

Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Joana Daniela Fernandes de Castro

Avaliação do potencial de produção de biodiesel a partir de algas

Tese de Mestrado

Ciclo de Estudos Integrados Conducentes ao Grau de Mestre em Engenharia de Materiais

Trabalho efetuado sobre orientação de:

Professora Doutora Cândida Vilarinho

Co-orientado:

Doutora Joana Maria Freitas Carvalho

Agradecimentos

Ao longo deste trabalho foram várias as pessoas que se cruzaram comigo e que de alguma forma ajudaram-me a ultrapassar esta última etapa.

Apresento os meus sinceros e especiais agradecimentos à Professora Doutora Cândida Vilarinho, do Departamento de Engenharia de Mecânica. Por todo o seu tempo dispensado comigo, incentivo, orientação. Obrigada por todo auxílio prestado durante as diversas dificuldades que foram aparecendo ao longo do trabalho, que devo dizer que foram muitas.

À Doutora Joana Carvalho pela ajuda prestada, pelos seus ensinamentos e pelo apoio prestado ao longo do trabalho.

Queria agradecer ao CVR – Centro para Valorização de Resíduos, pela disponibilização do laboratório, material e equipamentos, e principalmente às pessoas que fazem parte deste centro pela maneira como foi recebida, assim como todo o apoio indispensável prestado durante este trabalho. Um agradecimento muito especial ao Dr André Ribeiro pela transmissão de conhecimento e todo o apoio prestado.

Agradeço ao Vitor Neto, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho, pela produção da peça a ser utilizada na prensa, para a extração de óleo das sementes, e pelas várias modificações feitas, obrigada também pelas várias sugestões dadas para o sucesso do trabalho e pela sua disponibilidade.

Agradeço ao Carlos Jesus, do Departamento de Engenharia Civil do Laboratório de Materiais, da Universidade do Minho, pela disponibilidade na utilização da prensa, pelas várias sugestões dadas para o sucesso do trabalho, por todo o tempo, simpatia e auxílio prestado.

Um obrigado muito especial aos meus pais, irmã, restante família e amigos, em especial à Joana Fernandes, pelo apoio, paciência, amizade e coragem dada ao longo deste percurso académico.

Resumo

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar à escala laboratorial a viabilidade técnica da produção de biodiesel a partir de microalgas, particularmente as microalgas *Chlorella Ermersonii* (C.E.) e *Botryococcus Braunii* (B.B.). Para tal foram estudadas e avaliadas as várias etapas que integram o processo de produção nomeadamente o cultivo e o crescimento das microalgas e a extração do óleo por distintas metodologias e técnicas com vista à sua posterior transformação em biodiesel. Os resultados indicam uma extração máxima de 4% de óleo utilizando a *Chlorella Ermersonii* (C.E.) e 2,5% utilizando a *Botryococcus Braunii* (B.B.). Devido à reduzida percentagem de óleo obtido nos processos de extração estudados para ambas as espécies de microalgas, não foi possível realizar os ensaios de produção de biodiesel pelo método de transesterificação, conforme foi preconizado nos objetivos da presente dissertação.

Paralelamente, foi realizado um estudo relativo à possibilidade de obtenção de óleo e posterior produção de biodiesel quer a partir de algas marinhas da orla costeira da zona Norte de Portugal (*Sargaço* e *Bodelha*) quer a partir de oleaginosas, semente de girassol, de amendoim e de abóbora.

A produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados e óleos virgens foi igualmente levada a cabo no âmbito do trabalho, por processo de transesterificação básica utilizando o metanol (álcool) e o hidróxido de sódio (catalisador), tendo-se efetuado a sua caracterização e avaliação do cumprimento dos requisitos, de acordo com a norma EN14214.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que o sistema de cultura semi-aberta das microalgas não se revela eficaz, ao contrário do fotobioreactor o qual assegura as condições operatórias necessárias ao aumento da biomassa. Apesar de as microalgas apresentarem um teor em óleo superior a 40%, a principal limitação da sua utilização como matéria-prima prende-se com as dificuldades técnicas associadas à extração do óleo. Foi assim impossível obter biodiesel a partir destas, considerando os meios técnicos disponíveis no CVR.

Relativamente às algas marinhas, nomeadamente o sargaço, pode constituir uma potencial matéria-prima para a produção de biodiesel, tendo sido possível extrair 26% de óleo por extração química, com hexano. Resultados inferiores foram obtidos para a espécie bodelha.

Para os óleos alimentares usados e óleos virgens, o rendimento de transformação em biodiesel foi elevado, como evidenciado pelos parâmetros de qualidade. No entanto, os procedimentos experimentais não permitiram a obtenção de óleo virgem diretamente a partir de sementes oleaginosas.

Abstract

In this work we intended to study laboratory-scale technical feasibility of biodiesel production from microalgae, particularly *Chlorella ermersonii* (C.E.) and *Botryococcus braunii* (BB). To achieve project goals, we proceed to study and evaluate the various steps that comprise the process of production, including growing of microalgae and extraction of the oil by different methodologies and techniques, for the further transformation into biodiesel. The results obtained indicate a maximum of 4% extraction of oil using *Chlorella ermersonii* (C.E) and 2.5% using *Botryococcus braunii* (B.B.). Due to the small percentage of oil obtained in the extraction processes studied for both species of microalgae, it was not possible to perform tests of biodiesel production through the transesterification method, as indicated in the objectives of this dissertation.

In parallel, it was studied the possibility of obtaining oil for subsequent production of biodiesel from marine algae from the shoreline in the North of Portugal (*Bodelha* and *Sargasso*) either from oilseeds, sunflower seed, peanut and Pumpkin.

The production of biodiesel from used cooking oil and virgin oils was also carried out in the work, in both cases, was produced using a basic transesterification process using methanol (alcohol) and sodium hydroxide (catalyst), and the characterization and assessment of compliance in accordance with standard EN14214.

The results obtained in this study indicate that the semi-open culture system of microalgae revealed to be not effective, unlike in fotobioreactor, which ensures the operating conditions required to increase the biomass production. Although the present microalgae obtained an oil content exceeding 40%, the major limitation for their use as raw material for production of biodiesel, relates to the technical difficulties associated with oil extraction. It was thus impossible to obtain biodiesel from microalgae, considering the technical means available in the CVR.

For the marine algae, in particular *Sargasso*, it can be a potential feedstock for biodiesel production, being possible to extract 26% of this type of algae oil, using a chemical extraction method, with hexane. Lower results were obtained for the species *Bodelha*.

For cooking oils and as well for virgin oils, the transformation into biodiesel yield was higher, as evidenced by the quality parameters shown. However, the experimental procedures do not allow the production of crude oil directly from the oleaginous seeds.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice de Figuras	ix
Índice de tabelas	xv
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Objetivos.....	5
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	7
2.1. Biodiesel.....	7
2.1.1. Contexto atual do Biodiesel no Mundo e em Portugal	11
2.1.2. Vantagens e desvantagens do biodiesel.....	13
2.1.3. Métodos de Produção do biodiesel.....	16
2.1.4. Matérias-primas.....	22
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	49
3.1. OAU – Óleos Alimentares Usados.....	50
3.1.1. Caracterização da matéria-prima: Índice de acidez	50
3.1.2. Transformação da matéria-prima em biodiesel	51
3.1.3. Purificação do Biodiesel.....	52
3.1.4. Controlo de qualidade do biodiesel.....	54
3.2. Sementes oleaginosas.....	55
3.2.1. Seleção das sementes oleaginosas	55
3.2.2. Métodos de extração do óleo	56
3.2.3. Produção de biodiesel.....	60
3.3. Macroalgas – Algas Marinhas da orla costeira da zona norte Portugal	65
3.3.1. Recolha e seleção das Algas Marinhas	65
3.3.2. Limpeza e secagem das algas marinhas	66
3.3.3. Extração do óleo	67
3.4. Microalgas	75

3.4.1.	Meio de cultivo	75
3.4.2.	Recolha das algas (Colheita)	82
3.4.3.	Extração do óleo	83
Capitulo 4 – Discussão de resultados.....		91
4.1.	Óleos Alimentares Usados (OAU) e sementes oleaginosas	91
4.1.1.	Caracterização da matéria-prima quanto ao índice de acidez	92
4.1.2.	Rendimento da transformação da matéria-prima em biodiesel	93
4.1.3.	Caracterização do biodiesel produzido	95
4.2.	Macroalgas – Algas Marinhas da orla costeira da zona norte Portugal	98
4.3.	Microalgas	110
Capitulo 5 – Conclusões		125
Sugestões para trabalhos futuros.....		129
Bibliografia		131

Índice de Figuras

Figura 1 - Evolução do consumo mundial total final de combustíveis entre 1971-2008 (Mton) [4].	1
Figura 2 – Evolução mundial desde 1971 a 2008, das emissões de CO ₂ por queima de combustíveis [4].	2
Figura 3 - Ciclo de carbono a) dos combustíveis fósseis e b) biocombustíveis a partir da biomassa [8].	3
Figura 4 - Ciclo renovável do biodiesel [16]	8
Figura 5 – Principais países produtores de biodiesel em 2009 [23]	12
Figura 6 – Distribuição do consumo total de energia primária em Portugal no ano de 2006 [6] 12	
Figura 7 - Resumo da avaliação realizada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos sobre os efeitos do biodiesel na emissão de poluentes em motores de carga pesada. NO _x – óxidos de azoto; MP – matéria particulada; CO – Monóxido de Carbono; HC – hidrocarbonetos [28].	14
Figura 8 - Reação de transesterificação de óleo vegetal [31]	17
Figura 9 - Reações na transesterificação nos triglicerídeos, R1, R2 e R3 são cadeias longas de carbono e hidrogénio, designadas por ácidos gordos [15]	18
Figura 10 - Esquema de produção do biodiesel	19
Figura 11 - Processo de extração do óleo a partir de oleaginosas [adaptado de: [43]	26
Figura 12 - Esquema ilustrativo do processo da fotossíntese [46]	27
Figura 13 – a) <i>Phaeophyta</i> (<i>brown seaweeds – algas castanhas</i>); b) <i>Rhodophyta</i> (<i>red seaweeds – algas vermelhas</i>); c) <i>Chlorophyta</i> (<i>green seaweeds – algas verdes</i>) [45]	28
Figura 14 – Esquema das etapas de produção de biodiesel a partir de algas marinhas.....	31
Figura 15 – Apanha das algas a partir de um braço [57].....	31
Figura 16 - Método de extração Soxhlet e representação [63]	33
Figura 17 - Teor de lípidos e produtividades de diferentes espécies de microalgas [39]	35
Figura 18 – Produção de biodiesel a partir de microalgas, mostrando as principais etapas do processo, juntamente com as entradas e saídas que devem ser levadas em consideração pela análise do ciclo de vida [71].	37

Figura 19 - Representação esquemática da taxa de crescimento das algas em cultura (linha sólida) e concentrações de nutrientes (linha tracejada em função de um período de tempo) [39]	39
Figura 20 - Esquema básico [32,67] e apresentação de um fotobioreator tubular horizontal [54,77].....	41
Figura 21 – Esquema básico [66] e apresentação de um fotobioreator tubular horizontal [77].	42
Figura 22 - Resumo do procedimento experimental	49
Figura 23 – Óleo obtido depois da filtração	50
Figura 24 – a) Pesagem da matéria-prima; b) neutralização do solvente etanol:tolueno; c) amostra antes da titulação; d) amostra depois da titulação.....	51
Figura 25 - Mistura do metanol com NaOH no óleo alimentar usado aquecido.....	52
Figura 26 - a) Ao fim da reação e b) Ao fim das 4h em repouso.....	52
Figura 27 – Após separação: Biodiesel e Glicerina	53
Figura 28 - a) Antes da mistura da água acidificada com o biodiesel, b) Mistura do Biodiesel com água acidificada,.....	53
Figura 29 – a) Biodiesel após lavagens e b) Biodiesel após secagem.....	54
Figura 30 - Sementes de girassol	55
Figura 31 - Amendoins.....	55
Figura 32 - Sementes de abóbora	55
Figura 33 – Prensa do CVR.....	56
Figura 34 - Prensa de civil.....	56
Figura 35 - Molde	57
Figura 36 – Primeiro ensaio: a) Introdução das sementes dentro de uma rede; b) circunferências que serviram de peso; c) ensaio a ser realizado	57
Figura 37 – Peça de civil	58
Figura 38 – Malha de aço.....	58
Figura 39 – Nova alteração da peça.....	59
Figura 40 - Alteração da peça	60
Figura 41 – a) e b) <i>Sargaço</i> e c) e d) <i>Bodelha</i>	65
Figura 42 – Algas que constituem o Sargaço [45]	66
Figura 43 - Limpeza do sargaço: a) Lavagem e b) Secagem	67
Figura 44 - Limpeza da bodelha a) Lavagem e b) Secagem	67

Figura 45 – Prensa de Óleo	68
Figura 46 - <i>Sargaço</i> obtido após ida à prensa.....	68
Figura 47 – Moinho de Lâminas	69
Figura 48 – Após a ida ao moinho a) <i>Sargaço</i> ; b) Bodelha.....	69
Figura 49 – Trituração da bodelha no Moinho de lâminas 2	69
Figura 50 - Método 1: a) Inicial, b) Passado dois dias c) Passado três dias e d) Evaporação do solvente.....	70
Figura 51 - Esquema do método 3.....	72
Figura 52 – Microalgas utilizadas no trabalho experimental	75
Figura 53 - Amostras das microalgas aquando a receção no CVR: a) C.E. e b) B.B.	77
Figura 54 - As amostras das microalgas: dia 0 da cultura a) C.E. e b) B.B	77
Figura 55 – Algumas das culturas – fonte luminosa: sol.....	77
Figura 56 – a) Fotografia da sala de crescimento, evidenciando as lâmpadas para simulação de condições fóticas e b) Fotografia da sala de crescimento com as microalgas	78
Figura 57 - Fotobioreator	79
Figura 58 - Cadinhos após ida à estufa a) C.E. e b) B.B.....	81
Figura 59 – Processo de floculação: a) Biomassa sem floculante; b) introdução do floculante; c) atuação do floculante (4min depois); d) atuação do floculante – final; e) Centrifugação.....	83
Figura 60 – Esquema explicativo do método utilizado [91]	86
Figura 61 - Representação esquemática do processo [92]......	87
Figura 62 - Emulsões: a) A2)Tamb. e b) G2)Tamb.	94
Figura 63 – Rendimento obtido dos ensaios realizados ao <i>sargaço</i> , por esmagamento com a prensa, e respetivo solvente utilizado e formas de adição do mesmo.	100
Figura 64 – Observação do óleo formado a partir do <i>sargaço</i> submetido a diferentes condições de extração: a) ensaio 2; b) ensaio 3; c) ensaio 4.....	101
Figura 65 - Rendimento obtido dos ensaios realizados ao <i>sargaço</i> , triturado com o moinho de lâminas 2 e utilizando o tolueno como solvente (adição em várias fases).	101
Figura 66 - Rendimento obtido dos ensaios realizados ao <i>sargaço</i> , triturado com o moinho de lâminas 2 e utilizando o hexano como solvente (adição em várias fases).	102
Figura 67 – Observação do óleo formado a partir do <i>sargaço</i> , triturado pelo moinho de lâminas 2, seco durante 8 dias na estufa, utilizando o hexano como solvente durante várias fases.	102

Figura 68 - Rendimento obtido dos ensaios realizados à bodelha, triturada com o moinho de lâminas 2 e respetivo solvente utilizado (adição em várias fases).....	103
Figura 69 – Observação do óleo formado a partir da bodelha triturada pelo moinho de lâminas 2, onde se obteve maior rendimento: a e b) ensaio 6 (hexano) e c) ensaio 12 (tolueno)	103
Figura 70 – Relação entre o tipo de secagem e o rendimento obtido dos ensaios realizados as algas marinhas, triturada com o moinho de lâminas 2 e submetidos à adição de hexano com adição em várias fases.	104
Figura 71 - Rendimento obtido dos ensaios realizados às algas marinhas, triturada com o moinho de lâminas 1 e respetivo solvente utilizado, sempre com adição em várias fases.	105
Figura 72 – Rendimento de todos os ensaios realizados ao sargaço utilizando o tolueno como solvente.....	106
Figura 73 – Rendimento de todos os ensaios realizados ao sargaço utilizando o hexano como solvente.....	106
Figura 74 – Resultado final dos ensaios realizados ao sargaço onde obteve máximo rendimento: a) ensaio 4 e b) ensaio 9	107
Figura 75 - Rendimento de todos os ensaios realizados à bodelha e respetivo solvente.	108
Figura 76 - Crescimento das microalgas B.B., em condições de luz solar e luz artificial, em sistema semi-aberto.	112
Figura 77 – Crescimento das microalgas C.E., em condições de luz solar e luz artificial, em sistema semi-aberto.	112
Figura 78 – Todos ensaios de sólidos totais realizados à C.E. e B.B. em sistemas semi-aberto.	114
Figura 79 – Resultados obtidos dos sólidos totais realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na primeira e na segunda experiência.	115
Figura 80 - Resultados obtidos dos sólidos totais e densidade ótica realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na primeira experiência.....	117
Figura 81 - Resultados obtidos dos sólidos totais e densidade ótica realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na segunda experiência.	118
Figura 82 – Comparação das experiências realizadas no fotobioreator e no sistema semi-aberto na presença de luz artificial	119
Figura 83 – Rendimento obtido dos diferentes ensaios realizados às microalgas.....	123
Figura 84 – Resultado final da maioria dos ensaios realizados às microalgas.....	123

Figura 85 – Comparação entre a massa teórica e massa real	124
-----------------------------------------------------------------	-----



Índice de tabelas

Tabela 1 – Especificação para o Biodiesel segundo a norma EN 14214, e respetivos métodos analíticos de teste ou de análise.	9
Tabela 2 - Alguns ensaios normalmente realizados ao biodiesel de acordo com a norma EN 14214.....	10
Tabela 3 - Tabela resumo de características dos catalisadores básicos e ácidos [38]	22
Tabela 4 - Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel [39]	23
Tabela 5 - Planeamento dos ensaios a realizar	63
Tabela 6 – Biodiesel obtido.....	64
Tabela 7 – Tabela resumo sobre os métodos utilizados.....	73
Tabela 8 – M ₇ - Meio para as estripes C.E. e B.B. [87]	75
Tabela 9 - Composição para a solução de micronutrientes [87]	76
Tabela 10 – Tabela resumo dos ensaios realizados	89
Tabela 11 – Determinação do índice de acidez	92
Tabela 12 - Resultados obtidos das análises de diferentes parâmetros às amostras OAU e óleos vegetais.....	93
Tabela 13 – Condições operacionais e respetivo rendimento de extração de óleo obtido nos diferentes ensaios realizados ao sargaço e à bodelha	98
Tabela 14 – Previsão da relação do sargaço/hexano para obtenção de óleo	108
Tabela 15 – Previsão de relação de bodelha/Hexano para obtenção de óleo	109
Tabela 16 - Condições ótimas de valorização de extração de óleo das algas estudadas.....	109
Tabela 17 - Rendimento obtido dos diferentes ensaios realizados à C.E. e B.B.....	122

Capítulo 1 – Introdução

Os recursos energéticos são um suporte importante para a atividade humana. Ao longo dos anos tem-se verificado um crescente aumento do consumo de energia, facto que advém não só do aumento demográfico e suas conseqüentes necessidades básicas, mas também do suporte necessário ao funcionamento e execução das atividades económicas e do próprio padrão de vida das sociedades industrializadas. A indústria, os transportes, a agricultura, as atividades comerciais e domésticas, são os sectores que consomem mais energia, com tendência para um crescimento cada vez mais significativo do mesmo [1,2].

O carvão, o gás natural e o petróleo são combustíveis fósseis, resultantes da decomposição de organismos, vegetais ou animais, mortos, ao longo de dezenas ou centenas de milhões de anos [3], são as fontes de energia às quais corresponde uma maior taxa de consumo a nível mundial (figura 1).

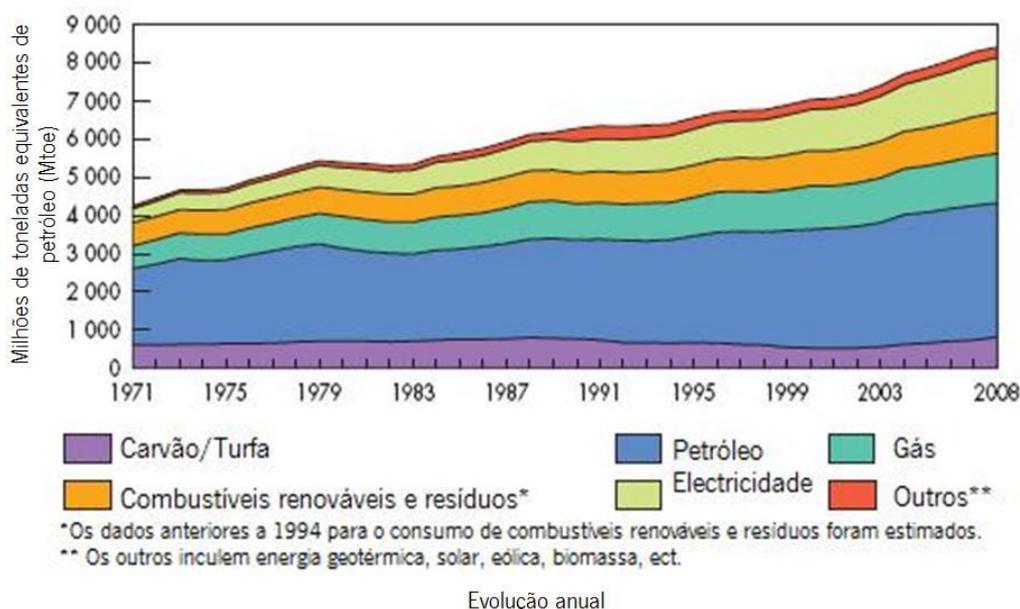


Figura 1 - Evolução do consumo mundial total final de combustíveis entre 1971-2008 (Mton) [4].

Os combustíveis fósseis encontram no sector dos transportes um dos seus principais consumidores com inerentes problemas daí decorrentes para o meio ambiente, nomeadamente o efeito de estufa, as alterações climáticas decorrentes da sua queima e o risco associado ao seu armazenamento e transporte. Adicionalmente promovem a degradação dos recursos naturais e dos ecossistemas com conseqüentes problemas não só a nível económico mas igualmente ao nível social e de saúde pública. Tal impacto é devido à emissão de gases para a atmosfera como dióxido de carbono (CO_2) e de contaminantes para o ar onde se incluem óxidos

de azoto (NO_x), óxidos de enxofre (SO_x), monóxido de carbono (CO), partículas e compostos orgânicos voláteis. Na figura 2 é possível observar-se os níveis de emissão de CO_2 causado ou promovido pela queima dos combustíveis ao longo dos anos [1,2].

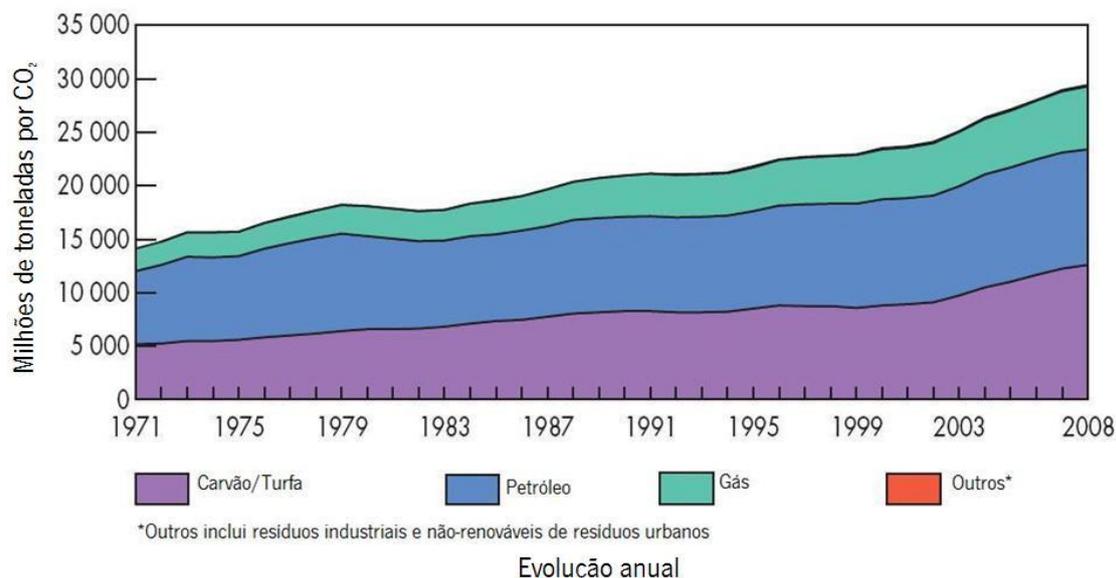


Figura 2 – Evolução mundial desde 1971 a 2008, das emissões de CO_2 por queima de combustíveis [4].
(Mton – Millions tonnes of CO_2 - Milhões de toneladas por CO_2)

Como é possível verificar, o aumento do consumo dos combustíveis, conduziu a um agravamento das emissões de CO_2 , e de poluentes emitidos com efeitos deletérios para o ambiente, que provocam poluição e a destruição da camada do ozono. Os combustíveis fósseis são energias primárias, que se encontram disponíveis na natureza e são recursos não-renováveis, isto é, são recursos limitados que pelo seu consumo, acabarão por se esgotar, desconhecendo-se ainda quando atingirão o seu pico de produção, bem como a quantidade real de reservas existentes e disponíveis [1,2].

Neste contexto, deparamo-nos com questões ambientais e questões energéticas, havendo a necessidade de pesquisar e encontrar fontes de energia alternativas aos combustíveis fósseis e que preferencialmente sejam renováveis, tais como, a hídrica, a biomassa, a eólica, a solar, a geotérmica e a nuclear.

Segundo a Diretiva 2009/28/CE [5] «*Biomassa*», é definida como “*a fração biodegradável de produtos, resíduos e detritos de origem biológica provenientes da agricultura (incluindo substâncias de origem vegetal e animal), da exploração florestal e de indústrias afins,*

incluindo da pesca e da aquicultura, bem como a fração biodegradável dos resíduos industriais e urbanos”.

A biomassa é constituída pelos materiais orgânicos derivados da reação entre o dióxido de carbono, a água, a luz do sol e outros nutrientes via fotossíntese [6], ou seja, a biomassa pode derivar do cultivo de culturas energéticas e pela colheita florestal ou de outros resíduos vegetais [4]. A biomassa tem sido destacada como uma fonte de energia alternativa, uma vez que é uma fonte renovável e que fixa o CO₂ da atmosfera através da fotossíntese [7]. Se a biomassa crescer de forma sustentável, a sua combustão não vai ter impactos no balanço de CO₂ na atmosfera, porque o CO₂ emitido pela queima da biomassa é compensado pelo CO₂ fixado na fotossíntese [7]. De entre os tipos de biomassa existentes, as algas (macro e microalgas) têm uma eficiência fotossintética mais elevada quando comparada com outros tipos de biomassa [4,7]. Na figura 3 é possível comparar o ciclo do carbono, tanto dos combustíveis fósseis como dos biocombustíveis a partir da biomassa.

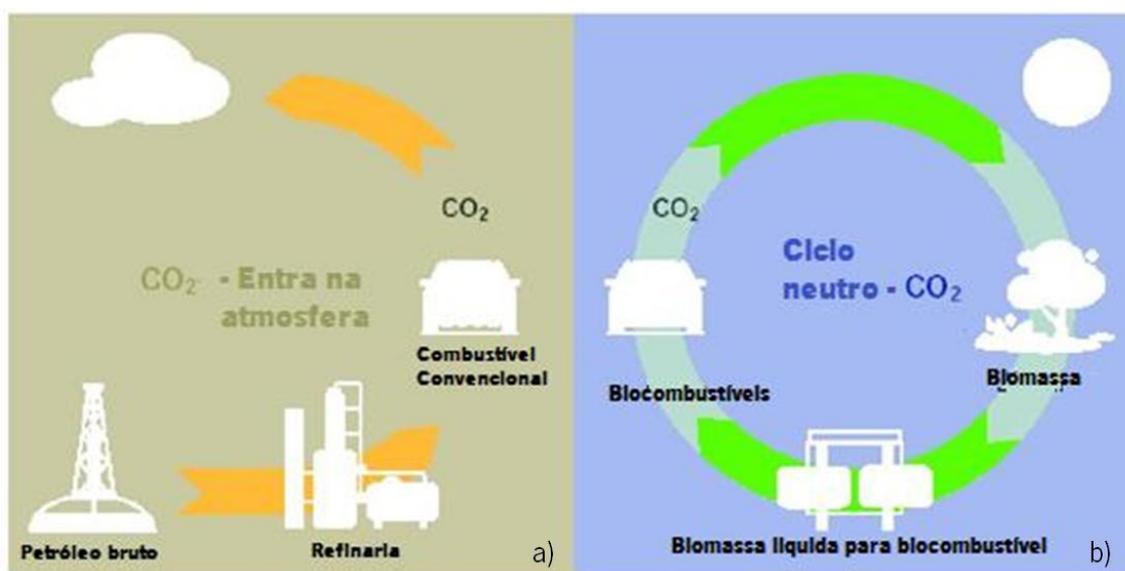


Figura 3 - Ciclo de carbono a) dos combustíveis fósseis e b) biocombustíveis a partir da biomassa [8].

Segundo a diretiva 2003/30/CE [5,9] «*Biocombustível*» é “*um combustível líquido ou gasoso para transportes, produzido a partir de biomassa*”. São combustíveis derivados de matéria-prima vegetal ou outras, sendo uma fonte atraente de energia, obtida por recursos renováveis (biomassa), sendo esta uma das formas com potencial para a substituição dos combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural). Os biocombustíveis mais comuns são o bioetanol, produzido através do milho, trigo ou beterraba, o biogás e ainda o biodiesel, produzido a partir de diversas fontes, como óleos alimentares, virgens ou usados, sementes oleaginosas,

algas, entre outras. Este tipo de combustíveis fornecem igualmente energia, e têm como objetivos primordiais reduzir a poluição atmosférica decorrente da libertação de contaminantes, minimizar a dependência dos combustíveis fósseis, uma vez que as suas reservas são cada vez menores, e assim prevenir a degradação do meio ambiente e a existência de problemas sociais, económicos e de saúde pública daí decorrentes [1,6,7].

Tendo em vista o incremento da utilização dos biocombustíveis, as políticas internacionais, o protocolo de Quioto e a legislação Europeia, promovem e potenciam a sua utilização estabelecendo por exemplo na diretiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes, a utilização de um teor mínimo de 5,75% de biocombustíveis até 2010 [9,10]. Posteriormente, em 23 de Abril de 2009 a publicação da diretiva 2009/28/CE do parlamento europeu relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subseqüentemente revoga as diretivas 2001/77/CE e 2003/30/CE, *aprovou como objetivo obrigatório uma quota de 20 % de energia proveniente de fontes renováveis no consumo energético comunitário global até 2020 e um objetivo obrigatório mínimo de 10 % a alcançar por todos os Estados-Membros para a quota de biocombustíveis no consumo de gasolina e gasóleo pelos transportes até 2020, a introduzir de forma economicamente eficaz* [5].

Deste modo, os biocombustíveis e em particular o biodiesel, são uma grande aposta, uma alternativa económica e ambientalmente necessária, sendo um combustível renovável, e com a vantagem de se adaptar aos motores a diesel mineral podendo substituir uma fração do combustível tradicionalmente utilizado nestes motores. O biodiesel pode ser produzido a partir de diversas origens desde óleos vegetais (virgens ou usados), de gorduras animais, de oleaginosas (normalmente sementes) ou ainda de microalgas [11].

1.1. Objetivos

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar à escala laboratorial a viabilidade técnica e económica da produção de biodiesel a partir de microalgas, particularmente as microalgas *Chlorella Ermersonii* (C.E.) e *Botryococcus Braunii* (B.B.). Para tal foram estudadas e avaliadas as várias etapas que integram o processo de produção nomeadamente o cultivo e o crescimento das microalgas, a extração do óleo e a metodologia da produção do biodiesel.

Paralelamente, foi realizado um estudo relativo à possibilidade de obtenção de óleo e posterior produção de biodiesel quer a partir de algas marinhas da orla costeira da zona Norte de Portugal (*Sargaço* e *Bodelha*) quer a partir de oleaginosas, semente de girassol, de amendoim e de abóbora.

A produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados e óleos virgens foi igualmente levada a cabo no âmbito do trabalho, tendo-se efetuado a sua caracterização e avaliação do cumprimento dos requisitos para utilização/aplicação comercial.

A caracterização dos objetivos propostos inclui a realização das seguintes tarefas:

- Estudo das condições de crescimento das microalgas, recolha da biomassa gerada e avaliação dos métodos de extração de óleo;
- Recolha de algas marinhas e análise de métodos para extração do óleo presente nas mesmas;
- Produção de biodiesel, a partir das microalgas, de algas marinhas e de oleaginosas, em escala laboratorial, através da reação de transesterificação e respetivas fases de purificação do mesmo (separação de fases, lavagens do biodiesel, secagem e filtração do biodiesel);
- Produção de biodiesel a partir de óleos alimentares virgens e usados;
- Caracterização do biodiesel produzido de acordo com a norma EN 14214;
- Avaliar a viabilidade técnica da produção de biodiesel a partir de algas (microalgas e macroalgas marinhas).

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Atualmente, o mundo está a enfrentar alguns problemas associados ao consumo de combustíveis fósseis, nomeadamente o seu elevado custo, os níveis de poluição e impacto para o ambiente, assim como a diminuição das reservas existentes. Neste contexto, cada vez mais existe a necessidade de procura e desenvolvimento de energias alternativas e renováveis, de forma a minimizar e ultrapassar estes condicionalismos. O biodiesel apresenta-se como um forte substituto do diesel mineral, pelo menos de uma fração deste, nos motores de ignição, contribuindo desta forma para a minimização ou diminuição da utilização dos combustíveis fósseis, nomeadamente os utilizados no sector dos transportes e agrícola [12].

2.1. Biodiesel

O biodiesel, também conhecido por *FAME (Fatty Acid Methyl Esters)*, abreviatura de ésteres metílicos de ácidos gordos, é um combustível renovável, proveniente de matérias-primas como óleos usados, óleos vegetais, gorduras de animais e algas. A transesterificação é o método mais comum de produzir biodiesel, que consiste numa reação química catalisada envolvendo os óleos (obtidos pelas matérias-primas referidas anteriormente) e um álcool (ex. metanol ou etanol) que vai originar os esteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel) e a glicerina (subproduto). A palavra biodiesel pode dividir-se em “bio” e “diesel”, “bio” indica que a fonte de matéria-prima utilizada é renovável e biológica, e “diesel” sugere a sua utilização como combustível em motores diesel [1,13,14].

O biodiesel é um combustível seguro, renovável, não-tóxico, limpo (a sua utilização não irá gerar o incremento de gases com efeito de estufa na atmosfera do planeta, não contribuindo assim para o aquecimento global e para a agudização dos fenómenos atmosféricos extremos no planeta), é biodegradável e contém teores menores de compostos de enxofre quando comparado com os combustíveis fósseis [1,14,15].

Na figura 4, ilustra-se o ciclo do biodiesel, e a razão pela qual este é considerado um combustível limpo e renovável. Indicam-se ainda as matérias-primas que podem dar origem ao óleo, bem como possíveis métodos de conversão do mesmo em biodiesel.



Figura 4 - Ciclo renovável do biodiesel [16]

É comum adicionar-se o biodiesel ao diesel mineral formando uma mistura, ou utilizar integralmente o biodiesel em motores de ignição devidamente preparados e adaptados para o efeito. Com o intuito de especificar a concentração de biodiesel na mistura com diesel mineral é comum utilizar uma nomenclatura específica, definida como BX, onde X se refere à percentagem em volume do biodiesel. Deste modo, B5, B20, B100 referem-se, respetivamente, a combustíveis com uma concentração de 5%, 20% e 100% de biodiesel (biodiesel puro) [15,17]. As propriedades do biodiesel são similares às do diesel, devendo cumprir as especificações definidas na Norma Europeia EN14214 [17] a qual impõe limites para diversos parâmetros físicos e químicos e define quais as normas e metodologias de ensaio a serem utilizadas para a avaliação destes parâmetros (tabela 1).

Tabela 1 – Especificação para o Biodiesel segundo a norma EN 14214, e respectivos métodos analíticos de teste ou de análise.

Parâmetros definidos por:	Parâmetro	Unidade	Norma Europeia EN 14214	Método analítico de teste
Parâmetros dependentes das matérias-primas	Teor de ésteres	% (m/m)	Min. 96,5	EN 14103
	Massa volúmica a 15°C	kg/m ³	860-900	EN ISO 3675, EN 12185
	Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,50-5,00	EN ISO 3104
	Enxofre Total	mg/kg	Max. 10	
	Resíduos de carbono	% (m/m)	Max. 0,3	EN ISO 10370
	Número de cetano	-	Min. 51	EN ISO 5165
	Teor de cinzas sulfatadas	% (m/m)	Max. 0,02	ISO 3987
	Contaminação total	mg/kg	Max. 24	EN 12662
	Estabilidade oxidativa	h	Min. 6	EN 14112
	Valor de iodo	-	Max. 120	EN 14111
	Teor de fósforo	mg/kg	Max. 10	EN 14107
	Ácido linoleico ME	%	Max. 12	EN 14103
	Polinsaturado (acima de 3 ligações duplas)	%	Max. 1	
	CFPP 15.04 a 30.09	°C	0	EN 116
	CFPP 01.10 a 15.11	°C	-10	EN 117
	CFPP 16.11 a 28.02	°C	-20	EN 118
CFPP 01.03 a 14.04	°C	-10	EN 119	
Parâmetros dependentes da produção	Ponto de inflamação	°C	Min. 120	ISO/CD 3679
	Teor de água	mg/kg	Max. 500	EN ISO 12937
	Corrosão do cobre (3h, 50°C)	Grau de corrosão	1	EN ISO 2160
	Índice de Acidez	mg	Max. 0,5	EN 14104
	Teor de metanol	% (m/m)	Max. 0,2	EN 14105
	Monoglicerídeos	% (m/m)	Max. 0,8	EN 14105
	Diglicerídeos	% (m/m)	Max. 0,2	EN 14105
	Triglicerídeos	% (m/m)	Max. 0,2	EN 14105
	Glicerina livre	% (m/m)	Max. 0,02	EN 14105, EN 14106
	Glicerina total	% (m/m)	Max. 0,25	EN 14105
Teor alcalino (Na+K)	mg/kg	Max. 5	EN 14108, EN 14109	

Tabela 2 - Alguns ensaios normalmente realizados ao biodiesel de acordo com a norma EN 14214

Ensaio de caracterização	
Índice de acidez (EN 14104)	Corresponde à quantidade de ácidos minerais e ácidos gordos livres contidos numa amostra de combustível. Depende principalmente da matéria-prima utilizada. Índice de acidez elevado pode afetar a estabilidade do biodiesel e causar corrosão e formação de depósitos nos motores. Este parâmetro de qualidade reflete o grau de degradação do biodiesel durante a armazenagem, pois quanto maior a degradação do biodiesel maior será a acidez.
Número de Iodo (EN 14111)	Mede o grau de insaturação do Biodiesel. A existência de ligações duplas pode levar à polimerização dos glicéridos por aquecimento, o que pode levar à formação de espumas.
Viscosidade cinemática a 40°C (EN ISO 3104)	É a medida de resistência interna ao escoamento de um combustível. Elevados valores de viscosidade podem provocar uma maior resistência da bomba injetora dos motores, acarretando um aumento da pressão e do volume de combustível injetado, especialmente quando o motor trabalha a baixas temperaturas. Como consequência direta, o tempo de ignição e injeção do combustível tende a ser ligeiramente maior, o que por sua vez leva a um aumento das emissões.
Massa volúmica a 15°C (EN ISO 3675, EN 12185)	A medição da massa volúmica tem como objetivo restringir algumas matérias-primas para a produção de biodiesel, pois tal como a viscosidade, esta propriedade apresenta grande influência no desempenho e eficácia na injeção do combustível diesel.
Teor em água de Karl Fisher (EN ISO 12937)	Este parâmetro tem um efeito proeminente na sua degradação, principalmente quando armazenado a temperaturas elevadas e exposto ao ar, o que se reflete numa diminuição da pureza e estabilidade oxidativa. Alguma quantidade de água pode ser formada durante o processo, através da reação dos ácidos gordos livres com o hidróxido de sódio. Também durante a fase de purificação, nas lavagens do biodiesel, alguma percentagem de água pode permanecer no biodiesel.
Ponto de Inflamação (prEN ISO 3679)	É um fator determinante para evitar a inflamabilidade dos materiais, pois representa a temperatura à qual um combustível inflama, quando exposto a uma fonte de calor. Quando apresenta valores baixos, o manuseamento, armazenamento e utilização do combustível torna-se mais perigoso. Consegue-se também avaliar a eficácia da remoção do metanol usado em excesso, pois a presença deste composto baixa significativamente o valor da temperatura de inflamação.
Teor em ésteres metílicos (EN 14103)	Mede a pureza do Biodiesel. Um valor baixo pode ser influenciado por: escolha errada das condições reacionais, tratamento insuficiente da matéria-prima, ou presença de impurezas, teores residuais de álcool/glicerina no produto final. Na etapa de purificação são removidos estes compostos, logo quanto mais eficaz for, melhor serão os valores de teor em ésteres.
Teor em Sódio (EN 14108 / EN 14109)	Mede os vestígios do catalisador utilizado na reação e que podem afetar o desempenho do Biodiesel final.

2.1.1. Contexto atual do Biodiesel no Mundo e em Portugal

Rudolf Diesel (1858-1913) foi o inventor do motor a diesel, sendo utilizado como combustível o óleo de amendoim. No ano de 1893 testou o primeiro motor de ignição por compressão (diesel), para trabalhar com óleos vegetais. Em 1900, foi testado o motor com óleo de amendoim, e em 1912, patenteou o motor com o seu nome. Numa altura em que ainda não eram discutidos temas como crises energéticas, alterações climáticas e o buraco de Ozono, Rudolf Diesel disse: “O uso de óleos vegetais pode parecer insignificante hoje, mas estes produtos a seu tempo tornar-se-ão tão importantes como o querosene e o carvão de hoje” [18,19,20].

A visão de Rudolf está cada vez mais atual, visto que o preço do petróleo continua a aumentar e a disponibilidade de combustíveis fósseis a diminuir (devido à crescente dependência no consumo dos combustíveis fósseis) e que as preocupações ambientais associadas ao aquecimento global e às alterações climáticas são cada vez mais intensas, tornando pertinente e oportuno o desenvolvimento de alternativas mais limpas e sustentáveis.

A utilização do biodiesel como combustível tem vindo a apresentar-se com um elevado potencial no mundo inteiro, verificando-se um crescimento acelerado no seu mercado de produção. Assim, países como os EUA, a Argentina, a Malásia, a França, a Áustria, a Alemanha, a Bélgica, o Reino Unido, a Itália, a Holanda, a Finlândia, o Japão e a Suécia têm vindo a investir significativamente na produção e viabilização comercial do Biodiesel, estimulando o desenvolvimento em escala comercial. Foi a partir dos anos 90 que a Europa começou o processo de industrialização do Biodiesel [21].

Na União Europeia é onde se produz mais Biodiesel, cerca de 75% da produção mundial. O governo garante incentivos fiscais aos produtores deste tipo de energias limpas, promovendo também legislação específica para o produto, visando assim uma melhoria do ambiente [22].

A Alemanha apresenta-se como sendo o maior produtor de Biodiesel na Europa, como se pode ver na figura 5.

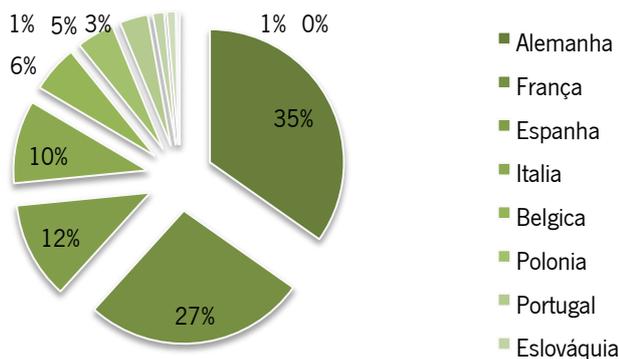


Figura 5 – Principais países produtores de biodiesel em 2009 [23]

Em Portugal, no que diz respeito ao uso de fontes de energia, sabe-se que importa cerca de 87% da energia, sendo que o petróleo domina as importações com 71%, dos quais 39% são utilizados nos sectores dos transportes [7].

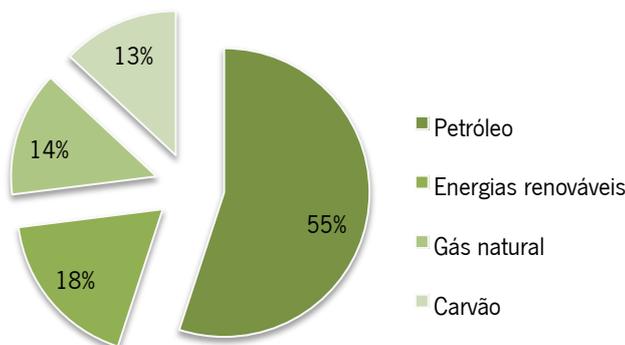


Figura 6 – Distribuição do consumo total de energia primária em Portugal no ano de 2006 [6]

Em Janeiro de 2006, o governo Português anunciou a isenção do Imposto Sobre Produtos Petrolíferos (ISP) para unidades com capacidade de produção inferior a 3000 toneladas/ano, ficando as unidades de maiores dimensões sujeitas a uma taxa reduzida. Com esta medida pretende fomentar a utilização dos biocombustíveis nos transportes e reduzir a dependência energética nacional. O Governo português, através do Decreto-Lei n.º 49/2009 de 26 de Fevereiro, define cotas mínimas de incorporação obrigatória de biocombustíveis em gasóleo rodoviário, definindo que em 2010, estabeleceu como objetivo incorporar 10%, em volume, de biocombustíveis no gasóleo em 2010 [24].

O objetivo é cumprir a diretiva 2009/28/CE, de 23 de Abril, na qual são estabelecidos objetivos nacionais obrigatórios coerentes com uma quota de 20 % de energia proveniente de fontes renováveis e uma quota de 10 % de energia proveniente de fontes renováveis no sector dos transportes no consumo energético da Comunidade, a atingir até 2020 [5].

Desta forma, veio permitir a criação de fileiras de biocombustíveis em Portugal, reforçando a produção de culturas energéticas, para diminuir a dependência das importações de petróleo e reduzir as emissões de CO₂. No que diz respeito a empresas já em funcionamento, ou pré-funcionamento, destacam-se as seguintes: SPACE, SOCIPOL, SUNERGY, IBEROL, PRIOBIOCOMBUSTÍVEIS, NUTRINVEST-TAGOL, DIESEILBASE e BIOLOGICAL [18].

2.1.2. Vantagens e desvantagens do biodiesel

O biodiesel, como combustível alternativo em relação ao diesel, apresenta várias vantagens. É derivado de recursos renováveis, existe disponibilidade da matéria-prima necessária à sua produção, reduz a emissão de poluentes para a atmosfera, é biodegradável, sustentável, não tóxico, não requer modificações nos motores para a sua utilização, apresenta boa eficiência de combustão e reduzido teor de enxofre e compostos aromáticos [12,17,25,26].

▶ Com a produção do biodiesel, matérias-primas como óleos alimentares usados, gorduras animais, etc., podem ser valorizados, sendo uma solução para o tratamento da acumulação deste tipo de resíduos.

▶ O biodiesel possui cerca de 10% de oxigénio (O₂) em peso. O O₂ vai melhorar o processo de biodegradação (degrada-se mais rapidamente do que os combustíveis tradicionais, cerca de quatro vezes mais rápido do que diesel) e aumentar a eficiência da combustão contribuindo para uma queima mais limpa [26,27].

▶ Em todo mundo circulam milhões de veículos que utilizam combustíveis derivados de petróleo, a sua queima contribui muito para a geração de emissões de gasosas, poluindo o meio ambiente (efeito de estufa). O CO₂, o CO, o NO_x, o SO_x, material particulado (PM), e compostos orgânicos voláteis (COV) são os gases de efeito de estufa atribuídos à causa do aquecimento global [13,17,26]. A utilização do biodiesel num motor de diesel reduz essas emissões em comparação com o diesel mineral, excepto as emissões de NO_x aumentam com a concentração de biodiesel no combustível. Na figura 7 pode observar-se de que forma é que evolui essas emissões com o aumento da percentagem de biodiesel incorporado no combustível [13,17,26].

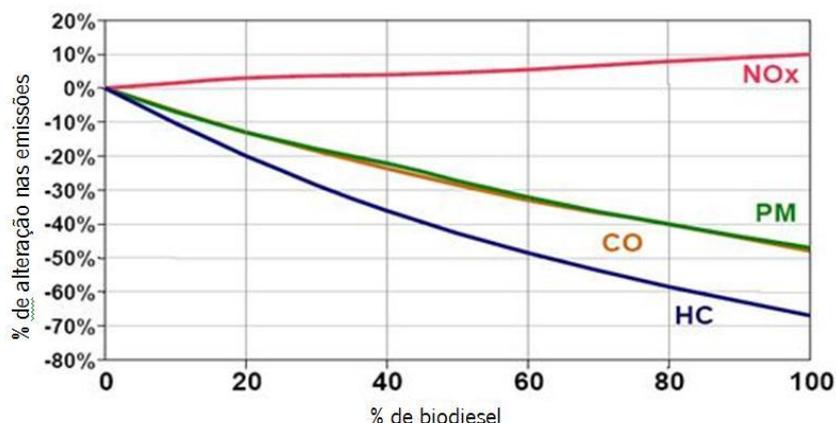


Figura 7 - Resumo da avaliação realizada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos sobre os efeitos do biodiesel na emissão de poluentes em motores de carga pesada. NO_x – óxidos de azoto; MP – matéria particulada; CO – Monóxido de Carbono; HC – hidrocarbonetos [28]

▶ O dióxido de carbono é considerado neutro relativamente às emissões, uma vez que o biodiesel é fabricado a partir de matéria vegetal, ou seja biomassa. A biomassa utilizada tem sido focada com fonte de energia alternativa, uma vez que é um recurso renovável e utiliza o CO₂ da atmosfera para realização da fotossíntese. Se a biomassa é cultivada de forma sustentada, a sua combustão não tem impacto sobre o balanço de CO₂ na atmosfera, porque o CO₂ emitido pela queima da biomassa é compensado pela fixação do CO₂ na fotossíntese [1,28]. As plantas capturam todo o CO₂ emitido pela queima do biodiesel e separam o CO₂ em C e O₂, neutralizando suas emissões. Não é o que acontece com os combustíveis fósseis, onde CO₂ emitido corresponde a CO₂ que foi absorvido e armazenado há milhares de anos [28].

▶ A diminuição das emissões, especialmente partículas e agentes mutagénicos, permitirá, a longo prazo, minimizar as doenças respiratórias e de foro oncológico, especialmente nas cidades, podendo promover uma melhoria na saúde pública, reduzindo assim as despesas no plano de saúde.

▶ O biodiesel é um combustível alternativo para substituir o diesel mineral em motores de combustão interna com ignição por compressão (diesel) sem necessidade de alteração do mesmo. O biodiesel pode ser substituído de forma total ou parcialmente no diesel mineral (camiões, tratores, camionetas, automóveis, etc.), sendo o desempenho do motor semelhante [26,27].

▶ O biodiesel tem melhores características de lubrificação. Esta propriedade pode ajudar a melhorar os injetores, diminuindo o desgaste do motor e aumentando a sua vida útil a longo prazo. Através da realização de distintos ensaios foi possível comprovar que existe uma melhoria

significativa na capacidade de lubrificação quando o biodiesel é adicionado ao diesel convencional [26].

- ▶ Possui baixo risco de explosão, pois necessita de uma fonte de calor superior a 150°C, sendo menos volátil, tornando-o mais seguro para transportar e para o seu armazenamento [29].

- ▶ Durante a produção do biodiesel, existe formação de um subproduto, a glicerina, que pode ser valorizada materialmente no mercado dos sabões, ou energeticamente, por intermédio da sua queima em caldeira.

- ▶ Os processos de obtenção deste combustível são menos dispendiosos do que os processos utilizados para extrair o petróleo, uma vez que este está a ser encontrado em poços mais fundos, e outros combustíveis fósseis.

- ▶ Como é uma indústria em expansão, pode contribuir para a criação de novos postos de trabalho.

No entanto, o biodiesel apresenta algumas desvantagens em relação aos combustíveis fósseis, nomeadamente poder calorífico mais baixo, um aumento nas emissões de NO_x, uma maior viscosidade, a possibilidade de solidificação a baixas temperaturas, entre outras.

- ▶ O biodiesel possui um poder calorífico menor que o diesel de petróleo, logo, o consumo deste combustível será ligeiramente superior ao normal. Esta contrapartida é compensada pelo facto do biodiesel possuir um maior número de cetano, o que significa que tem uma maior eficiência/qualidade de combustão, sendo maior o aproveitamento do seu conteúdo energético [26,27].

- ▶ Como é possível verificar-se, por análise da figura 7, existe um pequeno aumento dos níveis de NO_x sendo um elemento importante para o efeito de estufa [27].

- ▶ A oxidação do biodiesel durante de combustão e o seu armazenamento constitui uma das preocupações em relação à qualidade de biodiesel. Este fenómeno pode danificar o motor, sendo influenciado por vários fatores, incluindo, a luz, a temperatura, os materiais estranhos, os peróxidos, o tamanho da área de superfície entre o biodiesel e o ar [26].

- ▶ Há possibilidade de solidificação a temperaturas baixas, podendo provocar entupimentos nas linhas de abastecimento do combustível e filtros, sendo necessária a utilização de anticongelantes em climas frios [17].

2.1.3. Métodos de Produção do biodiesel

Como foi dito anteriormente, para a produção de biodiesel é necessário uma gordura ou óleo. Os óleos e/ou gorduras são constituídos por moléculas de triglicerídeos, com três ácidos gordos de cadeias longas, que estão ligados a uma única molécula do glicerol. São insolúveis em água mas solúveis em solventes orgânicos. Possuem densidades mais baixas do que a água, são referidos como "gorduras" quando são sólidos à temperatura ambiente, e quando são líquidos são chamados de "óleos." As gorduras e os óleos são classificados como "lípidos", que é um categoria que abrange uma ampla variedade de produtos químicos substâncias. Além de triglicerídeos, também inclui mono e diglicerídeos, fosfatídeos, cerebrósidos, esteróis, terpenos, álcoois gordos, ácidos gordos, lipossolúveis vitaminas e outras substâncias.

Os ácidos gordos são compostos orgânicos constituídos por uma cadeia hidrocarbonada, com o máximo de 24 átomos de carbono, com um grupo carboxilo (-COOH) no final. As ligações covalentes entre os átomos carbono podem ser simples ou duplas; quando ocorre uma ligação dupla, os átomos de carbono ligam-se a um em vez de a dois átomos de hidrogénio. As cadeias com ligações simples apresentam todos os átomos de hidrogénio que podem permitir, dizendo-se que estão saturadas de hidrogénio. As cadeias com uma ou mais ligações duplas dizem-se insaturadas (ou polinsaturadas).

Uma gordura possui maioritariamente ácidos gordos saturados (os ácidos gordos saturados são sólidos) sendo o seu aspeto sólido à temperatura ambiente, enquanto os óleos são constituídos em maior proporção por triglicerídeos formados em maior quantidade por ácidos gordos insaturados (ácidos gordos insaturados são geralmente líquidos), sendo líquidos à temperatura ambiente.

Depois desta breve explicação sobre o principal componente para a produção de biodiesel é fácil deduzir que a utilização direta dos óleos nos motores como combustível é problemática, devido à sua elevada viscosidade e baixa volatilidade [26]. Para tal, existem três formas utilizadas para a redução da viscosidade: microemulsão, pirólise, e a mais utilizada a transesterificação.

Os problemas colocados com a alta viscosidade do óleo vegetal podem ser minimizados através da mistura com diesel. O óleo vegetal misturado com combustível diesel mineral é um método simples para reduzir a viscosidade de óleo vegetal puro. Não necessita de qualquer processo químico [15,17].

A técnica de microemulsão é outra forma de tentar resolver o problema da viscosidade dos óleos vegetais. As microemulsões são definidas como transparente, termodinamicamente estáveis, dispersões coloidais em que o diâmetro das partículas da fase dispersa é inferior a um quarto do comprimento de onda da luz visível [17]. Os álcoois de cadeias curtas e imiscíveis, como o metanol, etanol, butanol, são utilizados para essas microemulsões [15,17,30]. Microemulsão à base de combustíveis são, por vezes, também denominados de " combustíveis híbridos ", embora as misturas convencionais do diesel com óleos vegetais também tenham sido apelidados de combustíveis híbridos [17]. Apesar de as microemulsões apresentarem boas características no que diz respeito aos padrões de atomização (redução de um todo a pequenas unidades), verificou-se que a longo prazo provocam a deposição de carbono no motor, a combustão incompleta e o aumento da viscosidade dos óleos lubrificantes [15,17].

A pirólise é a conversão de uma substância em outra por meio de calor, com o auxílio de um catalisador, na ausência de ar ou oxigênio. Neste processo provoca-se a quebra das ligações químicas para produzir moléculas mais pequenas. Esta técnica pode ser aplicada nos óleos vegetais, gorduras de animais, ácidos gordos naturais e ésteres metílicos de ácidos gordos [15,17]. O produto formado é quimicamente semelhante ao diesel (de origem do petróleo). Um dos problemas associados a este processo é o facto de o equipamento ser bastante dispendioso [15].

2.1.3.1. Reação de Transesterificação

O processo mais utilizado para a produção do biodiesel é a transesterificação, que consiste numa reação de uma gordura ou de um óleo vegetal com um álcool, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático), de modo a formar ésteres de ácidos gordos (biodiesel) e glicerol (sub-produto), como pode ver-se na figura 8 [19,29].

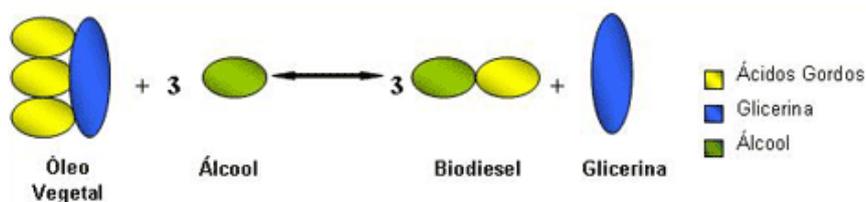


Figura 8 - Reação de transesterificação de óleo vegetal [31]

A transesterificação requer três moles de álcool (ex. metanol) para uma mole de triglicerídeos. Os três ácidos gordos libertam-se do glicerol e combinam-se com o álcool para produzir uma mole de glicerol e três moles de ésteres [29]. É constituída por uma sequência de três reações consecutivas reversíveis, onde os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos, os diglicerídeos em monoglicerídeos seguindo-se a conversão de monoglicerídeos em glicerol. Em cada passo é produzido um éster e, portanto, no final são convertidos em três moles de ésteres, a partir de uma mole de triglicerídeos, e uma mole de glicerol [15,19,29,32].

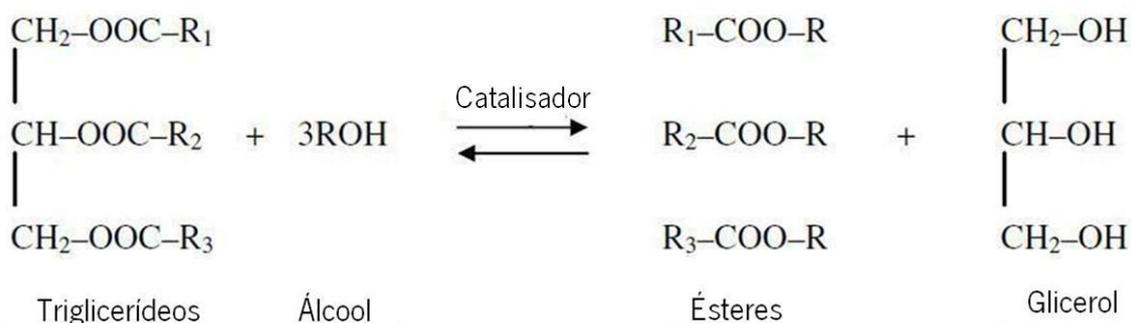
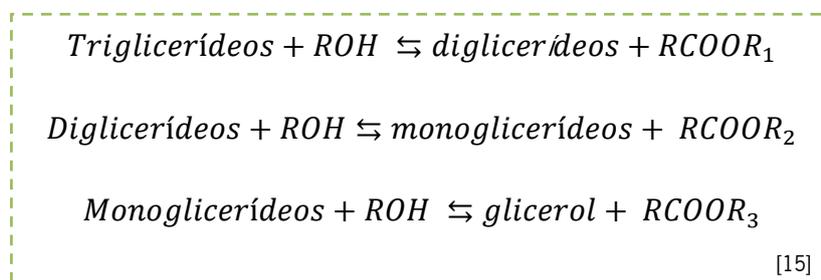


Figura 9 - Reações na transesterificação nos triglicerídeos, R1, R2 e R3 são cadeias longas de carbono e hidrogénio, designadas por ácidos gordos [15]



Uma vez que a reação é reversível é normal usar a nível industrial, seis moles de álcool para uma mol de triglicerídeos. Este excesso de álcool é uma forma de garantir de a reação se desloca para o lado dos produtos, ou seja, sentido de ésteres, no sentido do biodiesel [19,32].

Os álcoois que podem ser utilizados são o metanol, etanol, propanol, butanol ou álcool amílico (são álcoois simples). O metanol e o etanol são os mais utilizados. O etanol é menos tóxico para a saúde humana e pode ser obtido a partir de recursos naturais, tornando assim o biodiesel produzido 100% natural. No entanto, o metanol é o mais aplicado devido a razões físicas e químicas (cadeia curta e polaridade), é mais barato, possui grande disponibilidade, e facilita o processo de separação dos ésteres da glicerina (devido às propriedades químicas) [15].

O processo de produção de biodiesel é então composto pelas seguintes etapas: preparação da matéria-prima, reação de transesterificação, separação de fases (biodiesel da glicerina) e purificação do biodiesel (lavagem, secagem e filtração). A lavagem com ácido e água tem como objetivo a remoção de restos de catalisador e álcool, para evitar a formação de sabões. A secagem tem como finalidade remover a água que possa ficar no biodiesel com as lavagens, uma vez que quantidade máxima presente no biodiesel deverá ser de 500mg/kg (segundo a norma EN14214). Por último, como a filtração pretende-se remover as partículas maiores ou detritos que possam existir no biodiesel. Na figura 10 é possível observar os passos necessários para a produção do biodiesel.

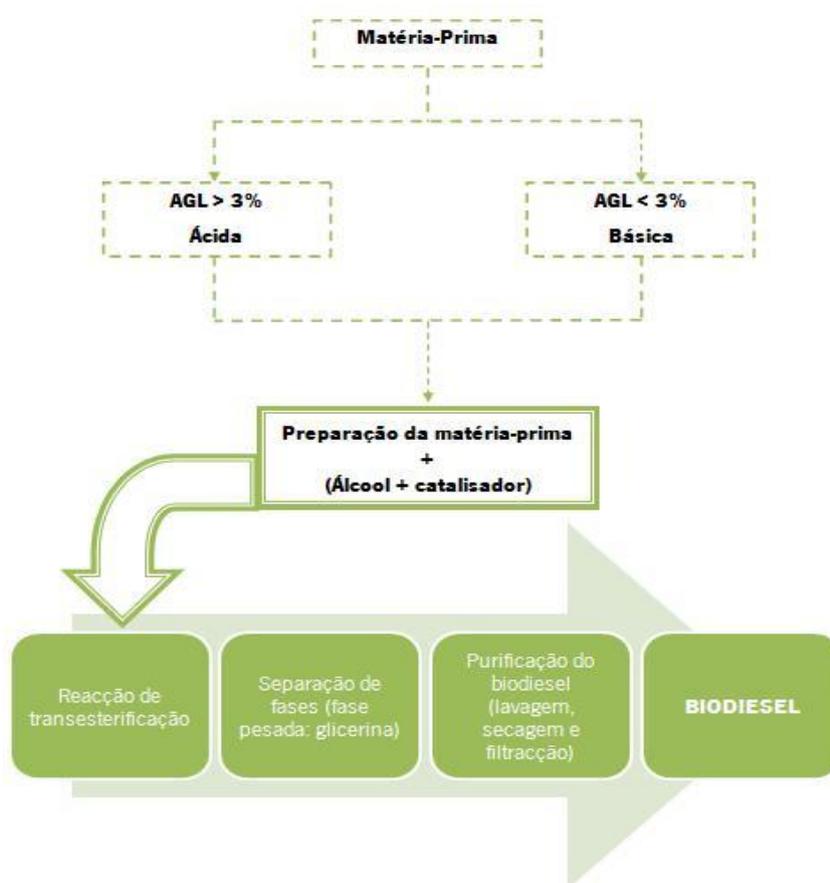


Figura 10 - Esquema de produção do biodiesel

O processo de transesterificação é influenciado pela temperatura de reação, razão molar de álcool: óleo, o tipo de catalisador, a quantidade de catalisador, velocidade de agitação, da matéria-prima utilizada. O tipo de catalisador, as condições da reação e a concentração de impurezas numa reação de transesterificação determinam o caminho que a reação segue. Relativamente ao catalisador, podem ser utilizados catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos.

O biodiesel é normalmente produzido por catalisadores básicos, como o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, metóxido de sódio, carbonatos ou óxidos [33]. Este processo é mais eficiente, mais rápido e menos corrosivo que a catálise ácida. Um dos problemas da catálise básica é a necessidade de grandes quantidades de água para a remoção do catalisador, mas esse mesmo excesso de água na reação pode provocar a formação de sabões. Para que tal não aconteça, o teor de ácidos gordos livres na matéria-prima não deve ultrapassar os 3%. Ultrapassando o limite em vez de um catalisador básico deverá utilizar-se um catalisador ácido. Os ácidos gordos livres determinam a acidez da matéria-prima, ditando qual o tipo de reação a utilizar [19,20,33,34].

No processo de catálise básica, o catalisador é dissolvido no álcool por agitação. Seguidamente mistura-se o óleo com o catalisador/álcool, com agitação, cerca de 2h a uma temperatura de 60°C (temperatura standard). Após a reação de transesterificação são produzidas duas fases líquidas: éster e glicerol em bruto [19,20,33].

No fim da reação (ao fim de aproximadamente 2h), a glicerina é removida dos ésteres, através da decantação, uma vez que a glicerina torna o óleo mais denso e viscoso, sendo necessária a sua remoção. O facto de a glicerina ser pouco solúvel na fase éster, e ser mais densa (pesada) vai facilitar a sua remoção. A glicerina obtida pode ser aproveitada no fabrico de cosméticos, produtos alimentares e farmacêuticos, podendo também proceder-se à sua queima em caldeiras [18,35].

Óleos e gorduras vegetais podem conter pequenas quantidades de água e ácidos gordos livres (AGL ou FFA – *Fatty Free Acid*). Quando se dá transesterificação com um catalisador alcalino, o catalisador reage com AGL formando assim o sabão. A equação seguinte mostra a reação de saponificação do catalisador (de sódio hidróxido) com AGL formando sabão e água [33, 35].



Esta reação é indesejável porque o sabão diminui o rendimento do biodiesel e inibe a separação dos ésteres a partir do glicerol, tornando o processo mais dispendioso. Para evitar a perda de rendimento devido a reações de saponificação (formação de sabão), o óleo e o álcool não devem conter água, e o óleo deve ter um mínimo de ácidos gordos livres. Biodiesel é recuperado com lavagem repetida com água, para remover o glicerol e metanol, podendo-se dizer que este é o principal objetivo do processo de purificação [32,35].

A transesterificação por via da catálise ácida, como o nome indica, usa um ácido como catalisador, sendo os mais utilizados o ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido sulfônico, sulfato de ferro, entre outros [15,17,19].

A utilização de um catalisador ácido é a solução ideal quando a matéria-prima é bastante ácida, isto é, possui bastantes ácidos gordos livres, aproximadamente superior a 3%, sendo utilizado para converter os AGL de esteres, como um passo de pré-tratamento, são bastante rápidos a convertê-los em ésteres. No entanto, para converter os triglicerídeos em biodiesel a reação é muito lenta, cerca de 4000 vezes mais lenta usando uma base como catalisador. Os catalisadores mais utilizados são o ácido sulfônico e o ácido sulfúrico. Estes catalisadores dão rendimentos muito elevados em ésteres, mas as reações continuam muito lentas [15,17,25,36].

O catalisador é dissolvido em metanol por agitação vigorosa em um pequeno reator. O óleo é transferido para o reator de biodiesel e, em seguida, a mistura de catalisador / álcool é bombeado dentro do óleo. As reações requerem elevados tempos de reação e o uso de elevadas quantidades de álcool para se obter bons rendimentos de produto. No entanto, o rendimento de éster não aumenta proporcionalmente com o rácio molar [17,36]. Na razão molar de 6 moles de álcool para 1 mol de óleo, e cerca de 1% de catalisador, a conversão é de 77% e demora cerca de 3h, para uma razão molar de 30 moles de álcool para 1 mole de óleo, e cerca de 1% para o catalisador, essa quantidade é suficiente para ter cerca de 99% de conversão, mas em contra partida a reação pode chegar até quase 70h [19,20,22]. A temperatura de reação pode variar entre 55 a 80°C [37].

A elevada eficiência de conversão com um catalisador ácido na transesterificação pode ser alcançada através do aumento da razão molar de álcool para o óleo da reação, temperatura, concentração do catalisador ácido e do tempo de reação [17].

Este processo é mais económico que o processo utilizando um catalisador básico, sendo um processo de etapa única, requerendo só uma etapa adicional para AGL para converter ésteres. No entanto, catálise ácida não é a primeira escolha para aplicações comerciais devido à taxa de reação mais lenta, exigência de temperatura de reação elevada, a razão molar elevada de álcool do óleo, separação do catalisador, e à corrosão ambiental grave [22].

Tabela 3 - Tabela resumo de características dos catalisadores básicos e ácidos [38]

Variáveis	Catalisadores básicos	Catalisadores ácidos
Temperatura de reação (°C)	60 -70	55-80
Tempo de reação (min)	60 – 360	4-140
Remoção de:	Metanol, catalisador	Metanol, catalisador
Ácidos gordos livres presentes na matéria-prima	Produtos saponificáveis	Ésteres
Água na matéria-prima	Interferência na reação	Interferência na reação
Rendimento em ésteres metílicos	Normal	Normal
Recuperação da glicerina	Difícil	Difícil
Purificação	Glicerol, sabões	Glicerol
Purificação dos ésteres metílicos	Lavagem repetida	Lavagem repetida
Custo de produção do catalisador	Baixo	Baixo

O processo de transesterificação através de enzimas ainda é recente, mas já demonstrou que é bastante favorável para a realização do processo. As enzimas mais utilizadas são as lipases que normalmente se encontram na natureza, obtidas através de animais, vegetais e microbianas.

2.1.4. Matérias-primas

Quimicamente, o biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos, com uma longa cadeia de ácidos gordos e é produzido normalmente a partir de recursos biológicos, não tóxicos, sendo necessário que o óleo utilizado possua triglicerídeos (constituídos por ácidos gordos e glicerol), sendo essenciais/necessários para a produção do biodiesel. As principais fontes de matéria-prima utilizadas para obter esses triglicerídeos são: óleos vegetais, obtidos por oleaginosas, óleos alimentares usados, gorduras de animais, e mais recentemente as microalgas.

A escolha do tipo de matéria-prima para a produção de biodiesel está dependente de vários fatores, como localização geográfica, da sua origem, da sua qualidade, da disponibilidade, o custo de culturas, as propriedades de armazenamento e do desempenho quando combustível. Assim é inegável que a matéria-prima será a variável mais importante que afeta mais o preço do biodiesel no mercado global. Na tabela seguinte, podem observar-se algumas matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel

Tabela 4 - Comparação de diferentes matérias-primas para a produção de biodiesel [39]

Fonte vegetal	Imagem	Teor em óleo (% óleo por wt ¹ por biomassa)	Quantidade de óleo (L óleo/ha ano)	Terra necessária (m ² ano/kg biodiesel)	Produtividade do biodiesel (kg/ha ano)
Milho (<i>Zea mays L.</i>)		44	172	66	152
Cânhamo (<i>Cannabis sativa L.</i>)		33	363	31	321
Soja (<i>Glycine max L.</i>)		18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas L.</i>)		28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa L.</i>)		42	915	12	809
Colza/Canola (<i>Brassica napus L.</i>)		41	974	12	862
Girassol (<i>Helianthus annuus L.</i>)		40	1070	11	946
Mamona (<i>Ricinus communis</i>)		48	1307	9	1156
Óleo palma (<i>Elaeis guineensis</i>)		36	5366	2	4747
Microalga (baixo teor em óleo)		30	58,700	0.2	51,927
Microalga (teor médio em óleo)		50	97,800	0.1	86,515
Microalga (teor alto em óleo)		70	136,900	0.1	121,104

2.1.4.1. Óleos Alimentares Usados (OAU)

De modo a ultrapassar esta limitação, os fabricantes de biodiesel estão concentrados no uso de matérias-primas de baixo custo, tais como óleos alimentares usados, a fim de assegurar a viabilidade económica da produção do combustível [22].

Apesar de o óleo vegetal virgem ter as características ideais para a produção do biodiesel, uniformidade da composição e reduzida quantidade de água, não necessidade de filtrações nem de outro tipo de remoção de impurezas, nem da logística da sua recolha, não constitui a matéria-prima preferencial quer por questões económicas, quer ambientais. Efetivamente, os óleos alimentares usados designados por OAU, são muito menos dispendiosos

¹ Wt - uma abreviatura para a percentagem em peso

do que os óleos vegetais refinados, constituindo uma fonte de matéria-prima promissora para a produção do biodiesel [22].

A fim de reduzir o custo de produção do biodiesel e os níveis de poluição ambiental, os óleos alimentares usados são uma boa escolha como matéria-prima, pois são mais baratos que os óleos virgens (cerca de 2-3 vezes menor) [17].

Segundo o decreto Decreto-Lei n.º 267/2009 de 29 de Setembro, em Portugal é proibida a eliminação dos OAU em Portugal, por isso, estes são recolhidos podendo ser encaminhados para os aterros ou então, aproveitar-se os óleos resultantes de processamentos domésticos, comerciais e industriais para a produção do biodiesel [18].

Os OAU representam um potencial de oferta surpreendente, superando as expectativas. Além do que, a sua conversão em esteres metílicos através da transesterificação, reduz o peso molecular, a viscosidade e o ponto de inflamação [22].

Quando o óleo está num processo de fritura, o que acontece é que existe um aumento de viscosidade, de calor específico e mudança de cor. A elevada viscosidade do óleo vegetal (assim como as gorduras animais) é um problema, pois faz com que a viscosidade fique superior à do próprio biodiesel. Para tal, é necessário que seja aquecido para que haja uma boa atomização pelos injetores. Caso isso não aconteça, não haverá uma boa queima, formando depósitos nos injetores do motor e nos cilindros, provocando um mau desempenho, mais emissões e reduzindo o tempo de vida do motor útil.

2.1.4.2. Gorduras de animais

Relativamente às gorduras/óleos de animais, estas possuem estruturas químicas semelhantes aos óleos vegetais, pois contêm os triglicerídeos obtendo-se assim os ácidos gordos. As gorduras/óleos podem ser obtidas a partir da banha de porco, sebo bovino, gordura e óleo de peixe, gordura de carneiro e gorduras de aves, entre outras matérias gordas de origem animal [15]. O principal problema relativo à conversão de gorduras animais de baixo custo em biodiesel é o alto teor de ácidos gordos presentes na matéria-prima que normalmente varia entre 5% a 30%.

A utilização das gorduras animais tem-se tornado cada vez mais atraente, não só devido ao seu baixo custo, mas também porque a sua incorporação na cadeia alimentar para produção de farinhas e rações, tem vindo a ser cada vez mais restrita devido ao risco de difusão de doenças [40].

2.1.4.3. Sementes oleaginosas

As sementes oleaginosas possuem na sua composição um elevado teor em óleos e gorduras [25]. Esses componentes podem ser utilizados para consumo humano, na forma de óleos vegetais, assim como para a produção de biodiesel. Muitas oleaginosas já foram investigadas para a produção de biodiesel, dentro delas destacam-se a soja, o girassol, o coco, o linho, o milho, a colza, o amendoim, o óleo ou gordura de palma, o óleo de pinho, o óleo de casca de laranja, a Canola, a Jatropha, as micro-algas, entre outras [15]. Através da tabela 5 é possível verificar que o óleo de palma e a Mamona são das oleaginosas com maior rendimento, podendo ser obtidas em climas inter-tropicais ou subtropicais.

O processamento da matéria-prima, para a conversão em biodiesel, visa criar melhores condições para uma maior eficácia da reação química, e logo uma maior taxa de conversão. No caso das sementes oleaginosas, é necessário, primeiramente, obter o óleo, que pode ser extraído por meios mecânicos (esmagamento), meios químicos por solventes e/ou extração mista. A seleção da forma de extração do óleo depende de dois fatores: capacidade produtiva e teor de óleo presente na biomassa. Normalmente o processo de extração compreende quatro passos sucessivos: trituração, pressão (prensa mecânica), extração do óleo contido no bolo (usando por exemplo hexano) e purificação do óleo obtido [41,42]. Através destas operações é produzido o óleo e uma pequena porção de “cake”, ou resíduo sólido que após o processamento pode servir de alimento aos animais, dado tratar-se de um produto de elevado teor proteico e energético [18]. O processo de obtenção do óleo a partir de oleaginosas é apresentado na figura 11.

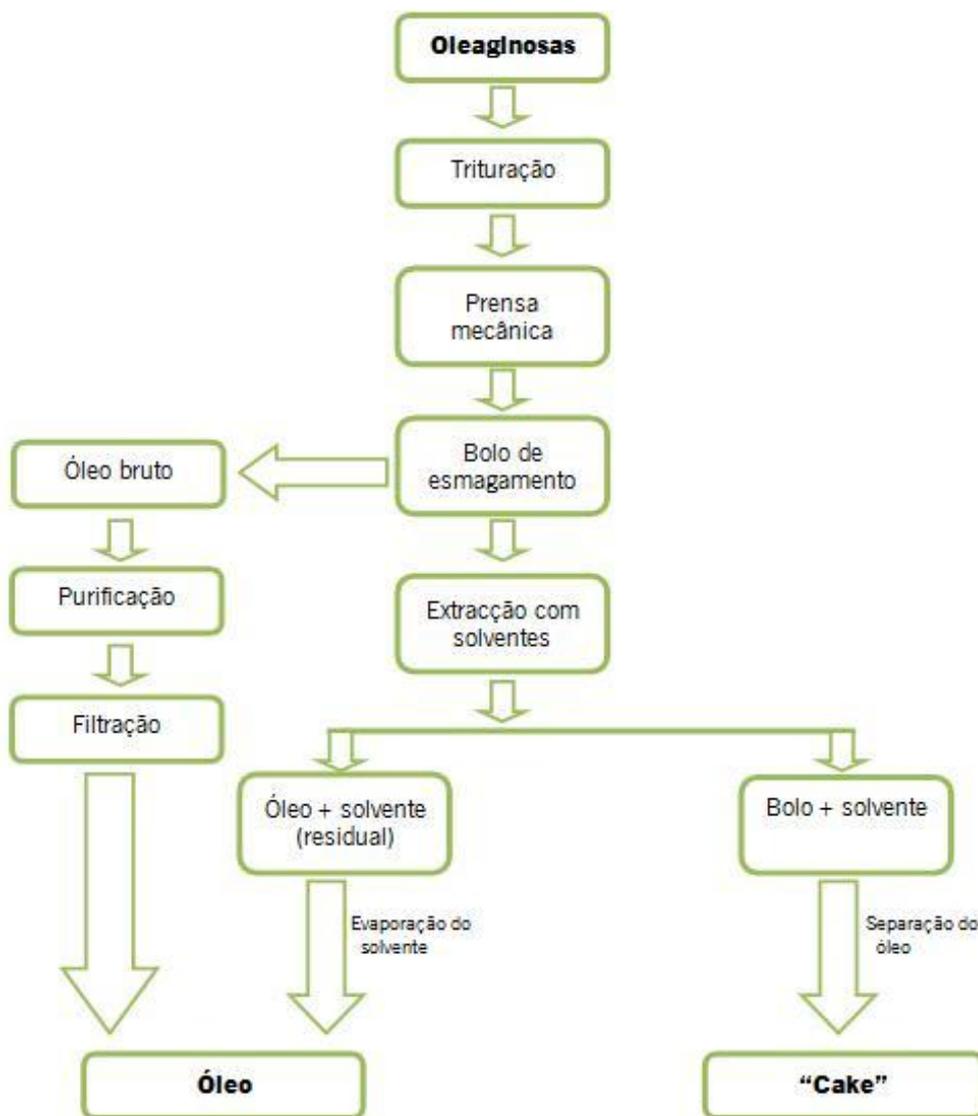


Figura 11 - Processo de extração do óleo a partir de oleaginosas [adaptado de: [43]

Após a recolha do óleo das oleaginosas, este é sujeito à reação de transesterificação de modo a obter o biodiesel.

A principal vantagem das sementes oleaginosas incide sobre o facto não haver limpeza e não necessitar de tratamento prévio, principalmente de filtrações. Um problema associado a este tipo de matéria-prima advém do facto de que a maior parte das sementes oleaginosas são fonte de alimento, incidindo na temática *food vs fuel*.

2.1.4.4. Algas (Micro e Macro)

O aparecimento das algas promoveu a absorção do dióxido de carbono (CO_2) da atmosfera e através da fotossíntese libertou o oxigénio (O_2), o que contribuiu para a evolução da vida no planeta [44].

A fotossíntese é o processo através do qual as plantas, seres autotróficos (seres que produzem o seu próprio alimento), transformam o CO_2 , a água (H_2O) e os sais minerais em compostos orgânicos (hidratos de carbono, CH_2n – glicose) e O_2 [45].

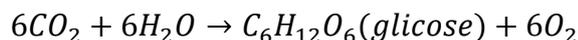
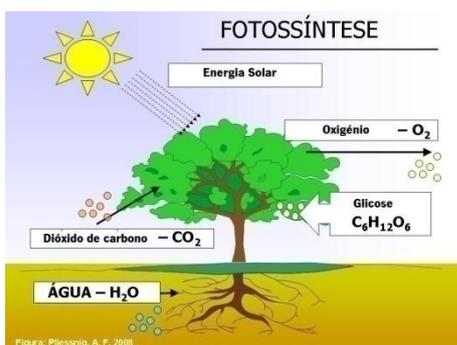


Figura 12 - Esquema ilustrativo do processo da fotossíntese [46]

As algas são um grupo de organismos fotossintéticos com uma grande diversidade de formas, que podem ser unicelulares ou multicelulares, de tamanhos e complexidade consideráveis. As algas vivem em meios aquáticos ou em terra, em zonas húmidas. Com base na sua morfologia e tamanho, as algas são normalmente subdivididas em duas grandes categorias; as macroalgas e as microalgas. As macroalgas são seres multicelulares, com elevada diferenciação. As microalgas são seres unicelulares, microscópicos sendo frequentemente encontradas em sistemas de água doce e em ambientes marinhos [47].

Durante os últimos anos foram desenvolvidos vários estudos para estimar a real viabilidade e sustentabilidade da utilização das algas na produção de biodiesel. Para diversos autores as algas podem vir a ser a próxima geração promissora de matérias-primas para a produção de biocombustíveis [48].

a) Macroalgas – algas marinhas

As macroalgas ou algas marinhas, ou simplesmente algas, são plantas adaptadas ao ambiente marinho, abundantes sobretudo nos lagos, rios e nos oceanos podem atingir vários metros de comprimento (até 60m) [49,50]. Podem encontrar-se dispersas na água, sobre as rochas húmidas, em muros, sobre outras plantas ou em associação com outros organismos [45].

As algas marinhas habitam nos oceanos há mais de 2mil milhões de anos, e são utilizadas como alimento principalmente pelos povos asiáticos desde o século XVII [45]. Atualmente existe um número elevado de espécies de algas marinhas que encontram aplicação na indústria farmacêutica, na cosmética e no sector alimentar [45,51,52,53]. Encontra igualmente aplicação como biofertilizante [53], de que é exemplo o *Sargaço* existente na orla costeira da zona Norte de Portugal, desde Apúlia a Viana do Castelo [45].

Em termos gerais, existem três tipos de algas definidos de acordo com a sua pigmentação, as *brown seaweeds – algas castanhas* (Filo *Phaeophyta* por exemplo: *Laminaria*, *Fucus*, *Sargassum*), *red seaweeds – algas vermelhas* (*Rhodophyta* por exemplo, *Gelidium*, *Palmaria*, *Porphyra*) e as *green seaweeds - algas verdes* (*Chlorophyta*, por exemplo, *Ulva*, *Codium*) [54,55].

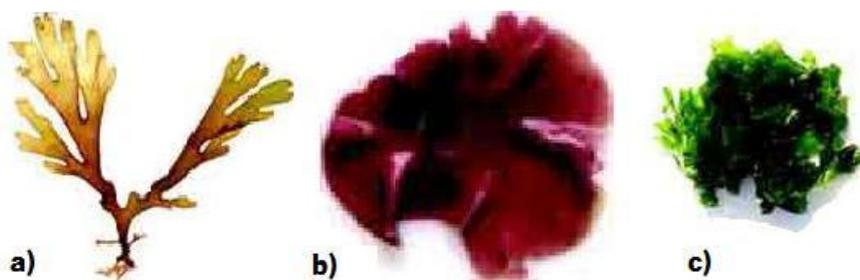


Figura 13 – a) *Phaeophyta* (*brown seaweeds – algas castanhas*); b) *Rhodophyta* (*red seaweeds – algas vermelhas*); c) *Chlorophyta* (*green seaweeds – algas verdes*) [45]

A diversidade das algas marinhas é ampla, podendo encontrar-se uma infinidade de tipos morfologia em função da sua complexidade, da sua estrutura e das adaptações ao meio ambiente. As macroalgas apresentam um complexo grau de organização morfológica, apresentando talos laminares, cilíndricos, tubulares, encrostantes, etc [45].

► Costa marítima Portuguesa

Portugal tem uma longa tradição marítima e um significativo potencial de exploração dos recursos marinhos, a apanha e utilização das algas marinhas é descrita desde o XIV. Geograficamente encontra-se situado no sudoeste da Europa, ocupando uma extensa área da parte sul-ocidental da Península Ibérica, entre a latitude 37 e 42°N com dois arquipélagos, a Madeira ao lado da costa de Marrocos e os Açores, com um grupo de nove ilhas vulcânicas no Atlântico em latitude 37°N. No continente, de inverno, a temperatura da água do mar superfície varia de 12°C, a norte, a 16,5°C no sul. Já no verão, as temperaturas da água do mar de superfície podem variar de 18°C, no norte, a 22°C no sul [56]. Possui 830 km de costa litoral, separados por grandes areias e extensões rochosas, riquíssimas em algas [56,57].

Nos anos 60, identificaram-se e descreveram-se 246 espécies de *Rhodophyta* (algas vermelhas), 98 de *Phaeophyceae* (algas castanhas) e 60 de *Chlorophyta* (algas verdes), números que não se alteraram significativamente até ao presente [56,57].

As algas do litoral ocidental, com uma orientação Norte-Sul, podem ser agrupadas em dois grupos: as algas da zona Norte (entre a foz do rio Minho e a foz do rio Tejo); e as algas da zona Sul (entre a foz do rio Tejo e o Algarve). Exemplos das primeiras: algas castanhas (Phaeophyceae) – *Saccharina latissima* (antes denominada *Laminaria saccharina*), *L. hyperborea*, *Fucus serratus*, *Pelvetia caniculata*, *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Chorda filum*; algas vermelhas (Rhodophyceae) – *Ahnfeltia plicata*, *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata*, *Ceramium shuttleworthianum* e *Delesseria sanguinea*. Exemplos das segundas: *Zonaria tournefortii*, *Amphiroa beavoisii*, *Griffithsia opuntioides*, *Ulva linearis* e *Valonia utricularis*. Outras algas, que são tipicamente de águas temperadas, têm o seu limite Norte na costa ocidental de Portugal. Estas incluem as algas castanhas (Phaeophyceae) *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira spp.*, *Padina pavonica*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris polypodioides* (antes denominada *D. membranaceae*) e *Halopteris filicina* [56,57].

► Potencialidades das macroalgas como biocombustível

Como foi dito anteriormente, as algas, tal como a maioria das plantas, possuem nas suas células uma série de pigmentos que lhes permite realizar a fotossíntese, podendo alimentar-se pela absorção de substâncias orgânicas presentes na água. A eficiência fotossintética da biomassa aquática é muito maior (6-8%, em média) do que a da biomassa

terrestre (1,8-2,2%, em média) [50,58]. As algas marinhas são responsáveis por aproximadamente 40-50% da fotossíntese que ocorre anualmente no planeta [52], sendo consideradas uma fonte renovável de emissão zero, isto é, fixam o CO₂ da atmosfera através da fotossíntese [58,59].

As microalgas receberam até agora mais atenção do que macroalgas para a produção de biocombustíveis. No entanto, as macroalgas, em especial aquelas que se encontram à superfície ou na costa à beira mar, têm igual potencial como fonte de utilização para a produção de biocombustíveis [60]. Como vantagens de utilização das algas marinhas destaca-se a sua grande dimensão e conseqüente biomassa associada, o facto de não serem uma fonte de alimento, grande disponibilidade, tecnologia de colheita de baixo custo, crescimento rápido [58,60].

As macroalgas, no geral, possuem baixa ou reduzida percentagem de lípidos na sua composição (cerca de 1-7% de matéria seca) [45,54,59], possuem uma superior percentagem de açúcares naturais e de outros hidratos de carbono, os quais podem ser fermentados para produzir biogás ou bioetanol [54]. No entanto, as algas marinhas têm sido alvo de estudo para verificar a existência de novos lípidos e ácidos gordos, sendo estes responsáveis pela produção de biodiesel [51]. Ao nível das microalgas, existe alguma informação sobre produção de biodiesel a partir desta, no entanto apesar dos estudos ainda há pouca informação disponível sobre o uso de macroalgas, por isso torna-se importante investigar a produção de biodiesel a partir de algas marinhas.

► Etapas de produção de biodiesel a partir de algas marinham

O processo de produção de biodiesel a partir de macroalgas envolve várias etapas ou operações. Na figura 14 é apresentado um diagrama simplificado de toda a operação do sistema, o qual inclui quatro principais subprocessos:

- 1) Colheita/recolha das algas marinhas;
- 2) Pré-tratamento, incluindo limpeza, desidratação, secagem (se necessário), trituração, etc. ;
- 3) Extração do óleo da respetiva biomassa [54].
- 4) Produção de biodiesel.

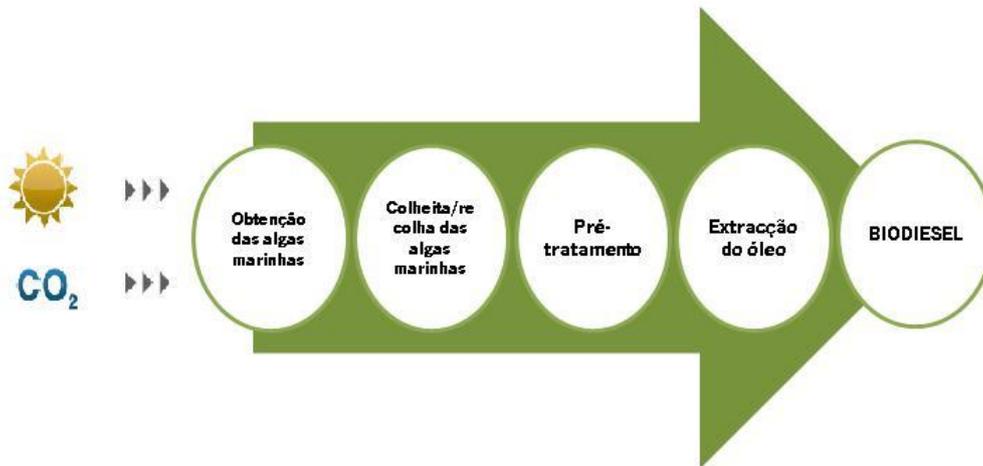


Figura 14 – Esquema das etapas de produção de biodiesel a partir de algas marinhas

1) Colheita/recolha das algas marinhas

A população natural das algas marinhas é um recurso significativo. Normalmente, nas zonas em que as águas são mais frias predominam as algas castanhas (em Portugal situa-se no norte) enquanto em águas mais quentes são as algas vermelhas que se apresentam em mais abundância (em Portugal situa-se no sul).

A forma mais utilizada e antiga para a colheita das algas marinhas é a colheita manual, isto é, a apanha das algas com as mãos. Estas são colhidas perto do mar, nas zonas litorais que possuem rochas, ou mesmo junto à costa [47,57]. Quando a maré se encontra baixa, veículos terrestres podem ter acesso à praia formando pilhas de algas, que posteriormente são utilizadas por pequenas comunidades costeiras como fertilizantes ou condicionador de solo [54]. Em Portugal, e próximo de Guimarães, na Apúlia, temos o caso do *Sargaço*, que aparece por volta do verão em que os agricultores vão guardando para posteriormente utilizarem para a agricultura, como fertilizante [45,56].



Figura 15 – Apanha das algas a partir de um braço [57]

Outra forma de recolher as algas marinhas é em pleno mar. Para tal, é utilizado um equipamento de mergulho [54,57] de circuito aberto autónomo de baixa pressão - narguilé, encontrando-se por isso dependente do compressor existente no barco, que recolhe o ar atmosférico e o envia através de uma mangueira, permitindo-lhe respirar debaixo de água – esta mangueira é o seu “cordão umbilical”. Quando esse saco está cheio, é recolhido para bordo [57].

No entanto, para se obterem quantidades significativas de algas, o método de apanha não é o mais indicado. Dessa forma, tem-se investigado formas de contornar ou ultrapassar este problema através do cultivo das algas. Para o efeito foram desenvolvidas instalações distintas de cultivo. A quantidade de algas cultivadas é ainda muito baixa, principalmente porque as empresas são muito pequenas, além do que ainda é processo cujo conhecimento na Europa é ainda incipiente [54].

2) Pré-tratamento: Limpeza, secagem, fragmentação.

O primeiro passo de pré-tratamento consiste em remover objetos estranhos da biomassa de algas. Os detritos encontrados mais regularmente são pedras coladas nas algas ou caracóis. Também é possível encontrar sacos do lixo, fios de pesca, redes de pesca, entre outros. Este processo de triagem de detritos é obrigatório, uma vez que é normalmente necessário o corte/trituração das algas marinhas, para redução da sua dimensão, facilitando o processo de extração e posterior produção do biodiesel. Quando o processo de colheita é manual as algas encontram-se mais limpas [54].

O passo seguinte consiste na lavagem das algas marinhas, para a remoção de areias que se encontram ligadas a estas. As algas que dão à costa são as que possuem mais areias. Muitas vezes, os barcos de recolha possuem tanques com água de forma às algas marinhas ficarem suspensas, promovendo a sua lavagem. Outra forma de obter algas mais limpas é tentar recolher as algas marinhas em águas rasas ou à superfície da água [54].

Após a lavagem é necessário proceder à secagem das algas. Inicialmente, as algas marinhas podem ser secas ao sol, reduzindo-se em média cerca de 20-30% do teor em água, estabilizando a biomassa, facilitando o seu transporte sem demasiada água e reduzindo a energia necessária para qualquer passo adicional de secagem [54]. A fragmentação das algas, é

a última etapa do pré-tratamento, e tem como objetivo facilitar o rompimento celular (para facilitar a penetração do solvente na extração do óleo). O método mais utilizado neste caso é o da trituração.

3) Extração do óleo

Após a fragmentação das algas, segue-se a obtenção do óleo. Após a pesquisa, verificou-se a existência de reduzidos estudos relativamente a este tema.

No caso das macroalgas, ainda não existem processos específicos, na bibliografia, no que concerne às metodologias de extração do respetivo óleo. No entanto, o método mais comum de obtenção de óleos consiste no método químico de por recurso a solventes, antes da reação de transesterificação [53]. E no caso das algas marinhas, um processo citado na bibliografia, consiste na utilização do aparelho do extrator Soxhlet [53,61].

Extração Soxhlet é um método de extração do óleo que utiliza solventes químicos, sendo utilizado quando se quer separar um líquido contido num sólido, por meio de um solvente. Neste caso, o objetivo é remover pequenas quantidades de óleo contidas nas macroalgas. O processo de extração é realizado de forma contínua com um solvente previamente aquecido. A extração é eficiente, mesmo utilizando uma pequena quantidade do solvente.

Os óleos presentes nas algas são extraídos através de repetidas lavagens, ou por percolação², com um solvente orgânico [62,63] tais como: hexano, clorofórmio, acetato de etilo, metanol, entre outros e mistura de solventes com razões volumétricas específicas [64,65], à temperatura de evaporação do solvente. Os solventes vão ser evaporados e depois condensados, para posterior reutilização.

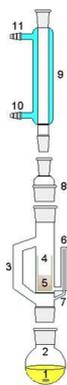


Figura 16 - Método de extração Soxhlet e representação [63]

- 1 – Agitador magnético
- 2 - Balão de fundo redondo (zona é inserido o solvente, não deve ser demasiado cheio);
- 3 – Caminho da destilação; 4 – Soxhlet Thimble; 5 – Extração do sólido (resíduos sólidos); 6 - Sifão entrada; 7 - Sifão saída; 8 - Adaptador de Expansão; 9 – Condensador; 10 – Sistema de refrigeração de água de entrada; 11 – Sistema de refrigeração de água para fora.

² Refere ao movimento e filtragem de fluidos por materiais porosos

b) Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintéticos procarióticos ou eucarióticos³ que podem crescer rapidamente e viver em condições adversas devido à sua estrutura unicelular ou multicelular simples [39]. Os biólogos classificam as microalgas em várias categorias, sendo definidas principalmente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular [66]. O grupo de classificação mais importante inclui quatro tipos de algas e assenta na sua abundância: Diatoms (*Bacillariophyceae*), Green algae (*Chlorophyceae*), Blue-green algae (*Cyanophyceae*) e Golden algae (*Chrysophyceae*) [67,68].

Microalgas são de rápido crescimento e capturam uma grande percentagem de dióxido de carbono, possuem uma alta taxa de eficiência fotossintética, elevada produtividade de biomassa e crescimento quando comparado com outras culturas terrestres. No caso das microalgas armazenam a energia obtida pela fotossíntese, sob a forma de óleos, de hidratos de carbono, e proteínas. Esses óleos são ricos em lípidos (triglicerídeos) que podem chegar a 50-60% da biomassa seca [68,69,70]. Na figura 17, pode verificar-se o teor de lípidos e a produtividade para diferentes espécies de microalgas.

³ As células procariontes são diferentes das eucariontes, a maior diferença é que as células procariontes não possuem carioteca. A carioteca é uma membrana que separa o material genético do citoplasma. As células eucariontes possuem a carioteca, individualizando o material nuclear da célula. Em ambas células, existe material genético, mas nas procariontes este está “flutuando” no citoplasma. E na célula eucarionte, o material genético está no núcleo – separado pela carioteca do restante da célula. As células procarióticas (cianobactérias) necessitam de organelos ligados à membrana (plastídeos, núcleos, mitocôndrias, órgãos de Golgi, e flagelos) e são mais parecidas com as bactérias em vez de algas. Células eucarióticas, que são compostas por muitos diferentes tipos de algas comum, têm estes organelos que controlam as funções da célula, permitindo-lhe sobreviver e reproduzir.

Marinha e água doce Espécies de Microalgas	O teor de lipídios (% De peso seco da biomassa)	Lipídico Produtividade (mg/L/dia)	Produtividade de volume de biomassa (g/L/dia)	Produtividade Área de biomassa (g/m ² /dia)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24.0–31.0	–	–	11.5–17.4
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0–75.0	–	0.02	3.0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07	–
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6–16.4/39.8	17.6	0.04	–
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0–63.0	10.3–50.0	0.036–0.041	0.91–0.97
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6–57.8	1214	2.00–7.70	–
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0–22.0	44.7	0.23–1.47	–
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0–58.0	11.2–40.0	0.02–0.20	0.57–0.95
<i>Chlorella</i> sp.	10.0–48.0	42.1	0.02–2.5	1.61–16.47/25
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	–	2.90–3.64	72.5/130
<i>Chlorella</i>	18.0–57.0	18.7	–	3.50–13.90
<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7	0.28	–
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0–51.1	–	10	–
<i>Dunaliella salina</i>	6.0–25.0	116.0	0.22–0.34	1.6–3.5/20–38
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	–	0.09	14
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7–71.0	–	0.12	–
<i>Dunaliella</i> sp.	17.5–67.0	33.5	–	–
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27.4	47.3	0.17	–
<i>Euglena gracilis</i>	14.0–20.0	–	7.70	–
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	–	0.05–0.06	10.2–36.4
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0–40.0	–	0.32–1.60	–
<i>Isochrysis</i> sp.	7.1–33	37.8	0.08–0.17	–
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4	0.19	–
<i>Monallanthus salina</i>	20.0–22.0	–	0.08	12
<i>Nannochloris</i> sp.	20.0–56.0	60.9–76.5	0.17–0.51	–
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7–29.7	84.0–142.0	0.37–0.48	–
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0–53.0	37.6–90.0	0.17–1.43	1.9–5.3
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0–65.0	90.0–134.0	–	–
<i>Nitzschia</i> sp.	16.0–47.0	–	–	8.8–21.6
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	–	–	40.6–45.8
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16	–
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14	–
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0–57.0	44.8	0.003–1.9	2.4–21
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0–18.8/60.7	34.8	0.36–1.50	25
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0–55.0	–	0.004–0.74	–
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9–18.4	35.1	0.19	–
<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6–21.1	40.8–53.9	0.03–0.26	2.43–13.52
<i>Skeletonema</i> sp.	13.3–31.8	27.3	0.09	–
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5–51.3	17.4	0.08	–
<i>Spirulina platensis</i>	4.0–16.6	–	0.06–4.3	1.5–14.5/24–51
<i>Spirulina maxima</i>	4.0–9.0	–	0.21–0.25	25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4	0.08	–
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5–23.0	27.0–36.4	0.12–0.32	19
<i>Tetraselmis</i> sp.	12.6–14.7	43.4	0.30	–

Figura 17 - Teor de lipídios e produtividades de diferentes espécies de microalgas [39]

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes, não só aquáticos mas também terrestres, representando uma grande variedade de espécies vivendo numa ampla gama de condições ambientais [39].

► Vantagens das microalgas:

A utilização de microalgas em detrimento de outras fontes de matérias-primas para a produção de biodiesel apresenta diversas vantagens, entre as quais se salienta:

→ As microalgas reproduzem-se usando a fotossíntese para converter a energia do sol em energia química, completando um ciclo de crescimento em poucos dias. Têm uma taxa de crescimento e produtividade muito superior às plantas convencionais, culturas agrícolas, e outras

plantas aquáticas, requerendo uma área muito menor do que outras matérias-primas de origem agrícola usadas para a produção de biodiesel [39,44,71];

→ No que respeita à manutenção e melhoria da qualidade do ar, a produção de biomassa de microalgas pode efetuar a remoção de CO₂ da atmosfera através da biofixação (para obter 1 kg de biomassa de algas secas necessita de utilizar cerca de 1,83 kg de CO₂) [47,66];

→ O cultivo de algas não necessita de aplicação de herbicidas ou pesticidas [66], não tendo efeito negativo sobre a agricultura tradicional, porque não são utilizados como alimento e não são cultivadas em terras aráveis [47];

→ Microalgas ganharam muita atenção devido ao seu alto valor nutricional, valiosos co-produtos ou subprodutos, tais como biopolímeros, proteínas, polissacarídeos, pigmentos, ração de animais e fertilizantes, vitaminas e têm muitos compostos bioativos [44,67]. Podem ser utilizadas como alimentos ou fertilizantes. Por exemplo, as microalgas secas podem ser usadas para alimentar peixes e camarões devido ao elevado teor de proteínas [44,66];

→ As microalgas são fáceis de cultivar e podem crescer em ambientes extremos. Podem ser cultivadas usando apenas CO₂ e luz solar [47] e água (podendo crescer em água do mar [47], águas salinas [44] e águas impróprias para consumo [39]), com pouca ou nenhuma atenção, porém necessitam de menos água que as culturas terrestres [66];

→ Os nutrientes necessários ao cultivo das algas (especialmente o azoto e o fósforo) podem ser obtidos em águas residuais [66]. Assim, para além de proporcionar um meio de cultura para o cultivo de algas existe a vantagem acrescida de poderem ser utilizadas no tratamento de efluentes orgânicos da indústria agro-alimentar [66] e em águas residuais.

► Etapas de produção do biodiesel a partir das microalgas:

O processo de produção de combustível biodiesel a partir de microalgas envolve vários passos. Na figura 18 apresenta-se um diagrama simplificado de toda a operação do sistema, o qual inclui as seguintes etapas principais:

- 1) Cultivo/crescimento de algas;
- 2) Colheita/Recolha da biomassa;
- 3) Extração dos óleos presentes na biomassa algal;
- 4) Conversão do óleo em biodiesel.

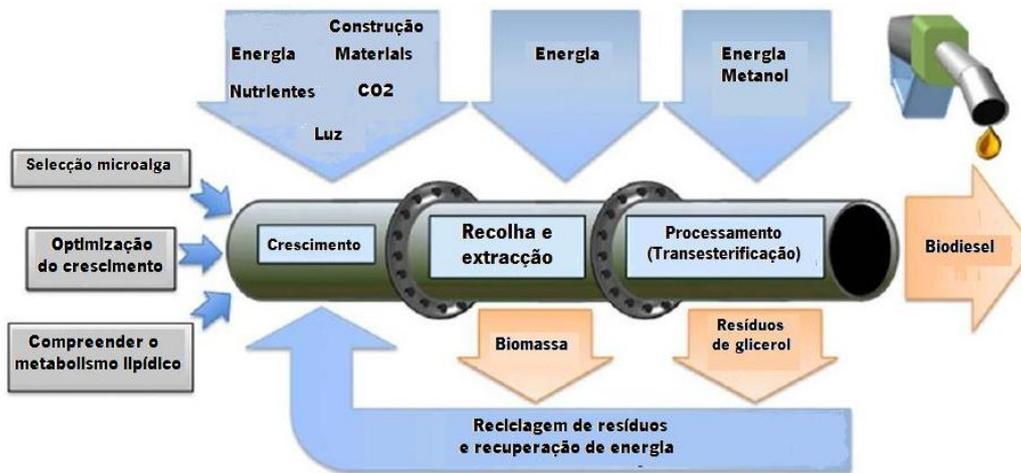


Figura 18 – Produção de biodiesel a partir de microalgas, mostrando as principais etapas do processo, juntamente com as entradas e saídas que devem ser levadas em consideração pela análise do ciclo de vida [71].

1) Cultivo/Crescimento das microalgas:

As principais classes de algas são: as algas verdes (*Chlorophyta*), algas vermelhas (*Rhodophyta*) e as diatomáceas (*Bacillariophyta*) [66,68]. As microalgas podem assumir diversos tipos de metabolismo, por exemplo:

→ Autotróficas - São organismos que produzem o seu próprio alimento, necessitam apenas de compostos inorgânicos como o CO_2 , sais e uma fonte de energia luminosa para crescer [66,72].

→ Fotoautotróficas - Usam apenas a luz como fonte de energia, que é convertida em energia química através de reações de fotossíntese [39,72].

→ Heterotróficas - É referente a um organismo que é consumidor, ingerem compostos orgânicos (como glucose e acetato) e nutrientes como fonte de energia e carbono porque não podem sintetizá-los a partir substâncias inorgânicas mais simples [39,66,72].

→ Fotoheterotróficas - Usam a luz como uma fonte de energia, ou oxidação de compostos orgânicos para obter energia [39,72].

→ Mixotróficas - São capazes de crescer quer de forma autotrófica, quer de forma heterotrófica, o metabolismo fotossintético utiliza luz para crescimento, enquanto a respiração aeróbia utiliza uma fonte de carbono orgânico, depende da concentração de compostos orgânicos e da intensidade de luz disponível [39,66].

Os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento das algas são a luz, a temperatura, a concentração de nutrientes, O_2 e CO_2 , a salinidade, o pH, entre outros. Os vários

fatores podem ser interdependentes e um parâmetro ótimo para uma alga não está necessariamente ótimo para outra. De seguida serão descritos os parâmetros importantes para o crescimento das algas:

→ Luz (qualidade e quantidade) - Como todas as plantas, as microalgas fototróficas, em condições de crescimento naturais, absorvem a luz solar, e assimilam o dióxido de carbono do ar, convertendo-os em matéria orgânica e oxigênio [66,73]. A luz solar, deve estar sempre disponível, e para a produção comercial de algas é mais vantajoso, pois é um recurso livre natural logo minimiza os custos. No entanto, esta utilização é limitada devido aos ciclos diários e às alterações sazonais [32,66]. Este facto limita assim, a viabilidade da produção de algas a zonas com elevada radiação solar. Para colmatar as limitações das condições naturais de crescimento impostas pela falta de luz, podem ser utilizadas luzes fluorescentes. No entanto, esta utilização restringe-se a culturas piloto, uma vez que a entrada de energia é significativamente maior [66]. A intensidade de luz desempenha um papel importante, mas as exigências variam com a profundidade e a densidade da cultura de algas: para maiores profundidades e concentrações celulares maior, a intensidade de luz necessária para assegurar a penetração na cultura terá de ser superior [73].

→ Temperatura - A seguir à luz, este é o fator mais importante nas culturas de microalgas. A temperatura ótima para as culturas está geralmente compreendida entre 20 e 30°C, sendo os valores dependentes da composição do meio de cultura, e das espécies cultivadas [32]. Muitas microalgas, apesar de conseguirem tolerar temperaturas 15°C abaixo da temperatura ótima de crescimento, retardam a velocidade de crescimento. Ao invés, as culturas de microalgas apenas conseguem sobreviver com temperaturas superiores às ótimas em intervalos de 2 a 4°C [39]. Se esta situação ocorrer, pode acontecer senescência (processo natural de envelhecimento ao nível celular) total das culturas microbianas. Como solução podem ser utilizados sistemas de arrefecimento de água sobre a superfície do recipiente de cultura ou controlando a temperatura do ar com unidades de ar condicionando [73].

→ Concentração de nutrientes – Para que um meio de cultura promova o crescimento das microalgas este deve conter água e nutrientes essenciais [32]. Culturas de algas devem ser enriquecidas com nutrientes para compensar as deficiências na água do mar. Alguns macronutrientes essenciais incluem o azoto (N), o fósforo (P), o ferro (Fe) e, em alguns casos o silício (Si) [32,72,73,74]. E os micronutrientes essenciais incluem vários metais e as vitaminas como a tiamina (B₁), a cianocobalamina (B₁₂) e, por vezes, biotina.

→ O_2 e CO_2

→ pH - O pH varia entre 7 e 9, para a maioria das espécies de microalga cultivadas. A estabilização é realizada ventilando a cultura. No caso de cultivo de algas de alta densidade, a adição de gás carbônico permite corrigir o aumento do pH, que pode alcançar valores limites de pH 9 durante o crescimento das microalgas [73].

→ Salinidade - A salinidade do meio de cultura pode aumentar durante condições de tempo quente, devido à evaporação. A sua alteração pode resultar em choque osmótico, iônico (sais) e em alterações das razões iônicas celulares devido à permeabilidade seletiva de iões pela membrana [39].

→ Agitação - A agitação da cultura é outro parâmetro importante. Durante o crescimento das microalgas, existe aumento da cultura, a agitação vai garantir que todas as microalgas fiquem igualmente expostas à luz, aos nutrientes e facilitar a troca de gases, isto é, captação do CO_2 e libertação do O_2 [39,73].

→ Patogénicos (bactéria, fungos, vírus) e competição por outras algas - Os possíveis contaminantes biológicos incluem algas indesejadas, bolor, leveduras, fungos, e bactérias [39].

Sob condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas podem crescer abundantemente [39]. O crescimento de uma cultura de microalgas é composto por cinco fases, que podem observar-se na figura 19:

1) fase de indução, 2) fase de crescimento exponencial, 3) fase de declínio da taxa de crescimento, 4) fase estacionária de crescimento e 5) fase de declínio ou morte [39,73,75,76].

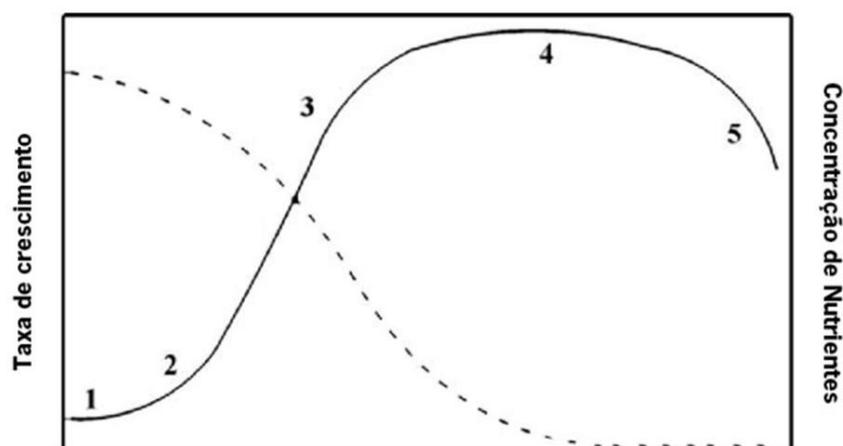


Figura 19 - Representação esquemática da taxa de crescimento das algas em cultura (linha sólida) e concentrações de nutrientes (linha tracejada em função de um período de tempo) [39]

1. Fase de indução ou lag – Nesta fase a densidade de cultura das microalgas é reduzida e esta dá-se imediatamente após a iniciação da cultura, isto é, é a fase que se segue à inoculação da estripe em novo meio nutritivo. Apesar da maioria das células serem viáveis, muitas ainda não se encontram em condições de sofrerem divisão. Esta fase, dita de latência, pode ter uma duração mais ou menos extensa consoante o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento disponibilizadas, se existe adaptação fisiológica do metabolismo da célula para crescer, bem como os níveis de enzimas envolvidos na divisão celular e na fixação de carbono [73,75,76].

2. Fase de crescimento exponencial ou log – Nesta fase tem lugar o início da divisão celular a uma taxa constante. Com resultado, observa-se um aumento da biomassa ao longo do tempo, e verifica-se um valor máximo na taxa de crescimento. A duração da fase exponencial em cultura varia conforme a espécie algal utilizada, o tamanho do inóculo, o ritmo do crescimento, a intensidade de luz e a temperatura [73,75,76].

3. Fase de crescimento linear - Durante esta fase ocorre um declínio da taxa máxima de crescimento, em resultado de microorganismos externos que inibem a reprodução ou alterações de alterações de parâmetros importantes para o crescimento das microalgas. As alterações desses parâmetros podem ser: devido ao aumento da densidade populacional, à diminuição da concentração de um (ou mais) nutrientes essenciais ao metabolismo celular [75,76], à diminuição da disponibilidade de luz para cada célula, às alterações em fatores ambientais (tais como pH, temperatura) os quais podem reduzir a atividade fotossintética, e/ou ao aumento da concentração de produtos do metabolismo que são tóxicos para as células [73,75].

4. Fase estacionária do crescimento - a taxa de crescimento é igual à taxa de mortalidade, não ocorrendo um aumento na população algal, devido à exaustão de nutrientes, à diminuição do CO₂ ou do O₂ presentes no meio.

5. Fase de declínio ou morte - Durante a fase de morte ocorre a perda irreversível da capacidade de divisão celular (morte celular) [76]. Tal origina um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana ao longo do tempo. Isto pode ocorrer devido a vários fatores, esgotamento de um nutriente, deficiência de oxigénio, aquecimento em excesso, perturbação do pH ou contaminação [75].

- Produção através de fotobioreatores

Atualmente, a produção fotoautotrófica é o único método considerado economicamente viável para a produção de biomassa algal em larga escala [66], utilizada posteriormente para a produção do biodiesel.

Do ponto de vista comercial, um sistema de cultura de microalgas deve ter em atenção as seguintes características: alta produtividade de área; produtividade volumétrica elevada; não ter custos elevados (tanto em termos de investimento como custos de manutenção); facilidade de controlo dos parâmetros de cultura (pH, temperatura, O_2 , agitação) e fiabilidade.

A culturas das microalgas pode ser realizada em sistemas abertos, fechados ou híbridos. Os aspetos de maior interesse de cada um destes sistemas são apresentados em seguida [72].

a) *Sistemas de produção em reservatórios abertos*

Os clássicos sistemas de cultivo ao ar livre para a produção de algas são os sistemas mais simples [77], podendo ser constituídos por águas naturais, como lagos, lagoas naturais e tanques, lagoas artificiais ou recipientes, sendo que os mais usados são as lagoas de fluxo contínuo (*raceway ponds*) [66,72,78]. A sua construção pode ser realizada em cimento ou em terra batida (revestida com um plástico para evitar a absorção do meio de cultivo), geralmente em forma de circuito fechado onde uma roda de pás (*paddlewheel*) circula de um modo contínuo, misturando as algas e os nutrientes e, de igual modo, prevenindo a sedimentação da biomassa algal [32,67,72,77]. O sistema é muitas vezes operado de modo contínuo, com entrada permanente dos nutrientes de interesse [77].



Figura 20 - Esquema básico [32,67] e apresentação de um fotobioreator tubular horizontal [54,77]

Estes sistemas são económicos e fáceis de construir, funcionam de forma duradoura [67,72], podendo utilizar a luz solar e os nutrientes podem ser fornecidos através de escoamento de água a partir de áreas de terra nas proximidades ou por canalização de água a partir de esgotos/água de tratamento e efluentes municipais [72,77]. Estes factos tornam este método mais barato, no que respeita às algas.

No entanto, este método apresenta desvantagens, uma vez que estando aberto ao ar, está mais sujeito a contaminações por outras algas e por microrganismos que se alimentam de algas. Além disso apresenta uma perda acentuada de água por evaporação, flutuações de temperatura no meio de crescimento (devido, por exemplo, a mudanças sazonais), não permitem um uso eficiente do dióxido de carbono, a mistura é ineficiente e comporta limitações no acesso à luz solar [32,67,72].

b) Sistemas de fotobioreatores fechados

Este tipo de sistema é utilizado para ultrapassar as principais limitações descritas nos sistemas abertos no que diz respeito às contaminações biológicas e aos problemas de evaporação [66,67,77]. Ao contrário dos sistemas de reservatórios abertos, os fotobioreatores permitem o cultivo de uma espécie de microalgas durante longos períodos de tempo. Estes fotobioreatores foram utilizados com sucesso na produção de grandes quantidades de biomassa algal [32].

A construção destes reatores tem um design tubular, formado por diversos tubos feitos de material transparente, com um diâmetro inferior a 10cm de forma a maximizar a penetração dos raios do sol pelos quais estão alinhados [32,77,78]. A figura seguinte apresenta um esquema do design de um fotobioreator tubular e a sua aplicação na produção de algas.

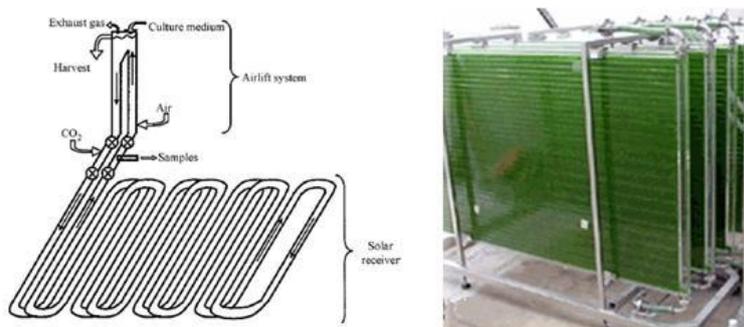


Figura 21 – Esquema básico [66] e apresentação de um fotobioreator tubular horizontal [77]

O meio de cultivo circula pelos tubos, onde vai ser exposto à luz solar, através de uma bomba mecânica ou de uma corrente de ar [32,77,78], voltando para um reservatório. Ao longo deste processo uma porção de algas é recolhida, possibilitando a sua cultura contínua [77]. Essas bombas têm como função evitar a sedimentação das microalgas nos tubos, mantendo sempre um fluxo constante [32]. Algumas vezes estes sistemas necessitam de uma fonte de luz artificial o que aumenta os custos associados ao processo [32,66,77], levando a que o seu uso seja geralmente feito para produtos de elevado valor para uso na indústria farmacêutica e cosmética, e não como matéria-prima da produção de biodiesel [66,77].

Ao contrário dos sistemas abertos, o oxigénio produzido durante a fotossíntese não vai retornar à atmosfera, permanecendo no meio até atingir níveis que inibem a fotossíntese e o crescimento das algas. Adicionalmente, o oxigénio dissolvido juntamente com a luz do sol produz danos foto-oxidativos nas células. Para minimizar estes problemas deverá existir uma zona de desgasificação, onde o oxigénio possa ser removido periodicamente [32,77]. Por outro lado, como as algas necessitam de dióxido de carbono para crescer e o seu consumo conduz ao aumento do pH, é necessário introduzir este composto em mais do que um ponto do sistema [32,77]. Outro facto que importa referir neste tipo de bioreator é a necessidade de arrefecimento durante o dia e a regulação da temperatura à noite, podendo ser levada a cabo através de permutadores de calor localizados nos tubos próprios ou na coluna de desgasificação [77].

c) Sistemas de produção híbridos

Em sistemas híbridos, as lagoas abertas e os sistemas de fotobioreator fechado são usados em combinação para obter melhores resultados. As lagoas abertas são um método muito eficiente com baixos custos de operação, mas tornam-se contaminadas por agentes externos muito rapidamente [67]. Uma combinação de ambos os sistemas é provavelmente a escolha mais lógica de custo-benefício cultivo para obter alto rendimento para os biocombustíveis.

Este é um método que combina fases de crescimento distintas em fotobioreatores e em sistemas abertos. Numa primeira fase, as culturas crescem num fotobioreator com condições controláveis que minimizam a contaminação por outros organismos. Posteriormente, essas culturas são transferidas para um sistema aberto, sendo sujeitas a um “stress” nutricional que aumenta a síntese dos produtos lipídicos desejados [66].

2) Colheita/Recolha da biomassa

Quando as microalgas atingem uma concentração desejável procede-se à recolha da biomassa do meio de cultura para posterior extração do óleo. Esta etapa pode contribuir para 20-30% do custo total de produção de biomassa [39,72]. A colheita da biomassa pode ser feita através de diferentes métodos, tais como: floculação, centrifugação, filtração [66,72,74,79,80]. Os métodos de colheita da biomassa dependem de fatores como o tamanho, a densidade, e o valor dos produtos alvo [66]. A colheita da biomassa é feita em dois passos:

- a) Recolha do meio – cujo objetivo é a separação da biomassa da suspensão total, sendo empregues técnicas como a floculação, a flotação ou a sedimentação gravimétrica;
- b) Espessamento – cujo objetivo é concentrar a lama através de técnicas como a centrifugação, a filtração e a agregação ultrassónica [66,72].

→ Floculação

Pode ser utilizada como passo inicial no processo de colheita da biomassa do meio de cultivo. A floculação é usada para agregar as microalgas para aumentar o tamanho das partículas, formando agregados pesados que se depositam no meio de cultivo [74,79]. Como as células das microalgas possuem cargas negativas que as impedem de auto-agregação na suspensão, adição de floculantes tais como catiões multivalentes e polímeros catiónicos promovem a agregação das algas [66,72]. Alguns floculantes utilizados para a colheita de microalgas são o cloreto de ferro (FeCl_3), o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), o sulfato de ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) e o alúmen [66,72]. Também, se o fornecimento de CO_2 for interrompido, pode haver autofloculação das algas.

→ Flutuação

Algumas microalgas flutuam naturalmente à superfície da água com o aumento de lípidos nas microalgas [66,72]. Embora a flutuação tenha sido mencionada como um método de colheita potencial, existem muito poucas provas da sua viabilidade técnica ou económica. Através deste método vai ser feito o aprisionamento das células das algas usando micro-bolhas de ar e, portanto, ao contrário de floculação, não necessita de qualquer adição de produtos químicos [66].

→ Agregação ultrassônica

A biomassa pode ser induzida acusticamente seguida por sedimentação. Este método tem a vantagem de poder ser usado em contínuo sem induzir stress mecânico na biomassa que pode destruir metabolitos potencialmente valiosos [66]. No entanto apresenta dificuldades associadas à escala de operação e os custos de operação.

→ Centrifugação

A centrifugação envolve a aplicação de forças centrífugas para separar ou isolar a biomassa do meio de crescimento [72]. O processo é rápido, no entanto requer grandes custos de energia e uma necessidade de manutenção potencialmente superior [66,72].

→ Filtração

O método de filtração convencional, tal como a sedimentação, é mais apropriado para a colheita de algas de um maior tamanho ($> 70\mu\text{m}$). Para microalgas com tamanhos inferiores será necessário utilizar membranas de filtração, microfiltração e ultrafiltração [66,72].

3) Processo de extração de óleo das microalgas

A biomassa colhida é perecível pelo que deve ser processada rapidamente depois de colhida [66]. Assim, após recolha da biomassa é necessário purificá-la, ou seja, eliminar o meio de cultura, pelo processo de secagem/desidratação.

a) Processo de secagem

As microalgas são cultivadas em sistemas de solução aquosa, pelo que para passar à fase seguinte do processo, estas necessitam de ser previamente secas. Uma vantagem de processamento de biomassa seca é melhor percolação de solventes ou fluidos através da célula para melhorar a eficiência da extração [80]. A secagem ao sol é provavelmente o método de secagem mais barato que tem sido utilizado para o tratamento de biomassa de microalgas [39,66,72]. No entanto, este método não é muito eficaz para a produção de pó das microalgas [74], além do que apresenta um tempo de operação de secagem elevado e requer uma grande

superfície de secagem. Mais eficientes, mas mais caros, temos secagem de tambor, secagem por pulverização, secagem por leiteo fluidizado, entre outros [66,72].

b) Rompimento celular

Por vezes, a biomassa é processada diretamente para extração dos lípidos [79]. Noutros casos, a biomassa é exposta a um método de rutura, sendo necessária para facilitar a recuperação dos produtos das microalgas, neste caso o óleo. Como o próprio nome indica, este processo rompe as estruturas celulares das microalgas [79], obrigando a libertação de lípidos intracelulares para o meio envolvente [79]. Estes métodos incluem homogeneizadores de alta pressão [66,72], autoclavagem [39,66,72,74,81], adição de ácido clorídrico [66,72], reações ácido-base (10% hidróxido de sódio) [66,72,81], lise alcalina [66,72], micro-ondas [81], sonicação [74], moinho de bolas [74], ácido clorídrico [66] choque osmótico (cloreto de sódio) [39,74].

c) Extração do óleo:

O rendimento desta etapa está dependente das etapas anteriores. A biomassa de microalgas para ser submetida à extração de lípidos pode assumir os seguintes estados físicos: concentrado, concentrado de interrupção ou em pó seco [79]. A extração de lípidos pode ser conseguida através de uma série de técnicas tais como a extração mecânica (prensagem) [44,72,74,82], extração química (solventes) [44,72,74,79,82], extração por líquidos supercríticos [44,72,74,79,82], choque térmico e ultrassons [82].

→ Extração mecânica (prensagem)

É um método mecânico para a extração de óleo de matérias-primas, como as sementes e as microalgas. É um processo simples que permite extrair uma grande percentagem (70-75%) dos óleos existentes nas microalgas [39,44,72,82]. A prensa utiliza uma pressão elevada que resulta numa compressão e lise celular. No caso das microalgas, para que o processo seja mais eficaz, é aconselhável que as microalgas estejam secas [72].

→ Extração química (solventes)

A extração química, com recurso a solventes, é uma forma de extração do óleo com sucesso. O solvente tem como função penetrar nas paredes celulares das microalgas [72,82], e extrair o óleo a partir de meio aquoso, sendo comum utilizar-se solventes orgânicos, tais como, benzeno, ciclo-hexano, hexano, acetona e clorofórmio [72,80,82]. O hexano é considerado o solvente mais eficiente para a extração, com base na sua capacidade máxima de extração e de baixo custo [82]. O extrato de solventes, líquido-líquido, pode ser submetido a um processo de destilação ou evaporação para separar o óleo do solvente [79,82], podendo ser recuperado para uso posterior [72]. Também é comum utilizar-se uma mistura de solventes orgânicos, apolares/polares, formando duas fases, sendo necessário utilizar métodos de separação bifásica, por ex. a decantação [79]. Um exemplo disso é o método Bligh and Dyer (B&D).

Este método tem como objetivo a extração de lípidos nas células das algas, com o auxílio de solventes, metanol, clorofórmio e água, em proporções específicas (1:2:0,8) [63,83,84]. A amostra de algas é misturada com o metanol e clorofórmio formando uma única fase com a amostra. O sistema de uma fase é separado em duas fases: fase inferior onde se encontra o clorofórmio (fase que possui os lípidos) e fase superior metanol/água (contendo as substâncias não lipídicas), com adição de mais clorofórmio e água [63,84]. A fase de clorofórmio com os lípidos é isolada (ex. decantação) e, após a evaporação do clorofórmio, obtém-se a quantidade de lípidos obtidos por pesagem [63]. A mistura de solventes tem de ser suficientemente polar para remover os lípidos nas células membrana, mas suficientemente não polar (apolar) para dissolver os lípidos neutros, é, portanto, necessário para extrair eficientemente lípidos do tecido biológico [85].

→ Ultrassons

Este método expõe as algas a uma onda ultrassônica de alta intensidade, o que cria bolhas de cavitação minúsculas no interior das células. Esta ação promove o rompimento das paredes celulares e conseqüentemente a extração dos lípidos [72,82]. Embora a extração de óleo a partir de microalgas com ultrassons esteja em ampla utilização à escala laboratorial, não existe informação suficiente sobre a sua viabilidade e/ou o custo à escala comercial [72].

→ Extração com líquidos supercríticos

A extração por fluidos supercríticos é uma tecnologia que aproveita a energia dos solventes utilizados. A vantagem da utilização de solventes supercríticos caracteriza-se essencialmente pela utilização de solventes com baixa densidade e viscosidade, apresentando-se em valores intermédios à fase gasosa ou líquida. Além disso, a difusão dos solutos tende a ser maior que na extração sólido-líquido, o que permite obter cinéticas de extração mais rápidas. Nesta técnica é aplicada pressão durante o processo de extração, permitindo assim, obter temperaturas acima do ponto de ebulição dos solventes. Este facto aumenta a transferência de massa e as taxas de extração, assim como, diminui o tempo de reação e o consumo de solventes orgânicos.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

A componente experimental do presente trabalho abordou a avaliação da utilização de diferentes fontes de matérias-primas na produção de biodiesel, com particular enfoque nas microalgas. A produção do biodiesel a partir de óleos alimentares virgens e óleos alimentares usados foi igualmente assegurado nesta fase do trabalho para referencial.

Ao longo deste trabalho, realizado maioritariamente no CVR – *Centro para a Valorização de Resíduos*, foram testados 2 grupos de matérias-primas: algas, onde se incluem as microalgas, *Chlorella emersonii* (C.E.) e *Botryococcus braunii* (B.B.), e as macroalgas, mais propriamente algas marinhas da orla costeira da zona norte de Portugal, o *Sargaço* e a *Bodelha*. Paralelamente foi avaliado o potencial das oleaginosas, semente girassol, amendoins e abóbora na produção de biodiesel.

Existem várias etapas operativas que integram o ciclo de produção do biodiesel, desde a aquisição da matéria-prima, preparação da biomassa, extração do óleo das respetivas fontes de matérias-primas, reação de transesterificação, purificação do biodiesel e por fim a sua caracterização. Na figura 22, é possível observar de uma forma resumida todo o trabalho experimental realizado no âmbito do presente trabalho.

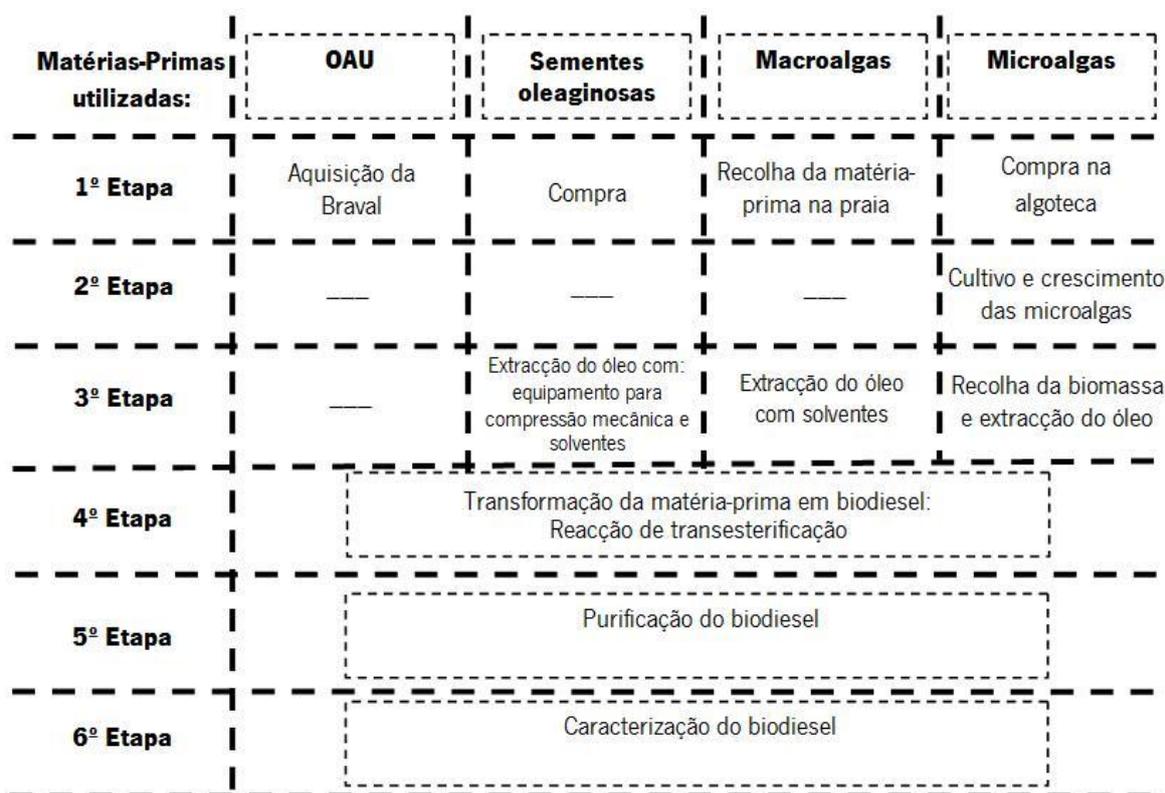


Figura 22 - Resumo do procedimento experimental

3.1. OAU – Óleos Alimentares Usados

Os óleos alimentares usados (OAU) utilizados para este trabalho, resultaram da recolha que o próprio CVR faz a diferentes estabelecimentos. Uma vez que são óleos usados, apresentavam bastantes resíduos, sendo necessário proceder-se a algumas filtrações com diferentes granulometrias, para remover todo o tipo de resíduos que poderiam conter. O efeito de vários parâmetros operacionais de processamento na transesterificação de OAU depende da qualidade da matéria-prima. Logo estes pré-tratamentos do OAU, ou seja, a separação dos resíduos por filtração, deve ser praticada, caso contrário, estas impurezas podem prejudicar a reação de transesterificação pela desativação do catalisador e criar problemas na separação dos produtos puros, reduzindo o rendimento e pureza do biodiesel. Após a filtração, seguiu-se de um pré-aquecimento (70°C) para remover alguns resíduos e água que o óleo ainda possa conter.



Figura 23 – Óleo obtido depois da filtração

3.1.1. Caracterização da matéria-prima: Índice de acidez

É importante a determinação do índice de acidez pois permitir saber se a matéria-prima pode ser transformada em biodiesel a partir de uma transesterificação básica (caso o valor seja > 3 mg KOH/g significa que é necessário realizar primeiro uma transesterificação ácida e só depois a básica) [34]. Determinou-se o índice de acidez, segundo a norma NP EN ISO 606 (2002), por titulação volumétrica, exprimindo-se por miligramas de KOH por grama da amostra.

Este método consiste na medição de 100ml de solvente etanol:tolueno (1:1), para um erlenmeyer. Mas antes de ser utilizada, tem de ser neutralizada, para esse efeito mediu-se 0,3 ml de fenofaleína e titulou-se com solução de Hidróxido de Potássio (KOH - 0,1 M) até pH 7

adquirindo uma tonalidade cor-de-rosa. Para haver uma melhor dissolução, a solução estava em agitação constante. Pesou-se⁴ 10,00g de matéria-prima para um gobelé e adicionou-se à mistura anterior. Com a ajuda da pompete e proveta, foi-se adicionando KOH de novo, até que a amostra passasse para cor-de-rosa. Esperou-se cerca de 30 segundos para verificar a possível mudança de cor. Anotou-se a quantidade de volume utilizado de KOH necessário para neutralizar a solução. O processo foi repetido 2x.

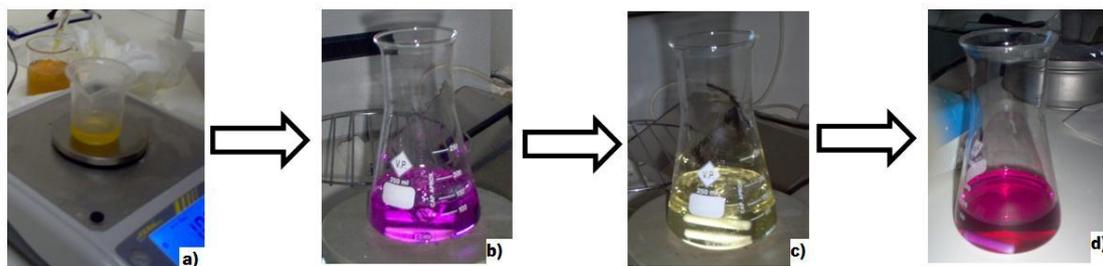


Figura 24 – a) Pesagem da matéria-prima; b) neutralização do solvente etanol:tolueno; c) amostra antes da titulação; d) amostra depois da titulação

Por fim, calculou-se o índice de acidez, para verificar qual o tipo de transesterificação a realizar.

$$IA = \frac{56,1 \times V \times C}{m}$$

Em que, V é o volume de solução KOH gasto na titulação, C é a concentração de KOH e m é a massa da amostra e 56,1 é a massa molecular de KOH.

3.1.2. Transformação da matéria-prima em biodiesel

Depois da determinação do índice de acidez da amostra de óleo usado, e consequente confirmação da admissibilidade do seu valor pela norma. Procedeu-se a realização de uma transesterificação básica, que se realizou da seguinte forma:

Verteu-se 200ml de óleo alimentar usado para um erlenmeyer, e colocou-se a aquecer numa placa de aquecimento, a uma temperatura de 65°C, durante 30min. Entretanto, procedeu-se à mistura de metanol (álcool) e hidróxido de sódio (catalisador). Para tal, pesou-se 0,808g de NaOH com o auxílio da balança e mediu-se 40ml de metanol, com a ajuda da pompete e pipeta.

⁴ Balança - Kurn PFB Máx: 120g d=0,001g

Em seguida procedeu-se à mistura dos compostos em agitação constante, com o auxílio da placa de agitação. Após os 30min, desligou-se a placa de aquecimento e verteu-se a mistura de metanol com o NaOH (metóxido) no óleo alimentar, e deixou-se em agitação, com o auxílio de um agitador magnético durante 2h.

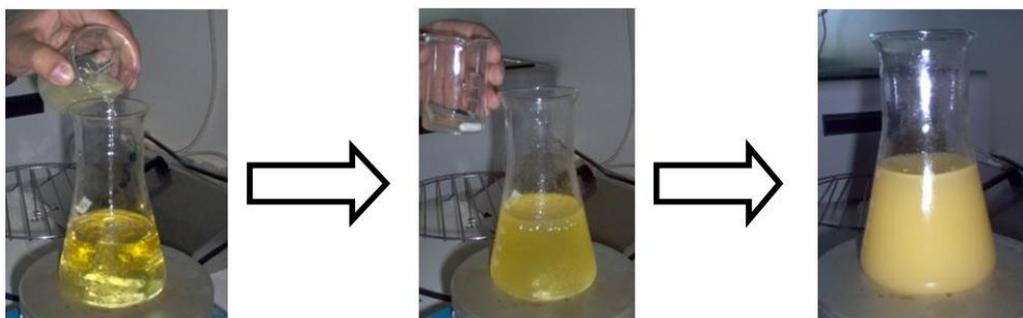


Figura 25 - Mistura do metanol com NaOH no óleo alimentar usado aquecido

No final das 2 horas da reação de transesterificação, desligou-se o agitador e deixou-se a repousar cerca de 4 horas. Desta forma, promove-se a separação de fases entre a glicerina e o Biodiesel.

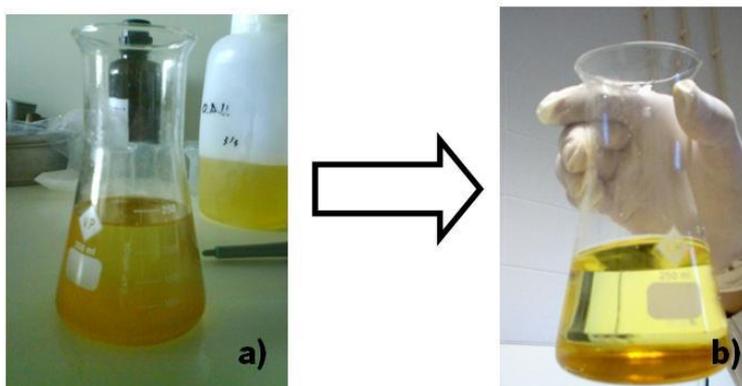


Figura 26 - a) Ao fim da reação e b) Ao fim das 4h em repouso

3.1.3. Purificação do Biodiesel

3.1.3.1. Lavagem do biodiesel

Após a transformação dos OAU em biodiesel, procedeu-se ao processo de purificação que consiste na separação do biodiesel da glicerina, lavagens do biodiesel e secagem do biodiesel.

Separou-se o biodiesel da glicerina, com a ajuda de uma pipeta, removendo-se o biodiesel para outro erlenmeyer. Entretanto, procedeu-se ao aquecimento, até 50°C, da água acidificada (ácido cítrico com pH=4) para a lavagem do biodiesel.

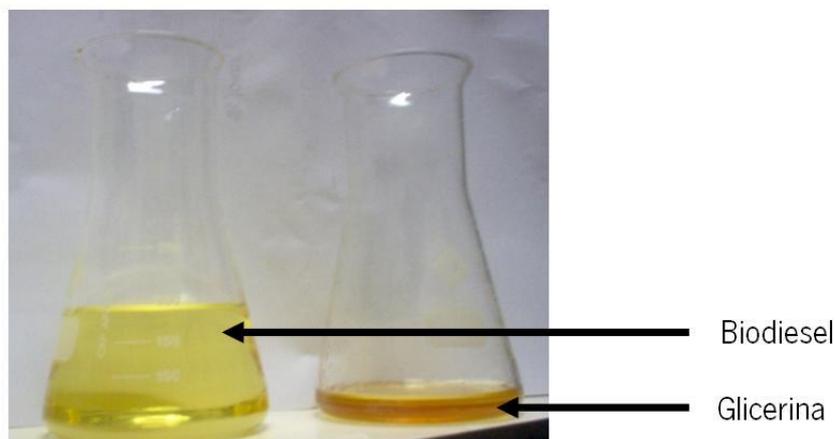


Figura 27 – Após separação: Biodiesel e Glicerina

Procedeu-se à montagem, como se pode ver na figura 28, para se efetuar a primeira lavagem. Esta é feita com água acidificada (ácido cítrico) a uma temperatura de cerca 50°C. Depois de adicionada mexeu-se, para haver mistura entre o biodiesel e água acidificada. Depois deixou-se repousar para que houvesse separação de fases: biodiesel e água acidificada. Em seguida verteu-se a água acidificada, ficando o biodiesel na ampola de decantação. A primeira lavagem, tem como finalidade neutralizar qualquer catalisador residual e quebrar qualquer quantidade de sabão que tenha-se formado durante a reação. Sabões reagirão com o ácido para formar sais solúveis em água e AGL, de acordo com a seguinte equação:

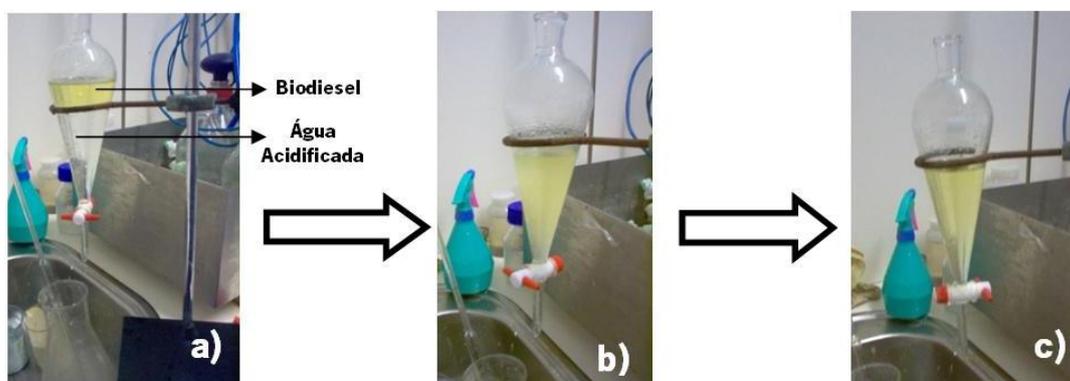
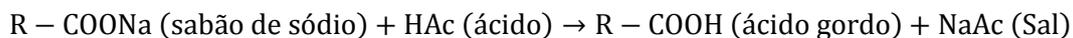


Figura 28 - a) Antes da mistura da água acidificada com o biodiesel, b) Mistura do Biodiesel com água acidificada, c) Biodiesel depois da remoção da água acidificada

Repetiu-se novamente o processo descrito anteriormente, mas desta vez só com água morna (50°C). Considera-se o biodiesel lavado quando a água que se coloca é igual à que sai, ou seja, a água tem de sair translúcida. Estas lavagens têm como finalidade de remover qualquer quantidade residual de catalisador, sabões, sais, metanol ou glicerina livre do produto final. A neutralização antes da lavagem aquosa reduz a quantidade de água necessária para o processo e minimiza a tendência de formação de emulsões, quando a água de lavagem é adicionada ao biodiesel. Após as lavagens, verteu-se o biodiesel para um erlenmeyer para este ser seco, isto é, para remover água ou resíduos que o biodiesel ainda possa ter. Para tal, o biodiesel foi à estufa⁵ a 105°C durante 2 a 3 horas. Depois o biodiesel passou por uma unidade de filtração. Que tem como finalidade remover eventuais partículas e água que ainda possa existir no biodiesel.

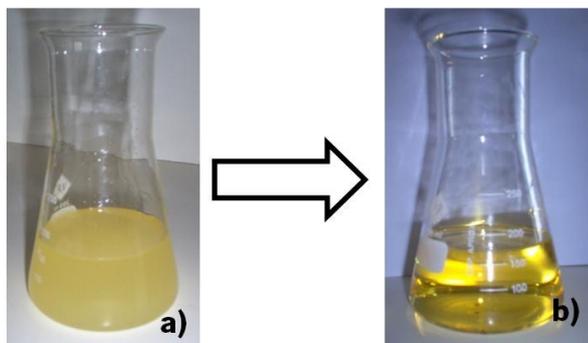


Figura 29 – a) Biodiesel após lavagens e b) Biodiesel após secagem

Após a produção do biodiesel foram realizados alguns ensaios de caracterização do mesmo, de forma a verificar a viabilidade do produto obtido.

3.1.4. Controlo de qualidade do biodiesel

O biodiesel depois de obtido necessita de um controlo acerca da sua qualidade, sendo utilizado para tal, a norma EN 14214. Os parâmetros analisados de acordo com esta norma foram: Teor em água, Massa volúmica a 15°C, Metais alcalinos (Sódio e Potássio) e teor em metanol. O índice de acidez, teor em metanol, teor em água e a massa volúmica a 15°C foram determinados no laboratório do CVR, de acordo com as normas específicas. As análises às cinzas: K e Na foram realizadas no LAQ (Laboratório de análises químicas) da Universidade do Minho.

⁵ Estufa – Estufa MMM Medcenter Venticell

3.2. Sementes oleaginosas

3.2.1. Seleção das sementes oleaginosas

Outras fontes de matéria-prima para a produção de biodiesel foram as sementes oleaginosas. Muitas oleaginosas foram investigadas para a produção de biodiesel, destacando-se a soja, o girassol, coco, linho, milho, colza, amendoim, óleo ou gordura de palma, óleo de pinho, óleo de casca de laranja, canola, jatropha, entre outras [15].

A seleção das sementes, a serem utilizadas na produção do biodiesel, foi feita de acordo com algumas características das sementes, como capacidade produtiva, teor de óleo encontrado na biomassa e ainda da sua acessibilidade na recolha/compra da semente. Para tal, as sementes selecionadas foram: semente girassol, sementes de abóbora e amendoins.

As sementes de girassol (*Helianthus annuus L.*) possuem alto teor em óleo, possui cerca de 47% de gordura na sua composição.



Figura 30 - Sementes de girassol

O óleo de amendoim é extraído da leguminosa *Arachis hypogaea*. A sua composição química contém aproximadamente 50% de óleo e de 20 a 30% de proteína.



Figura 31 - Amendoins

A abóbora é uma planta da família das *Cucurbitáceas*. Possuem cerca 44 a 50% de teor em óleo (rica em ácidos gordos mono e poliinsaturados), elevado teor em proteínas e fibras.



Figura 32 - Sementes de abóbora

3.2.2. Métodos de extração do óleo

3.2.2.1. Métodos Mecânicos

Após a seleção das sementes e à sua aquisição, procedeu-se à tentativa de extração óleo das mesmas. Foram diversas as tentativas mecânicas para extrair óleo das sementes oleaginosas.

Método 1) Inicialmente começou-se por tratar da matéria-prima, em que as sementes foram lavadas e secas, após esse processo inicial é que se utilizou a prensa de óleo. Neste processo, as sementes eram introduzidas no funil, e como a prensa possuía um parafuso sem fim, ia triturado e ao mesmo tempo extraía o óleo, o que sobrava das sementes saía no fim da prensa, essas sobras são muitas vezes utilizadas para produzir ração para os animais. Fez-se uma única experiência, com sementes de girassol, onde se conseguiu obter cerca de 10ml de óleo. Não foi possível fazer mais ensaios uma vez que a prensa acabou por avariar.



Figura 33 – Prensa do CVR

Método 2) Uma vez que a prensa ficou danificada, teve-se de arranjar outra alternativa para extrair o óleo das sementes. Desta vez, experimentou-se uma prensa⁶, que se pode visualizar na figura 34, dispensada pelo departamento de Engenharia Civil, do Laboratório de Materiais.



Figura 34 - Prensa de civil

⁶ Prensa – Prensa (ELLE) ELE Auto test

Iniciou-se os ensaios com um molde, de forma a tentar perceber se a prensa era indicada para este processo. Neste molde foram utilizados: amendoim triturado, amendoim inteiro, sementes de girassol triturado, sementes de girassol inteiras e sementes de abóbora também inteiras. Nesses ensaios variaram entre as quantidades de massa das matérias-primas e pesos aplicados entre os 500KN e 1000KN.



Figura 35 - Molde

Primeira peça) Foi feita uma peça pensado no processo utilizado nos lagares dos azeites, que possui-a uma base inferior com uma fenda e dois orifícios para conseguir recolher o óleo e tubos para sair o mesmo, possui-a um veio, as sementes eram colocados no interior de uns sacos com rede, e utilizou-se pesos para esmagar as sementes. Pode observar-se o processo na figura seguinte:

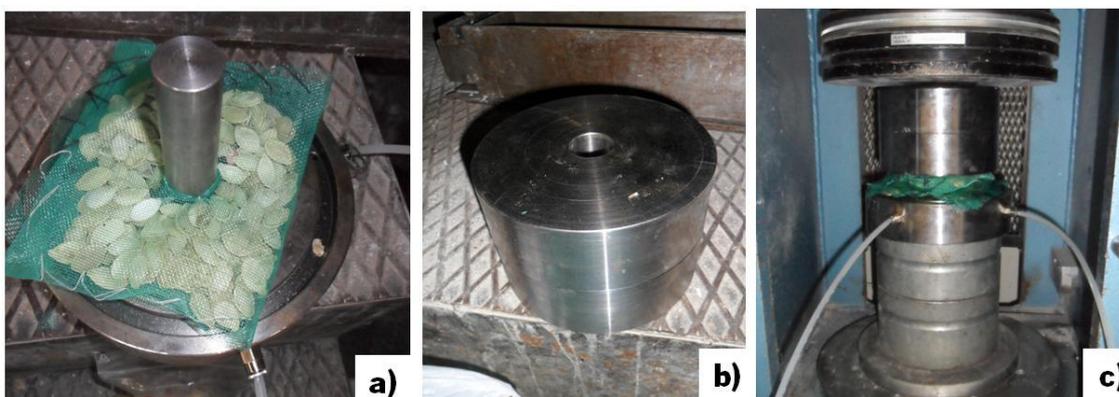


Figura 36 – Primeiro ensaio: a) Introdução das sementes dentro de uma rede; b) circunferências que serviram de peso; c) ensaio a ser realizado

Entretanto foram realizados vários ensaios com esta peça em diferentes sementes, que se colocava cerca de 200g de semente na rede e tentava-se atingir cerca de 2000KN, repetindo-se várias vezes a pressão exercida. Experimentou-se colocar mais redes, perfazendo um total de 3 redes com sementes.

Alteração da peça) Uma vez que o processo não estava a resultar devidamente, no departamento de civil existia uma peça, sob a forma de um cilindro, como se pode ver na figura 37. A própria peça possuía uma base e tinha um peso que serviu para esmagar as sementes. Experimentalmente colocou-se as sementes diretamente dentro do cilindro, e verificou-se que se funcionava muito melhor, conseguindo-se atingir cerca de 2500KN.

Este processo tinha alguns problemas pois não tinha forma de recolher o óleo, o óleo em vez de descer, subia. A área onde se colocava as sementes era grande, e as sementes não ficavam bem esmagadas, ficavam bastante entre elas, dificultando a assim a remoção do “cake” (o que resta das sementes) ficando muitas sementes por esmagar. Estas eram mexidas mas mesmo assim elas continuavam quase intactas. Experimentou-se com as sementes trituradas mas continuou-se com problemas.



Figura 37 – Peça de civil

Então, decidiu-se fazer uma malha de aço para que esta fosse colocada por cima da base e as sementes eram postas em cima, tinha como objetivo fazer com que o óleo não se misturasse com as sementes.



Figura 38 – Malha de aço

Alteração da peça) Como as peças utilizadas não foram as mais eficazes, tentou-se com um “copo” que se encheu com sementes, espremeu-se com um êmbolo e verificou-se que saiu bastante óleo. Utilizou-se as circunferências da peça produzida, como possuíam um vazio onde entrava o veio sob a forma de cilindro, colocou-se sementes e com um bocado de veio que sobrou de se fazer a peça, serviu como êmbolo, e a base era a mesma da peça produzida. Entretanto fez-se mais furos na base para sair o óleo mais facilmente. Neste caso, como o diâmetro do cilindro onde se colocava as sementes era muito pequeno, não se podia atingir uma força tão grande como nos processos anteriores, uma vez que área de secção era muito menor.

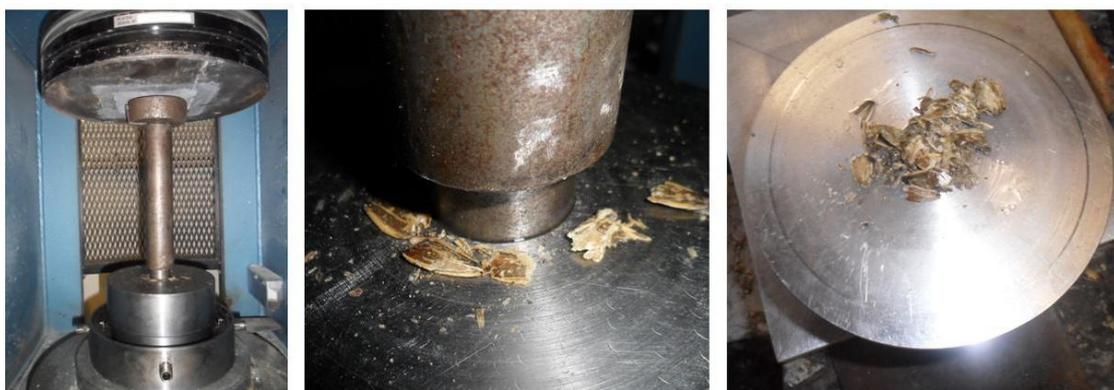


Figura 39 – Nova alteração da peça

Alteração da peça) Neste caso, o processo utilizado foi exatamente o mesmo que na experiência anterior, utilizou-se a mesma peça mas decidiu-se aumentar o diâmetro do cilindro onde se colocou as sementes, pois o anterior era muito pequeno, e a quantidade de sementes era muito pouca dificultando o processo de extração. O diâmetro ficou de 50mm. Apesar de este método ser melhor, verificou-se que com a força aplicada as sementes estavam a ficar por de baixo do cilindro, fazendo este levantar. A solução arranjada foi arranjar uma base e aparafusou-se ao cilindro, com furos para sair o óleo, serviu como contra-pressão, como se pode visualizar na figura 40. Os furos produzidos eram muito grandes e o “cake” misturado com o óleo estava a sair por esses furos, tentou-se arranjar forma de tentar diminuir esses furos, mas continuou-se com o mesmo problema. As pressões com esta peça chegaram a cerca de 500KN. Houve também bastantes problemas quando se tentava retirar as sementes do cilindro, como a pressão era muito grande e com o óleo das sementes provocava vácuo, era bastante difícil retirar o êmbolo do cilindro, dificultando em muito a mudança das sementes.



Figura 40 - Alteração da peça

O principal problema que esteve associado a estas experiências era a recolha do óleo, chegando a ser utilizado plástico debaixo da circunferência para “segurar” o óleo, e com o auxílio de um salazar de forma a tentar conseguir retirar o mesmo óleo, mas mesmo assim foram tentativas falhadas.

3.2.3. Produção de biodiesel

Uma vez que houve grande dificuldade em extrair o óleo das sementes, decidiu-se comprar óleo vegetal de girassol e de amendoim, para a produção de biodiesel. Antes da produção do biodiesel foi necessário procedeu-se à caracterização do teor em ácidos de gordos livres (índice de acidez) na matéria-prima, descrito no ponto 3.1.1., deste mesmo capítulo.

3.2.3.1. Cálculos para a obtenção do biodiesel

Depois da determinação do índice de acidez da amostra de óleo usado, e conseqüente confirmação da admissibilidade do seu valor pela norma. Procedeu-se a realização de uma transesterificação básica, mas antes calcula-se quais as quantidades necessárias para a transformação do óleo vegetal das duas matérias-primas em biodiesel.

Decidiu-se realizar uma estequiometria de 1:6, óleo vegetal:álcool, o álcool selecionado foi o metanol e o catalisador foi o hidróxido de sódio.



Alguns dados importantes para os cálculos:

n – número de moles (mol)

m – massa (g)

M – massa molar (g/mol)

M (massa molar do girassol, teórica, obtida através da média de 5 valores) = 861,22g/mol

M (massa molar do girassol, teórica, obtida através da média de 5 valores) = 800,77g/mol

M (massa molar do álcool) = 32,04g/mol

ρ (densidade do Metanol) = 0,79g/cm³ = 0,79g/ml de álcool

→ Óleo de girassol

O volume de óleo a utilizar foi de 200ml, pesaram-se esses 200ml, que deu cerca de 180g.

1) Cálculo da densidade de óleo:

$$\rho(\text{óleo}) = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \Leftrightarrow \rho_{\text{óleo}} = \frac{180g}{200ml} = 0,9g/ml = 0,9g/cm^3 = 900g/l$$

2) Calculo o número de moles do óleo:

$$n_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{M_{\text{óleo}}} = \frac{180g}{861,22g/mol} = 0,209mol$$

3) A partir daí conseguiu-se calcular o número de moles do álcool:

$$n_{\text{álcool}} = \frac{6 \times n_{\text{óleo}}}{1mol\ de\ óleo} = 6 \times 0,209 = 1,254mol$$

4) Com o número de moles obteve-se a massa necessária de álcool:

$$m_{\text{álcool}} = n_{\text{álcool}} \times M_{\text{álcool}} = 1,254 \times 32,04 = 40,178g$$

5) Com o auxílio da densidade do álcool, conseguiu-se saber o volume de metanol necessário:

$$\rho(\text{densidade do álcool}) = \frac{m_{\text{álcool}}}{V_{\text{álcool}}} \Leftrightarrow V_{\text{álcool}} = \frac{40,178g}{0,79g/ml} = 50,85ml$$

As quantidades de Catalisador foram calculadas da seguinte forma:

$$G.1) \text{ Com } 0,4\% \text{ de catalisador: } m = \frac{0,4}{100} \times 180 \text{ (massa do óleo)} = 0,72g$$

$$G.2) \text{ Com } 0,8\% \text{ de catalisador: } m = \frac{0,8}{100} \times 180 \text{ (massa do óleo)} = 1,44g$$

→ **Óleo de amendoim**

O volume de óleo a utilizar foi de 200ml, pesaram-se esses 200ml, que deu cerca de 175,13g.

1) Cálculo da densidade de óleo:

$$\rho(\text{óleo}) = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \Leftrightarrow \rho_{\text{óleo}} = \frac{175,13g}{200ml} = 0,8756g/ml = 0,8756g/cm^3 = 876g/l$$

2) Calculo o número de moles do óleo:

$$n_{\text{óleo}} = \frac{m_{\text{óleo}}}{M_{\text{óleo}}} = \frac{175,13g}{800,77g/mol} = 0,2187mol$$

3) A partir daí conseguiu-se calcular o número de moles do álcool:

$$n_{\text{álcool}} = \frac{6 \times n_{\text{óleo}}}{1mol \text{ de óleo}} = 6 \times 0,2187 = 1,3122mol$$

4) Com o número de moles obteve-se a massa necessária de álcool:

$$m_{\text{álcool}} = n_{\text{álcool}} \times M_{\text{álcool}} = 1,3122 (mol) \times 32,04(g/mol) = 42,04g$$

5) Com o auxílio da densidade do álcool, conseguiu-se saber o volume de metanol necessário:

$$\rho(\text{densidade do álcool}) = \frac{m_{\text{álcool}}}{V_{\text{álcool}}} \Leftrightarrow V_{\text{álcool}} = \frac{42,04g}{0,79g/ml} = 53,26ml$$

As quantidades de Catalisador foram calculadas da seguinte forma:

$$A.1) \text{ Com } 0,4\% \text{ de catalisador: } m = \frac{0,4}{100} \times 175,13 \text{ (massa do óleo)} = 0,70052g$$

$$A.2) \text{ Com } 0,8\% \text{ de catalisador: } m = \frac{0,8}{100} \times 175,13 \text{ (massa do óleo)} = 1,40104g$$

3.2.3.2. Produção do Biodiesel

Planearam-se 8 ensaios, que variaram na quantidade de catalisador e na temperatura do óleo vegetal antes da reação de transesterificação. Na tabela 5 mostra o planeamento:

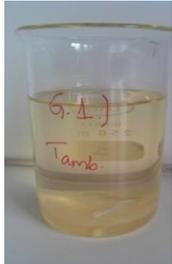
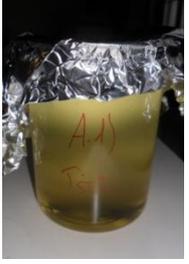
Tabela 5 - Planeamento dos ensaios a realizar

	Nomes do ensaio	Massa de óleo (g)	Volume do álcool (ml)	Massa de Catalisador (g)	% Catalisador	Temperatura do ensaio
Óleo Girassol	G2) Tamb	180,01	50,85	1,44	0,8	Ambiente
	G2) T50°C	179,93	50,85	1,44		50°C
	G1) Tamb	179,78	50,85	0,72	0,4	Ambiente
	G1) T50°C	179,22	50,85	0,73		50°C
Óleo Amendoim	A2) Tamb	176,90	53,26	1,40	0,8	Ambiente
	A2) T50°C	175,24	53,26	1,40		50°C
	A1) Tamb	176,29	53,26	0,70	0,4	Ambiente
	A1) T50°C	175,94	53,26	0,70		50°C

O parâmetro de temperatura está relacionado com um aquecimento prévio do óleo a 50°C, durante 30min. Quando se realizou o ensaio com o aquecimento, o primeiro passo a dar é verter 200ml do óleo vegetal para um gobelé previamente pesado, procedendo-se à respetiva pesagem do óleo vegetal e o posterior aquecimento durante os 30min, e entretanto procedia-se à diluição do metanol com o hidróxido de sódio. Caso o ensaio fosse com o óleo vegetal à temperatura ambiente bastou só a pesagem e aguardar pela diluição do metanol e hidróxido de sódio (catalisador), ou seja, o metóxido. Após estes passos realizava-se a mistura entre o óleo e o metóxido (metanol + hidróxido de sódio) que ficaram em agitação durante 2h. Após a reação, deixou-se em repouso o biodiesel, cerca de 4h, para promover a separação entre o biodiesel e a glicerina. Foi realizado o processo de purificação do biodiesel descrito no ponto 3.1.2., não havendo necessidade de filtrar uma vez se tratar de óleos vegetais virgens. O processo foi repetido para as 8 amostras. A biodiesel obtido pelos óleos vegetais foi caracterizado segundo as mesmas características que os óleos alimentares usados, descrito no capítulo presente, mas precisamente em 3.1.3.

Na tabela 6 pode visualizar-se o biodiesel obtido nos diferentes ensaios realizados.

Tabela 6 – Biodiesel obtido

Biodiesel antes Das lavagens	Biodiesel limpo	Biodiesel antes Das lavagens	Biodiesel Limpo
G2) Tamb.		A2)Tamb.	
			
G2)T50°C		A2) T50°C	
			
G1)Tamb.		A1)Tamb.	
			
G1)T50°C		A1)T50°C	
			

3.3. Macroalgas – Algas Marinhas da orla costeira da zona norte Portugal

3.3.1. Recolha e seleção das Algas Marinhas

A costa Portuguesa apresenta um gradiente acentuado na distribuição da flora algal. As algas do litoral ocidental, com uma orientação Norte-Sul, podem ser agrupadas em dois grupos: as algas da zona Norte (entre a foz do rio Minho e a foz do rio Tejo); e as algas da zona Sul (entre a foz do rio Tejo e o Algarve).

Assim, as algas marinhas da orla costeira da zona Norte de Portugal foram escolhidas como fonte de matéria-prima para tentativa de obtenção de óleo e possível produção de biodiesel. Esta escolha prendeu-se com a sua enorme abundância e facilidade de serem recolhidas/encontradas próximas das superfícies das águas, como praias, lagoas, rios, entre outros locais. A recolha, de duas espécies de algas marinhas, foi efetuada na praia da Apúlia, situada a 10km da Póvoa de Varzim e perto de Ofir. As algas recolhidas foram identificadas como *Sargaço* e *Fucus vesiculosus*, mais conhecida por *Bodelha*.



Figura 41 – a) e b) *Sargaço* e c) e d) *Bodelha*

O sargaço, também conhecido como “argaço e limo”, é das algas mais abundantes na zona litoral norte de Portugal, de Viana do Castelo até à Póvoa de Varzim, sendo típica da praia da Apúlia, conhecida como “terra dos sargaceiros”, tornando-se lógica a sua apanha, uma vez possui em grande abundância e facilidade de colheita. O sargaço pertence à classe das *Phaeophyceae* (castanhas), são algas macroscópicas, pluricelulares e autotróficas. O sargaço é um conjunto de diversas algas marinhas (*Saccarhiza*, *Laminaria*, *Fucus*, *Codium*, *Palmaria*, *Gelidium* e *Chondrus*) que crescem nos rochedos da zona litoral [45,56,57]. A tradicional apanha do sargaço consistia na recolha, na praia ou na beira-mar, das algas que se desprendiam dos rochedos com o movimentos das ondas. O sargaço é bastante utilizado como

fertilizante em Portugal [57], as suas paredes contêm celulose e alguma percentagem de óleo, usados como reservas de alimento.

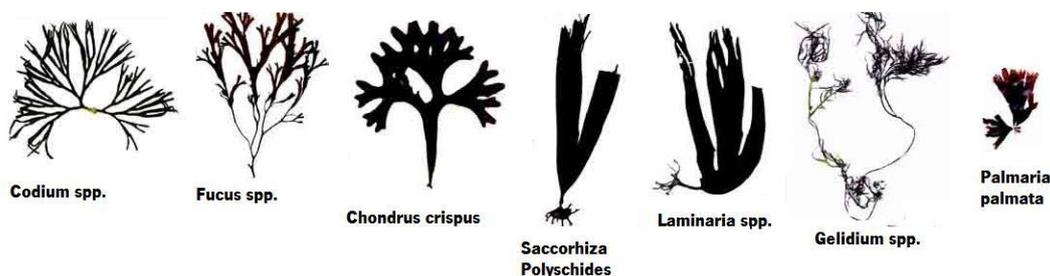


Figura 42 – Algas que constituem o Sargaço [45]

A outra alga apanhada foi identificada como *Fucus vesiculosus* ou *Bodelha*. São algas castanhas, do mesmo tipo que o sargaço, pertencentes ao grupo das *feofíceas*. Os nomes mais comuns: *Bodelha*, *Botelho*, *Trombolho*, *Estalos*, *Esgalhota*, *Limo-bexiga*, *Fava-do-mar*, (*Fucus vesiculosus* e *Fucus spiralis*) – o *Fucus vesiculosus* e o *F. spiralis* são algas castanhas (feofíceas) e caracterizam-se pela presença de um talo dividido dicotomicamente, podendo atingir os 60 cm de comprimento e possuir lâminas com 1 a 2 cm de largura [45,57]. De cor é castanho-escuro ou verde-oliváceo, de consistência coriácea e fixando-se ao substrato por intermédio de um disco basal. O talo apresenta uma nervira mediana bem desenvolvida, mas encontra-se desprovido de vesículas aeríferas. As lâminas possuem uma nervura mediana proeminente, podendo apresentar vesículas aeríferas ou aerocistos (presentes no *F. vesiculosus*), que possibilitam a flutuação dos talos quando emersos [57].

3.3.2. Limpeza e secagem das algas marinhas

Após recolha das algas marinhas, procedeu-se à sua limpeza. As algas foram inicialmente lavadas, para remover areias e alguns resíduos, seguindo-se uma pré-secagem ao sol. No caso do sargaço foi necessário repetir este processo mais do que as bodelhas, uma vez que possuem uma camada viscosa que agarrava muito a areia, dificultando assim a limpeza.

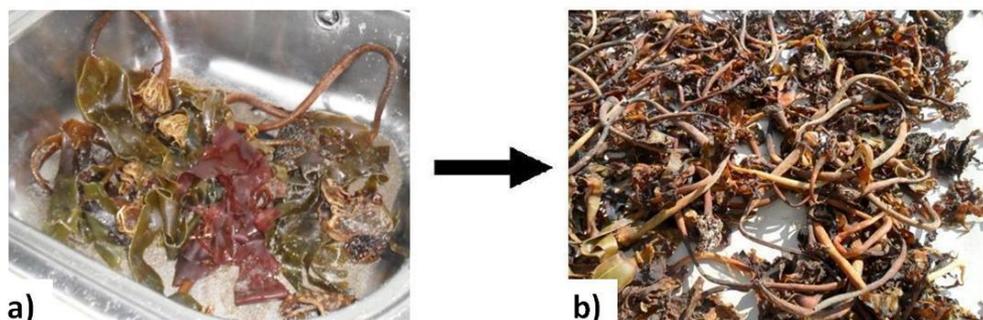


Figura 43 - Limpeza do sargaço: a) Lavagem e b) Secagem

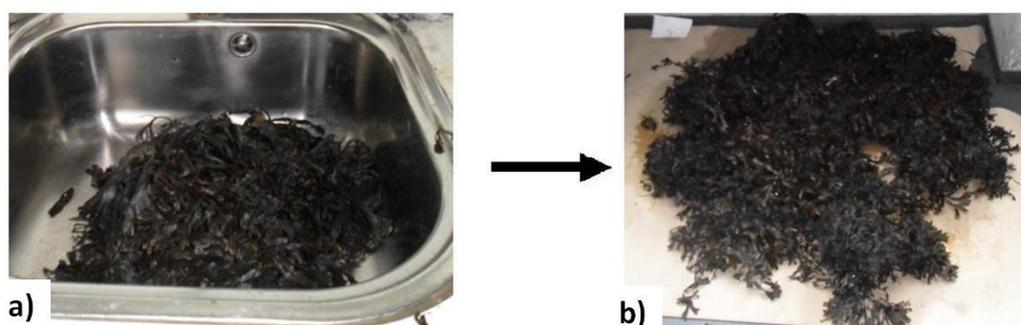


Figura 44 - Limpeza da bodelha a) Lavagem e b) Secagem

3.3.3. Extração do óleo

Como a utilização de macroalgas (principalmente algas marítimas da orla costeira portuguesa) para a produção de biodiesel ainda foi pouco estudada, informação bibliográfica ainda é escassa, os métodos de extração de óleo das algas marinhas ainda são pouco conhecidos. Este estudo permitiu verificar qual a forma mais eficaz de extrair óleo das macroalgas, sendo o processo otimizado para maximização do rendimento de extração de óleo.

A extração do óleo das macroalgas foi efetuada com recurso a solventes, podendo ser realizada em conjunto com um processo mecânico (por exemplo a prensa) de forma a fraturar as células algais, partindo assim as células facilitando assim que os solventes se ligassem mais facilmente com o óleo, conseguindo assim extrai-lo. Para tal, começou-se por um processo de pré-rompimento das células das algas, isto é, forma de obter as algas marinhas em tamanhos menores e ao mesmo tempo romper as células para se poder extrair o óleo das células. Para tal, foram utilizados 3 formas: prensa, moinho de lâminas 1 e moinho de lâminas 2.

3.3.3.1. Tratamento da biomassa:

1) Método 1 - Prensa

A prensa⁷ que pode observar-se na figura 45, é mais indicada para a extração de óleo de sementes mas neste caso foi utilizado para algas marinhas, mas só o sargaço, uma vez que a prensa acabou por avariar e não haver recursos para a recuperar. A compressão nesta prensa é por meio de um parafuso sem fim, podendo se considerar uma prensa contínua. Neste caso, atuou como pré-prensagem, isto é, houve a prensagem do sargaço com posterior extração por solventes.



Figura 45 – Prensa de Óleo

Experimentalmente o que se fez foi primeiramente: ajustar o parafuso de forma (2) a obter um maior esmagamento, convém que esse parafuso esteja mais chegado ao ponto 3, para haver uma maior extração e menor saída do chamado “cake” (restos de materiais esmagados – a saída desses restos dá pelo número 4). Colocou-se o material, neste caso o sargaço, limpo e seco, no número 1, ligou-se a prensa, o material começou a ser fragmentado e arrastado ao longo do parafuso sem fim, acabando por sair uma mistura bastante homogénea, pelo número 5 sendo uma espécie de cesto formado por barras de aço, a biomassa (Figura 45). Na figura 46 é possível observar o aspeto final do sargaço após a ida à prensa.



Figura 46 - *Sargaço* obtido após ida à prensa

⁷ Prensa – Oil press; óleo technology; Tipo EL68L; capacidade até 50kg/h; Potência: 4kw

2) Método 2- Moinho de lâminas 1

Outra forma utilizada para “fraturar” as células das algas marinhas foi o moinho de lâminas⁸, em forma de hélice. Neste caso não se obteve uma “massa” como no caso da prensa, mas sim partículas. Uma vez que aqui o moinho não comprime as algas, moeu as algas em tamanhos pequenos. A lâmina utilizada foi de 0,5mm. As algas marinhas estavam limpas e secas (só foram secas ao sol) quando foram introduzidas no moinho de lâminas.



Figura 47 – Moinho de Lâminas



Figura 48 – Após a ida ao moinho a) Sargaço; b) Bodelha

3) Método 3 - Moinho de lâminas 2

O moinho de lâminas 2⁹ foi outra forma encontrada para tentar obter biomassa das algas marinhas, para posteriormente extrair o óleo. Antes de se introduzir as algas no robô estas tinham de se humedecer um pouco, para torná-las mais maleáveis, facilitando assim o corte, uma vez que este robô não é muito potente e nem é o mais indicado para algas marinhas, uma vez que não fabricado para este efeito.



Figura 49 – Trituração da bodelha no Moinho de lâminas 2

⁸ Moinho de lâminas 1 – Retch SM 2000

⁹ Moinho de lâminas 2 – Robot de Cozinha Bosch MCM 2020

Após o corte, as algas marinhas aparentavam uma “papa” sendo posteriormente secas de três maneiras diferentes: ao sol ou na estufa, durante dois ou oito dias.

3.3.3.2. Métodos de adição de solventes

Após a obtenção da biomassa e da biomassa estar seca, foram feitos vários ensaios de forma a verificar qual a melhor forma de se obter óleo a partir de algas marinhas. Os ensaios foram feitos de três formas diferentes, variando-se o tipo de biomassa, forma de obter a biomassa, forma de secagem da biomassa e o tipo de solvente.

O primeiro método, denominado de soxhlet, este baseou-se no método soxhlet, utilizado pelo autor Maceiras [53], para a extração de lípidos das algas marinhas, este instrumento permite a separação de sólidos-líquidos, mas como não havia condições para se obter o aparelho houve necessidade de se experimentar de uma forma “parecida”. Montou-se o esquema conforme a figura 50, colocou-se cerca de 10g de biomassa no filtro e 250ml de solvente na ampola de decantação, regulou-se a torneira de forma a cair gota a gota sobre a biomassa. Quando o solvente tinha sido todo vertido, voltava-se a colocar o solvente na ampola e este caía novamente sobre a biomassa. Repetiu-se este processo durante cerca de quatro dias, sendo que à noite o processo era interrompido. Seguiu-se a evaporação do solvente para obtenção do óleo.

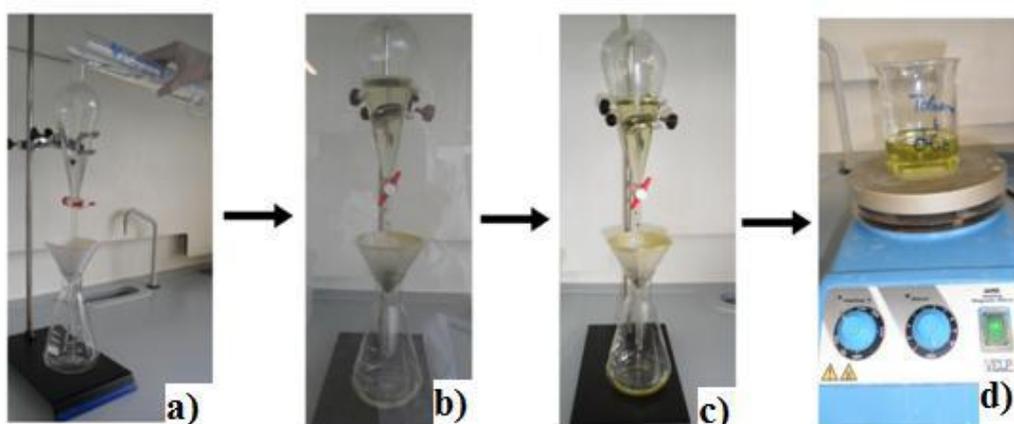


Figura 50 - Método 1: a) Inicial, b) Passado dois dias c) Passado três dias e d) Evaporação do solvente

O segundo e o terceiro método são muito idênticos, o que altera é o facto que no segundo método não existe uma segunda adição de solvente, sendo o segundo método denominado de adição única de solvente. Através do esquema apresentado na figura 51, é possível observar-se de que forma feito o terceiro método. O terceiro método foi realizado de forma idêntica ao descrito segundo o autor Bastianoni [86], sendo esta a forma mais económica e possível de ser realizada. Os solventes utilizados foram: hexano e tolueno.

Muito resumidamente, o segundo e o terceiro processo de extração, denominado de adição de solvente em várias fases, começa com a pesagem da biomassa, depois adiciona-se um dos solventes mencionados, coloca-se em agitação aproximadamente um dia. Ao fim desse período tempo filtrava-se a mistura, e com um gobelé devidamente pesado, eram lá colocados os solventes, sendo colocado a evaporar, sendo gobelé novamente pesado após arrefecer.

No caso do terceiro processo era aproveitada a biomassa que ficava no filtro, e utilizava-se para realizar um novo ciclo, isto é, adicionava-se solvente e colocava-se em agitação durante aproximadamente um dia, voltando-se a filtrar, e com um gobelé devidamente pesado, os solventes eram colocados lá e era posto a evaporar.

No geral os processos de extração de óleo das algas marinhas variaram de acordo com o tipo de biomassa, método de trituração/esmagamento da biomassa, método de secagem da biomassa, solventes e método de adição dos mesmos. Na tabela 7 pode ver-se resumidamente os ensaios realizados.

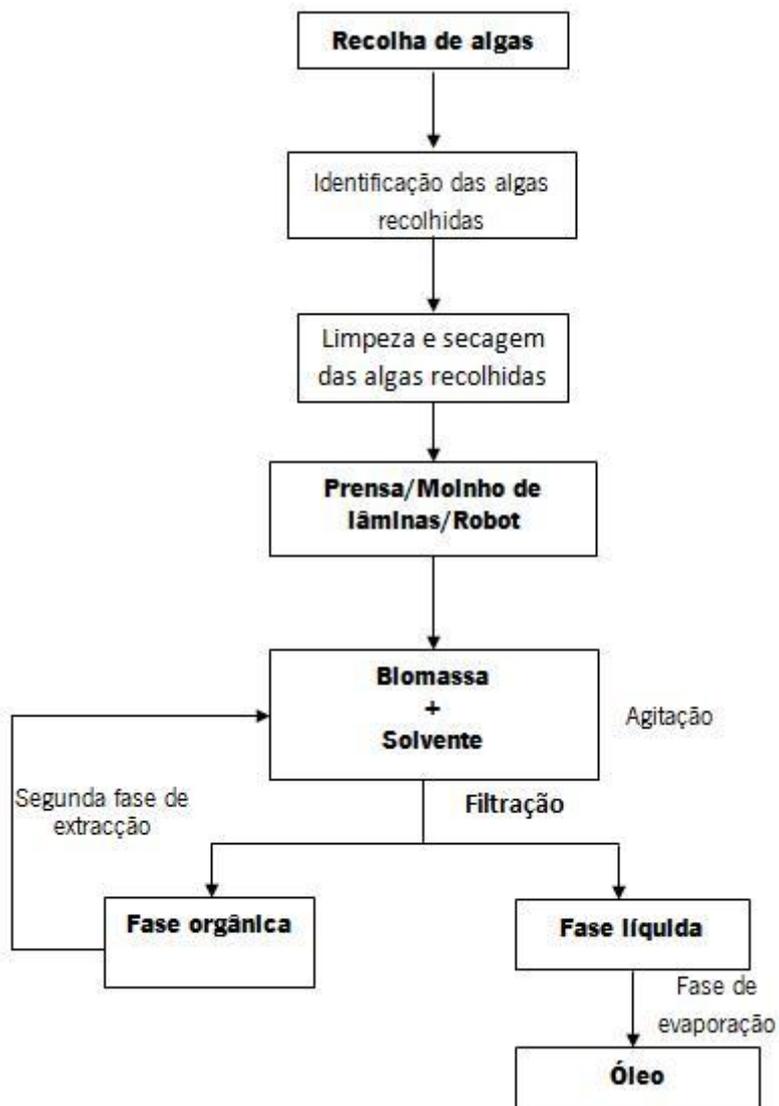


Figura 51 - Esquema do método 3

Tabela 7 – Tabela resumo sobre os métodos utilizados¹⁰

Número do ensaio	Alga	Método de trituração	Secagem	Solvente (ml)	Método de adição dos solventes
1	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Tolueno 250ml	Soxhlet
2	Sargaço 9,90g	Prensa	Sol	Tolueno 20ml	Adição única
3	Sargaço 9,99g	Prensa	Sol	Hexano 20ml	Adição única
4	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
5	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
6	Bodelha 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 50 +50	Adição em várias fases
7	Sargaço 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
8	Sargaço 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 50 +50	Adição em várias fases
9	Sargaço 10,08g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
10	Sargaço 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
11	Sargaço 50,11g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Tolueno 150 +150	Adição em várias fases
12	Bodelha 50,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Tolueno 150 + 150	Adição em várias fases
13	Sargaço 10,03g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
14	Sargaço 10,07g	Moinho de lâminas 1	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
15	Bodelha 10,07g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
16	Bodelha 10,08g	Moinho de lâminas 1	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
17	Bodelha 10,14g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
18	Bodelha 10,03g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
19	Bodelha 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases

¹⁰ Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela 7 - resumo sobre os métodos utilizados

Número do ensaio	Alga	Método de trituração	Secagem	Solvente (ml)	Método de adição dos solventes
20	Sargaço 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases
21	Sargaço 102,08g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 250 + 250	Adição em várias fases
22	Bodelha 10,07g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases
23	Bodelha 120,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 250 + 250	Adição em várias fases
24	Bodelha 150,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 300 + 300	Adição em várias fases

3.4. Microalgas

3.4.1. Meio de cultivo

As espécies de microalgas utilizadas no presente trabalho (figura 52) foram escolhidas tendo em conta o seu conteúdo ou teor em óleo. Mediante este parâmetro, foram escolhidas a *Chlorella emersonii* (C.E.) e a *Botryococcus braunii* (B.B.). Estas microalgas foram encomendadas à ACOI – Coimbra Collection of Algae.

A C.E. possui um teor em lípidos compreendido entre 25% a 65% teor em lípidos (peso seco da biomassa) e a B.B. uma percentagem pode variar de 25 a 75%. Normalmente estas microalgas crescem em meios de água doce como lagos e lagoas, isto é, em meios de cultura simples que facilita a simulação destas condições em laboratório. Estas microalgas são organismos unicelulares, em que as células individuais variam em tamanho desde 5-10 μm com as colónias poderem atingir 25-35 μm , eventualmente coalescendo para formar massas até 1mm. A faixa de temperatura ótima de crescimento é de 23-30°C. Estas algas verdes são caracterizadas por teores elevados em hidrocarbonetos.

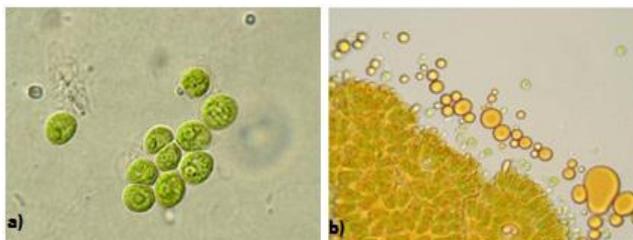


Figura 52 – Microalgas utilizadas no trabalho experimental
a) *Chlorella emersonii* (C.E.) e b) *Botryococcus braunii* (B.B.)

O crescimento inicial das microalgas foi promovido em frascos de Schoot, semi-abertos, para simular as condições existentes num fotobioreator. O meio utilizado foi o meio recomendado pelo fornecedor das algas, meio M₇, cuja composição é descrita na tabela 8:

Tabela 8 – M₇ - Meio para as estripes C.E. e B.B. [87]

Nome do composto	Concentração da solução (%)	M ₇ (ml)
Nitrato de Potássio - KNO ₃	1	10
Sulfato de Magnésio - MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	10
Fosfato de amónio dibásico - (NH ₄) ₂ HPO ₄	0.2	5
Sulfato de Cálcio - CaSO ₄	Solução saturada	10
Extracto de solo	-	20
Água destilada	-	940
Micronutrientes	-	5

Este meio possui os elementos essenciais para o crescimento das microalgas, elementos como o azoto (N) e o fósforo (P), possuindo igualmente vitaminas que, em baixas concentrações, estão ligados aos micronutrientes (como por exemplo a H – biotina). Na tabela 9 é apresentada a composição da solução/meio relativamente aos nutrientes, por forma a promover o crescimento das microalgas.

Tabela 9 - Composição para a solução de micronutrientes [87]

Nome do composto	Concentração da solução (%)	Solução de micronutrientes
Sulfato de Zinco - $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	1.0 ml A
Sulfato de Manganês - $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1	2.0 ml
Ácido Bórico - H_3Bo_3	0.2	5.0 ml
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0.02	5.0 ml
Molibdénio de sódio - $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.02	5.0 ml
Sulfato de Cobre hexahidratado - $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0005	1.0 ml
Água destilada	-	981 ml
Hepta-sulfato ferroso $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	-	0.7 g
ETDA (Ethylenediaminetetraacetic acid – Titriplex III, Merck)	-	0.8 g

Com base no descrito na tabela 9 foram produzidas experimentalmente duas soluções de micronutrientes que consistiram em:

- ❖ Solução I – 881 mL H_2O destilada + A + 0,4g EDTA
- ❖ Solução II - 100 mL H_2O destilada + 0,7g $FeSO_4$ + 0,4g EDTA

Fez-se as respetivas soluções de 1 e 2. As soluções foram autoclavadas¹¹, durante 1h a 1atmosfera, separadamente, acabando-se por juntar no fim.

- ❖ Extrato de solo – pesou-se 200g de solo de jardim sem grande conteúdo de húmus, fertilizantes ou outros agentes protetores. Adicionou-se 1l de água destilada, e esterilizou-se aquecendo durante 1 hora. Separou-se o extrato decantado das partículas por centrifugação¹². Colocou-se em pequenos recipientes da solução de

¹¹ Autoclave: Miniautoclave – JP Selecta Micro7 → Aplicar pressões e temperaturas elevadas de forma a matar os microorganismos, serve também para esterilizar

¹² Centrifugadora – Gravimeta Degicen 20 ortoalresa rpm = 5000

stock, autoclavou-se por 1 hora a 1 atmosfera em três dias consecutivos. Armazenou-se no frigorífico.

As estripes, com proveniência da Algoteca de Coimbra, tinham cerca de 3ml, o seu conteúdo não era só constituídas por microalgas mas também por meio, uma vez que estas tiveram de ser deslocadas de Coimbra até Guimarães, e sem existência de meio adequado não sobreviviam.

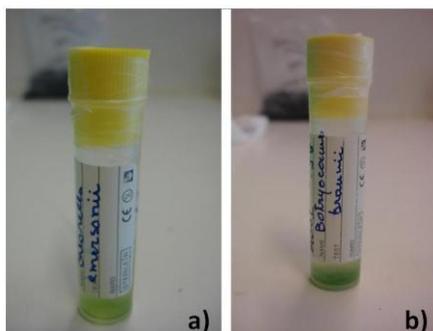


Figura 53 - Amostras das microalgas aquando a receção no CVR: a) C.E. e b) B.B.

No início da cultura e crescimento das microalgas deu-se com adição de cerca de 15ml de meio de cultura em frascos de semi-abertos, para simular as condições de um fotobioreator, isto é, para garantir a passagem do ar, devido às necessidades do dióxido de carbono, pois este é um dos parâmetros mais importantes para se dar o crescimento das microalgas. Neste período inicial de ensaios de crescimento, as microalgas foram colocadas num local iluminado à temperatura ambiente e a agitação foi realizada manualmente em períodos de tempo regulares, cerca de uma vez por dia, para evitar a sedimentação das microalgas, garantir assim que todas as células eram expostas à luz e que se promovia a libertação do oxigénio.

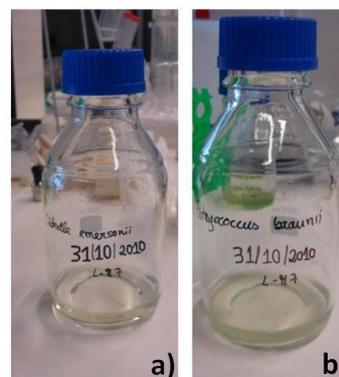


Figura 54 - As amostras das microalgas: dia 0 da cultura a) C.E. e b) B.B



Figura 55 – Algumas das culturas – fonte luminosa: sol

Com o tempo, as microalgas foram crescendo, havendo um aumento da biomassa, com a formação de colónias. Para que essas algas se mantivessem vivas, foi necessário transferir periodicamente parte dessas mesmas para um novo frasco, devidamente lavado, com um novo meio de cultura. Este processo denomina-se por repicagem. Através deste método foi assegurado o aumento da biomassa, uma vez que a forma de reprodução das microalgas é realizada pela divisão celular. A repicagem tem igualmente como objetivo diminuir o esgotamento do substrato e assegurar a manutenção da cultura.

Portugal é um dos países da Europa com maior disponibilidade de radiação solar, mas como é normal o número de horas de exposição solar varia muito de acordo com a altura do ano. No verão é o período de tempo com mais horas de luminosidade, cerca de 15h, já no inverno é o período em que os dias são mais curtos cerca de 9h (e não é certo). O mesmo acontece com a temperatura, verificando-se que no verão a média de temperaturas é de cerca de 30°C enquanto que no inverno atinge os 15°C. Uma vez que existe essa diminuição do número de horas solares e temperatura ambiente, no sentido de potenciar e garantir o crescimento da biomassa algal foi assegurada a luminosidade necessária por recurso à iluminação artificial. Para tal procedeu-se à instalação e montagem de uma sala de crescimento em para além de se assegurar a luminosidade necessária para o crescimento celular, mediante o recurso a lâmpadas fluorescentes, figura 56, foi igualmente possível garantir o controlo de temperatura a um nível ótimo de 25°C, aproximadamente.

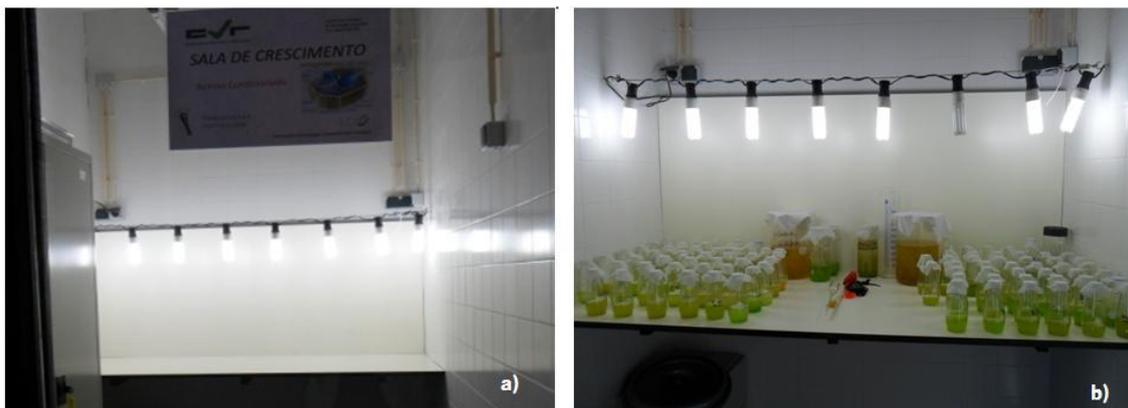


Figura 56 – a) Fotografia da sala de crescimento, evidenciando as lâmpadas para simulação de condições fóticas e b) Fotografia da sala de crescimento com as microalgas

No entanto, no decorrer dos ensaios e dado os elevados períodos dos mesmos verificou-se alteração de cor das culturas (de verde para castanho) evidenciando a existência da fase de decaimento com a conseqüente morte das microalgas. Quando as microalgas atingiram esse estado, eram adicionados num coletor de recolha até se atingir um volume de biomassa suficiente para recolha e a extração do seu óleo.

Uma vez que mesmo na sala de crescimento com imposição das condições anteriormente referidas as microalgas não cresceram a um ritmo expectável, optou-se pelo projeto e construção de um fotobioreator fechado de forma a potencializar o crescimento das microalgas. O fotobioreator desenvolvido possui capacidade para 100L de meio, é um sistema fechado. Possui ainda 2 motores de forma a garantir que as microalgas estão em constante agitação, possui 4 fontes de iluminação, uma fonte de calor, termómetro, uma botija de CO₂ e uma torneira para recolha das amostras e análise do meio.

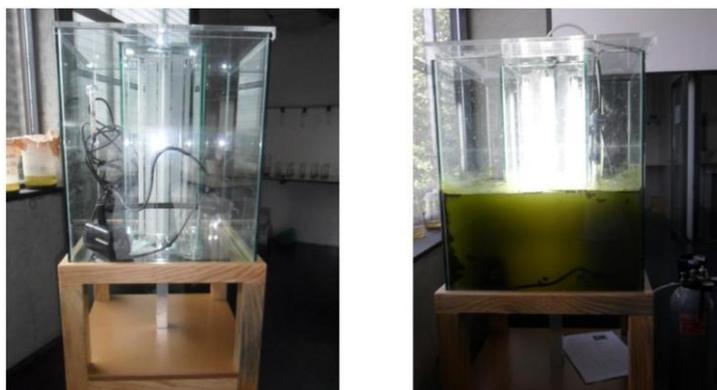


Figura 57 - Fotobioreator

O primeiro teste (primeira experiência) de colocação do fotobioreator em funcionamento consistiu na adição de cerca de 3l de biomassa C.E. com 50L de meio M₁. Este crescimento teve duração de 1 mês, tendo sido realizadas algumas recolhas de amostras para posterior análise relativamente a alguns parâmetros como sólidos totais e densidade ótica de determinar a taxa de crescimento.

Após o primeiro teste com o fotobioreator procedeu-se a uma alteração do número de bombas envolvidas (de 2 para 3) de forma a garantir menores níveis de deposição foi-se obrigado a alterar as bombas, e colocar em vez de 2, 3 bombas. Durante este período de tempo foram feitas recolhas para o acompanhamento do crescimento das microalgas. Sendo um segundo teste (segunda experiência) para verificar o crescimento das microalgas.

3.4.1.1. Caracterização dos meios de cultura ou de biomassa produzida em sistemas abertos e fechados

→ pH

Ao longo da cultura e crescimento das microalgas houve necessidade de medir o pH, uma vez que este pode influenciar o seu crescimento. Foram feitas algumas medições deste parâmetro, em diversas culturas, sendo escolhidas aleatoriamente. Essas medições foram feitas através de fitas para pH¹³.

→ Sólidos totais secos

Entende-se por sólidos, todos os materiais existentes na água, sob a forma solúvel ou em suspensão. Sólidos totais é o termo aplicado ao resíduo de material deixado num recipiente após a evaporação de uma amostra e subsequente secagem numa estufa a uma temperatura definida. Sólidos totais incluem "sólidos suspensos totais" é a fração de sólidos totais retidos por um filtro e "sólidos dissolvidos totais" são a porção que passa através do filtro. Os sólidos totais secos são denominados assim pois resultam resíduos presentes na água, após esta ter sido sujeito a uma evaporação numa estufa a 105°C. Os sólidos totais são medidos em mg/L [88].

O processo dos sólidos totais é realizado da seguinte forma:

- 1) Aferição de cadinhos de cerâmica na mufla¹⁴ a 550°C, durante uma hora, e para queimar impurezas que estes possam conter.
- 2) Posteriormente, os cadinhos eram retirados da mufla e colocados no exsiccador até arrefecer.
- 3) Entretanto, a cultura a analisar era colocada em agitação para a biomassa ficar bem dispersa.
- 4) Após o arrefecimento dos cadinhos aferidos eram pesados¹⁵.
- 5) Com auxílio de uma pipeta era medido determinado volume de cultura, normalmente 50ml, que ainda continuava em agitação para não provocar erros de medição, e colocada nos cadinhos.

¹³ Fitas de pH – pH fix 0-14 Macherey – Nafel

¹⁴ Mufla - Mufla de secagem cerâmica Venticall

¹⁵ Balança – Balança analítica aeADAM

- 6) Os cadinhos são colocados na estufa¹⁶ (105°C) durante 24h. Os cadinhos eram retirados na estufa e iam novamente para exsiccador até arrefecer, sendo pesados novamente (peso seco). Para cada cultura era realizado os sólidos totais em duplicado de forma a minimizar o erro.

A determinação dos sólidos totais é dada pela seguinte equação:

$$mg \text{ dos sólidos totais/L} = \frac{(A - B) \times 1000}{\text{volume da amostra, mL}}$$

Onde, A – peso do cadinho com os resíduos, após a ida à estufa, mg

B – peso do cadinho após secagem, mg

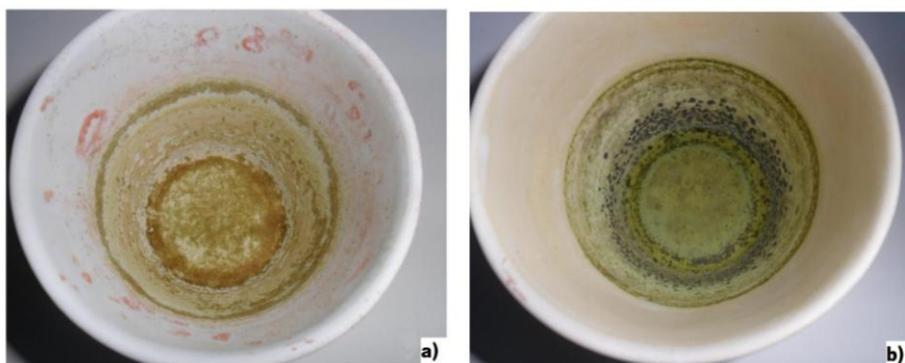


Figura 58 - Cadinhos após ida à estufa a) C.E. e b) B.B.

A realização deste ensaio teve como objetivo controlar o crescimento das microalgas, uma vez que a cultura algal é constituída maioritariamente por água e microalgas, logo quando os cadinhos vão à estufa a 105°C a água é evaporada, ficando as microalgas nos cadinhos. Conseguindo assim, de uma forma indireta, analisar o crescimento das microalgas.

→ Densidade ótica

A utilização da densidade ótica é outra forma indireta de avaliar o crescimento das microalgas, mede a turbidez da cultura microbiana. É um método rápido de estimar a concentração celular. A densidade ótica corresponde à absorvância, isto é, quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorvância) e menor será a transmitância (passagem de luz pela amostra). Nessas medições utiliza-se o espectrofotómetro

¹⁶ Estufa – Estufa MMM Medcenter Venticell

para realizar as medições, que idealmente devem ser em intervalos de tempo bem controlados. A quantidade de luz que atravessa a suspensão celular depende da concentração de células na suspensão e do tamanho destas, do comprimento de onda e da intensidade (I_0) da luz incidente e do diâmetro do tubo que contém a suspensão celular.

Os comprimentos de onda frequentemente usados para a medição da densidade ótica podem variar entre 400nm a cerca de 700nm, isto para que os pigmentos fotossintéticos (as clorofilas) não interfiram nas medições. Esses pigmentos encontram-se nessas gamas de comprimentos de onda, uma vez que quando se faça a medição seja fundamentalmente à obstrução física da passagem da luz pelas células em suspensão.

De acordo com o autor Borkenstei [89] utilizou um comprimento de onda 550nm no mesmo tipo de microalgas, ou seja, C.E., nesse sentido utilizou-se o mesmo comprimento de onda. Foram realizadas medições com o espectrofotômetro¹⁷ às amostras recolhidas no fotobioreator, quer na situação 1 quer na situação 2, de modo a analisar o crescimento nas microalgas C.E..

3.4.2. Recolha das algas (Colheita)

Após o processo inicial de cultivo e crescimento, a biomassa foi aumentando ao longo do tempo. Atingindo um volume significativo de biomassa algal, seguiu-se a etapa de recolha e processamento da mesma, sendo esta reservada para a posterior recolha do óleo.

Para o processo de recolha de biomassa no meio de cultura, e conseqüentemente separação da água recorreu-se a floculação das culturas, de forma a agregar todas as células das microalgas presentes no meio. Foram testados 3 compostos, Cloreto de Alumínio ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$ - Merck), Cloreto de Ferro ($FeCl_4 \cdot 4H_2O$ - Merck) e Sulfato de Alumínio ($Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ - Panreac), sendo o mais utilizado o Cloreto de Alumínio [66,72]. As culturas algais foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm, ou simplesmente filtradas quando a quantidade assim o permitia, recolhendo-se posteriormente a biomassa.

¹⁷Espectrofotômetro – JASCO V-530 UV – Vis Spectrophotometer

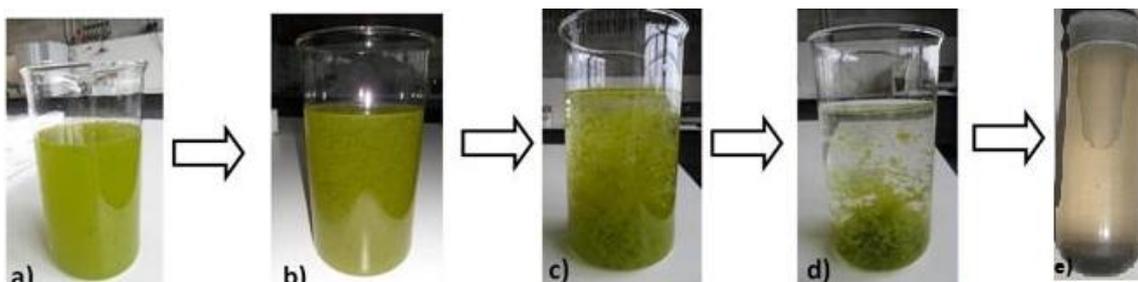


Figura 59 – Processo de floculação: a) Biomassa sem floculante; b) introdução do floculante; c) atuação do floculante (4min depois); d) atuação do floculante – final; e) Centrifugação

3.4.3. Extração do óleo

Após a recolha das microalgas procedeu-se ao rompimento das células, para facilitar a extração do óleo das mesmas. Existem distintos processos para promover o rompimento das células das microalgas como: a prensagem, a extração por solventes, o choque térmico, extração com líquidos super-críticos, entre outros. A seleção dos processos foi realizada de acordo com os aspetos económicos e com a facilidade de aquisição.

Antes da realização dos processos de extração de óleo houve a necessidade de realizar uma preparação da biomassa. O processo iniciou-se imediatamente após a recolha da biomassa, em que foi reservada no congelador e posterior desidratação na estufa a 60°C, durante 24h, seguindo-se o processo de extração de óleo. Os métodos que se efetuaram esta pré-preparação foram 2), 3), 4), 5), 6), 8), 10) e 11).

1) O *primeiro método* de extração de óleo das microalgas a ser testado consistiu na aplicação do processo de sonicação, promovendo-se a rutura celular com o recurso a ultrassons¹⁸ por um período de 30 minutos. Este processo foi aplicado sobre biomassa seca na estufa a 105°C, durante 24h.

2) O *segundo método* testado, denominado por método do choque osmótico, foi utilizado ou testado nas microalgas C.E. O processo iniciou-se na pesagem de cerca de 2g de biomassa seca e a adição de solução de cloreto de sódio a 10%, assegurando a sua agitação durante 5min. Após agitação, a mistura das microalgas com o cloreto de sódio permaneceu em repouso durante 48h, procedendo-se à sua filtração, e nova recolha da biomassa.

¹⁸ Ultrassons – Bandelin Sunorex 35KHz

Posteriormente foram adicionados à biomassa 100ml dos solventes a hexano/2-propanol V/V 1:1, com agitação durante 4h. Findo este período procedeu-se à filtração para remoção de biomassa sendo a solução reaproveitada noutra gobelé devidamente pesado, procedendo-se à evaporação dos solventes na estufa.

3) No *terceiro método*, intitulado pelo método da autoclave, utilizou-se a biomassa C.E.. Pesou-se 2g de biomassa seca, que de seguida foi colocada na autoclave durante 5min à temperatura de 121°C. Posteriormente, adicionou-se 100ml de hexano/2-propanol V/V 1:1, promovendo a sua agitação durante 4h e determinando o rendimento do processo.

4) O *quarto método*, chamado pelo método do ultrassons. Pesou-se cerca de 2g de biomassa de C.E. seca, e colocou-se no ultrassons durante 5min. Perante a inexistência de alteração prolongou-se o ensaio por mais 25min no ultrassons, posteriormente adicionou-se 100ml de hexano/2-propanol V/V 1:1, promovendo a agitação durante 4h. A solução da biomassa com os solventes foi depois filtrada e calculada o respetivo rendimento.

5) O *quinto método*, denominado por método de reações ácido-base, método químico, utilizou-se a C.E. como biomassa. Pesou-se cerca de 2g de biomassa seca, acrescentou-se 50ml de água destilada e mediu-se o pH. Foi adicionado hidróxido de sódio 2 Molar, ajustando o pH a 12. De seguida submeteu à adição de 100ml de hexano/2-propanol V/V 1:1, promovendo a agitação durante 4h. No final obtiveram-se 3 fases, uma menos densa constituída por hexano e o óleo, a fase do meio rica em microalgas e uma fase mais densa (2-propanol e água destilada). Para separar essas fases decantou-se o conteúdo, antes foram pesados 2 gobelés onde a fase menos densa ficou num gobelé e as outras duas fases noutra gobelé. Colocaram-se na estufa os gobelés até que os solventes evaporassem e se obtivesse o óleo. Após arrefecimento os gobelés foram pesados e calculado o rendimento.

6) O *sexto método*, denominado por método do almofariz, foi realizado de forma idêntica ao mencionado pelo autor Tavares [90]. Após a preparação e secagem da biomassa C.E. pesaram-se 5g e esmagaram-se com o auxílio ao almofariz e pilão. Por cada grama de biomassa adicionou-se 5ml de hexano e 5ml de 2-propanol, perfazendo um total de 25ml de cada solvente. Amassou-se novamente com o almofariz e utilizou-se o ultrassons durante 10min.

Por cada grama de biomassa adicionou-se 5ml de 2-propanol e 9ml de água destilada, adicionando no total de 25ml de 2-propanol e 45ml de água, após a sua adição foi novamente para o ultrassons durante 10min, formando-se 2 fases. Posteriormente foi para a centrífugadora, durante 10min a 5000 rpm. As microalgas ficaram separadas dos solventes, pesou-se um gobelé e verteu-se os solventes para esse gobelé, de seguida adicionou-se mais 10ml de 2-propanol e foi mais uma vez para o ultrassons durante 10min. Por fim, evaporaram-se os solventes. As microalgas que ficaram nos tubos da centrífugadora, foram novamente aproveitadas e colocadas num filtro, que permaneceram lá até ficarem secas, pesou-se um gobelé, e verteu-se sobre as microalgas 20ml de tolueno, reaproveitando-o e vertendo-o sobre as microalgas, várias vezes. Levou-se o gobelé a evaporar.

7) O *sétimo método* foi realizado de forma idêntica ao método utilizado pela autora Pinto [91], e tem como base o método *Bligh and Dyer* mas um pouco modificado. Neste método utilizou-se a biomassa C.E. logo após a sua recolha. Pegou-se num frasco com medidas de volume, colocou-se a biomassa, perfazendo-se um total de 5ml e depois voltou-se a pesar novamente o frasco, a massa total de biomassa foi de 18,77g. Adicionou-se 75ml de hexano/2-propanol 1:2 (V/V), colocou-se no vortex¹⁹ durante 4min. De seguida, adicionou-se 25ml de hexano, agitando-se novamente com o vortex durante 4min, por fim, adicionou-se 25ml de água e agitou-se mais 4min com o auxílio do vortex. Após as agitações com vortex, a mistura foi centrifugada a 5000rpm durante 5min, colocou-se a mistura centrifugada, que se encontrava por fases, numa ampola de decantação, para separar as fases obtidas. Decantou-se e cada fase foi colocada num gobelé devidamente pesado: a fase de cima, fase menos densa, onde se encontrava o hexano e o óleo extraído colocou-se a evaporar. Na figura seguinte, figura 60, mostra esquematicamente o processo realizado neste método.

¹⁹ Vortex Mixer: C 220V±10% 50Hz Power consumption: 30W

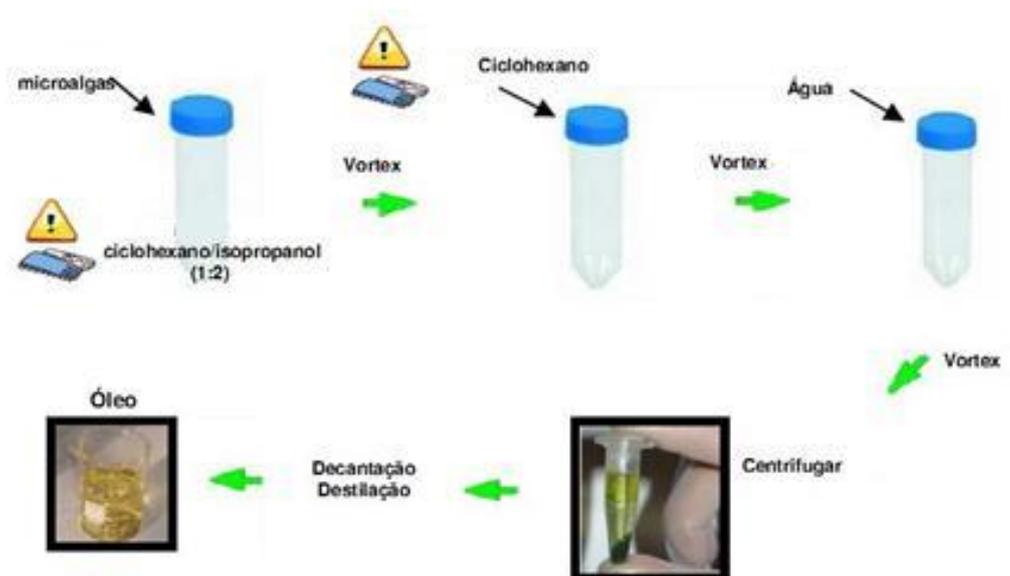


Figura 60 – Esquema explicativo do método utilizado [91]

Repetiu-se o mesmo método para as microalgas B.B. Mas neste caso, a quantidade em volume utilizada foi de 7,5ml. Adicionou-se 25 ml de mistura de hexano/2-propanol 1:2 (V/V), agitou-se no vortex durante 3min. De seguida, adicionou-se 9ml de hexano, agitando-se no vortex por 2min, por fim, adicionou-se 9ml de água e agitando-se uma última vez com o vortex durante 2min. Após as agitações com vortex, a mistura centrifugada a 5000rpm durante 6min, depois de centrifugada, a mistura encontrava-se por fases, e colocou-se numa ampola de decantação, para as separar. Decantou-se as diferentes fases existentes, e cada fase foi para um gobelé devidamente pesado, a fase de cima, é a fase menos densa, onde se encontrava o hexano e o óleo que se colocou a evaporar.

8) O *oitavo método* foi realizado de forma idêntica ao anterior, método sétimo, mas com algumas alterações no processo. Após o tratamento da biomassa, pesou-se um frasco onde se colocou a biomassa, que fez um volume de 6ml, e pesou-se novamente o frasco. Adicionou-se cerca de 22,5ml de hexano/acetona (1/2 V:V) foi sujeito a uma agitação no vortex durante 4min. De seguida adicionou-se 7,5ml de hexano sendo agitada novamente no vortex por 4min, e por último adicionou-se 7,5ml de água e realizando-se mais uma agitação de 4min no vortex. Após a ida ao vortex centrifugou-se a mistura a 5000rpm durante 6min, ficando separada por fases, verteu-se para uma ampola de decantação e separou-se as diferentes fases, a fase de

cima é onde se encontrava o hexano e o óleo, as fases foram colocadas em gobelés devidamente pesados. O gobelé que continha o hexano e o óleo foi sujeito a uma evaporação.

9) No *método nove* foi realizado de forma idêntica ao descrito pelo autor Ehimen [92]. A biomassa utilizada foi C.E. que se encontrava no congelador, desidratou-se na estufa a 80°C durante cerca de 24h. Pesou-se a biomassa depois de seca, tinha cerca de 15g, adicionou-se 40ml de etanol, 2,2ml de ácido sulfúrico e colocou-se em agitação durante 2h a 60°C. Após a agitação o gobelé esteve 1h em repouso, a reação da mistura foi filtrada e os resíduos lavados duas vezes por em etanol – 30ml. Adicionou-se 50ml de água destilada ao filtrado, sendo depois transferida para um funil de decantação. A extração do FAME (*Fatty Acid Methyl Esters*) foi conseguida com adição de 30ml de hexano e posteriormente 50ml de água destilada, decantou-se a mistura que se encontrava dividida em duas partes, a fase de cima continha o hexano, o FAME e os glicerídeos, a fase de baixo, etanol, a água, o catalisador e o excesso de etanol. Foi pesado o gobelé, onde seria armazenado o FAME, verteu-se o FAME, adicionou-se 2g de sulfato de sódio anidro (para remover a água em excesso), por fim o FAME foi novamente filtrado e colocou-se evaporar o gobelé. Na figura seguinte, figura 61, mostra esquematicamente o processo realizado.

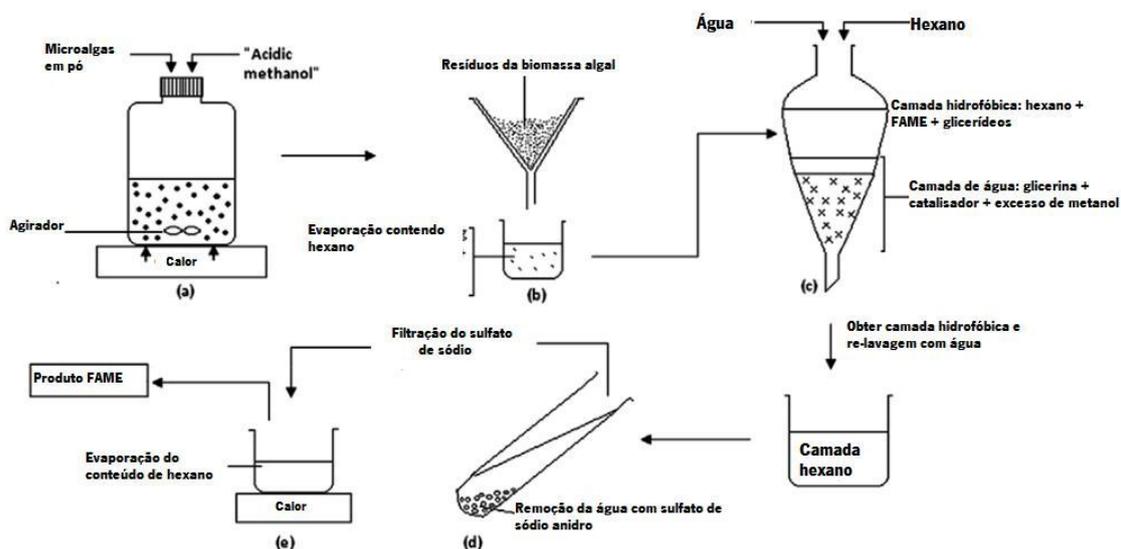


Figura 61 - Representação esquemática do processo [92].

10) No *décimo método*, a biomassa utilizada foi C.E.. Este ensaio teve início com o tratamento à areia da praia (recolhida na praia de Esposende) com HCl:água 1:1 v/v na hotte

para eliminar matéria orgânica. Depois foram feitas várias lavagens com água até pH ficar neutro, deixou-se a secar. Por fim, passou-se com um íman para retirar as impurezas metálicas contidas. Pesou-se a biomassa seca (13,6g) e colocou-se no frasco com medidas de volume para ver qual o volume que teria (cerca de 10ml), a biomassa foi para um almofariz e adicionou-se a areia (o volume da areia e da biomassa seca deve ser 1:1) e com o auxílio pilão triturou-se a biomassa. Depois adicionou-se cerca 37,5ml de hexano/2-propanol (1:2) agitou-se com o auxílio do vortex durante 5min. Depois adicionou-se 12,5ml de hexano e voltou-se agitar no vortex por 5min, por último adicionou-se 12,5ml de água e foi agitado mais uma vez no vortex durante 5min. Para separar a areia e as microalgas, utilizou-se a centrifugadora a 5000rpm durante 10min. Após ida à centrifugadora a mistura ficou separada por fases, pesaram-se os gobelés, decantaram-se e verteu-se o conteúdo para esses mesmos gobelés. Por último, colocou-se o gobelé que continha o hexano e possivelmente o óleo, ou seja a parte de cima, na estufa para evaporar.

Repetiu-se o método com a B.B. A quantidade de biomassa de seca foi de 4,84g, a biomassa foi colocada num frasco com medidas de volume que teria cerca de 8ml de volume. O volume adicionado de hexano/isopropanol (1:2) foi de 35ml, agitou-se com o auxílio do vortex durante 5min. Adicionou-se 10ml de hexano e voltou-se agitar no vortex por 5min, por último adicionou-se 10ml de água e foi agitado mais uma vez no vortex durante 5min.

11) No *décimo primeiro método*, a biomassa utilizada foi do tipo C.E. Após a preparação da biomassa, esta foi macerada em almofariz até está ficar em pó. Pegou-se num frasco, colocou-se a biomassa e pesou-se (cerca de 1,36g), adicionou-se 20ml de acetona e agitou-se com auxílio do vortex por 3min, depois adicionou-se 20ml de hexano e voltou-se a utilizar o vortex durante 3min. Por último, filtrou-se para remover a biomassa, pesou-se antes o gobelé onde se colocou o filtrado e depois foi para a estufa evaporar.

Repetiu-se o processo com B.B., a quantidade de massa utilizada foi de 3,70g, adicionou-se 40ml de acetona e agitou-se com auxílio do vortex durante 4min, depois adicionou-se 40ml de hexano e voltou-se a utilizar o vortex durante 4min. Por último, filtrou-se para remover a biomassa, pesou-se antes o gobelé onde se colocou o filtrado e depois foi para a estufa evaporar. Calculou-se o rendimento obtido.

Na seguinte tabela, tabela 10, pode observar-se um resumo dos ensaios realizados às respetivas microalgas, perfazendo um total de 15 ensaios, qual os solventes utilizados e sua variação de massa.

Tabela 10 – Tabela resumo dos ensaios realizados

Número do ensaio	Método e tipo de microalga	Solventes	Rompimento celular	Varição de massa final (g)
1	1 - C.E. e B.B. 2,00g	Hexano	Ultrassons	0,01
2	2 - C.E. 2,00g	Hexano e 2-propanol	Choque osmótico	0,01
3	3 - C.E. 2,09g	Hexano e 2-propanol	Autoclave	0,07
4	4 - C.E. 1,99g	Hexano e 2-propanol	Ultrassons	0,07
5	5 - C.E. 2,00g	Hexano, 2-propanol e água	Ácido-base	0,06
6	6 - C.E. 4,92g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e ultrassons	0,20
7	7 - C.E. 7,23g	Hexano, 2-propanol e água	Vortex e centrifugadora	0,17
8	7 - B.B. 18,77g	Hexano, acetona e água	Vortex e centrifugadora	0,11
9	8 - C.E. 8,39g	Hexano	Vortex e centrifugadora	0,13
10	9 - C.E. 16,36g	Hexano		0,07
11	10 - C.E. 13,6g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e vortex	0,12
12	10 - B.B. 4,84g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e vortex	0,13
13	11 - C.E. 1,46g	Acetona e Hexano	Almofariz e vortex	0,02
14	11 - B.B. 3,70g	Acetona e Hexano	Almofariz e vortex	0,08
15	6 – C.E. 60g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e ultrassons	0,78

Após uma análise mais detalhada verificou-se o método 6, foi onde se obteve um maior rendimento. Nesse sentido, repetiu-se o método com cerca de 60g de biomassa de C.E. com 300ml de hexano, 300ml de 2-propanol e 540ml de água. O tempo de ultrassons foi de entre adição de solventes foi de 25min, prezando um total de 50min.

Capítulo 4 – Discussão de resultados

Ao longo deste trabalho foi estudado o potencial de produção de biodiesel a partir de três matérias-primas distintas sementes oleaginosas, macroalgas e microalgas, razão pela qual a discussão de resultados está dividida em três partes.

4.1. Óleos Alimentares Usados (OAU) e sementes oleaginosas

Uma vez que houve produção de biodiesel em dois casos, utilizando Óleos Alimentares Usados e óleos virgens provenientes das sementes de girassol e amendoim, decidiu-se fazer a discussão em conjunto, com os dois tipos de matérias-primas.

Relativamente à extração de óleo por parte das sementes oleaginosas, salienta-se a ocorrência de diversos problemas, tanto na extração assim como na recolha do óleo. Quando se utilizou a prensa de parafuso sem fim, ou seja a primeira prensa utilizada, o principal problema neste caso foi o parafuso que esta possuía, uma vez que este era igual em todo o seu comprimento, logo não existia compressão das sementes, apenas moía as sementes e não extraía o óleo que estas continham. O parafuso ideal seria crescente, isto é, deveria começar com uma área grande onde o material poderia passar e no fim do parafuso o deveria haver pouco espaço para passar o material obrigando-o a comprimir, e desta forma, promovendo a extração do óleo.

No caso da prensa de civil, houve a necessidade da construção de uma peça de forma a armazenar as sementes para serem posteriormente esmagadas pelo êmbolo da prensa. Foram realizadas diversas alterações à peça, no entanto, todas elas falharam. Foram aplicadas cargas entre 2500KN a 20KN/s, o que resultou no total esmagamento de extração e à capacidade que as sementes apresentam de absorver novamente o óleo, a captação e coleta do óleo foi praticamente impossível. Como a extração do óleo a partir das sementes oleaginosas não se revelou vantajosa, não tendo sido obtido nenhum resultado optou-se por utilizar óleos virgens (de acordo com as sementes que se utilizaram na prensa, exceto a semente de abóbora) para produzir biodiesel.

4.1.1. Caracterização da matéria-prima quanto ao índice de acidez

Na tabela seguinte pode observar-se os resultados obtidos pelo teste efetuado aos óleos ao índice de acidez, antes da reação de transesterificação.

Tabela 11 – Determinação do índice de acidez

Determinação do índice de acidez				
Amostra	Massa inicial (g)	Concentração da titulação (mol/L)	Volume da titulação (mL)	Índice de acidez (mg KOH/g)
OAU	10,026	0,1	2	1,119
Óleo girassol	20,02	0,1	0,25	0,07
Óleo de amendoim	20,00	0,1	0,14	0,03

Um elevado índice de acidez é traduzido pela presença de um elevado teor de ácidos gordos livres que inviabiliza a utilização do processo de produção do biodiesel a partir de uma transesterificação por via básica. Segundo bibliografia, o valor do índice de acidez não deve ultrapassar os 3mg KOH/g para se produzir o biodiesel a partir do processo mais tradicional [34].

Nos três casos, foi permitido realizar a transesterificação básica visto que o valor de índice de acidez (ácidos gordos livres) está de acordo com a bibliografia.

Na tabela 12 mostra os resultados obtidos no controlo de qualidade do biodiesel nas amostras realizadas, quer dos óleos usados, óleo de amendoim e óleo de girassol:

Tabela 12 - Resultados obtidos das análises de diferentes parâmetros às amostras OAU e óleos vegetais

Amostra	Rendimento (%)	Massa volúmica (Kg/m ³)	Teor em água (mg/Kg)	Índice de acidez (mg KOH/g)	Teor em metanol	Teor Na (mg/Kg)	Teor K (mg/Kg)
Norma 14214		860-900	500mg/Kg	Max. 0,5	Max. 0,2	Max. 5	
OAU	92,56	881	385,4	0,139	0,0125	4,58	1,12
G2) T50°C	71,14	869,7	204,4	0,140	0,0637	91,0	14
A2) T50°C	62,31	890,1	5194,87	0,112	0,0116	134,0	16
G1) Tamb	78,20	899,7	386,17	0,096	0,0521	87,0	17
A1) Tamb	71,50	872,3	750,93	0,266	0,0313	186,0	7
G1) T50°C	88,96	877,4	281,09	0,196	0,0651	83,0	15
A1) T50°C	89,94	875,1	451,53	0,140	0,0106	107,0	18

4.1.2. Rendimento da transformação da matéria-prima em biodiesel

O rendimento da transformação da matéria-prima em biodiesel é bastante importante a nível económico e de forma a aferir a viabilidade técnica do processo. As amostras G2)Tamb e A2)Tamb não foram sujeitas a qualquer tipo de caracterização, uma vez que houve uma grande produção de emulsões (visualizar figura 62), existindo a possibilidade de não ter ocorrido a reação de transesterificação, mas sim saponificação. Este acontecimento poderá ter sido causado devido ao excesso de catalisador (0,8%), uma vez que não existiu um aquecimento prévio, facilitando a ativação do catalisador para acelerar a transformação dos óleos vegetais em biodiesel.

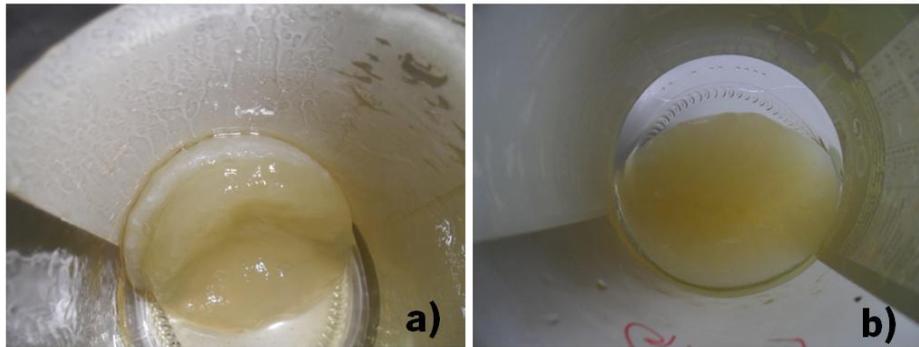


Figura 62 - Emulsões: a) A2)Tamb. e b) G2)Tamb.

O rendimento foi obtido através do volume do óleo usado antes da reação de transesterificação e do volume de biodiesel final obtido. Os óleos usados, G1)T50°C e A1)T50°C foram as amostras que obtiveram um maior rendimento. Constata-se que o processo de transformação do óleo das duas matérias-primas (óleos usados, óleo vegetal de girassol e óleo vegetal de amendoim) em biodiesel e a fase de purificação correram dentro da normalidade. Se observarmos a figura 27 e tabela 8, verifica-se que estas amostras foram as únicas em que obtiveram glicerina. G1)T50°C e A1)T50°C, as amostras com maior rendimento, foram aquelas em que se utilizaram 0,4% de catalisador e em que houve aquecimento prévio das amostras.

As amostras G2)T50°C e A2)T50°C foram as amostras em que se obtiveram piores rendimentos, neste caso, a percentagem de catalisador incorporado foram de 0,8% e houve um pré-aquecimento de 50°C. Quando terminou a reação de transesterificação, estas duas amostras tinha também emulsões, tal como as amostras G2)Tamb e A2)Tamb, mas em menor quantidade. Salienta-se também que estas amostras foram as que necessitaram de um maior número de etapas de purificação, mais propriamente a lavagem, ou seja, necessitaram de mais lavagens que as outras amostras.

Assim, constata-se que temperatura, a percentagem de catalisador e a fase purificação, em especial a fase da lavagem, influenciam no rendimento de transesterificação das amostras. Sendo a fase da lavagem que pode provocar um maior decréscimo de rendimento, pois é nessa fase que pode haver formação de sabões devido ao excesso de catalisador e o próprio biodiesel pode ser arrastado com a água.

4.1.3. Caracterização do biodiesel produzido

4.1.3.1. Massa volúmica

A massa volúmica do biodiesel depende, principalmente, do seu conteúdo em ésteres metílicos e da quantidade restante de metanol, por isso, esta propriedade é influenciada principalmente pela escolha do óleo vegetal, e em certa medida pelas etapas de purificação aplicadas [93].

Assim sendo, esta característica surge com o principal objetivo de restringir algumas matérias-primas, apresentando uma grande influência sobre o desempenho e eficácia na injeção do combustível. A massa volúmica das amostras do biodiesel produzido encontra-se dentro do limite estabelecido pela norma, logo segundo esta característica o biodiesel pode ser utilizado.

4.1.3.2. Teor em água

A água pode estar presente em duas formas, como água dissolvida ou como água dispersa em gotículas. Geralmente o biodiesel é insolúvel em água, no entanto, absorve muito mais água que o diesel. A presença de água pode contribuir para o aumento da acidez, provocando a corrosão de acessórios do sistema de injeção do combustível, afetando o funcionamento do motor. Quando surge a corrosão pode formar substâncias sólidas que formam borra contribuindo para o entupimento dos filtros de combustível. Em suma, o teor em água no biodiesel tem um efeito proeminente na sua degradação, principalmente quando armazenado a temperaturas elevadas e exposto ao ar, refletindo-se numa diminuição da pureza e estabilidade oxidativa.

Alguma quantidade de água pode formar-se durante o processo, através da reação entre os ácidos gordos livres com o catalisador alcalino. Assim, os ácidos gordos livres que se encontram no óleo não foram convertidas em ésteres, mas sim, em sabão (produtos secundários), contribuindo para uma menor concentração de ésteres e uma consequente diminuição de pureza do biodiesel [93]. Durante a fase de purificação, nas lavagens do biodiesel, alguma percentagem de água pode permanecer no biodiesel, aumento assim o teor em água.

Nesse sentido foi importante fazer uma avaliação do combustível ao nível de teor em água. A quantidade de água que amostra do biodiesel possui é a ideal, isto é, encontra-se de acordo com a norma, exceto as amostras A2) T50°C e A1) Tamb.

4.1.3.3. Índice de acidez

O valor do índice de acidez mede o teor de ácidos gordos livres na amostra, logo um elevado índice de acidez traduz um elevado teor de ácidos gordos livres na amostra. É definido como a massa necessária de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos gordos livres na amostra. A acidez é dependente da matéria-prima, neste caso OAU, óleo de girassol e óleo de amendoim, e do processo de produção do biodiesel [93]. O catalisador é bastante sensível ao teor em ácidos gordos livres, para tal, o teor de ácidos gordos livres não deve ultrapassar os 3%. O excesso de ácidos gordos livres pode desativar o catalisador (NaOH), e influencia na formação de sabões e emulsões [34].

O elevado teor de acidez do biodiesel reflete-se no envelhecimento do combustível e no grau de degradação do biodiesel durante a armazenagem. Quanto maior a acidez maior será a degradação, principalmente a temperaturas mais elevadas, provocando também a corrosão no motor [93].

Por tudo isto, a norma estabelece um valor limite, em que o índice de acidez deve ser menor que 0,50 mg KOH/g. Assim sendo, as amostras do biodiesel produzido estão de acordo com a norma, confirmando-se então, que o processo de produção através da reação de transesterificação básica foi bastante eficaz na redução do índice de acidez das matérias-primas, prevenindo também que o biodiesel não se degrade com tanta facilidade.

4.1.3.4. Teor em Metanol

Antes de mais, ponto de inflamação é a temperatura na qual um combustível inflama, quando exposto a uma fonte de calor. A combustão de um álcool (neste caso o metanol que é muito inflamável) na presença de ar pode ser iniciada por uma fonte de intensa energia localizada, tal como uma chama ou uma faísca, e também, através da aplicação de energia por meio de calor e pressão, como acontece no pistão, onde existe compressão e faísca. Uma vez que os álcoois, especialmente metanol, podem ser facilmente inflamados por superfícies quentes, a pré-ignição pode ocorrer.

A eficácia da remoção do metanol usado em excesso está relacionado com a avaliação do ponto de inflamação, pois a presença do metanol baixa significativamente o valor da temperatura de inflamação. O excesso de álcool no combustível pode ainda afetar o motor e os elastómeros, podendo inclusive promover a corrosão dos componentes metálicos. Quando o

ponto de inflamação é baixo, o manuseamento, armazenamento e utilização do combustível tornam-se mais perigosos.

Neste sentido, as amostras estudadas encontram-se dentro do valor normativo, não trazendo qualquer tipo de problema para o biodiesel.

4.1.3.5. Metais alcalinos: Sódio e Potássio

Os metais Sódio e o Potássio referem-se ao grupo de metais I, já o Magnésio e o Cálcio pertencem ao grupo de metais II. Estes metais podem aparecer devido aos catalisadores (KOH, NaOH e/ou CH_3ONa , CH_3OK), sendo estes bastante importantes para que haja produção do biodiesel. Por vezes, apresentam-se em forma de iões (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), uma possível origem para o aparecimento destes iões é o facto de poderem estar contidos na matéria-prima. Os iões em conjunto com a água e óleos residuais provocam a formação de sabões insolúveis, estes podem induzir para um aumento da viscosidade, formação de géis e espumas, e fez com que a separação da glicerina seja mais difícil. As amostras de G2)Tamb, A2)Tamb, G2)T50°C e A2)T50°C foram as amostras em que houve a formação de gel, sendo estas amostras em que se utilizou mais catalisador.

Os sabões podem vir a criar problemas nos motores, formando depósitos que danificam o sistema de injeção. Por outro lado quando a lavagem não é feita de forma eficaz, os catalisadores também se podem encontrar na forma livre no biodiesel, sendo responsável pela ocorrência de fenómenos de corrosão no motor.

De acordo com a norma, a única amostra em que o teor destes elementos que se encontra dentro do limite estabelecido foi no caso dos óleos alimentares usados, já as outras amostras possuem valores muito superiores aos permitidos pela norma, tornando um entrave para o uso deste biodiesel, uma vez que a lavagem das amostras não foram eficazes ficando de forma livre o catalisador. Nesse sentido, uma forma de minimizar esses valores é aumentando o número de lavagens, e de forma mais eficazes.

De um modo geral, após o estudo de parâmetros analisados a amostra que se encontra de acordo com a norma é de óleos alimentares usados. O principal problema nas restantes amostras é no teor em sódio e potássio, tornando-se um entrave para ser utilizado como biocombustível.

4.2. Macroalgas – Algas Marinhas da orla costeira da zona norte Portugal

As principais etapas estudadas para a obtenção de biodiesel a partir das macroalgas englobaram a recolha, a identificação e a limpeza da matéria-prima, as formas possíveis de extração de óleo e as etapas necessárias à sua transformação em biodiesel. Foram muitos os ensaios que se realizaram numa tentativa de extrair o óleo. Como já referido anteriormente, tanto o sargaço como a bodelha, foram submetidos a processos de trituração e/ou de esmagamento por distintos métodos que englobaram a prensa mecânica e recurso a dois tipos de moinhos de lâminas. A secagem das algas foi sempre assegurada ao sol. No entanto para testar o efeito de secagem, em alguns dos métodos de ensaio foi testada a secagem em estufa por períodos de 2 e de 8 dias (105°C). Foi igualmente verificada a influência do tipo de solvente (hexano e tolueno), bem como a sua forma de adição (soxhlet, adição única e adição em várias fases) na extração de óleo.

A tabela 13 exhibe as condições e respetivo rendimento obtido de cada ensaio realizado ao sargaço e à bodelha.

Tabela 13 – Condições operacionais e respetivo rendimento de extração de óleo obtido nos diferentes ensaios realizados ao sargaço e à bodelha²⁰

Nº do ensaio	Alga	Método de esmagamento /trituração	Secagem	Solvente (ml)	Método de adição de solvente	Rendimento (%)
1	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Tolueno 250ml	Soxhlet	2,87
2	Sargaço 9,90g	Prensa	Sol	Tolueno 20ml	Adição única	4,78
3	Sargaço 9,99g	Prensa	Sol	Hexano 20ml	Adição única	3,44
4	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	26,38
5	Sargaço 10,00g	Prensa	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	1,63
6	Bodelha 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 50 +50	Adição em várias fases	4,43
7	Sargaço 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	4,49
8	Sargaço 10,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 50 +50	Adição em várias fases	0,06

²⁰ Continuação da tabela na página seguinte

Continuação da tabela 13, da página anterior - Condições operacionais e respetivo rendimento de extração de óleo obtido nos diferentes ensaios realizados ao sargaço e à bodelha

Nº do ensaio	Alga	Método de esmagamento /trituração	Secagem	Solvente (ml)	Método de adição de solvente	Rendimento (%)
9	Sargaço 10,08g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	16,37
10	Sargaço 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	5,19
11	Sargaço 50,11g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Tolueno 150 + 150	Adição em várias fases	0,14
12	Bodelha 50,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Tolueno 150 + 150	Adição em várias fases	1,42
13	Sargaço 10,03g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	12,66
14	Sargaço 10,07g	Moinho de lâminas 1	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	0,62
15	Bodelha 10,07g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	0,57
16	Bodelha 10,08g	Moinho de lâminas 1	Sol	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	1,24
17	Bodelha 10,14g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	0,89
18	Bodelha 10,03g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	0,55
19	Bodelha 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	0,25
20	Sargaço 10,01g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 8 dias	Tolueno 50 + 50	Adição em várias fases	0,12
21	Sargaço 102,08g	Moinho de lâminas 1	Sol	Hexano 250 + 250	Adição em várias fases	0,16
22	Bodelha 10,07g	Moinho de lâminas 2	Estufa – 2 dias	Hexano 50 + 50	Adição em várias fases	1,00
23	Bodelha 120,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano 250 + 250	Adição em várias fases	0,06
24	Bodelha 150,00g	Moinho de lâminas 2	Sol	Tolueno 300 + 300	Adição em várias fases	0,71

Com os ensaios realizados tentou-se perceber de que forma a secagem, a trituração/esmagamento (ou seja, a preparação mecânica), o tipo de solvente e o método de adição do mesmo influenciam a taxa de extração do óleo.

No gráfico 63 podem-se observar os resultados do rendimento da extração do óleo a partir do sargaço, obtidos após esmagamento na prensa e posterior extração química com duas tipologias de solventes. Para ambos os solventes foram testados diferentes formas de adição.

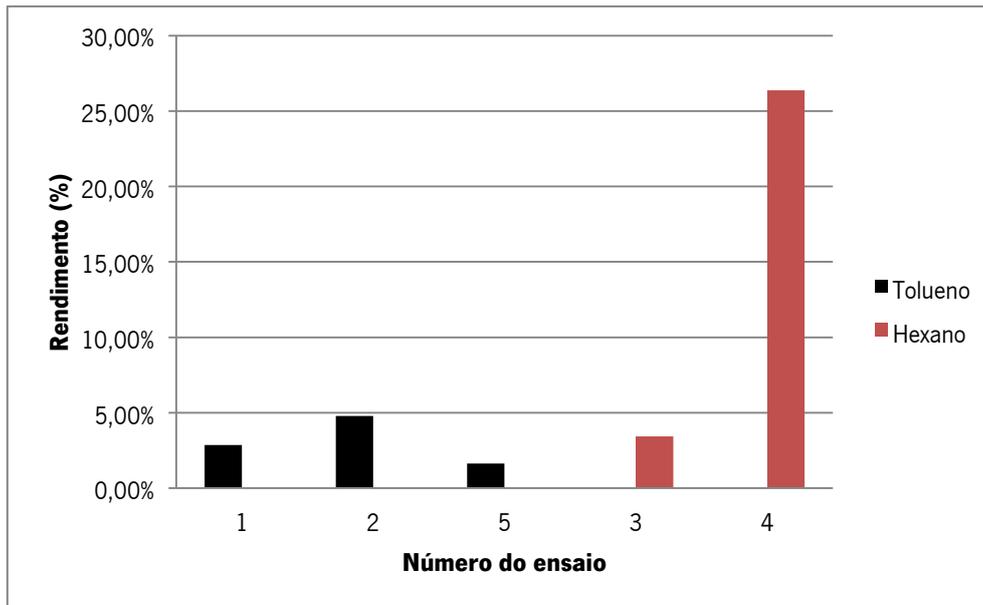


Figura 63 – Rendimento obtido dos ensaios realizados ao sargaço, por esmagamento com a prensa, e respectivo solvente utilizado e formas de adição do mesmo.

No que respeita ao rendimento de extração, verifica-se que genericamente, o hexano apresenta rendimentos à extração superiores ao tolueno. Neste caso, a extração com hexano obteve um rendimento máximo de 26% (ensaio 4), já o tolueno obteve um rendimento de extração máximo de 4,78% (ensaio 2). Relativamente ao método de adição de solventes constata-se que no ensaio 4 (adição de solventes em várias fases) foi mais eficaz que os restantes métodos de adição do solvente (soxhelt e método de adição única) na extração do óleo de sargaço, utilizando o hexano como solvente. No entanto nos ensaios que utilizaram o tolueno como solvente de extração verifica-se que o ensaio número 2, correspondente à adição única de solvente, foi mais eficaz que os restantes métodos testados tendo-se obtido um rendimento de extração de 4,78%. Tendo em conta a discrepância de resultados entre os solventes hexano e tolueno, constata-se que o melhor método para extração do óleo do sargaço é o correspondente ao ensaio 4, ou seja, esmagamento pela prensa mecânica, secagem ao sol e utilização do hexano em várias fases de adição. Conforme se pode constatar na figura 65, a) corresponde ao ensaio 2, b) corresponde ao ensaio 3) e c) corresponde ao ensaio 4, além de melhor rendimento obteve-se óleo no estado líquido (possui maior percentagem de ácidos gordos insaturados).

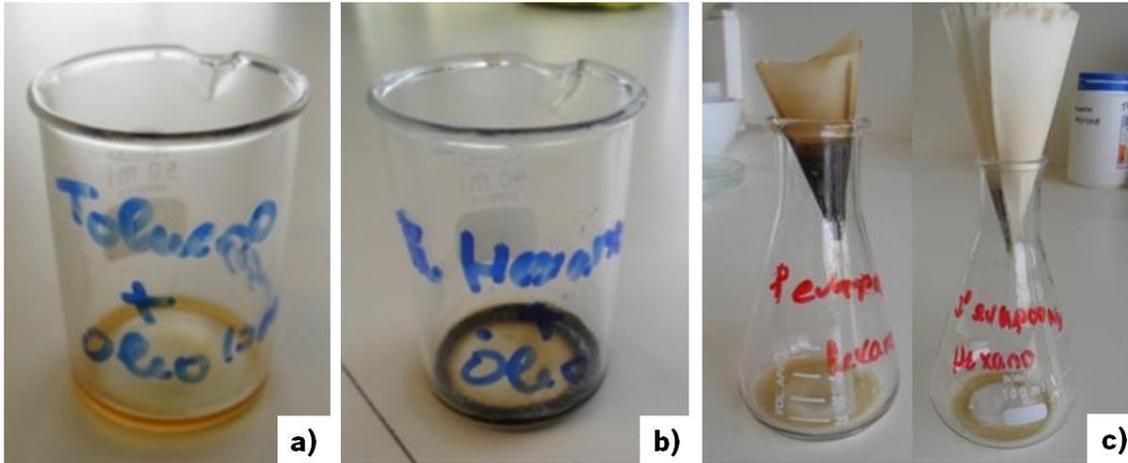


Figura 64 – Observação do óleo formado a partir do sargaço submetido a diferentes condições de extração: a) ensaio 2; b) ensaio 3; c) ensaio 4.

Na figura 65 e 66 são apresentados os resultados de extração do óleo do sargaço submetido a trituração em moinho de lâminas 2, e submetida à adição de diferentes tipologias de solventes. Estes ensaios foram realizados em condições de secagem distintas.

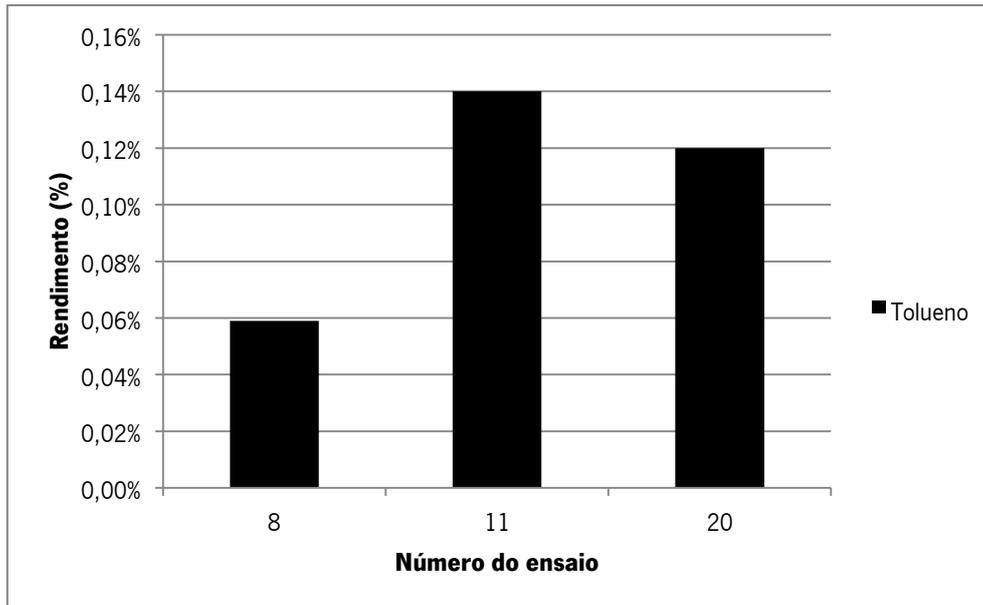


Figura 65 - Rendimento obtido dos ensaios realizados ao sargaço, triturado com o moinho de lâminas 2 e utilizando o tolueno como solvente (adição em várias fases).

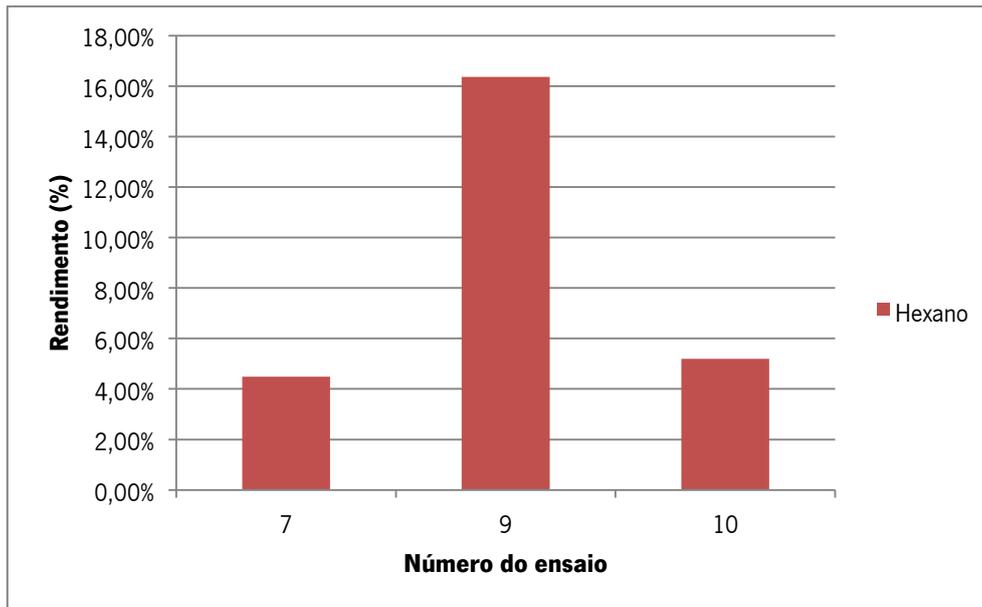


Figura 66 - Rendimento obtido dos ensaios realizados ao sargaço, triturado com o moinho de lâminas 2 e utilizando o hexano como solvente (adição em várias fases).

Verifica-se mais uma vez que o tolueno apresenta rendimentos de extração inferiores ao hexano. O objetivo da realização destes ensaios visa avaliar o melhor método de secagem, mantendo como constantes do processo a preparação por moinho de lâminas 2, o tipo de solvente e o método de adição (adição em várias fases). Constatou-se que o ensaio 9, correspondente à secagem na estufa durante 8 dias apresenta um rendimento de extração superior que aos restantes métodos de secagem estudadas, tendo-se obtido uma taxa de extração de 16%. Na figura 67 observa-se algum óleo extraído nestas condições, no entanto, devido à recuperação de baixa quantidade de óleo, seria impossível proceder à tentativa de produção do biodiesel, a partir do mesmo.



Figura 67 - Observação do óleo formado a partir do sargaço, triturado pelo moinho de lâminas 2, seco durante 8 dias na estufa, utilizando o hexano como solvente durante várias fases.

A figura 68 mostra os resultados de extração do óleo da bodelha obtidos pela trituração (moinho de lâminas 2) com o hexano e tolueno como solventes. Nota-se mais uma vez a diferença no rendimento obtido em função do solvente utilizado, correspondendo ao hexano as taxas superiores de extração.

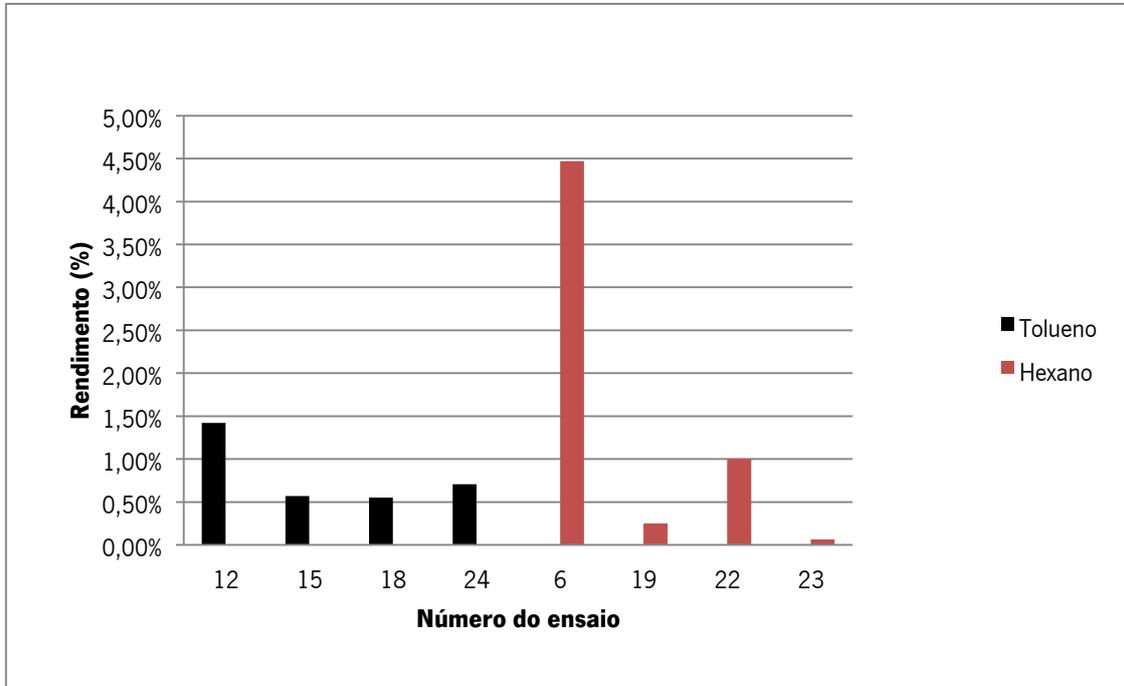


Figura 68 - Rendimento obtido dos ensaios realizados à bodelha, triturada com o moinho de lâminas 2 e respetivo solvente utilizado (adição em várias fases).

Os ensaios que possuem um maior rendimento são o ensaio 6 e 12 (seca durante 2 dias na estufa). No ensaio 6, a bodelha foi seca ao sol e o solvente utilizado foi o hexano, neste caso, como se pode constatar na figura 69 a) e b) obteve-se óleo no estado líquido (possui maior teor ácidos gordos insaturados). Relativamente ao ensaio 12, a bodelha foi sujeita a uma secagem durante dois dias na estufa e o solvente utilizado foi o tolueno, que aparentemente foi possível obter óleo no estado líquido mas num estado mais viscoso, como se pode constatar na figura 69c).

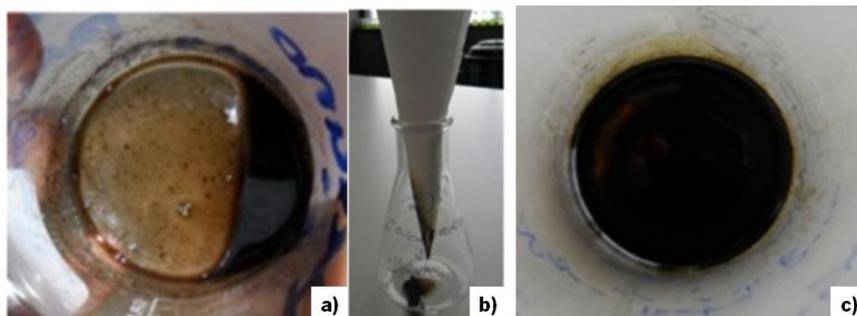


Figura 69 – Observação do óleo formado a partir da bodelha triturada pelo moinho de lâminas 2, onde se obteve maior rendimento: a e b) ensaio 6 (hexano) e c) ensaio 12 (tolueno)

Ao comparar-se o sargaço e a bodelha no mesmo tipo de trituração, ou seja moinho de lâminas 2, os ensaios onde se obtiveram maior rendimento no foi ensaio 6 para a bodelha e ensaio 9 para o sargaço (figura 66). Diferindo entre eles a forma de secagem, em que no ensaio 6 a bodelha foi seca ao sol e no ensaio 9 o sargaço foi sujeito a uma secagem de 8 dias na estufa. Verificou-se que com o ensaio 6 obteve-se um rendimento menor e que o óleo obtido foi um pouco diferente relativamente ao ensaio 9, apresentando-se mais viscoso e própria cor também foi diferente, uma vez que no caso do sargaço apresentou uma cor acastanhada e no caso da bodelha parecia quase preto.

Pela comparação entre as duas espécies de macroalgas constatou-se que o sargaço apresenta melhores rendimentos de extração do que a bodelha. Ao analisar a imagem seguinte (ver figura 70), que relaciona o tipo de secagem com espécie de algas marinhas, quando utilizado o moinho de lâminas 2 como forma de trituração. Para a construção do gráfico utilizou-se os resultados obtidos com o solvente hexano por ser aquele à qual correspondem as maiores taxas de rendimento.

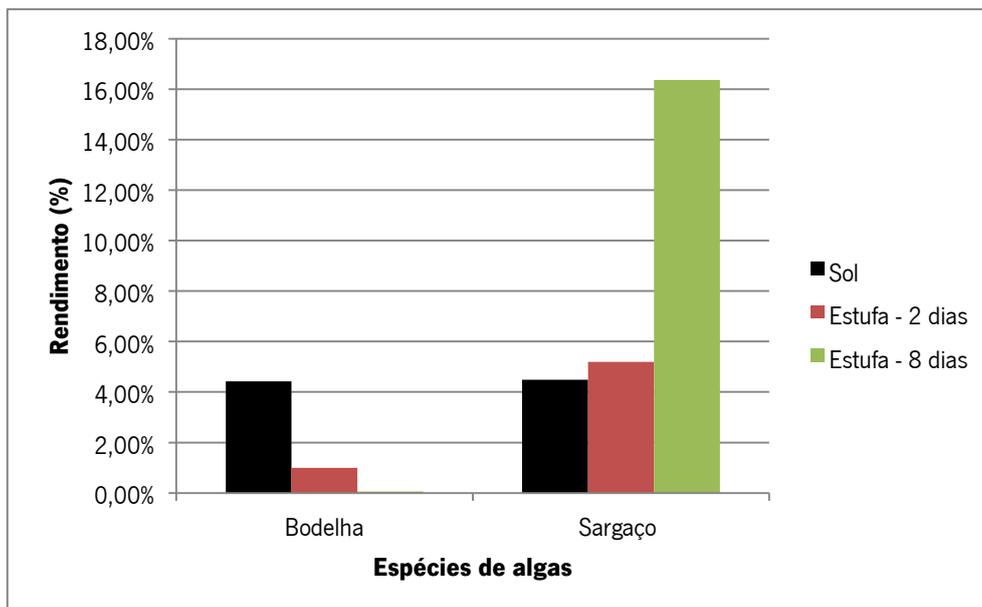


Figura 70 – Relação entre o tipo de secagem e o rendimento obtido dos ensaios realizados as algas marinhas, triturada com o moinho de lâminas 2 e submetidos à adição de hexano com adição em várias fases.

É de notar que existe uma inversão do comportamento na extração do óleo de uma alga em relação à outra, dependendo tipo de secagem. No caso da bodelha, quando a secagem foi feita à luz solar, houve uma melhor extração, há medida que a bodelha ficava mais seca mais difícil foi extrair o óleo, isto é, notou-se uma diminuição da extração do óleo com secagem mais

efetiva. Relativamente ao sargaço acontece o inverso, à medida que se aumento o tempo de permanência de secagem, isto é, à medida que ficava mais seca existia um maior rendimento na extração do óleo. Verificando assim que a extração está dependente do tipo de secagem das algas, e dentro do mesmo método de secagem em função da própria espécie de alga.

Na figura 71 pode observar-se os resultados obtidos tanto do sargaço como da bodelha utilizando como trituração o moinho de lâminas 1 e extração por solvente.

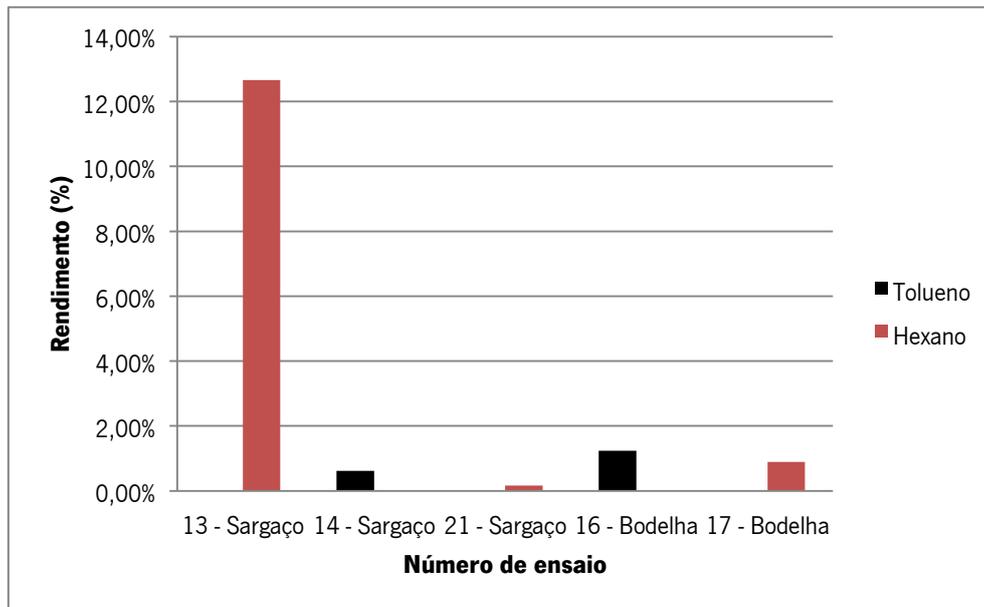


Figura 71 - Rendimento obtido dos ensaios realizados às algas marinhas, triturada com o moinho de lâminas 1 e respetivo solvente utilizado, sempre com adição em várias fases.

Os ensaios apresentados, algas marinhas foram secas ao sol e o método de adição do solvente foi o método 3, ou seja, adição de solvente em várias fases. Mais uma vez o sargaço obteve melhores resultados do que a bodelha e mais uma vez o hexano apresentou-se como melhor solvente, com taxas de extração superiores. O ensaio que possui um maior rendimento de extração foi o 13, neste caso o sargaço foi a alga marinha utilizada, a secagem foi feita ao sol e utilizou-se o hexano como solvente. Relativamente à alga marinha bodelha, o ensaio 16, foi o que obteve maior extração de óleo, ensaio no qual se utilizou solvente tolueno e secagem ao sol. No geral, o poder de extração com este tipo de equipamento de trituração foi muito baixo com valores inferiores a 0,14%, significativamente mais baixos do que as outras formas de esmagamento/trituração.

Na figura 72 e 73, pode observar-se o gráfico com todos os ensaios realizados ao sargaço, para comparando o tipo de influência do solvente utilizado.

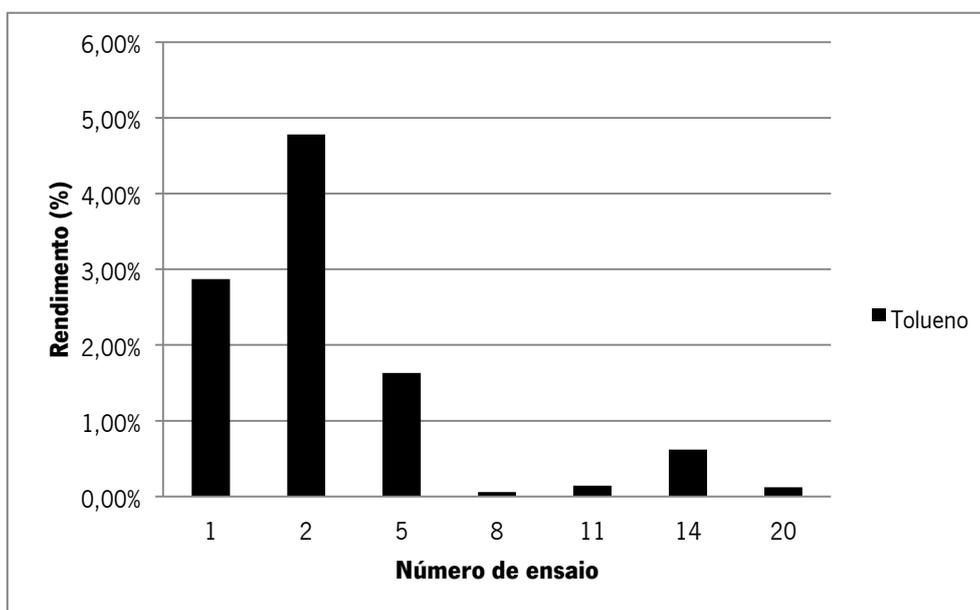


Figura 72 – Rendimento de todos os ensaios realizados ao sargaço utilizando o tolueno como solvente.

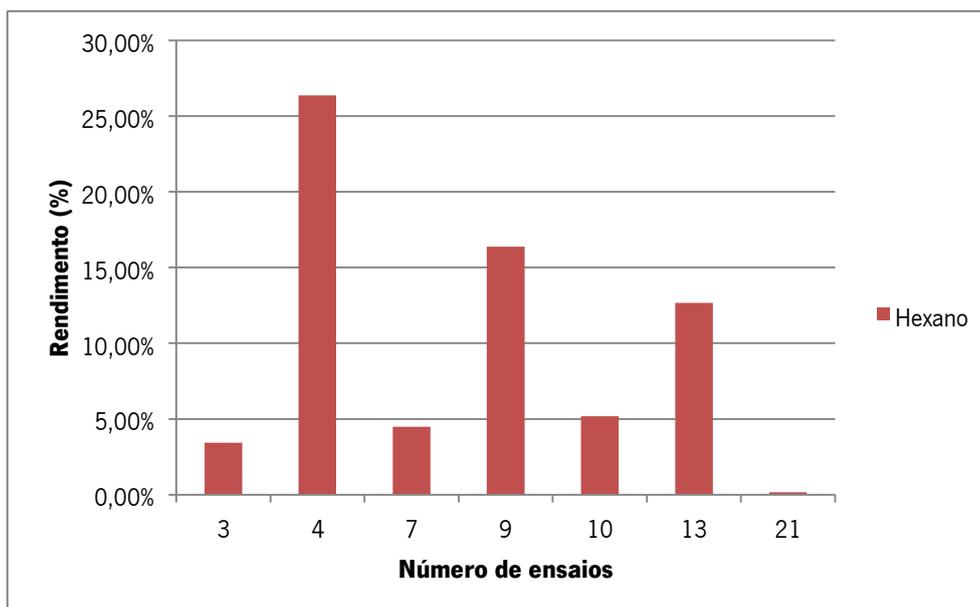


Figura 73 – Rendimento de todos os ensaios realizados ao sargaço utilizando o hexano como solvente.

Em suma, os ensaios onde se obtêm uma maior percentagem de variação de massa, percentagem de óleo, relativamente ao sargaço, é o ensaio número 4, no qual o mecanismo de trituração foi a prensa, a secagem foi realizada à luz solar e o solvente utilizado foi o hexano. O tolueno não constitui um bom solvente para extração do óleo do sargaço.

Na figura 74 pode observar-se o óleo extraído dos ensaios 4 e 9, ensaios onde se obteve melhores resultados para o sargaço. No primeiro ensaio a secagem foi realizado ao sol, o método de trituração a prensa, já no segundo caso a secagem foi de oito dias na estufa e o método de trituração foi de moinho de lâminas 2. Em ambos os casos utilizou-se o hexano como solvente.

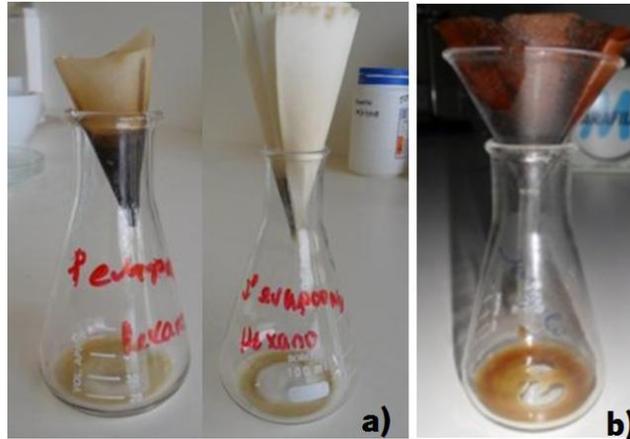


Figura 74 – Resultado final dos ensaios realizados ao sargaço onde obteve máximo rendimento: a) ensaio 4 e b) ensaio 9

Nos dois casos foi possível obter mesmo óleo, Segundo Maceiras, o único artigo encontrado que está direcionado para as algas marinhas e utiliza o sargaço como matéria-prima, indica que a maior percentagem obtida de óleo foi de 3,5 % massa. O autor [53] utilizou como método de extração do óleo o Soxhlet, com 1000g de sargaço seco e 2,5L de hexano, e possuía um sistema acoplado para realizar a transesterificação. Apesar do processo de extração ser diferente do referido no artigo, neste caso o valor foi superior ao dito no artigo (26% - ensaio 4).

Na tabela 14, pode ver-se a relação entre a biomassa e o solvente necessário para se conseguir extrair cerca de 200g e 2 toneladas de óleo a partir do sargaço. Como se pode constatar, seria necessária uma quantidade grande de solvente e algas marinhas para se atingir estes níveis de óleo. O processo de obtenção de 200g de óleo não foi concretizado na prática devido principalmente à falta de meios e à excessiva matéria-prima e solventes necessários ao processo.

Tabela 14 – Previsão da relação do sargaço/hexano para obtenção de óleo

Sargaço biomassa (g)	Volume do hexano (ml)	Massa de óleo obtido (g)
Ensaio 4		
10,000	100	2,638
758,15	7581	200
$7,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^7$	2×10^6

No caso da bodelha, observar a figura 75, acontece o mesmo que no sargaço, o melhor resultado obtido no ensaio número 6, sendo o moinho de lâminas 2 o meio de trituração usado para a preparação das algas, a secagem realizada ao sol e o solvente utilizado o hexano.

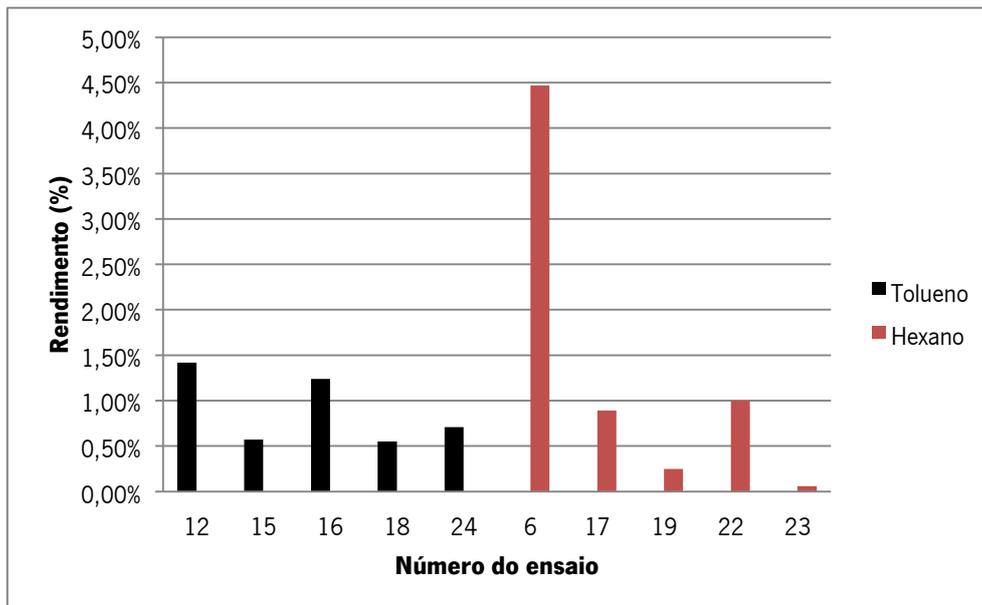


Figura 75 - Rendimento de todos os ensaios realizados à bodelha e respectivo solvente.

Relativamente à Bodelha não existe referências na literatura que permita compara com os resultados obtidos no presente trabalho. Constituindo assim uma mais valia para utilização das macroalgas.

Fez-se igualmente a previsão do material necessário (visualizar tabela 15), para produzir 200g e 2 toneladas de óleo a partir da bodelha tendo como base de cálculo os resultados obtidos no ensaio 6, ensaio que conduziu à maior percentagem de extração.

Tabela 15 – Previsão de relação de bodelha/Hexano para obtenção de óleo

Bodelha biomassa (g)	Hexano volume (ml)	Massa de óleo obtido (g)
Ensaio6		
10,003	100	0,448
4470	44692	200
4,5x10 ⁷	4,5x10 ⁸	2x10 ⁶

No geral, verificou-se que as algas marinhas estudadas possuem baixa percentagem de óleo na sua composição, e que a extração do mesmo é tecnicamente difícil. No entanto, os resultados obtidos são, para sargaço, significativamente superiores aos referidos na literatura. Foi ainda possível verificar que o sargaço possui uma maior percentagem de óleo em relação à bodelha. Em ambos os casos, nota-se que o tolueno não é um bom solvente para extrair óleo, sendo mais indicado o hexano.

Na tabela 16, mostra um resumo dos melhores resultados obtidos, para o sargaço e bodelha, e quais as condições utilizadas.

Tabela 16 - Condições ótimas de valorização de extração de óleo das algas estudadas

Alga	Método de esmagamento/trituração	Secagem	Solvente	Método de adição de solventes
Sargaço	Prensa	Sol	Hexano	Adição em várias fases
Bodelha	Moinho de lâminas 2	Sol	Hexano	Adição em várias fases

4.3. Microalgas

As microalgas selecionadas para este projeto foram a *Chlorella emersonii* (C.E.) e *Botryococcus braunii* (B.B.). Estas microalgas são organismos unicelulares e pertencentes ao grupo Chlorophyceae. O metabolismo destas microalgas é denominado de autotrófico e as suas paredes celulares são compostas por lípidos e ácidos gordos. As microalgas selecionadas, C.E. e B.B. possuem, de acordo com o autor Mata, uma elevada percentagem de óleo, cerca de 25,0-63,0% e 25,0-75,0% [39], respetivamente. Para que se concretize o crescimento das microalgas, alguns parâmetros operacionais têm de ser assegurados, nos quais se incluem, temperatura, luz, agitação, CO₂ e nutrientes.

As microalgas necessitam de sol para se desenvolver, e Portugal é um dos países da Europa com maior disponibilidade de radiação solar. Todavia como é normal o número de horas de exposição solar varia de acordo com a estação do ano. O verão é o período de tempo com mais horas de sol, cerca de 15h, já o inverno é o período de tempo com menos horas cerca de 9h. O mesmo acontece com a temperatura, no verão a média de temperatura é de cerca 30°C, já no inverno a temperatura média é de 15°C, o que influencia o crescimento das microalgas.

Neste trabalho, o estudo do crescimento das microalgas foi iniciado no inverno pela colocação de Schoot semi-abertos junto de uma janela. Porém verificou-se que não existia grande desenvolvimento das mesmas, sendo a principal causa as baixas temperaturas registadas (as temperaturas indicadas para o crescimento rondam entre 25-35°C) e a luz existente. Os principais problemas quando as microalgas são cultivadas num sistema semi-aberto são: sofrerem frequentemente taxas de crescimento inconstantes; ficaram mais suscetíveis à invasão de microorganismos endógenos (microorganismos externos que podem destabilizar o crescimento das microalgas pela competição pelo substrato); serem significativamente influenciadas pelas condições meteorológicas (temperatura e luz).

Com isto houve necessidade de recorrer à luz artificial, numa sala de crescimento para potencializar o crescimento da biomassa algal, com temperaturas constante a rondarem os 25°C e com luz permanente para a realização da fotossíntese. Sempre que as condições atmosféricas o permitiram as microalgas foram colocadas à luz solar.

Neste sistema, as microalgas possuíam um arejamento passivo (resultante do diferencial entre a pressão atmosférica e a pressão exercida pela libertação do gás das microalgas) e eram

agitadas manualmente. Desta forma promoveu-se a troca de gás entre o meio de cultura e o ar, assegurando o CO₂ necessário para a fotossíntese e a libertação do oxigénio produzido na mesma. A agitação promovia também uma difusão mais completa do substrato para as microalgas. No entanto esta agitação manual dos frascos Schoot não se revelou suficiente, pois apenas era realizada em média uma vez por dia.

No decorrer do crescimento foi efetuada a medição do pH, tendo-se registado para este parâmetro valores compreendidos entre 7 e 9, em concordância com a bibliografia [73]. Esses valores não se alteraram muito uma vez que as microalgas estavam expostas ao ar livre, havendo sempre entrada de dióxido de carbono e saída de oxigénio, não se verificando também potencial oxidação do meio.

A repicagem das microalgas é uma atividade importante no controlo de um processo de crescimento de biomassa algal. Esta técnica permite rejuvenescer a cultura, pois uma porção das microalgas é adicionada num meio de cultura novo, o que induz o crescimento da biomassa. Por outro lado, a repicagem das microalgas permite controlar os possíveis organismos contaminantes ou competidores e as possíveis contaminações do meio. Desta forma, obtém-se culturas mais puras. Apesar de as microalgas crescer facilmente foi importante ter atenção a algumas condições operacionais, nomeadamente: agitação, arejamento, pH, meio de cultivo (nutrientes) e luz.

As microalgas precisam de luz para realizarem a fotossíntese, elas assimilam carbono inorgânico para converter em matéria orgânica. A luz é a fonte de energia que dirige esta reação, por isso torna-se importante perceber de que forma é que a luz (luz solar ou luz artificial), influencia o crescimento das microalgas.

Neste sentido, foram realizados ensaios laboratoriais, com objetivo de perceber qual a melhor condição operacional, para o crescimento das microalgas, ou seja, tendo como opção a luz solar ou a luz artificial. A evolução da taxa de crescimento foi efetuada por análises de sólidos totais, sendo estes realizados no verão. Este método pode ser utilizado como forma indireta de determinar o crescimento das microalgas. No entanto, é importante referir, que a sua determinação baseia-se na análise aos sólidos totais que uma amostra contém, por isso podem ser contabilizados células vivas, mortas ou compostos solubilizados no meio. Para o efeito, o ensaio foi realizado com as duas espécies de microalgas, estudadas no âmbito do presente

trabalho C.E. e B.B., quer à luz solar, quer à luz artificial (na sala de crescimento). Durante 25 dias foram realizadas várias colheitas de amostras para posteriormente realizar-se o ensaio.

Na figura 76 e 77 são apresentados os gráficos de “crescimento” da C.E. e da B.B. tanto à luz solar como à luz artificial.

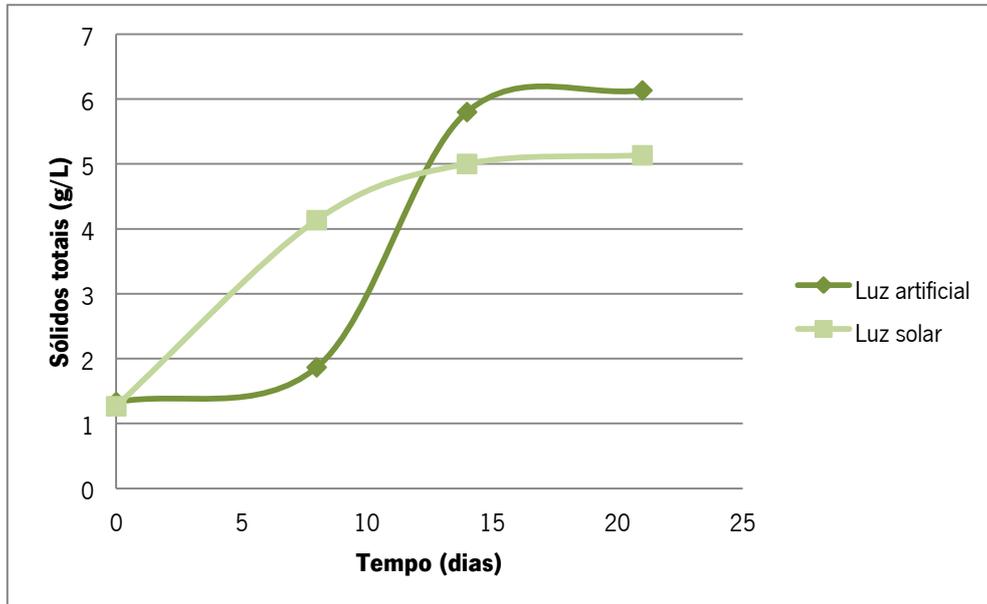


Figura 76 - Crescimento das microalgas B.B., em condições de luz solar e luz artificial, em sistema semi-aberto.

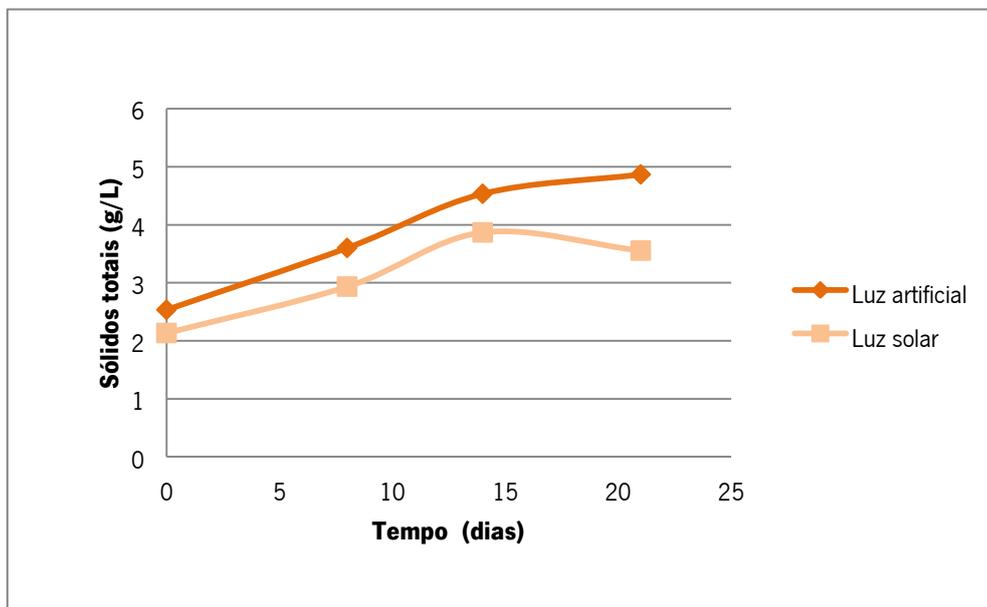


Figura 77 – Crescimento das microalgas C.E., em condições de luz solar e luz artificial, em sistema semi-aberto.

Ao observa-se a figura 76, ou seja, relativamente à C.E., verifica-se que estas iniciam um crescimento com concentração inicial idêntica mas que com o decorrer do tempo de ensaio

apresentam um comportamento diferente dependendo da luz aplicada, sendo que neste caso existe um maior crescimento na presença da luz artificial do que na luz solar. O mesmo acontece na figura 77, que compara a microalga B.B. com o crescimento efetuado à luz solar como à luz artificial.

No caso da C.E. à luz artificial, constata-se uma elevada proximidade entre a curva obtida nos ensaios laboratoriais e a taxa de crescimento das algas em cultura de acordo com as referências bibliográficas, conforme pode ser visto no capítulo 2, na página 42 (figura 19). Neste gráfico é possível observar as diferentes fases de crescimento das microalgas, desde a fase de indução ou lag (onde existe uma adaptação da microalga ao meio de cultivo e meio envolvente), a fase de crescimento exponencial ou log (dá-se o início da divisão celular, isto é, a biomassa começa a crescer, a nível exponencial). Relativamente à curva obtida da C.E. à luz solar, nota-se que existe um crescimento mais rápido, por exemplo, no dia 8, C.E. à luz solar possuía um valor de sólidos totais de 4,0 g/L já o valor de sólidos totais no mesmo dia, C.E. à luz artificial, era de 2,0 mg/L. No entanto, quando termina o ensaio, a quantidade de sólidos da C.E. à luz artificial é maior do que C.E. à luz solar. A explicação para esta situação prende-se no fato, no caso da luz solar o crescimento é interrompido num menor tempo de operação, ou seja, a fase estacionária começa mais cedo. Nesta situação a taxa de crescimento é compensada pela taxa de mortalidade, não ocorrendo um aumento na população algal. Isto devido à exaustão de nutrientes, a diminuição do CO₂ ou do O₂ no meio.

No caso da C.E. à luz solar o crescimento dá-se de uma forma crescente, aqui durante todo o tempo de operação os sólidos totais no caso da luz artificial foi sempre mais elevado que o ensaio de cultivo à luz solar. Este fato deve-se essencialmente à elevada exposição à luz, no caso do cultivo das microalgas à luz artificial.

De acordo com a análise à bibliografia, referida na figura 17 do capítulo 2 da presente dissertação, a C.E apresenta uma taxa de crescimento diário muito baixa de 0,036-0,041 g/L/dia, já a B.B. possui 0,02 g/L/dia, um pouco mais baixo. Através da figura 78 é possível observar a taxa de crescimento obtidas para os dois tipos de microalgas, com distintas condições de luminosidade. Neste caso o parâmetro indicador do crescimento é dado pelos sólidos totais em função do tempo, no fundo uma taxa de crescimento.

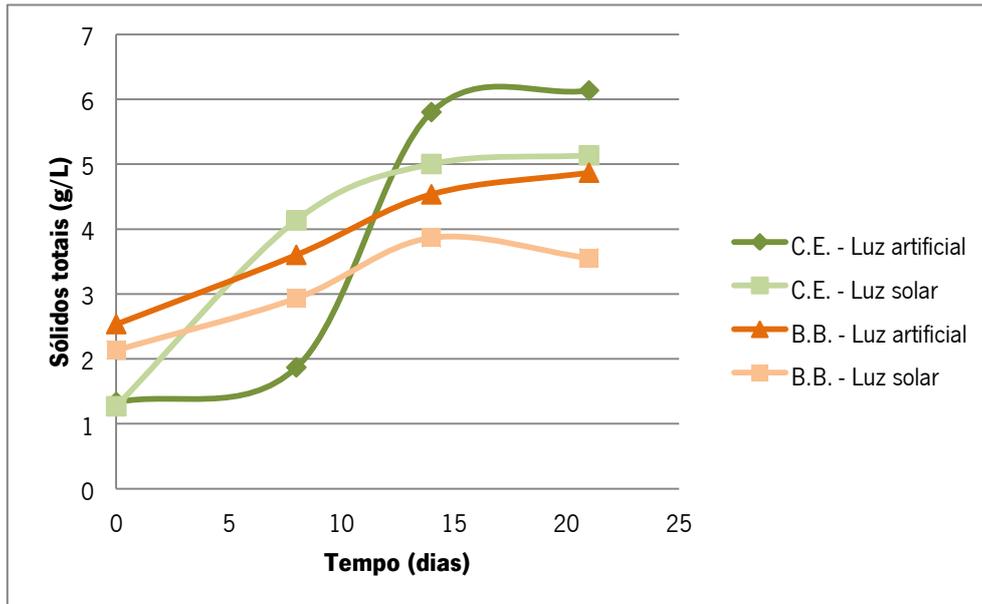


Figura 78 – Todos ensaios de sólidos totais realizados à C.E. e B.B. em sistemas semi-aberto.

Através da análise ao gráfico pode-se observar que apesar de a C.E. começar com um valor de sólidos totais inferior ao da B.B., ao longo do tempo de operação, existe um maior crescimento por parte da C.E. do que a B.B. Tanto à luz solar como luz artificial, constata-se que a C.E. obteve um crescimento superior à B.B. ou seja, conclui-se que apresenta uma taxa de crescimento superior.

No geral, observa-se um ligeiro aumento dos sólidos totais da C.E. e B.B. quando se encontravam na presença da luz artificial. Um dos fatores para este aumento dever-se-á ao facto da sala de crescimento ter condições constantes, isto é, a temperatura e a luz encontravam-se estáveis, a luz estava constantemente ligada assim como a temperatura que rondava os 25°C.

Mas mesmo assim, com esses cuidados, a quantidade de biomassa produzida não era suficiente para a posterior produção de biodiesel, mesmo encontrando-se na sala de crescimento. Como foi referido, utilizou-se um fotobioreator, desenhado e construído com o objetivo aumentar e fomentar o crescimento das microalgas. Nos ensaios realizados ao crescimento das microalgas em sistemas semi-abertos, concluiu-se que a C.E. apresentou taxas de crescimento superiores à B.B. Por isso, a realização dos ensaios de crescimento no fotobioreator compreendeu a utilização desta cultura em detrimento da B.B.

Comparativamente com os ensaios em sistema semi-aberto, observou-se diferenças relativamente ao nível de aumento de biomassa, isto devido ao facto de as microalgas estarem

em constante agitação e de ser injetado o CO_2 necessário para a fotossíntese, para produzirem o seu alimento. Adicionalmente, neste tipo de sistemas, as condições de cultivo são mais bem controladas do que no caso de sistemas abertos, fornecendo uma melhor proteção contra invasão agentes externos.

Foram consideradas duas situações operacionais (sendo que a diferença entre elas consiste no número de motores). Tanto na primeira como na segunda situação experimental foram realizadas várias recolhas de amostras do material produzido no fotobioreator realizaram-se os respetivos ensaios de sólidos totais e determinação da densidade ótica.

Observando o gráfico da figura 79 é possível verificar que existe alguma discrepância de valores dos sólidos totais, que pode estar relacionado com a geometria retangular do equipamento, pois apesar de se ter colocado motores para induzir agitação, devido ao formato do reator, alguma biomassa permaneceu agregada nos vértices do reator, o que poderá induzir algum erro na amostragem e por consequência nos resultados obtidos.

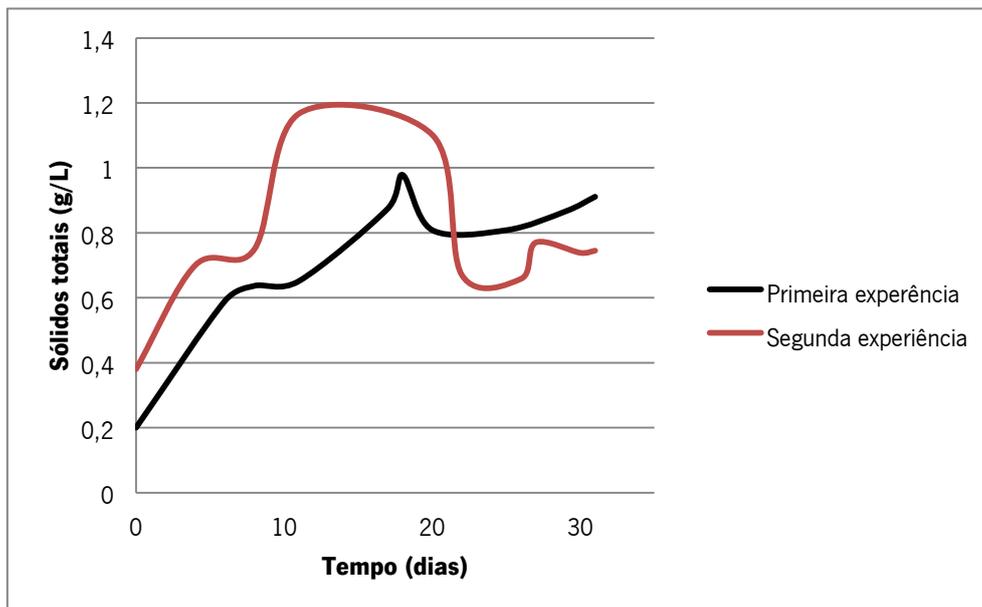


Figura 79 – Resultados obtidos dos sólidos totais realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na primeira e na segunda experiência.

Apesar da existência dessas discrepâncias entre os valores verifica-se que existe aumento da biomassa, no entanto as curvas de obtidas não têm um comportamento de crescimento similar ao exibido pela figura 19, do capítulo 2, da presente dissertação onde é possível identificar os diferentes patamares de crescimento.

O que se pode verificar com estas duas experiências é que a agitação é muito importante para o desenvolvimento das microalgas, pois vejamos: ao examinar a primeira experiência observa-se que de um modo geral os sólidos totais aumentaram sempre ao longo do tempo, podendo concluir-se que possivelmente o meio nutritivo ainda não se tinha esgotado pois se os sólidos totais apresentam um crescimento constante, significa que a biomassa também está a aumentar logo o meio nutritivo ainda se encontra disponível.

Relativamente à segunda experiência observa-se um crescimento das culturas bastante diferente que no primeiro caso. No segundo ensaio constata-se um crescimento rápido da cultura, seguido de uma fase pseudo-estacionária e seguida de uma fase de decaimento. No mesmo período de tempo (nomeadamente ao décimo quinto dia) verifica-se que no segundo ensaio existe uma concentração superior de microalgas. As diferenças entre o primeiro ensaio e o segundo podem estar relacionados com aumento do número de motores, isto é, de um ensaio para outro, aumentou-se o número de motores, logo existe um aumento de agitação das microalgas e do meio nutritivo. Estas condições operacionais aumentam a área superficial de nutrientes disponíveis para as microalgas assim como uma maior penetração da luz, ou seja, todas as microalgas encontravam-se em contacto com o meio nutritivo e com acesso à luz. Com estas vantagens, a atividade fotossintética das microalgas aumentou mais rapidamente, até ocorrer o esgotamento do meio nutritivo, que neste caso aconteceu a partir do vigésimo (20) dia de operação. Após o esgotamento do meio nutritivo, as microalgas iniciaram a fase de senescência ou morte celular.

De forma a estimar apenas o crescimento das microalgas foi realizada a análise à densidade ótica. Este ensaio por norma será mais fiável que os sólidos totais, uma vez que neste caso a determinação apenas tem em consideração a biomassa viva.

No gráfico seguinte, figura 80, pode comparar-se os resultados obtidos quer pela densidade ótica quer dos sólidos totais referentes à primeira experiência no fotobioreator.

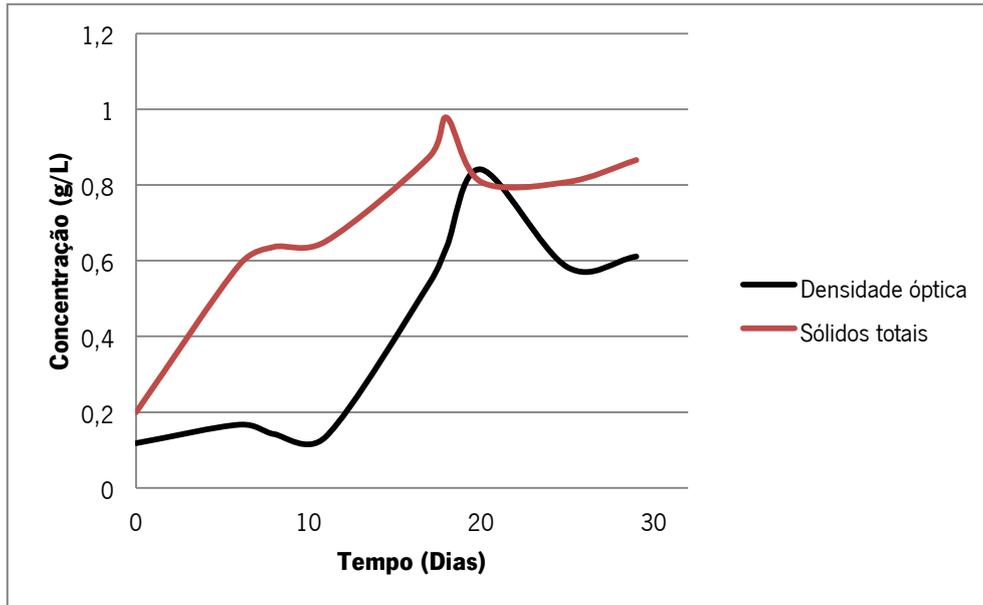


Figura 80 - Resultados obtidos dos sólidos totais e densidade ótica realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na primeira experiência.

Ao observar as curvas obtidas, observa-se que existe crescimento nas duas situações e que o comportamento do crescimento da C.E. é semelhante às duas determinações, como já era expectável. Seria expectável que no caso dos valores de concentração obtidos através da densidade ótica, estes seriam inferiores aos dos sólidos totais, sendo isso mesmo que acontece, como se pode constatar no gráfico. Como já foi referido, isto seria previsível que acontecesse uma vez que na densidade ótica não contabiliza o meio e todas as microalgas que se encontrem vivas.

No gráfico da figura 81 apresentam-se os resultados da concentração de microalgas obtidos na análise comparativa entre a densidade ótica e os sólidos totais no ensaio 2.

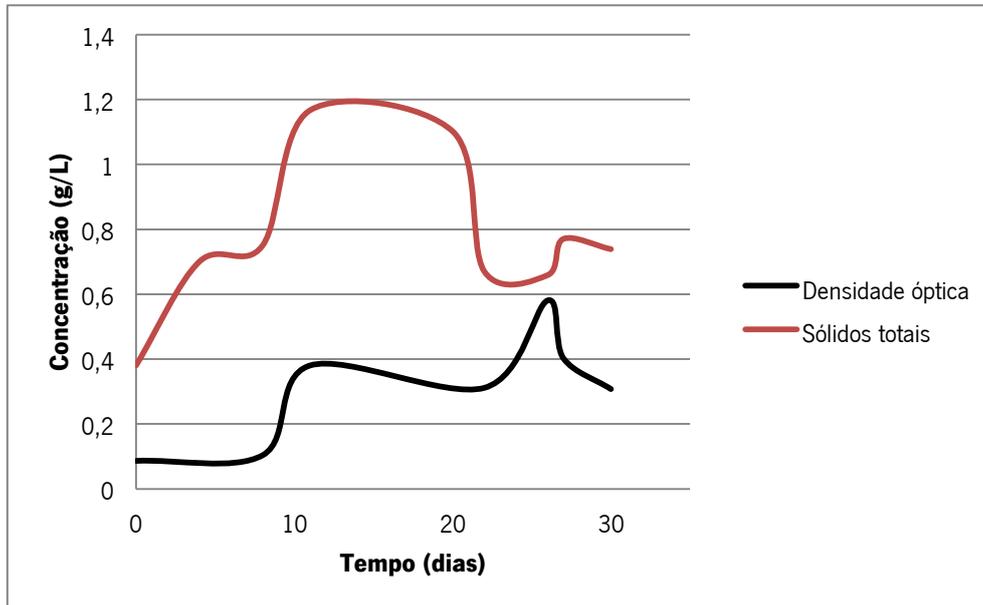


Figura 81 - Resultados obtidos dos sólidos totais e densidade ótica realizados à C.E. em sistema de fotobioreator fechado, na segunda experiência.

Pela análise ao gráfico da figura 81 verifica-se uma elevada discrepância entre as duas determinações. A principal explicação para este sucedido tem como base uma dificuldade técnica na amostragem e na conseqüente análise. Quando se realiza a determinação da densidade ótica em espectrofotómetro, esta é realizada numa cuvete de 10ml onde a amostra das microalgas é inserida. O seu espectro de adsorção é então determinado pela quantidade de luz expressa num comprimento de onda predefinido, neste caso 550nm, que é absorvido pela amostra. Nesse sentido é essencial que a amostra esteja o mais dispersa possível pela cuvete, para que a leitura seja feita corretamente, e entre a colocação da amostra dentro da cuvete e a inserção da cuvete no espectrofotómetro deve ser o mais rápido possível para que não ocorra deposição das microalgas. Neste caso, devido às condições de preservação das amostras, neste caso estas foram congeladas, ocorreu agregação das algas. Foram testados métodos no sentido de promover novamente a desagregação, no entanto, estes métodos foram infrutíferos. O problema técnico na determinação da concentração das microalgas na análise à densidade ótica deveu-se essencialmente à rápida deposição da amostra no fundo da cuvete. Este facto poderá induzir em erro a amostragem, o que se traduziu na baixa concentração obtida.

No entanto, pela determinação dos sólidos totais verifica-se que o ensaio 2 obteve melhores resultados que o ensaio 1, pois foram obtidos valores de concentração máxima superiores ao primeiro ensaio. Este fato seria expetável, pois a colocação de mais um motor, facilitou a dispersão do meio de cultura no reator, a difusão e troca gasosa entre as microalgas e absorção mais correta da fonte luminosa.

No gráfico seguinte, figura 82, é possível comparar-se os sólidos totais obtidos nos fotobioreator e observar-se os sólidos totais obtidos um frasco escolhido ao acaso de C.E. que se encontrava na sala de crescimento, ou seja, na presença de luz artificial.

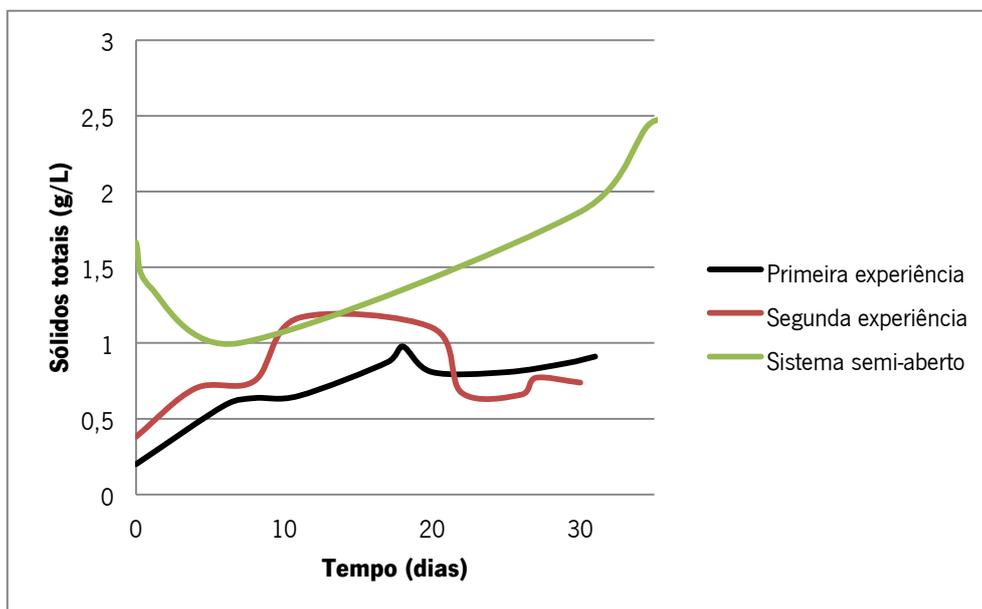


Figura 82 – Comparação das experiências realizadas no fotobioreator e no sistema semi-aberto na presença de luz artificial

Se compararmos os sólidos totais obtidos no fotobioreator com o frasco selecionado (um fotobioreator semi-aberto), no mesmo período de tempo, pode observar-se que o valor inicial de sólidos totais no caso do frasco (1,0 g/L) é maior do que no caso dos fotobioreatores (0,5 g/L). Ao longo do tempo de operação observa-se também um crescimento de biomassa mais eficaz no fotobioreator semi-aberto. Este fato deve-se essencialmente à escala utilizada. O ensaio realizado no fotobioreator semi-aberto teve um volume útil de 200 ml, por sua vez, os ensaios realizados no sistema de fotobioreator fechado tiveram volumes uteis de 50 litros. Esta diferença de volume, pelos resultados obtidos confere melhores condições de crescimento em volumes reduzidos. Através da análise às curvas de crescimento verifica-se que no caso do fotobioreator semi-aberto o valor mais baixo é cerca de 1,0g/L e o mais alto 2,5g/L, portanto a diferença

entre os valores é cerca de 1,5g/L, ou seja a biomassa cresceu 1,5g/L. Por outro lado no ensaio 1 realizado no fotobioreator o valor inicial dos sólidos totais foi de 0,2g/L e o final aproximadamente 1g/L, ou seja a biomassa aumentou 0,8g/L. No ensaio 2 realizado no fotobioreator fechado o valor inicial dos sólidos totais foi de 0,35g/L e no final 1,2g/L, registando-se assim uma variação e crescimento de 0,95g/L. Estes resultados comprovam que os ensaios realizados a uma escala reduzida induzem um crescimento de microalgas superior.

A intensidade da luz desempenha um papel importante, mas as exigências variam com a profundidade e a densidade da cultura de algas. Para profundidades e concentrações de célula maiores, a intensidade de luz deve ser aumentada para penetrar na cultura. Neste caso, o facto dos sólidos totais apresentarem um valor mais elevado no caso do sistema semi-aberto pode estar relacionado com a facilidade com que a luz atravessa o sistema e chega às microalgas. A cultura é bem mais pequena e como a luz penetra mais facilmente, as algas aumentam a sua atividade fotossintética, aumentando a biomassa, relativamente à conseguida no fotobioreator.

De uma forma geral o fotobioreator será uma melhor aposta do que os fotobioreatores semi-abertos. O fotobioreator fechado apresenta as condições necessárias para manter uma cultura de microalgas por longos períodos de tempo, ou seja, era transparente para facilitar a passagem do sol quando o tempo se encontrava adequado, desligando-se a luz artificial, permite o controlo de possíveis contaminantes ou organismos competidores, etc. Os problemas deste tipo de reator residem no fato de este ser fechado, pois nestas condições a troca gasosa é mais dificultada e por vezes a ação dos motores em conjugação com a temperatura externa, provoca o aumento da temperatura interna no reator, o que não é benéfico para o crescimento das microalgas.

Apesar de em Portugal haver muito sol, a falta de agitação, do controlo da temperatura e de possíveis contaminantes, e pelo fato do reduzido volume de operação, o fotobioreator semi-aberto não é uma opção viável para o crescimento contínuo de microalgas.

Após o aumento da biomassa microalgal, procedeu-se à etapa da recolha/colheita, isto é, separar a biomassa do meio nutritivo, para posterior extração do óleo. Esta etapa consistiu na utilização de cloreto de alumínio, como floculante, em que este era adicionado ao meio e as células de microalgas aderem-se umas às outras para formar agregados pesados que depois se depositam. Após a adição dos floculantes realizou-se a centrifugação ou filtração da solução

floculada. Estas técnicas têm como objetivo separar o sólido (microalgas) do líquido (meio). Esta etapa foi realizada com sucesso, ou seja, não houve perdas significativas de biomassa. No entanto foi possível verificar que quando havia pouca quantidade de biomassa algal e se realizou a recolha da biomassa, com adição de flocculante e a sua posterior filtração, notou-se que havia algumas perdas quer no meio. Por isso constatou-se que a centrifugação seria o método mais eficaz de separar a biomassa do meio de cultura. Já na situação em que existia grande quantidade de biomassa, obtida pelo fotobioreator, verificou-se que a filtração é mais benéfica, no que respeita à quantidade de biomassa perdida e ao tempo de operação gasto. Logo em pequenas quantidades de biomassa é mais benéfico a utilização da centrifugadora, já quando são grandes quantidades de biomassa não existe grandes problemas com a utilização de filtração.

Após obtenção da biomassa procedeu-se à tentativa de recolha de óleo. Para a recuperação dos lípidos da biomassa da C.E. e B.B. foram utilizadas diferentes formas de extração, por ultrassons, choque osmótico, em almofariz, por recurso a autoclave, entre outros sistemas e a utilização de solventes orgânicos, como o hexano, 2-propanol, acetona e a água. Os métodos de rompimentos de células da microalgas tinham como principal objetivo a extração do óleo presente nas paredes celulares. Os solventes têm como função a penetração através da membrana celular, facilitando a libertação do óleo.

Durante esta etapa de extração do óleo a partir das microalgas foram realizados 11 métodos diferentes, num total de 15 ensaios. A tabela seguinte descreve os ensaios efetuados e a percentagem de óleo que permitiram extrair.

Tabela 17 - Rendimento obtido dos diferentes ensaios realizados à C.E. e B.B.

Nº ensaio	Método e tipo de microalga	Solventes	Rompimento celular	Variação de massa final (g)	Percentagem de óleo (%)
1	1 - C.E. e B.B. 2,00g	Hexano	Ultrassons	0,01	0,00
2	2 - C.E. 2,00g	Hexano e 2-propanol	Choque osmótico	0,01	0,50
3	3 - C.E. 2,09g	Hexano e 2-propanol	Autoclave	0,07	3,45
4	4 - C.E. 1,99g	Hexano e 2-propanol	Ultrassons	0,07	3,51
5	5 - C.E. 2,00g	Hexano, 2-propanol e água	Ácido-base	0,06	3,00
6	6 - C.E. 4,92g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e ultrassons	0,20	4,07
7	7 - C.E. 7,23g	Hexano, 2-propanol e água	Vortex e centrifugadora	0,17	2,35
8	7 - B.B. 18,77g	Hexano, acetona e água	Vortex e centrifugadora	0,11	0,58
9	8 - C.E. 8,39g	Hexano	Vortex e centrifugadora	0,13	1,55
10	9 - C.E. 16,36g	Hexano		0,07	0,43
11	10 - C.E. 13,6g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e vortex	0,12	0,88
12	10 - B.B. 4,84g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e vortex	0,13	2,69
13	11 - C.E. 1,46g	Acetona e Hexano	Almofariz e vortex	0,02	1,47
14	11 - B.B. 3,70g	Acetona e Hexano	Almofariz e vortex	0,08	2,16
15	6 - C.E. 60g	Hexano, 2-propanol e água	Almofariz e ultrassons	0,78	1,3

No gráfico da figura 83, podem observar-se todos os ensaios realizados como as microalgas e a correspondentes variação de peso obtido em percentagem.

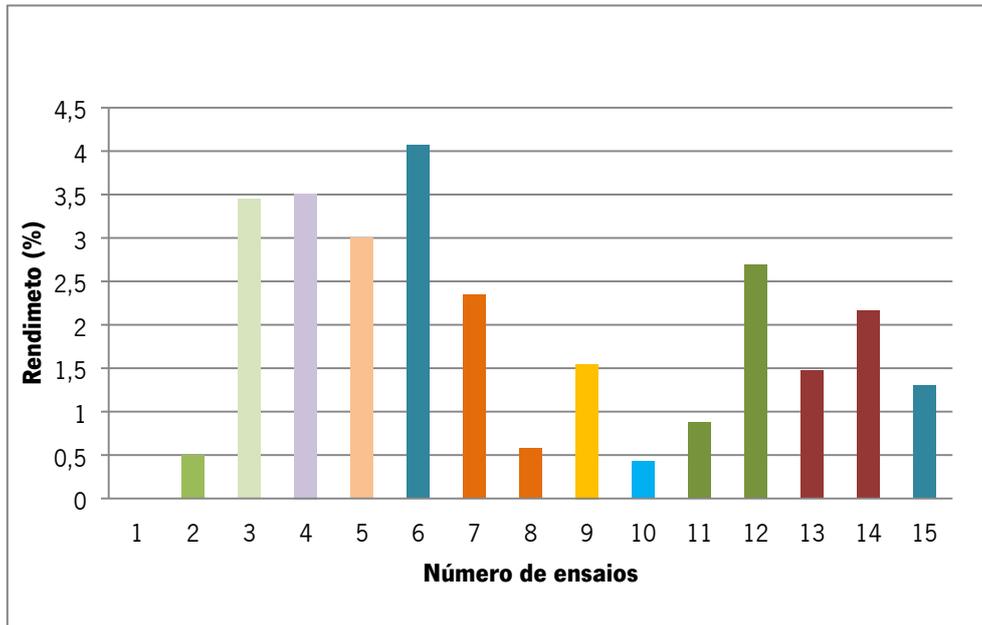


Figura 83 – Rendimento obtido dos diferentes ensaios realizados às microalgas

Ao comparar-se todos os ensaios, o método 6 C.E. (o ensaio número 6), em que este foi sujeito inicialmente a uma congelação, sendo depois seco a 60°C na estufa e foi utilizado o método do almofariz, isto para o rompimento das células, obteve-se uma variação de massa de cerca de 4% sendo utilizada a microalga C.E. Relativamente à B.B., o número do método onde se conseguiu um rendimento de extração mais elevado foi o 12 (10 B.B.) obtendo-se cerca de 2,5%. Neste caso a biomassa só foi seca a 60°C e para o processo de rompimento celular utilizou-se o almofariz com o auxílio de areia. No geral, não foi possível obter óleo em nenhum ensaio realizando, não atingindo assim o objetivo da realização de ensaios de produção de biodiesel através do óleo de microalgas. Na figura 84 apresentam-se os resultados relativos à extração do óleo das duas espécies de microalgas estudadas.



Figura 84 – Resultado final da maioria dos ensaios realizados às microalgas

No gráfico da figura 85 pode visualizar-se uma comparação entre os valores teóricos em massa, isto é, através da massa inicial, considerando-se no caso da C.E. a percentagem de óleo seja de 50% e no caso da B.B. considerando-se 70%.

De acordo com a análise ao gráfico da figura 85 verifica-se uma discrepância elevada entre os valores da massa obtidos para cada método e os valores teóricos, tendo em consideração as médias de composição de óleo para cada espécie, de acordo com a literatura especializada.

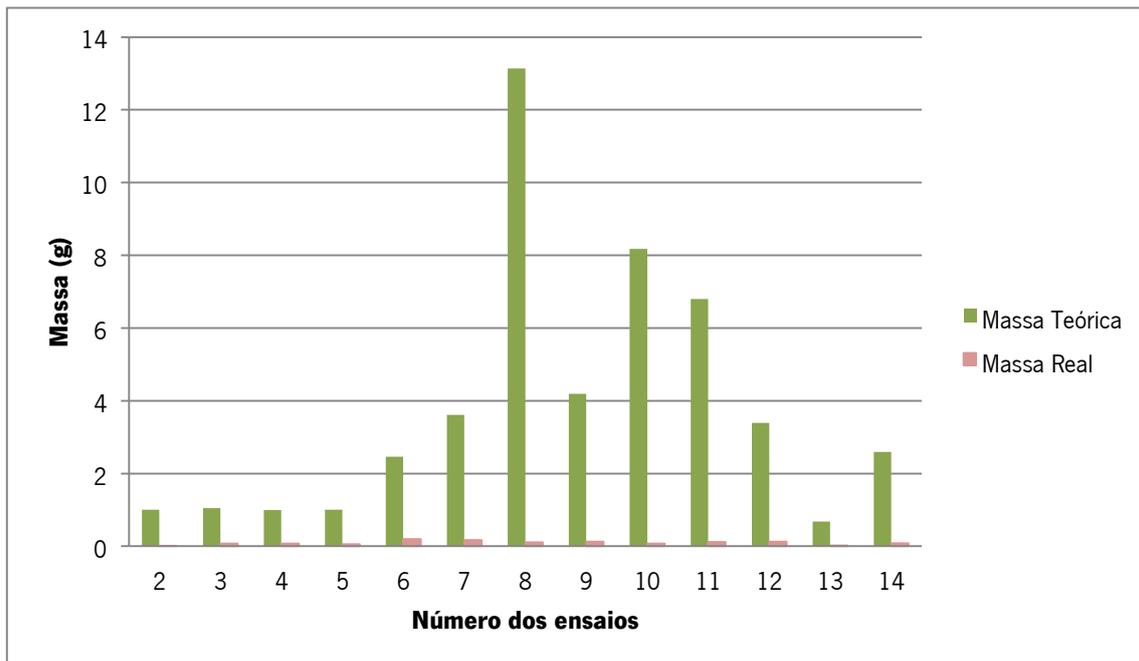


Figura 85 – Comparação entre a massa teórica e massa real

Para este fato podem surgir várias considerações ou possíveis explicações. No entanto pode-se considerar que os estudos bibliográficos nos quais são apresentados os valores teóricos de óleo para cada espécie tem em consideração condições operatórias que não são apresentadas ou que são em alguns casos omitidas. As condições ou composição do meio de cultura influenciam diretamente não só a cinética de crescimento das microalgas mas também os compostos que elas produzem. Condições de stress, nomeadamente, baixos teores em azoto, podem induzir um estado de stress nas microalgas, que promove o aumento de lípidos nas células. No entanto este estado pode também diminuir a taxa de multiplicação e assim reduzir a quantidade de biomassa disponível. Por este fato, e por não existirem dados suficientes, no que diz respeito à composição desses meios de cultura, no âmbito desta dissertação optou-se por utilizar o meio de cultura ideal para promover o crescimento sustentado da biomassa.

Capítulo 5 – Conclusões

Muita esperança tem sido depositada nos biocombustíveis, em especial no biodiesel obtido utilizando como matéria-prima as microalgas, as quais apresentam características excepcionais em termos de teores de óleo e de taxas de crescimento. Nesse sentido, pretendeu-se avaliar o potencial de produção, a nível laboratorial, de produção de biodiesel a partir de microalgas, *Chlorella Ermersonii* (C.E.) e *Botryococcus Braunii* (B.B.). Paralelamente foi realizado um estudo relativo à possibilidade de obtenção de óleo e posterior produção de biodiesel quer a partir de algas marinhas da orla costeira da zona Norte de Portugal (*Sargaço* e *Bodelha*) quer a partir de oleaginosas, semente de girassol, de amendoim e de abóbora, a fim de selecionar o melhor processo ambiental, económico e energético. A produção de biodiesel a partir de óleos alimentares usados e de óleos virgens foi igualmente realizada. As principais conclusões que se podem retirar com a realização deste trabalho são:

→ Pode-se comprovar que a utilização de resíduos de óleos alimentares usados constitui uma mais-valia na produção de biodiesel, pois revela-se como uma forma de gestão dos resíduos (óleos usados), promovendo a sua transformação em biocombustíveis que podem ser utilizados com diesel em motores de automóveis.

→ Grande parte do óleo usado foi convertido em biodiesel, sendo o seu rendimento bastante elevado. Confirma-se então, que a escolha pela transesterificação básica foi eficaz assim como a respetiva fase de purificação. Os próprios resultados de caracterização dos OAU comprovam isso mesmo, cumprindo os requisitos da norma.

→ Foi tentada a obtenção de óleo a partir de distintas sementes oleaginosas por recurso a prensa mecânica. No entanto, não foi possível obter óleo em quantidade suficiente para a realização de reação de transesterificação. Por essa razão, foi apenas efetuada a caracterização de óleos comerciais com origem nas sementes testadas (amendoim e girassol).

→ Através da produção de biodiesel a partir de OUA e óleos vegetais comerciais (girassol e amendoim), pode comprovar-se que a qualidade e rendimento do combustível pode ser influenciado por muitos fatores, sendo eles: composição dos ácidos gordos (dos óleos utilizados), o processo de produção utilizado, tempo da reação, temperatura de reação, tipo de catalisador, assim como o processo de purificação, etc.

→ A exploração do recurso natural, algas marinhas da orla costeira da zona Norte de Portugal, o sargaço e a bodelha, foi uma forma de avaliar o potencial de aplicação deste tipo de

biomassa como matéria-prima para produção de biodiesel. Através dos ensaios realizados foi possível verificar a existência de óleo em ambas as espécies, apresentando o sargaço um valor máximo de 26% de extração e no caso da bodelha um valor máximo de 4,5%. O solvente mais adequado foi o hexano.

→ Através da realização de vários ensaios ao sargaço e bodelha foi possível concluir que a secagem, a forma de trituração das algas, o tipo de solvente e a forma de adição deste influenciam a taxa de extração do óleo presente nas algas marinhas. Sendo que no caso do sargaço o melhor resultado foi obtido por recurso a prensa, após secagem ao sol e utilizando o hexano como solvente com adição do mesmo em várias fases. Relativamente à bodelha, foi triturado através do moinho de lâminas 2, a secagem foi realizada ao sol, utilização de hexano como solvente com adição do mesmo em várias fases.

→ No entanto, a produção de biodiesel a partir de algas marinhas conduziria a um elevado consumo das mesmas e a um elevado investimento inicial para trituração e extração dos óleos desta fonte de matéria-prima.

→ No caso das microalgas, na execução do projeto, considerando a estrutura física existente, foi escolhido um sistema de cultura semi-aberta. Este método verificou-se pouco eficaz devido à fraca exposição solar e aos volumes reduzidos de cultura. No entanto, com a utilização do fotobioreator facilitou o aumento da biomassa, sendo este um sistema fechado e mais controlado ao nível de parâmetros importantes para o crescimento das microalgas desde temperatura, agitação constante, CO₂, nutrientes, entre outros, sendo esta a melhor forma de produção de biomassa.

→ Apesar dos resultados obtidos, com as infra-estruturas e a exposição solar adequadas, as microalgas apresentam diversas vantagens relativamente a outras fontes, nomeadamente:

- As microalgas reproduzem-se usando a fotossíntese para converter a energia do sol em energia química, completando um ciclo de crescimento em poucos dias. Têm uma taxa de crescimento e produtividade muito superior às plantas convencionais, culturas agrícolas, e outras plantas aquáticas, requerendo uma área muito menor do que outras matérias-primas para a produção de biodiesel de origem agrícola;
- As microalgas são fáceis de cultivar, crescem em meio aquoso (podendo crescer em água do mar, águas salobras e águas impróprias para consumo), com

pouca ou nenhuma atenção, porém necessitam de menos água que as culturas terrestres;

- As microalgas podem crescer em áreas inadequadas ao cultivo agrícola independentemente das mudanças climáticas sazonais, não incorrendo em alterações da terra utilizada, minimizando assim os impactos ambientais associados e sem comprometer a produção de culturas alimentares;

→ Considerando o anteriormente referido, este processo, em condições ótimas, poderá ser economicamente viável uma vez que existem algas com uma elevada percentagem de óleo e que requerem pouca ou nenhuma atenção para crescerem, implicando baixos custos na manutenção de culturas.

→ No entanto, não foram os resultados obtidos na biomassa que inviabilizaram o processo, mas sim o processo de extração do óleo das microalgas. Apesar de C.E. e B.B. possuem um teor em óleo superior a 40%, os resultados indicam uma extração máxima de 4% de óleo utilizando a *Chlorella Ermersonii* (C.E.) e 2,5% utilizando a *Botryococcus Braunii* (B.B.). Devido à reduzida percentagem de óleo obtido nos processos de extração estudados para ambas as espécies de microalgas, não foi possível realizar os ensaios de produção de biodiesel pelo método de transesterificação, conforme foi preconizado nos objetivos da presente dissertação.

→ De referir que materiais utilizados para a extração do óleo foram os que se encontravam disponíveis no CVR e os economicamente mais viáveis. Podendo-se concluir que não foi possível produção de biodiesel a partir das microalgas.

→ Se comparar os resultados obtidos pelas microalgas com as macroalgas, os resultados foram mais satisfatórios nas macroalgas que nas microalgas, onde se pôde obter algum óleo e houve uma maior percentagem de extração, tanto no caso do sargaço como da bodelha.

→ Com tudo isto, verifica-se que ainda não é viável a produção de biodiesel com utilização de microalgas à escala laboratorial.

O biodiesel, não deve ser só visto como um produto, mas também como um projeto a nível governamental, que tem como missão, promover a utilização do biodiesel (biocombustíveis) e a fusão destes com os recursos esgotáveis (petróleo). O consumo do biodiesel em lugar do diesel pode diminuir claramente a dependência ao petróleo, contribuindo para a uma redução da poluição atmosférica, já que contém menores teores de poluentes que o diesel, além de gerar alternativas de empregos em áreas geográficas menos propícias para outras atividades económicas e, desta forma, promover a inclusão social. O processo que mostrou ser

tecnicamente viável, e que ao mesmo tempo valoriza um resíduo, é a utilização dos OAU como matéria-prima para a produção de biodiesel, enquanto a utilização de óleos virgem com base nas sementes oleaginosas levanta a questão de *food vs fuel*. Relativamente às algas, marinhas e micro, existe a necessidade de promover uma melhoria das técnicas de extração de óleos nelas contido, nomeadamente pela procura de soluções mais económicas, tecnicamente mais eficientes e alternativas à utilização de reagentes químicos.

Sugestões para trabalhos futuros

Com a realização do presente trabalho, foi possível obter algumas conclusões, no que diz respeito à produção de biodiesel a partir de microalgas mas também no que diz respeito a outros tipos de matérias-primas, como macroalgas, sementes e óleos alimentares usados. Tendo em conta as limitações e os resultados obtidos sugerem-se como trabalhos futuros:

- O desenvolvimento de um fotobioreactor circular para o crescimento mais efetivo das microalgas. O recurso a um motor com mais potência e a implementação de um sistema de recolha mais facilitado;
- Utilização de lodo ou algas encontradas em pântanos ou lagoas numa tentativa de extração de óleo para possível produção de biodiesel;
- Extração do óleo das microalgas a partir de uma maior quantidade de biomassa verificando a sua influência no rendimento da extração;
- Otimização de equipamento necessário de extração do óleo;
- Estudo de métodos mais eficazes e ambientalmente mais corretos para a extração de óleo das macroalgas.

Bibliografia

- [1] *Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy*. **Hossain, A.B.M. Sharif, et al.** Malaysia : Science Publications, 2008, American Journal of Biochemistry and Biotechnology, Vol. 4, pp. 250-254.
- [2] *A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance*. **Baska, Syed Ameer, Gopal, K. Raja and Jebaray, S.** India : s.n., 2009, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 13, pp. 1628-1634.
- [3] **Ramage, Janet.** *Guia da Energia*. Lisboa : Monitor, 1997.
- [4] IEA - International Energy Agency. *Web site de International Energy Agency*. [Online] [Cited: Maio 23, 2011.] <http://www.iea.org>.
- [5] *Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Abril de 2009 relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE e 2003/30/CE*. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Estrasburgo, França : Jornal Oficial da União Europeia, 2009.
- [6] *Sistema de apoio à decisão na logística da Biomassa*. **Azevedo, João, Teixeira, José and Maria, Carvalho.** s.l. : Gráfica Vilaverdense, Artes Gráficas, Lda, Novembro 2008, Valorização de Resíduos.
- [7] *Projecto NewBiodiesel: Desenvolvimento de um equipamento de baixo custo para produção de biodiesel em pequena e média escala*. **Azevedo, T, et al.** Guimarães : Gráfica Vilaverdense, Artes Gráficas Lda, Novembro 2008, Valorização de Resíduos.
- [8] **Kavalov, B. and Peteves, S. D.** *Status and perspectives of biomass-to-liquid fuels in the European Union*. Institute for Energy, European Commission. Petten, The Netherlands : Institute for Energy – JRC IE, PR&Communication, 2005.
- [9] *Directiva 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de Maio de 2003 relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis*

-
- nos transportes*. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia . Estrasburgo, França : Jornal Oficial da União Europeia, 2003. Directiva.
- [10] *Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus*. **Vicente, Gemma, et al.** Spain : s.n., 2009, Biochemical Engineering Journal, Vol. 48, pp. 22-27.
- [11] *Valorização energética de glicerina*. **Teixeira, José Carlos and Ferreira, Manuel Eduardo**. s.l. : Gráfica Vilaverdense, Artes Gráficas, Lda, Novembro 2007, Valorização de resíduos.
- [12] *A prespective on incorporation of glycerin purification process in biodiesel plants using waste cooking oil as feedstocks*. **Singhabhandhu, Ampaitopin and Tezuka, Tetsuo**. Japan : s.n., 2010, Energy, Vol. 35, pp. 2493-2504.
- [13] *A process model to estimate the cost industrial scale biodiesel production from waste cooking oil by supercritical transesterification*. **Kasteren, J. M. N. and Nisworo, A. P.** The Netherlands : s.n., 22 August, 2007, Resources Conservation & Recycling, Vol. 50, pp. 442-458.
- [14] *Alkaline catalyzed biodiesel production from moringa oleifera oil with optimized production parameters*. **Kafuku, G. and Mbarawa, M.** Pretoria, South Africa : s.n., 2010, Applied Energy, Vol. 87, pp. 2561–2565.
- [15] *Progress and recent trends in biodiesel fuels*. **Demirbas, Ayhan**. Sila Science, Trabzon, Turkey : s.n., October 16, 2009, Energy Conversion and Management, Vol. 50, pp. 14-34.
- [16] **Balanço energético, DRE (Direcção Regional da Energia)**. Biodiesel. *Biodiesel*. [Online] <http://biodieselprojectacores.blogspot.pt/>.
- [17] *Progress in biodiesel processing*. **Balat, Mustafa and Balat, Hawa**. Turkey : s.n., 2010, Applied Energy, Vol. 87, pp. 1815-1835.
- [18] **Gomes, Rui**. *Manual de biodiesel: Uma Energia Alternativa, Uma solução Energética*. Lisboa - Porto : Litexa Editora, Lda., 2006.
- [19] *A review on FAME production processes*. **Vyas, Amish P., Verma, Jaswant L. and Subrahmanyam, N.** Fuel, India : s.n., 2010, Fuel, Vol. 89, pp. 1-9.

- [20] *A review of bio-diesel production process.* **Andrade, J. E., et al.** Mexico : s.n., January 13, 2011, Biomass and Bioenergy, Vol. 35, pp. 1008 - 1020.
- [21] **Silva, Márcia.** Instituto pme formação. *pme.online.pt*. [Online] Agosto 04, 2006. [Cited: Março 16, 2011.] <http://www.pme.online.pt>.
- [22] *Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review.* **Lam, Man Kee, Lee, Keat Teong and Mohamed, Abdul Rahman.** Malaysia : s.n., 2010, Biotechnology Advances, Vol. 28, pp. 500-518.
- [23] EBB - European Biodiesel Board. *European Biodiesel Board*. [Online] 2003. [Cited: Abril 2, 2011.] <http://www.ebb-eu.org/index.php>.
- [24] *Decreto-Lei n.º 49/2009 de 26 de Fevereiro.* Ministério da Economia e da Inovação. s.l. : Diário da República, 2009. Decreto-lei.
- [25] *Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods.* **Demirbas, Ayhan.** Turkey : s.n., Abril 18, 2005, Progress in Energy and combustion science, Vol. 31, pp. 466–487.
- [26] *High quality biodiesel and its diesel engine application: A review.* **Atadashi, I. M., Aroua, M. K. and Aziz, A. Abdul.** Malaysia : s.n., 2010, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 14, pp. 1999–2008.
- [27] *Environmental aspects and challenges of oilseed produced biodiesel in Southeast Asia.* **Jayed, M. H., et al.** Malaysia : s.n., June 12, 2009, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 13, pp. 2452–2462.
- [28] Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. *Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs*. [Online] [Cited: Novembro 12, 2011.] <http://www.omafra.gov.on.ca>.
- [29] *Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment.* **Zhang, Y., et al.** Canada : s.n., 21 January, 2003, Bioresource Technology, Vol. 89, pp. 1-16.

- [30] *Biodiesel production via peanut oil extraction using diesel-based reverse-micellar microemulsions*. **Nuguyen, Thu, Do, Linh and Sabatini, David A.** USA : s.n., March 20, 2010, Fuel, Vol. 89, pp. 2285–2291.
- [31] LAMTec - Laboratório do Ambiente Marinho e Tecnologia, Universidade dos Açores. *Laboratório do Ambiente Marinho e Tecnologia, Universidade dos Açores*. [Online] [Cited: Julho 12, 2011.] <http://www.lamtec-id.com>.
- [32] *Biodiesel from microalgae*. **Chisti, Yusuf.** New Zealand : s.n., February 13, 2007, Biotechnology Advances, Vol. 25, pp. 294 - 306.
- [33] *Alternative Feedstocks for Biodiesel Production*. **Ribeiro, André, et al.** 2012, Materials Science Forum , Vols. 730-732, pp. 623-629.
- [34] *Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review*. **Meher, L. C., Sagar, D. Vidya and Naik, S. N.** India : s.n., September 15, 2006, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 10, pp. 248 - 268.
- [35] *A review on biodiesel production using catalyzed transesterification*. **Leung, Dennis Y. C., Wu, Xuan and Leung, M. K. H.** Hong Kong, China : s.n., 2010, Applied Energy, Vol. 87, pp. 1083–1095.
- [36] *Properties of various plants and animals feedstocks for biodiesel production*. **Karmakar, Aninidita, Karmakar, Subrata and Mukherjee, Souti.** India : s.n., May 20, 2010, Bioresource Technology, Vol. 101, pp. 7201–7210.
- [37] *Possible methods for biodiesel production*. **Marchetti, J. M., Miguel, V. U. and Errazu, A. F.** Bahia Blanca, Argentina : s.n., 2007, Vol. 11, pp. 1300 - 1311.
- [38] *Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil—A review*. **Enweremadu, C. C. and Mbarawa, M. M.** South Africa : s.n., 2009, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 13, pp. 2205–2224.
- [39] *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. **Mata, Teresa M., Martins, António A. and Caetano, Nidia S.** Porto, Portugal : s.n., 2010, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 14, pp. 217–232.

- [40] **Moreira, Ana Luísa Vasconcelos.** *Produção de biodiesel a partir de gordura de frango.* Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Porto : s.n., 2009. Tese.
- [41] *Moringa oleifera oil: A possible source of biodiesel.* **Rashid, Umer, et al.** Pakistan : s.n., 2008, Bioresource Technology, Vol. 99, pp. 8175–8179.
- [42] *Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: Feasibility study.* **Evon, Ph., et al.** France : s.n., 2009, industrial crops and products, Vol. 29, pp. 455–465.
- [43] *Aqueous and enzymatic processes fro edible oil extraction.* **Rosenthal, A., Pyle, D. L. and Niranjan, K.** Avenue of the Americas, New York, NY 10010 : Elsevier Science inc., 1996, Enzyme and Microbial Technology , Vol. 19, pp. 402-420.
- [44] *Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems.* **Demirbas, Ayhan.** Sirnak, Turkey : s.n., 2011, Applied Energy.
- [45] **Pereira, Leonel.** Algas, Litoral de Viana do Castelo. *Centro de Monitorização e Interpretação Ambiental de Viana do Castelo.* [Online] 2008. <http://www.cmia-viana-castelo.pt>.
- [46] **Robaert, Samuel.** Aprender Ciências. *Aprender Ciências.* [Online] 2009. <http://samuelrobaert.blogspot.pt>.
- [47] *Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran.* **Tabatabaei, Meisam, et al.** Iran : s.n., 2011, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 15, pp. 1918–1927.
- [48] *Biodiesel production by microalgal biotechnology.* **Huang, GuanHua, et al.** China : s.n., 2010, Applied Energy, Vol. 87, pp. 38 - 46.
- [49] **Pereira, Leonel.** *Algas para que vos quero...* Departamento de Botânica, Universidade de Coimbra - Faculdade de Ciências e Tecnologia. Coimbra : s.n., 2008.
- [50] *Classification of macroalgae as fuel and its thermochemical behaviour.* **Ross, A. B., et al.** IK : s.n., 2008, Bioresource Technology, Vol. 99, pp. 6494–6504.

-
- [51] *Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae*. **Kumari, Puja, Reddy, C. R. K. and Jha, Bhavanath**. India : s.n., 2011, Analytical Biochemistry.
- [52] *Advances in genetic engineering of marine algae*. **Qin, Song, Lin, Hanzhi and Jiang, Peng**. China : s.n., 2012, Biotechnology Advances.
- [53] *Macroalgae: Raw material for biodiesel production*. **Maceiras, Rocio, et al**. Spain : s.n., 2010, Applied Energy.
- [54] **Lyons, Henry, et al**. *A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland*. Sustainable Energy Ireland. Ireland : s.n., 2009. Relatório.
- [55] *Biological importance of marine algae*. **El Gamal, Ali A**. Saudi Arabia : s.n., 2010, Saudi Pharmaceutical Journal, Vol. 18, pp. 1-25.
- [56] **Sousa-Pinto, Isabel and Araújo, Rita**. *The seaweed resources of Portugal*. Departamento de Zoologia, Universidade de Coimbra. Artigo.
- [57] *As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades*. **Pereira, Leonel**. Coimbra : s.n., 2010. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Texto baseado na palestra com o mesmo título, integrada na iniciativa “Contam as Plantas”, organizada pelo Departamento de Botânica (FCTUC) e pela Sociedade Broteriana.
- [58] *Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study*. **Aresta, Michele, Dibenedetto, Angela and Barberio, Grazia**. Italy : s.n., 2005, Fuel Processing Technology, Vol. 86, pp. 1679-1693.
- [59] *The characteristics of bio-oil produced from the pyrolysis of three marine macroalgae*. **Bae, Yoon Ju, et al**. Republic of Korea : s.n., 2011, Vol. 102, pp. 3512-3520.
- [60] *Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction*. **Aresta, Michele, et al**. Italy : s.n., 2005, Original Paper, Vol. 3, pp. 136-139.
- [61] *Influence of n-Hexane on in Situ Transesterification of Marine Macroalgae*. **Sánchez, Angel, et al**. Spain : s.n., 2012, Energies, Vol. 5, pp. 243-257.

- [62] **Sreevatsan, Sreevatsan.** Oilgae . *Oilgae*. [Online] <http://www.oilgae.com>.
- [63] **Xiao, Liping.** *Evaluation of Extraction Methods for Recovery of Fatty Acids from Marine Products*. University of Bergen. 2010. p. 125, Tese de Mestrado.
- [64] *Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae*. **Ryckebosch, Eline, Muylaert, Koenraad and Foubert, Imogen.** Belgium : s.n., 201.
- [65] Method 3540C Soxhlet extraction . *EPA - United States Environmental Protection Agency* . [Online] <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/>.
- [66] *Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. **Brennan, Liam and Owende, Philip.** Ireland : s.n., 2010, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 14, pp. 557–577.
- [67] *Prospects of biodiesel production from microalgae in India*. **Khan, Shakeel A., et al.** India : s.n., 2009, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 13, pp. 2361-2372.
- [68] *Importance of algae oil as a source of biodiesel*. **Demirbas, Ayhan and Demirbas, M. Fatih.** Turkey : s.n., 2011, Energy Conversion and Management, Vol. 52, pp. 163–170.
- [69] *Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia lipase**. **Trab, Dang-Thuan, et al.** Tainan, Taiwan, ROC : s.n., 2012, Bioresource Technology, Vol. 108, pp. 119–127.
- [70] *Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures*. **Wahlen, Bradley D., Willis, Robert M. and Seefeldt, Lance C.** United States : s.n., 2011, Bioresource Technology, Vol. 102, pp. 2724–2730.
- [71] *Biodiesel from algae: challenges and prospects*. **Scott, Stuart A., et al.** UK : s.n., 2010, Current opinion in Biotechnology, Vol. 21, pp. 277-286.
- [72] *Third generation biofuels from in microalgae* . **Dragone, Giuliano, et al.** Braga, Portugal : Technology and Education Toppic , 2010, Technology and Education Topics Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, pp. 1355 - 1366.

-
- [73] **Villaça, Roberto.** *Cultivo de Microalgas*. Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia. Rio de Janeiro, Lisboa : s.n. pp. 1-18, Trabalho da disciplina Elementos de Maricultura.
- [74] *Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons.* **Khoo, H. H., et al.** Singapore : s.n., 2011, Vol. 102, pp. 5800–5807.
- [75] Ciência Viva. [Online] 1996. <http://www.cienciaviva.pt>.
- [76] **IST, Grupo de Ciências Biológicas do.** e-escola. [Online] Instituto Superior Técnico, 2002. <http://www.e-escola.pt>.
- [77] *Microalgae as a Feedstock for Biofuel Production.* **Wen, Zhiyou and Johnson, Michael B.** s.l. : Publication 442-886, 2009, Virginia Cooperative Extension, pp. 1-7.
- [78] *Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae.* **Amin, Sarmidi.** Indonesia : s.n., 2009, Energy Conversion and Management, Vol. 50, pp. 1834–1840.
- [79] *Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review.* **Halim, Ronald, Danquah, Michael K. and Webly, Paul.** Australia : s.n., 2012, Biotechnology Advances, Vol. 30, pp. 709–732.
- [80] *Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production.* **Zeng, Xianhai, et al.** China : s.n., 2011, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 15, pp. 3252-3260.
- [81] *Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review.* **Ahmad, A. L., et al.** Malaysia : s.n., 2010, Renewable and Sustainable Energy Reviews.
- [82] *Commercialization potential of microalgae for biofuels production.* **Singh, Jasvinder and Gu, Sai.** UK : s.n., 2010, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol. 14, pp. 2596–2610.
- [83] *Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method.* **Archana, S., Moise, Sandhya and Suraishkumar, G. K.** India : s.n., 2012, biomass and bioenergy, pp. 1-4.

- [84] *Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue.* **Iverson, Sara J., Lang, Shelley L.C. and Cooper, Margaret H.** Canada : s.n., November 2011, *Lipids* , Vol. 36, pp. 1283–1287.
- [85] *Evaluation of the Bligh & Dyer Lipid Determination Method.* **Smedes, Foppe and Thomasset, Torsten K.** The Netherlands : s.n., 1996, *Marine Pollution Bulletin* , Vol. 32, pp. 681-688.
- [86] *Biofuel potential production from the Orbetello lagoon macroalgae: A comparison with sunflower feedstock.* **Bastianoni, Simone, et al.** Italy : s.n., 2008, *Biomass & Bioenergy*, Vol. 32, pp. 619-628.
- [87] **Santos, Liliana ;.** ACOI: Culture Media and Recipes. *ACOI: Culture Media and Recipes.* [Online] 2007. <http://acoi.ci.uc.pt/>.
- [88] **Clesceri, Lenore S., Greenberg, Arnold E. and Eaton, Andrew D.** *Standard Methods - For the Examination of water and wastewater 20th edition.* 20^a Edição. Washington : APHA: American Public Health Association, 1998.
- [89] *Cultivation of Chlorella emersonii with flue gas derived from a cement plant.* **Borkenstein, Clemens G., et al.** Austria : s.n., 2011, *J Appl Phycol* , Vol. 23, pp. 131 - 135.
- [90] **Tavares, João Evandro Brandão.** *Cultivo de microalgas do género Botryococcus visando a produção de biodiesel.* Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências. Lisboa : s.n., 2009. Dissertação.
- [91] **Pinto, Angelina and Silva, Joaquim C. G. Esteves da.** *Das microalgas ao Biodiesel - Oficinas de Verão.* Faculdade de Ciências, Universidade do Porto. 2009. Relatório.
- [92] *Variable affecting the in situ transesterification of microalgae lipids.* **Ehimen, E. A., Sun, Z. F. and Carrington, C. G.** New Zealand : s.n., 2010, *Fuel*, Vol. 89, pp. 677–684.
- [93] *Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using sonochemical reactors.* **Hingu, Shishir M., Gogate, Parag R. and Rathod, Virendra K.** India : s.n., 2010, *Ultrasonics Sonochemistry* , Vol. 17.

