

# MICROALGAS APLICADAS À PRODUÇÃO DE BIODIESEL

F.P. Vilas Boas<sup>(1)</sup>, T.S. Nunes<sup>(1)</sup>, N.F. Santos<sup>(2)</sup>, C. Baptista<sup>(2)</sup>



## RESUMO

A fraca disponibilidade de recursos energéticos não renováveis reflecte-se na crescente procura e na maior relevância dos biocombustíveis, em particular do biodiesel, no panorama nacional. Esta fonte de energia de carácter biológico pode ser obtida a partir de várias matérias-primas de onde se destacam as oleaginosas e as microalgas. Embora sendo de etiologia diferente ambas possibilitam a utilização dos seus óleos que, após sofrerem transesterificação, originam a mistura de ésteres alquílicos designada por biodiesel.

Com o objectivo de produzir biodiesel a partir de microalgas foram realizados seis crescimentos da microalga *Chlorella protothecoides* em reactores batch, em modo fotoautotrófico. A biomassa algal foi utilizada para a extracção dos lípidos e para a produção e análise do biodiesel.

Realizou-se o controlo do crescimento da biomassa através de análises diárias. A alga foi colhida durante a fase estacionária de crescimento. A biomassa colhida foi sujeita a tratamentos de centrifugação, ultracongelção, liofiliza-

ção e moagem, após os quais se procedeu à extracção dos lípidos. Obteve-se um rendimento de lípidos de 12,05%. Os lípidos extraídos foram transesterificados pelo método de Lepage e Roy com o objectivo de produzir biodiesel e simultaneamente derivatizar os ácidos gordos constituintes dos triglicéridos algais de modo a poderem ser analisados por cromatografia gasosa.

Pela análise cromatográfica verificou-se que o biodiesel contém uma quantidade exagerada do ácido gordo linolénico 18:3 $\Omega$ 3 ( $\approx$  56% relativamente ao total de ésteres metílicos) o que potencia uma estabilidade oxidativa baixa, incompatível com as exigências requeridas para o biodiesel comercial. No entanto, se o óleo das microalgas for misturado com outros óleos bastante saturados, o biodiesel final produzido a partir desta mistura tornar-se-á viável.

**Palavras-chave:** biodiesel; *Chlorella protothecoides*; crescimento fotoautotrófico; microalgas.

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintéticos que usam energia solar e dióxido de carbono com uma eficiência fotossintética elevada e constituem uma das alternativas mais promissoras para a produção de biodiesel devido à sua elevada capacidade de sintetizar e acumular lípidos, o que leva a uma maior taxa de crescimento relativamente às plantas oleaginosas permitindo uma produção média de biodiesel 10 a 20 vezes superior à obtida com as suas sementes (Reis et al., 2008).

A literatura refere inúmeras vantagens da utilização de microalgas com esta finalidade, sendo de realçar o seu fácil cultivo, uma vez que não necessitam de grande monitorização e intervenção nas etapas de crescimento; por outro lado as microalgas crescem numa ampla variedade de meios, inclusive em águas impróprias para consumo humano (Mata et al., 2010), utilizam a fotossíntese convertendo a energia solar em energia química, têm taxas de crescimento muito elevadas e a produtividade de óleo excede o rendimento das oleaginosas. Skjanes e colaboradores (2007) afirmam que a produção mássica de óleo/ha de plantação é muito superior no caso das microalgas – 80 ton óleo/ha, em comparação com a soja – 375 kg óleo/ha ou o de palma – 5 ton óleo/ha. As microalgas produzem biodiesel que não contém enxofre e que tem uma performance tão boa como o diesel produzido a partir do petróleo, levando também a emissões reduzidas de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e consequentemente SOx; removem também CO<sub>2</sub> da atmosfera e são utilizadas no tratamento de águas residuais, para remoção de iões NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (Wang et al., 2008). No que respeita à taxa de remoção teórica de CO<sub>2</sub> os valores variam entre 1,65 e 1,83 g CO<sub>2</sub>/g biomassa microalgal, tendo já sido determinada uma taxa de remoção real de ≈ 4 g CO<sub>2</sub>/g biomassa microalgal (Rosa, 2007). A biomassa microalgal, após a extracção do óleo, pode ser processada com vista à produção de etanol, metano e ração animal, pode ainda ser utilizada como adubo orgânico devido ao seu alto teor de N e P, ou simplesmente pode ser queimada para produção de energia; esta biomassa permite também a extracção de outros compostos com aplicações importantes em diferentes sectores industriais, tais como: gorduras, ácidos gordos poliinsaturados, corantes naturais, açúcares, antioxidantes e outros compostos de alto valor bioactivo (Raja et al., 2008).

Contudo, importa referir que ainda não foi possível seleccionar as espécies algais com melhor desempenho em termos de produção e extracção de lípidos, nem optimizar o consumo energético envolvido nas operações de cultivo, colheita e processamento da biomassa. De acordo com Mata e colaboradores (2010) e a título exemplificativo,

pode referir-se que a produtividade lipídica das microalgas do Gén. *Chlorella* é muito variada, podendo situar-se entre 2 e 63% (massa óleo/biomassa seca). Uma vez seleccionada a espécie de microalga, dotando-a de um ambiente favorável em termos de luz, água, nutrientes, CO<sub>2</sub> e temperatura inicia-se o processo de cultivo que culmina com a colheita da biomassa no período de maior produção lipídica que ocorre durante a fase estacionária de crescimento. As microalgas podem adoptar três tipos de metabolismo, o fotoautotrófico, o heterotrófico e o mixotrófico, podendo mudar a sua actividade metabólica em resposta às condições ambientais.

Na produção fotoautotrófica, através da fotossíntese, as microalgas podem transformar o dióxido de carbono e a luz em várias formas de energia química e, em conjunto com outras substâncias presentes no meio, podem formar proteínas, lípidos e glúcidos. O cultivo de microalgas pode ser feito em sistemas de cultura abertos – as lagoas naturais ou artificiais (lagoas Raceway), ou em sistemas fechados – os fotobiorreactores. Em sistemas abertos a quantidade de biomassa microalgal varia consideravelmente com as estações do ano, tendo sido já registadas 10g biomassa/m<sup>2</sup>.dia no inverno e 40-50 g biomassa/m<sup>2</sup>.dia no verão (Rosa, 2007). A viabilidade de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas da espécie seleccionada, bem como pelas condições presentes nestes sistemas e pelos custos de área de implantação (Brennan e Owende, 2010).

Os requisitos básicos para o crescimento de microalgas fotoautotróficas devem incluir fontes de carbono e de energia, macronutrientes e micronutrientes. Como fonte de carbono estas algas utilizam o CO<sub>2</sub> proveniente da atmosfera ou de efluentes gasosos industriais (Huang et al., 2010), o que se pode tornar duplamente vantajoso, pelo processo de síntese ocorrido em simultâneo com o processo de biorremediação da poluição gasosa.

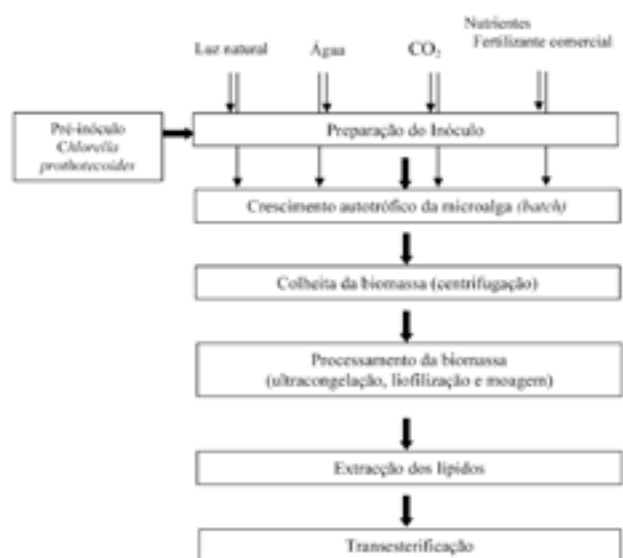
A biomassa colhida poderá ser em seguida processada de modo a extrair o óleo sintetizado, antecedendo a reacção de transesterificação geradora de biodiesel.

A colheita das algas consiste na separação da biomassa do meio de cultura sendo seguida por algumas etapas de separação sólido-líquido para eliminação da água e obtenção da maior quantidade possível de biomassa. De entre estas etapas destacam-se a centrifugação e a desidratação. Através da centrifugação pode concentrar-se rapidamente qualquer tipo de microrganismo com uma eficiência superior a 95% e obtendo-se uma concentração final de biomassa até 150 vezes superior à inicial, embora com um custo considerável devido aos gastos energéticos (Heasman et al., 2000). A desidratação pode fazer-se por liofilização realizada em três etapas sequenciais: a pré-congelação, realizada a uma temperatura que permita a máxima congelação

da água, a secagem primária onde se efectua a sublimação do gelo e a secagem secundária onde se elimina a água por evaporação a vácuo até um teor de 2%. Esta é também uma operação dispendiosa, embora com a vantagem da obtenção dos produtos com estruturas inalteradas e facilmente hidratáveis (Brennan e Owende, 2010). A extracção lipídica é facilitada se após a desidratação se promover o rompimento celular por moagem. Esta extracção pode ser efectuada em extractor de Soxhlet utilizando como solventes o hexano, o etanol ou uma mistura hexano-etanol 1:1 ou 3:1, sendo possível obter 98% de ácidos gordos (Mata et al., 2010). A reacção de transesterificação é realizada habitualmente com metanol utilizando-se uma catálise alcalina com metilato de sódio. Os rendimentos desta reacção são bastante elevados, na ordem dos 98%, obtidos com baixo tempo de reacção - 30 minutos (Balat e Balat, 2010).

A norma europeia EN ISO 14214 de Novembro de 2008 estipula as especificações de qualidade a que o biodiesel deve obedecer para poder ser comercializado como combustível.

Para a produção laboratorial do biodiesel a partir da microalga seguiram-se os passos descritos no diagrama da figura 1.

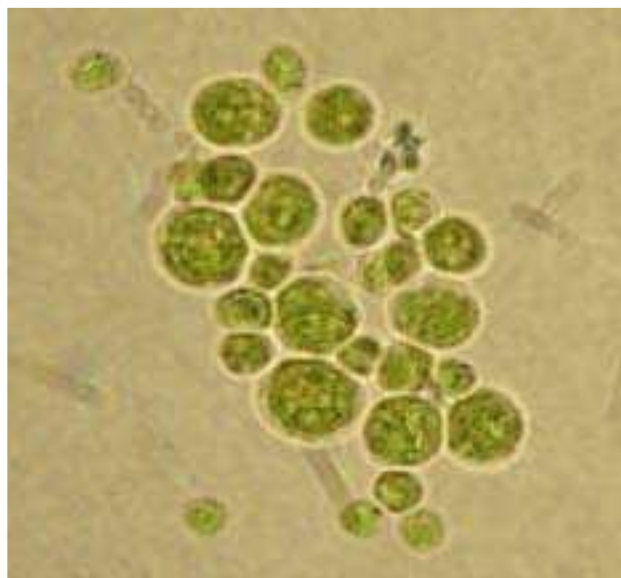


**Figura 1** – Etapas para a produção de biodiesel a partir da *Chlorella protothecoides*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a microalga *Chlorella protothecoides* proveniente da colecção da UTEX (Universidade de Austin, Texas), representada na figura 2.



**Figura 2** – *Chlorella protothecoides* UTEX 25, ampliação de 1000 x.

A *Chlorella protothecoides* é uma alga microscópica verde, unicelular, imóvel, de água doce. Possui uma forma esférica com diâmetro que varia entre 2-10  $\mu\text{m}$ , não contendo flagelos (Raja et al., 2008). Os cloroplastos contêm pigmentos verdes fotossintéticos de clorofila a e b e  $\beta$ -caroteno que possibilitam a fotossíntese na presença de  $\text{CO}_2$ , água, luz solar e pequenas quantidades de minerais.

Esta microalga apresenta a seguinte composição química: proteínas –  $54,1 \pm 2,2\%$ , lípidos –  $29,4 \pm 1,5\%$ , glúcidos –  $13,7 \pm 0,7\%$ , outros –  $4,8 \pm 0,4\%$ . No que respeita à fracção lipídica a sua composição detalhada é: ácidos gordos saturados –  $10,8 \pm 0,6\%$ , ácidos gordos monoinsaturados –  $24,1 \pm 1,2\%$ , ácidos gordos poliinsaturados –  $62,8 \pm 2,5\%$  e ácidos gordos livres  $2,6 \pm 0,2\%$  (Demirbaş, 2009).

### 2.2. Crescimento

#### Condições de crescimento

Usaram-se as seguintes condições de crescimento:

- Temperatura óptima –  $28^\circ\text{C}$ ;
- pH óptimo – 7,2
- Meio de cultura – água destilada não esterilizada com fertilizante líquido com N e P, numa concentração de composto azotado de 2,5 g/l.

Prepararam-se os inóculos com um volume de 500 ml, adicionando a cada um 30 ml de um pré-inóculo de microalga em suspensão e o fertilizante azotado. Estes foram mantidos em condições autotróficas até se atingir a fase exponencial de crescimento. Cada um dos pré-inóculos permitiu a inoculação de um reactor batch. Estes reactores,

foram sujeitos a uma incidência média de luz solar directa de 6h, num intervalo de temperaturas entre 20 e 42°C.

### Reactor batch

Utilizou-se um contentor de PET de 5l de capacidade, com agitação e entrada de ar proporcionada por uma bomba e um difusor de aquário, com controlo e registo manual de temperatura.

## 2.3. Controlo do crescimento

Foram realizadas amostragens de 10 ml, em duplicado, para monitorização do crescimento microalgal, através da medição da densidade óptica do meio de crescimento e determinação da respectiva biomassa seca (gravimetria). Realizou-se uma curva de calibração densidade óptica *versus* biomassa seca, com medição da absorvância a 540 nm.

## 2.4. Processamento da biomassa algal e extracção dos lípidos

Centrifugaram-se os meios de cultura com as microalgas a 4500 rpm durante 10 minutos, concentrando a microalga para posterior ultracongelamento (a -60°C) e liofilização (durante 48h). A biomassa algal liofilizada foi moída num moinho de discos vibratórios com o objectivo de promover a lise celular (figura 3), utilizando-se uma massa de  $\approx 2,5$ g e um tempo de 20 s.

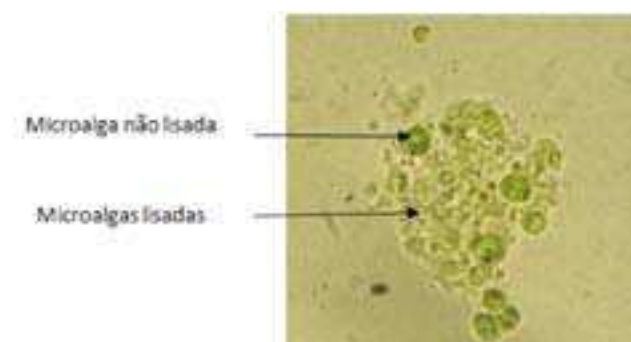


Figura 3 – Microalga moída – células lisadas e não lisadas.

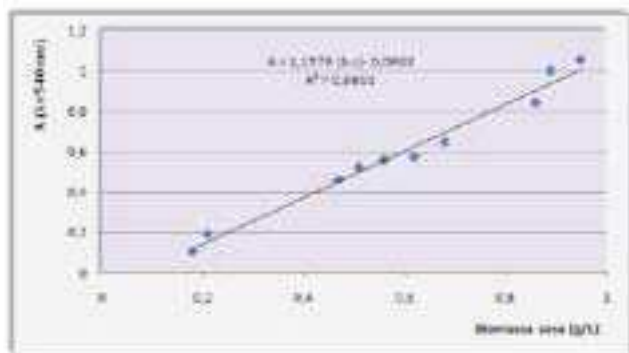
Após a moagem foi realizada a extracção dos lípidos das microalgas utilizando um extractor de Soxhlet e o n-hexano como solvente. A extracção decorreu durante 6 horas, com um número mínimo de 2 ciclos por hora. O solvente foi posteriormente recuperado utilizando um evaporador rotativo. Os balões foram secos em estufa a 60°C, até obtenção de massa constante.

## 2.5. Transesterificação e análise do biodiesel

A determinação do perfil de ácidos gordos constituintes do óleo foi baseada no método de Lepage e Roy (1986). Pesou-se 0,1 g de biomassa algal liofilizada e moída e adicionaram-se a esta 2,0 ml de uma mistura de metanol/cloreto de acetilo (95:5 v/v) recém-preparada em banho de gelo. Adicionou-se 0,2 ml de solução de padrão interno – ácido heptadecanóico. A mistura foi fechada num tubo de ensaio sob atmosfera de azoto e ao abrigo da luz, sendo posteriormente aquecida a 80°C durante 1h. Após arrefecimento até à temperatura ambiente adicionaram-se 2,0 ml de n-heptano com 0,01% de 2,6-di-tert-butil-hidroxitolueno (BHT), para a extracção dos ésteres metílicos e 1,0 ml de água destilada para facilitar a separação das fases. A fase orgânica (heptanóica) foi transferida para um filtro de algodão com um leito de sulfato de sódio anidro e foi filtrada, tendo sido recolhida num vial em atmosfera de azoto. As amostras de biodiesel foram injectadas no cromatógrafo gasoso (GC) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,32 mm de diâmetro interno) e um detector de ionização de chama. A programação do forno foi a seguinte: temperatura inicial - 200°C, durante 8 min, rampa de temperatura - 4°C/min até 240°C com patamar a 240°C durante 24 min. As temperaturas do injector e do detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente, e a relação de split de 1:50 durante 5 min e de 1:10 no tempo restante. Por cada amostra foram preparadas 2 derivatizações independentes (análise de transmetilação) e, por cada derivatizado foi realizada uma injeção. Assim, cada análise de ácidos gordos correspondeu à média da área dos picos de 2 injeções. Os resultados foram expressos em mg/100mg biomassa seca. A identificação dos picos e o cálculo dos factores de resposta foram realizados utilizando padrões conhecidos (Nu-Chek-Prep, Elysian, USA).

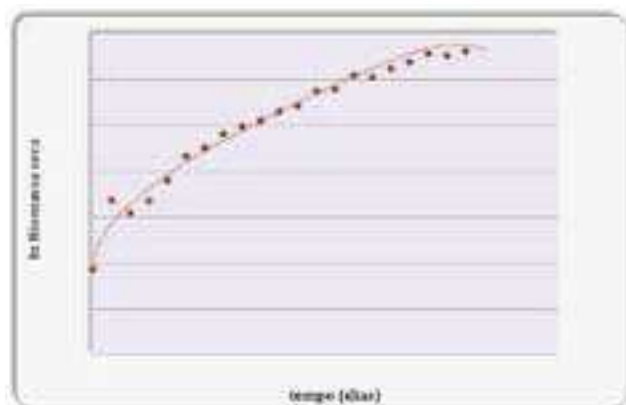
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi caracterizado o crescimento da microalga através da medição diária da densidade óptica do meio de crescimento. Para a determinação da biomassa algal seca elaborou-se uma curva de calibração (figura 4) a partir de 20 amostragens. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) apresenta um valor bastante bom, tendo em conta que se trata de resultados experimentais, com a particularidade de traduzirem um crescimento de uma população viva ao longo de 13 dias.



**Figura 4** – Curva de calibração Absorvância versus Biomassa seca.

A figura 5 apresenta as principais fases de um dos crescimentos realizados com a *Chlorella*. Pela análise do gráfico, podemos verificar que a fase de adaptação e a fase de aceleração foram bastante curtas, apenas 1 dia, as fases de crescimento exponencial e de desaceleração foram de 16 dias enquanto a fase estacionária se manteve durante 3 dias. Este período foi escolhido por ser entendido que durante a fase de depleção de nutrientes a produção lipídica aumenta consideravelmente (Scott et al., 2010).



**Figura 5** – Curva de crescimento da biomassa algal. 1 - Fase de adaptação e fase de aceleração; 2 - Fase exponencial e fase de desaceleração; 3 - Fase estacionária.

De seguida foram realizadas duas extracções Soxhlet (em duplicado) a partir da biomassa algal previamente moída. Numa delas utilizou-se a biomassa de um reactor onde a colheita da alga foi efectuada no início da fase estacionária – amostras A1 e A2; na outra extracção utilizou-se a biomassa colhida noutra reactor, ao 3º dia da fase estacionária – amostras B1 e B2. Deste procedimento resultou um total de quatro amostras cujos resultados se mostram na tabela 1.

Verifica-se claramente a diferença de rendimentos lipídicos obtidos em função do momento da colheita algal, de acordo com a literatura (Scott et al., 2010). Com este teor de lípidos (12,05%) e sabendo que a taxa teórica de conversão da reacção de transesterificação varia entre 95 e 99%, pode-se estimar que se obteria um intervalo de volumes de biodiesel situado entre 0,133 l e 0,139 l respectivamente.

**Tabela 1** - Massas usadas e rendimentos obtidos nas extracções Soxhlet dos lípidos produzidos.

Amostra	Massa de alga (g)	Massa dos lípidos (g)	Rendimento da extracção (%)	Rendimento médio (%)
A1	1,0010	0,0938	9,37	9,28
A2	1,0010	0,092	9,19	
B1	1,0034	0,1233	12,29	12,05
B2	1,007	0,1182	11,81	

O rendimento de biodiesel em função da massa de alga, seria por consequência cerca de 11,7%. O valor obtido de 12,05% é da mesma ordem de grandeza que os rendimentos descritos por outros autores (Miao e Wu, 2006, 2004).

De forma a produzir o biodiesel foram realizadas as reacções de transesterificação usando o método de Lepage e Roy a partir da biomassa algal moída. Seguiu-se uma metodologia semelhante à utilizada na extracção dos lípidos, de forma que a tabela 2 mostra os resultados obtidos na análise cromatográfica dos ésteres metílicos do biodiesel produzido a partir das amostras A1/A2 e B1/B2.

**Tabela 2** – Ácidos gordos dos óleos produzidos pela *Chlorella protothecoides*.  $\Sigma$  FA Total - soma total de ácidos gordos;  $\Sigma$  SFA - soma de ácidos gordos saturados;  $\Sigma$  MUFA - soma de ácidos gordos monoinsaturados;  $\Sigma$  PUFA - soma de ácidos gordos polinsaturados.

Ácidos gordos	Amostras A1/A2		Amostras B1/B2	
	Massa (mg/100mg b.s.)	Abundância Relativa (%)	Massa (mg/100mg b.s.)	Abundância Relativa (%)
14:0	0,080±0,024	1,7	0,109±0,028	2,0
16:0	0,598±0,116	12,6	0,830±0,082	15,1
18:0	0,033±0,009	0,7	0,059±0,012	1,1
<b><math>\Sigma</math> SFA</b>	<b>0,711±0,148</b>	<b>15,0</b>	<b>0,998±0,123</b>	<b>18,2</b>
16:1 $\Omega$ 7	0,103±0,045	2,2	0,124±0,013	2,3
18:1 $\Omega$ 9	0,543±0,130	11,5	0,766±0,118	13,9
<b><math>\Sigma</math> MUFA</b>	<b>0,647±0,175</b>	<b>13,7</b>	<b>0,890±0,131</b>	<b>16,2</b>
18:2 $\Omega$ 6	0,646±0,159	13,6	0,531±0,088	9,6
18:3 $\Omega$ 6	0,048±0,013	1,0	0,052±0,007	0,9
18:3 $\Omega$ 3	2,685±0,723	56,7	3,028±0,444	55,1
<b><math>\Sigma</math> PUFA</b>	<b>3,380±0,895</b>	<b>71,3</b>	<b>3,611±0,540</b>	<b>65,6</b>
<b><math>\Sigma</math> FA Total</b>	<b>4,738±1,218</b>	<b>100</b>	<b>5,499±0,794</b>	<b>100</b>

Os ésteres metílicos isolados foram originados pelos ácidos gordos existentes nos lípidos sintetizados pela microalga. Estão listados os ácidos gordos isolados com maior relevância em termos de abundância relativa que permitem avaliar a qualidade do biodiesel.

Segundo a Norma Europeia EN 14214, de todos os ésteres metílicos derivados dos ácidos gordos insaturados, os que merecem uma especial atenção são os linolénicos 18:3 e os polinsaturados ( $\Omega 4$  com ligações duplas), não devendo estes ultrapassar os limites de 12% e 1%, respectivamente (Silva et al., 2009).

Pela análise dos dados, verificou-se que no que respeita ao ácido gordo linolénico 18:3 $\Omega 6$ , este não ultrapassou a percentagem limite (12%), enquanto o ácido 18:3 $\Omega 3$  ultrapassou este limite atingindo um diferencial de 44,7% nas amostras A1/A2 e de 43,1% nas amostras B1/B2, sendo o ácido gordo dominante dos ésteres metílicos presentes nas amostras.

Os ésteres metílicos poliinsaturados ( $\Omega 4$  com ligações duplas) não foram detectados. Em relação aos ácidos gordos 18:0, 18:1 e 18:2, verifica-se que estes não estão presentes numa elevada quantidade, 25,8% nas amostras A1/A2 e 24,6% para as amostras B1/B2. Estes resultados indicam que o biodiesel produzido a partir destas amostras não se revela muito promissor, a não ser que este óleo microalgal seja misturado com outro óleo bastante saturado, como é o caso do óleo de amendoim (Silva et al., 2009).

## 4. CONCLUSÃO

A *Chlorella protothecoides* é uma microalga fácil de cultivar em modo autotrófico e que produz quantidades significativas de lípidos que puderam ser transesterificados para produzir biodiesel.

Através da curva de crescimento algal foi possível delinear as diferentes fases de crescimento, de modo a identificar a fase estacionária, altura ideal para a colheita da alga em virtude dela possuir nesta fase a maior quantidade de lípidos.

Após a produção da microalga, esta foi processada e extraíram-se os lípidos através de uma extracção de Soxhlet, obtendo-se um rendimento de 12,05%, valor este próximo do teórico para o crescimento autotrófico.

Pela análise cromatográfica verificou-se que o biodiesel produzido contém, maioritariamente, o éster metílico do ácido gordo linolénico 18:3 $\Omega 3$ , num teor relativo de aproximadamente 56%, o que potencia uma estabilidade oxidativa baixa deste biodiesel. Assim, o biodiesel produzido exclusivamente a partir dos óleos desta microalga, não pode ser considerado viável. Para cumprir os valores

presentes na Norma Europeia EN 14214, este óleo deveria ser misturado previamente à reacção de transesterificação com outros óleos mais saturados.

## AGRADECIMENTOS

As autoras pretendem agradecer ao LNEG, na pessoa do Doutor Alberto Reis a cedência da microalga e o acompanhamento dado às alunas do curso de EAB do Instituto Politécnico de Tomar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balat M. e Balat H., (2010). Progress in biodiesel processing. *Applied Energy* 87:1815-1835.
- Brennan L. e Owende P., (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of bio-fuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577.
- Demirbaş A., (2009). Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources, Part A* 31:163-168.
- Heasman, M., Diemar, J., O'Connor, W., Sushames, T. e Foulkes, L., (2000). Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve mollusk – A summary. *Aquaculture Research* 31(8-9): 637-659.
- Huang G., Chen F., Wei D., Zhang X. e Chen G., (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87:38-46.
- Lepage, G. e Roy, C.C., (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *Journal of Lipid Research* 27:114-119.
- Mata T., Martins A. e Caetano N., (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232.
- Miao X. e Wu Q., (2004). High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology* 110: 85-93.
- Miao X. e Wu Q., (2006). Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97:841-846.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S., Rengasamy, R., (2008). A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 34(2):77-88.
- Reis, A., Silva, T., Gouveia L. e Rosa F., (2008). As Energias Marinhas em Portugal. Microalgas marinhas, que perspectivas?, Seminário Energia dos Oceanos, Peniche.
- Rosa, F., (2007). O Potencial de Produção de Biocombustíveis em Portugal, Seminário A Ciência dos Biocombustíveis, Sintra.
- Scott S., Davey M., Dennis J., Horst I., Howe C., Lea-Smith D. e Smith A., (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Energy Biotechnology*, 21: 277-286.
- Silva T., Santos C. e Reis A., (2009). Multi-parameter Flow Cytometry as a Tool to Monitor Heterotrophic Microalgal Batch Fermentations for Production Towards Biodiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14:330-337.
- Skjanes K., Lindblad P. e Muller J., (2007). BioCO<sub>2</sub> – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO<sub>2</sub> while producing H<sub>2</sub> and high value products. *Biomolecular Engineering* 24:405-413.
- Wang B, Li Y, Wu N e Lan C.Q., (2008). CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(5):707-718.

- (1) Alunas da Unidade Curricular de Projecto do 3º ano da Licenciatura em Engenharia do Ambiente e Biológica do Instituto Politécnico de Tomar. Portugal.
- (2) Docentes orientadoras do trabalho de Projecto, Departamento de Engenharia Química e do Ambiente do Instituto Politécnico de Tomar. Portugal.