae cultured in effluents from the anaerobic biological treatment of urban wastewaters," *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 6, no. 4, pp. 293–302, 1992.
- [81] N. Uduman, V. Bourniquel, M. K. Danquah, and A. F. A. Hoadley, "A parametric study of electrocoagulation as a recovery process of marine microalgae for biodiesel production," *Chem. Eng. J.*, vol. 174, no. 1, pp. 249–257, 2011.
- [82] D. Vandamme, S. C. V. Pontes, K. Goiris, I. Foubert, L. J. J. Pinoy, and K. Muylaert, "Evaluation of electro-coagulation-flocculation for harvesting marine and freshwater microalgae," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 10, pp. 2320–2329, 2011.
- [83] M. Y. A. Mollah, P. Morkovsky, J. A. G. Gomes, M. Kesmez, J. Parga, and D. L. Cocke, "Fundamentals, present and future perspectives of electrocoagulation," *J. Hazard. Mater.*, vol. 114, no. 1–3, pp. 199–210, 2004.
- [84] S. Gao, J. Yang, J. Tian, F. Ma, G. Tu, and M. Du, "Electro-coagulation–flotation process for algae removal," *J. Hazard. Mater.*, vol. 177, no. 1–3, pp. 336–343, 2010.
- [85] J. R. Benemann and W. J. Oswald, "Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO<sub>2</sub> to biomass. Final report," Berkeley, CA, USA, 1996.
- [86] B. Koopman and E. P. Lincoln, "Autoflotation harvesting of algae from high-rate pond effluents," *Agric. Wastes*, vol. 5, no. 4, pp. 231–246, 1983.
- [87] C. Ratti, "Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review," *J. Food Eng.*, vol. 49, no. 4, pp. 311–319, 2001.
- [88] A. K. Lee, D. M. Lewis, and P. J. Ashman, "Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels : Processes and specific energy requirements," *Biomass and Bioenergy*, vol. 46, pp. 89–101, 2012.
- [89] R. Pacheco, A. F. Ferreira, T. Pinto, B. P. Nobre, D. Loureiro, P. Moura, L. Gouveia, and C. M. Silva, "The production of pigments & hydrogen through a *Spirogyra* sp. biorefinery," *Energy Convers. Manag.*, vol. 89, pp. 789–797, 2015.
- [90] H. M. Amaro, Â. C. Macedo, and F. X. Malcata, "Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels?," *Energy*, vol. 44, no. 1, pp. 158–166, 2012.
- [91] M. D. Macías-Sánchez, C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. M. Lubián, and O. Montero, "Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*," *J. Food Eng.*, vol. 66, no. 2, pp. 245–251, 2005.
- [92] A. P. R. F. Canela, P. T. V. Rosa, M. O. M. Marques, and M. A. A. Meireles, "Supercritical Fluid Extraction of Fatty Acids and Carotenoids from the Microalgae *Spirulina maxima*," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 3012–3018, 2002.
- [93] J. L. Luque-García and M. D. Luque de Castro, "Ultrasound: a powerful tool for leaching," *Trends Anal. Chem.*, vol. 22, no. 1, pp. 41–47, 2003.
- [94] P. T. Vasudevan and M. Briggs, "Biodiesel production—current state of the art and challenges," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 35, no. 5, pp. 421–430, 2008.
- [95] Y. C. Sharma and B. Singh, "Development of biodiesel from karanja, a tree found in rural India," *Fuel*, vol. 87, no. 8–9, pp. 1740–1742, 2008.
- [96] C. Oliveira, "Apontamentos das aulas de Energia da Biomassa," in *Energia da Biomassa, 4ª Aula*, 2014.
- [97] A. Demirbas, "Biodiesel production from vegetable oils by supercritical methanol," *J. Sci. Ind. Res.*, vol. 64, no. 11, pp. 858–865, 2005.
- [98] N.-J. Kim, H. Li, K. Jung, H. N. Chang, and P. C. Lee, "Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 16, pp. 7466–7469, 2011.

- 2011.
- [99] S. P. Choi, M. T. Nguyen, and S. J. Sim, "Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 14, pp. 5330–5336, 2010.
- [100] B. Sialve, N. Bernet, and O. Bernard, "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 4, pp. 409–416, 2009.
- [101] A. F. Ferreira, J. Ortigueira, L. Alves, L. Gouveia, P. Moura, and C. Silva, "Biohydrogen production from microalgal biomass: Energy requirement, CO<sub>2</sub> emissions and scale-up scenarios," *Bioresour. Technol.*, vol. 144, pp. 156–164, 2013.
- [102] I. Priyadarshani and B. Rath, "Commercial and industrial applications of micro algae – A review," *J. Algal Biomass Util.*, vol. 3, no. 4, pp. 89–100, 2012.
- [103] L. Zhu, "Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 41, no. January, pp. 1376–1384, 2015.
- [104] J. M. Romero-García, L. Niño, C. Martínez-Patiño, C. Álvarez, E. Castro, and M. J. Negro, "Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends," *Bioresour. Technol.*, vol. 159, pp. 421–432, 2014.
- [105] L. Zhu, "The combined production of ethanol and biogas from microalgal residuals to sustain microalgal biodiesel: A theoretical evaluation," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 8, no. 1, pp. 7–15, 2014.
- [106] L. Zhu, Z. Wang, Q. Shu, J. Takala, E. Hiltunen, P. Feng, and Z. Yuan, "Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment," *Water Res.*, vol. 47, no. 13, pp. 4294–4302, 2013.
- [107] E. Uggetti, B. Sialve, E. Trably, and J.-P. Steyer, "Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 8, no. 4, pp. 516–529, 2014.
- [108] L. Zhu, E. Hiltunen, Q. Shu, W. Zhou, Z. Li, and Z. Wang, "Biodiesel production from algae cultivated in winter with artificial wastewater through pH regulation by acetic acid," *Appl. Energy*, vol. 128, no. May 2014, pp. 103–110, 2014.
- [109] Flanders State of the Art, "A place in the sun," *Flanders Today*, 2012. [Online]. Available: <http://www.flandertoday.eu/current-affairs/place-sun>. [Accessed: 19-Jan-2015].
- [110] E. W. Becker, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1994.
- [111] B. Gami, J. P. Patel, and I. L. Kothari, "Cultivation of *Chlorella protothecoides* (ISIBES – 101) under autotrophic and heterotrophic conditions for biofuel production," *J. Algal Biomass Util.*, vol. 5, no. 2, pp. 20–29, 2014.
- [112] B. O. Arredondo-Vega, C. J. Band-Schmidt, and R. Vazquez-Duhalt, "Biochemical composition of *Neochloris oleoabundans* adapted to marine medium," *Cytobios*, vol. 83, no. 335, pp. 201–205, 1995.
- [113] M. E. Martinez, S. Sánchez, J. M. Jiménez, F. El Yousfi, and L. Muñoz, "Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*," *Bioresour. Technol.*, vol. 73, no. 3, pp. 263–272, 2000.
- [114] Q.-H. Shen, J.-W. Jiang, L.-P. Chen, L.-H. Cheng, X.-H. Xu, and H.-L. Chen, "Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production," *Bioresour. Technol.*, vol. 190, pp. 257–263, 2015.
- [115] T. M. Mata, A. C. Melo, M. Simões, and N. S. Caetano, "Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*," *Bioresour. Technol.*, vol. 107, no. March, pp. 151–158, 2012.
- [116] P. Kaewkannetra, P. Enmak, and T. Chiu, "The effect of CO<sub>2</sub> and salinity on the cultivation of *scenedesmus obliquus* for biodiesel production," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 17, no. 3, pp. 591–597, 2012.

- [117] S.-H. Ho, W.-M. Chen, and J.-S. Chang, "Scenedesmus obliquus CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 22, pp. 8725–8730, 2010.
- [118] S. Mandal and N. Mallick, "Microalga Scenedesmus obliquus as a potential source for biodiesel production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 84, no. 2, pp. 281–291, 2009.
- [119] J. R. Miranda, P. C. Passarinho, and L. Gouveia, "Bioethanol production from Scenedesmus obliquus sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 2, pp. 555–564, 2012.
- [120] J. H. Mussnug, V. Klassen, A. Schlüter, and O. Kruse, "Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept," *J. Biotechnol.*, vol. 150, no. 1, pp. 51–56, 2010.
- [121] A. P. Batista, L. Ambrosano, S. Graça, C. Sousa, P. A. S. S. Marques, B. Ribeiro, E. P. Botrel, P. Castro Neto, and L. Gouveia, "Combining urban wastewater treatment with biohydrogen production – An integrated microalgae-based approach," *Bioresour. Technol.*, vol. 184, no. May 2015, pp. 230–235, 2015.
- [122] CICALA: Culture Collection of Autotrophic Organisms, "454 Scenedesmus obliquus (Turpin) Kuetzing," 2013. [Online]. Available: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/scenedesmus-obliquus-turpin-kuetzing-2>. [Accessed: 25-Sep-2015].
- [123] C. Safi, B. Zebib, O. Merah, P.-Y. Pontalier, and C. Vaca-Garcia, "Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 35, no. July, pp. 265–278, 2014.
- [124] H. Xu, X. Miao, and Q. Wu, "High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters," *J. Biotechnol.*, vol. 126, no. 4, pp. 499–507, 2006.
- [125] T. G. Tornabene, G. Holzer, S. Lien, and N. Burris, "Lipid composition of the nitrogen starved green alga Neochloris oleoabundans," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 5, no. 6, pp. 435–440, 1983.
- [126] L. Gouveia, A. E. Marques, T. L. da Silva, and A. Reis, "Neochloris oleoabundans UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 36, no. 6, pp. 821–826, 2009.
- [127] J. Parmentier, "Spirogyra," *Micscape Magazine*, 1999. [Online]. Available: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artjan99/gyra.html>. [Accessed: 29-Nov-2015].
- [128] Grupo de Ciências Biológicas do IST, "Análise espectrofotométrica da Densidade Óptica (D.O.) de uma cultura microbiana," 2005. [Online]. Available: <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=235&ordem=4>. [Accessed: 03-Jun-2015].
- [129] APHA, "Solids (Method 2540)," in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington: American Public Health Association; American Water Works Association & Water Environmental Federation, 1998.
- [130] APHA, "Open Reflux method (Method 5220-B)," in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington: American Public Health Association; American Water Works Association & Water Environmental Federation, 1998.
- [131] A. Vázquez Roncero, R. Maestro Durán, and E. Graciani Constante, "Componentes fenólicos de la aceituna.II. Polifenoles del alpechín," *Grasas y Aceites*, vol. 25, no. 6, pp. 341–345, 1974.
- [132] APHA, "Vanadomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method (Method 4500-P C.)," in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Washington: American Public Health Association; American Water Works Association & Water Environmental Federation, 1998.
- [133] C. Hoebler, J. L. Barry, A. David, and J. Delort-Laval, "Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 37, no. 2, pp. 360–367, 1989.

- [134] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith, "Colorimetric Method for determination of sugars and related compounds," *Anal. Chem.*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956.
- [135] EN ISO 5509, "Animal and vegetable fats and oils - preparation of methyl esters of fatty acids." 2000.
- [136] EN 16300, "Automotive fuels — Determination of iodine value in fatty acid methyl esters (FAME) — Calculation method from gas chromatographic data." 2003.
- [137] EN 14111, "Fatty acid methyl esters (FAME) – Determination of iodine value." 2003.
- [138] Markos, "Análise de Águas & Efluentes - E. Série de Sólidos," *Principais Usos da Água e Critérios de Qualidade*, 2008. [Online]. Available: [http://www.c2o.pro.br/analise\\_agua/a1833.html](http://www.c2o.pro.br/analise_agua/a1833.html). [Accessed: 02-Dec-2015].
- [139] S. A. Bradford, E. Segal, W. Zheng, Q. Wang, and S. R. Hutchins, "Reuse of concentrated animal feeding operation wastewater on agricultural lands," *J. Environmetal Qual.*, vol. 37, no. 5, pp. 97–115, 2008.
- [140] K. Yetilmezsoy and S. Sakar, "Development of empirical models for performance evaluation of UASB reactors treating poultry manure wastewater under different operational conditions," *J. Hazard. Mater.*, vol. 153, no. 1–2, pp. 532–543, 2008.
- [141] E. P. Lincoln, A. C. Wilkie, and B. T. French, "Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater," *Biomass and Bioenergy*, vol. 10, no. 1, pp. 63–68, 1996.
- [142] R. Halim, M. K. Danquah, and P. A. Webley, "Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 3, pp. 709–732, 2012.
- [143] AOCS Lipids Library, "Methylation of fatty acids a beginner's guide," *History & Education*, 2011. [Online]. Available: <http://lipidlibrary.aocs.org/History/content.cfm?ItemNumber=40363>. [Accessed: 28-Nov-2015].
- [144] X. Lang, A. K. Dalai, N. N. Bakhshi, M. J. Reaney, and P. B. Hertz, "Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils," *Bioresour. Technol.*, vol. 80, no. 1, pp. 53–62, 2001.
- [145] O. Pulz, "Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, no. 3, pp. 287–293, 2001.
- [146] C. Koç, M. Vatandaş, and A. B. Koç, "LED Lighting Technology and Using in Agriculture." 25th National Congress Mechanization and Energy in Agriculture, Isparta, Turkey, pp. 153–158, 2009.
- [147] A. P. Batista and C. Santos, "Microalgas – um mar de oportunidades." *Semana da Ciência e da Tecnologia 2015, Ciência Viva, Lisboa, Portugal*, 2015.
- [148] M. E. Martinez, S. Sánchez, J. M. Jiménez, F. El Yousfi, and L. Muñoz, "Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*," *Bioresour. Technol.*, vol. 73, no. 3, pp. 263–272, 2000.
- [149] M. S. de Alva, V. M. Luna-Pabello, E. Cadena, and E. Ortiz, "Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production," *Bioresour. Technol.*, vol. 146, pp. 744–748, 2013.
- [150] P. F. C. Leitão, "Utilização de tecnologias low cost para a produção, colheita e secagem de biomassa microalgal: comparação com as tecnologias convencionais," *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*, 2015.
- [151] C. V. de Sousa, "Microalgas: do Tratamento de Efluentes para a Biorrefinaria," *Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa*, 2014.

## Anexos

### Anexo I

Tabela 24 – Composição da solução de elementos-traço.

Reagente	Concentração
H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub>	286 mg/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	154 mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	22 mg/L
CuSO <sub>4</sub>	5 mg/L
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6 mg/L
CoSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	8 mg/L

Tabela 25 – Meio de conservação *Chlorella*.

Reagente	Concentração
KNO <sub>3</sub>	1,15 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,11 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g/L
Fe-EDTA	0,0117 g/L
Elementos-traço	10 mL/L (sem diluição)

Tabela 26 – Meio de conservação *Neochloris oleoabundans*, correspondente ao meio *Bristol*.

Reagente	Concentração
NaNO <sub>3</sub>	250 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 mg/L
CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	33 mg/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg/L
NaCl	25 mg/L
Fe-EDTA	60 mg/L
Elementos-traço	10 mL/L (sem diluição)

Tabela 27 – Meio de conservação *Spirogyra*.

Reagente	Concentração
NaNO <sub>3</sub>	250 mg/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	25 mg/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	75 mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	175 mg/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	75 mg/L
NaCl	25 mg/L
Elementos-traço	6 mL/L (sem diluição)
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	750 mg/L
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	97 mg/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	41 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	5,0 mg/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 mg/L
Na <sub>2</sub> KOO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,0 mg/L

## Anexo II

Tabela 28 – Consumos energéticos de alguns equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental. Fontes: [150], [151].

Atividade	Equipamento	Marca/ Modelo	Consumo
<b>Cultivo</b>	Lâmpadas LED	<i>Master LED Tube T8 19W/865</i>	1,4 kWh/dia
	Lâmpadas fluorescentes	Phillips TL-D 36W/54-765	3,1 kWh/dia
<b>Extração de lípidos neutros</b>	Manta de aquecimento	BlocDigest20 ( <i>P Selecta</i> )	0,35 kWh
	Rotavapor + Banho térmico	<i>Büchi Heating Bath B-490</i>	0,05 kWh
	Estufa		0,6 kWh
<b>Eletrocoagulação</b>	Centrífuga	<i>Heraeus Multifuge 3SR+</i>	0,15 kWh/L meio
	Fonte de alimentação DC	<i>Mastech DC Power Supply HY3005D</i>	0,011 kWh
<b>Secagem</b>	Estufa	<i>Memmert</i>	0,3 kWh/4 h
	Liofilizador	Heto PowerDry LL 3000 Freeze Dryer ( <i>Thermo Scientific</i> )	8,73 kWh/dia
	Secador solar	SECMAD [89]	0 ou 0,06 kWh

### Anexo III

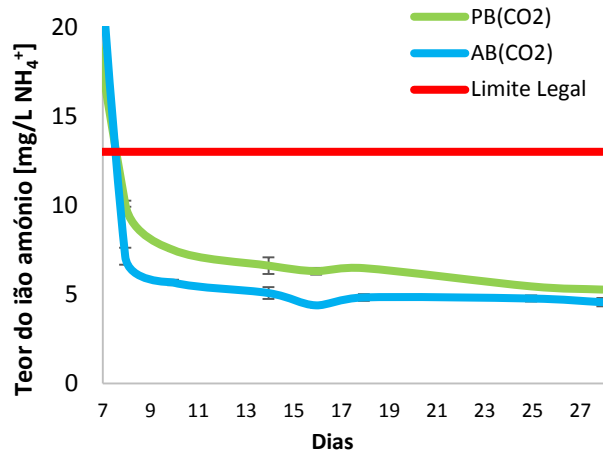


Fig. 62 – Ampliação da altura a partir da qual o nível do ião amónio cumpre o requisito legal imposto no DL nº236/98 de 1 de agosto, no ensaio com adição de CO<sub>2</sub> às culturas com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto*, sujeitas a iluminação fluorescente.

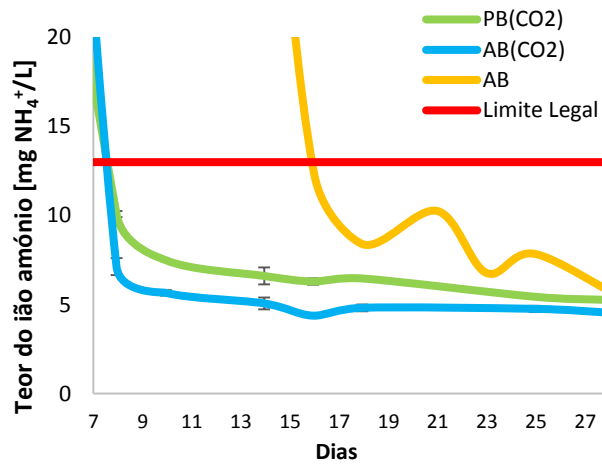


Fig. 63 – Ampliação do momento a partir do qual o nível do ião amónio se tornou legal de acordo com o DL nº236/98 de 1 de agosto, nas culturas com os efluentes de porco *bruto* e avícola *bruto* (com e sem a adição de CO<sub>2</sub>) sob iluminação fluorescente.