

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA**

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO EFLUENTE DE  
REATOR ANAERÓBIO VISANDO À OBTENÇÃO DE ÉSTERES  
ETÍLICOS**

**ELIAS TREVISAN**

**Dissertação de Mestrado  
submetida à Universidade  
Estadual de Maringá, como parte  
integrante dos requisitos para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Bioenergia, área de concentração  
Biocombustíveis.**

**Maringá, fevereiro de 2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO VISANDO À OBTENÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS**

ELIAS TREVISAN

Engenheiro Ambiental, UNICENTRO, 2010.

Geógrafo, UNICENTRO, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Estadual de Maringá, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Bioenergia, área de concentração Biocombustíveis.

Maringá – PR – Brasil  
Fevereiro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

T814c Trevisan, Elias  
Cultivo de *Chlorella vulgaris* utilizando efluente de reator anaeróbio visando à obtenção de ésteres etílicos / Elias Trevisan. -- Maringá, 2013.  
xii, 69 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2013.

1. *Chlorella vulgaris* - Cultivo - Efluente anaeróbio. 2. Microalga - Cultivo. 3. Efluente anaeróbio. 4. Biomassa - Reação in situ. 5. Ésteres etílicos. I. Arroyo, Pedro Augusto, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. III. Título.

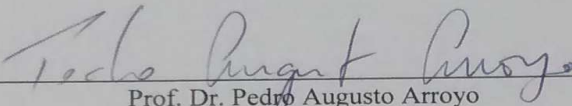
CDD 23.ed. 665.3


GV5-002612


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por **Elias Trevisan** perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 28 de fevereiro de 2013.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo  
Orientador/Presidente

  
Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien  
Membro

  
Prof. Dr. Nehemias Curvelo Pereira  
Membro

**À MINHA ESPOSA TAYSA  
E MINHA FAMÍLIA.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, criador de todas as coisas visíveis e invisíveis, por ter me dado o dom da vida. Por ter possibilitado ter andado em tantos caminhos e com tantas pessoas, que me ajudaram a chegar até este momento.

Agradeço de maneira especial ao Professor Pedro Augusto Arroyo, por ter me acolhido para a realização deste trabalho, pelas suas contribuições ao mesmo e, também, pelos momentos de descontração. Tenho certeza que todos os ensinamentos deste amigo e professor estarão ao longo de minha vida.

A todos os professores do Mestrado em Bioenergia, que compartilharam seus conhecimentos durante esta jornada.

Aos amigos que passaram pelo Laboratório de Catálise e Biodiesel (LCHBio) que sempre que houve necessidade me ajudaram ou me ensinaram, de maneira especial ao Aroldo Salviato, Jorge Burak, Silvio Hoshino, Kemely Branco, Rodrigo Raia e aos demais pela amizade durante este período que estivemos juntos.

Gostaria de agradecer ainda aos funcionários do Departamento de Engenharia Química em especial a Maria Sueli, Walmir e o Fernando que por inúmeras vezes me atenderam prontamente.

À minha amada esposa Taysa, maravilhosa, que caminha ao meu lado e tem me incentivado nesta caminhada que foi muito importante, para nós dois. Pela fé que possui em mim e pelo amor incondicional, pois o meu mundo é o seu abraço.

De maneira muito especial quero agradecer aos meus pais, Euclides e Erika, que ensinaram a mim e aos meus irmãos o valor que se tem o conhecimento, ou como em suas palavras o “ estudo” . O incentivo que deram e o esforço que fizeram para que pudéssemos estudar e alcançar os objetivos que traçamos para a nós.

À minha irmã Eliane, que me ensinou o hábito da leitura, principalmente sobre os seus ombros.

Ao meu irmão Elizeo, meu companheiro de aventuras principalmente a caminho ou na volta da escola. E que também sempre me incentivou na minha caminhada durante a graduação e mestrado.

Aos meus sogros, Jonas e Dirlene, que me acolheram como filho, pelos ensinamentos e incentivo.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia (INT), por ter gentilmente fornecido a cepa da microalga foco deste estudo.

À SANEPAR por ter autorizado a utilização de água residuária em sua estação de tratamento de esgoto.

## **CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* UTILIZANDO EFLUENTE DE REATOR ANAERÓBIO VISANDO À OBTENÇÃO DE ÉSTERES ETÍLICOS**

**Autor: Elias Trevisan**

**Orientador: Prof. Pedro Augusto Arroyo**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual de Maringá; Av. Colombo, 5790, Bloco C-67, Sala 02; CEP 87020-900 – Maringá-PR-Brasil, defendida em 28 de fevereiro de 2013, 69 p.

### **RESUMO**

As microalgas vêm sendo estudadas para a produção de biodiesel e biogás visando à geração de energia. As microalgas também podem ser utilizadas para realizar o tratamento de efluentes industriais, domésticos e da agroindústria, substituindo o uso de nutrientes comerciais. A partir disto, esta dissertação teve por objetivo o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* com efluente de reator anaeróbico, sistema de tratamento de esgoto sanitário, uma tecnologia consolidada e muito empregada no Brasil, o que possibilita, desta forma, remover a amônia remanescente do meio e acumular lipídeos, que poderão ser utilizados para a produção de ésteres. Isto demonstra que é possível substituir o uso de meio sintético no cultivo das microalgas. A partir disso, a produção de ésteres foi realizada por meio de reações *in situ* da microalga, com etanol e ácido clorídrico como catalisador, utilizando como solvente o hexano e o clorofórmio, em tempos de reação que foram de 15 a 150 minutos. Foi avaliada a utilização de três meios sintéticos, selecionados a partir da literatura, juntamente com efluente de reator anaeróbico do tipo Ralf de uma estação de tratamento de esgoto doméstico (efluente *in natura*). Entre os meios sintéticos, a maior produtividade (P) foi obtida para o meio DM ( $P = 77,85 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), alcançando uma produção de  $0,75 \text{ g L}^{-1}$ , após 14 dias de cultivo. Os cultivos com efluente *in natura* foram também avaliados com o uso dos pré-tratamentos, sendo estes filtração e filtração+UV. Os cultivos em que foram realizados a filtração+UV e filtração resultaram em produtividade de  $135,56$  e  $95,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. Estes pré-tratamentos do meio de cultivo foram responsáveis pelas



melhores taxas de remoção do nitrogênio alcançando 100% após 4 dias de cultivo para todas as diluições, enquanto que cultivado em efluente *in natura* necessitou 10 dias. Demonstrando ser viável a utilização do efluente com pré-tratamento e como fonte de nutrientes. Para a produção de ésteres etílicos por meio da reação *in situ* da microalga, os testes com hexano atingiram os melhores resultados nas temperaturas de 75 e 90 °C, alcançando rendimentos máximos de 105,55 e 137,75 mg de ésteres/g de biomassa seca, respectivamente. Por outro lado, a utilização de clorofórmio como solvente apresentou o melhor resultado em 75 °C, com rendimento em ésteres etílicos em torno de 75,89 mg de ésteres/g de biomassa seca. O uso de efluente demonstra-se viável para a produção de biomassa destinada para biocombustíveis e no tratamento de águas residuais. Demonstrada pela produtividade que apresentou valores próximos aos obtidos pelo meio de cultivo convencional, bem como, pela produção de lipídeos que se mantiveram dentro dos encontrados na literatura.

**Palavras-chave:** *Chlorella vulgaris*, cultivo de microalga, efluente anaeróbio, biomassa, reação *in situ*, ésteres etílicos.

## ***Chlorella vulgaris* GROWING USING ANAEROBIC REACTOR EFFLUENT TO ETHYL ESTERS PRODUCTION**

**Author: Elias Trevisan**

**Supervisor: Prof. Dr. Pedro Augusto Arroyo**

Master Thesis; Bioenergy Graduate Program; State University of Maringá; Colombo Av., 5790, Bloco C-67, Sala 02; ZIP 87020-900 – Maringá - PR-Brazil, presented in February, 28<sup>th</sup> 2013, 69p.

### **ABSTRACT**

Microalgae has been studied to biodiesel and biogas production for power generation. Microalgae can also be used to realize the treatment of industrial, domestic and agribusiness effluents, replacing the use of nutrient trading. Thus, this dissertation aimed the cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* with reactor effluent from anaerobic treatment system for sewage, a consolidated technology and widely used in Brazil, enabling to remove the remaining ammonia and accumulate lipids for the esters production. This demonstrates that it can be possible to replace the use of synthetic medium. The production of esters was performed by reactions *in situ*, carried out with the microalgae, ethanol and hydrochloric acid, as catalyst, using hexane and chloroform as solvent and reaction time from 15 to 150 minutes. The evaluation of three synthetic media, based on the literature, was evaluated, besides the effluent from anaerobic reactor type Ralf. Among the synthetic media was obtained a yield of 77.85 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> to the middle DM, reaching a production of 0.75 g L<sup>-1</sup> after 14 days of cultivation. Cultivation using sanitary effluent was also evaluated with pre-treatments, filtration and effluent filtration plus UV. The cultivation was carried out in which the filtration plus UV and just filtration resulted in a productivity of 135.56 and 95.00 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectively. With the use of the reaction *in situ* tests with hexane best results achieved at temperatures of 75 to 90 ° C, reaching maximum esters yield of 105.55 and 137.75 mg/g dry weight, respectively. On the other hand, the use of chloroform as solvent

showed the best results at 60 and 75 °C with esters yield of about 75.89 mg esters/g dry biomass, however, the use of 60 ° C require reaction times higher to achieve the same values.

**Keywords:** esterification/transesterification in situ, ethyl esters, biomass, anaerobic effluent.

# Sumário

<u>CAPÍTULO I</u>	1
<u>INTRODUÇÃO</u>	1
<u>CAPITULO II</u>	4
<u>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	4
<u>II.1 – Águas residuárias</u>	4
<u>II.2 – Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)</u>	6
<u>II.2.1 – Remoção de nutrientes</u>	7
<u>II.3 – Biocombustíveis</u>	8
<u>II.4 – Biodiesel</u>	10
<u>II.5 – Matéria-prima</u>	11
<u>II.6 – Microalgas</u>	12
<u>II.7 – Cultivo de microalgas</u>	14
<u>II.7.1 – Meios de cultivo</u>	16
<u>II.7.2 – Nitrogênio</u>	17
<u>II.7.3 – pH</u>	20
<u>II.8 – Utilização de microalgas para produção de ésteres etílicos por meio de reação <i>in situ</i></u>	21
<u>CAPITULO III</u>	23
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	23
<u>III.1 – Cultivo de microalgas</u>	23
<u>III.1.1 – Meios de cultivo das microalgas</u>	23
<u>III.2 – Cinética de crescimento da microalga</u>	26
<u>III.3 – Métodos analíticos</u>	28
<u>III.3.1 – Monitoramento do pH</u>	28
<u>III.3.2 – Amônia</u>	28
<u>III.3.3 – Sólidos suspensos e totais</u>	28
<u>III.4 – Recuperação e secagem da biomassa</u>	28
<u>III.5 – Extração de lipídeos</u>	29
<u>III.5.1 – Determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de microalga</u>	29
<u>III.6 – Produção de ésteres</u>	30
<u>III.6.1 – Reação <i>in situ</i></u>	30
<u>III.7 – Análises cromatográficas</u>	31
<u>III.7.1 – Quantificação dos produtos</u>	32
<u>CAPITULO IV</u>	35

	13
<b><u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u></b>	35
<b><u>IV.1 – Cultivo das microalgas</u></b>	35
<b><u>IV.1.1 - Avaliação do crescimento de <i>C. vulgaris</i> em meio de cultivo sintético</u></b>	35
<b><u>IV.1.2 – Avaliação do pH</u></b>	44
<b><u>IV.1.3 – Remoção de amônia do efluente</u></b>	45
<b><u>IV.2 – Caracterização dos lipídeos extraídos da biomassa de microalga</u></b>	50
<b><u>IV.3 – Obtenção de ésteres etílicos por reação <i>in situ</i> da microalga</u></b>	51
<b><u>CAPITULO V</u></b>	56
<b><u>CONCLUSÕES</u></b>	56
<b><u>CAPITULO VI</u></b>	59
<b><u>REFERÊNCIAS</u></b>	59

## LISTA DE FIGURAS

<u>Figura II.1: Esquema de um reator anaeróbio para o tratamento de esgoto sanitário.</u>	7
<u>Figura II.2: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.</u>	9
<u>Figura II.3: Efeito do pH sobre o equilíbrio do nitrogênio amoniacal.</u>	18
<u>Figura IV.1: Concentração da biomassa de <i>C. vulgaris</i> em função do tempo, para os diferentes meios sintéticos de cultivo.</u>	36
<u>Figura IV.2: Concentração de biomassa produzida com efluente in natura em função do tempo de cultivo, para as diferentes diluições do meio.</u>	38
<u>Figura IV.3: Concentração de biomassa produzida com efluente in natura filtrado em função do período de cultivo, para as diferentes diluições do meio.</u>	40
<u>Figura IV.4: Concentração de biomassa produzida com o efluente in natura filtrado e submetido à desinfecção com luz ultravioleta em função do período de cultivo e da diluição do meio.</u>	42
<u>Figura IV.6: Remoção de amônia em efluente in natura em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.</u>	46
<u>Figura IV.7: Remoção de amônia em efluente in natura filtrado em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.</u>	47
<u>Figura IV.8: Remoção de amônia no efluente in natura filtrado tratado com luz ultravioleta em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.</u>	49
<u>Figura IV.9: Rendimento em ésteres etílicos obtidos por reação in situ da microalga em função do tempo, para o solvente hexano, em diferentes temperaturas.</u>	52
<u>Figura IV.10: Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação in situ em função do tempo de reação, para o solvente clorofórmio, em diferentes temperaturas.</u>	54

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela II.1: Coleta e tratamento de esgoto sanitário no Brasil.</u>	5
<u>Tabela II.2: Principais espécies utilizadas na produção de biocombustíveis.</u>	12
<u>Tabela II.3: Quantidade de óleo encontrada em algumas espécies de microalga.</u>	13
<u>Tabela II.4: Tipos de meio de cultivo utilizados na produção de microalgas.</u>	17
<u>Tabela II.5: Proporção entre amônia livre e ionizada em função do pH e temperatura.</u>	19
<u>Tabela III.1 – Parâmetros físico-químicos do efluente in natura.</u>	26
<u>Tabela IV.1: Produtividade e taxa de crescimento para os três meios de cultivo sintéticos.</u>	36
<u>Tabela IV.2: Produtividade e taxa de crescimento em função da diluição do efluente in natura.</u>	39
<u>Tabela IV.3: Produtividade e taxa de crescimento da microalga em função da diluição do efluente in natura filtrado.</u>	41
<u>Tabela IV.4: Produtividade e taxa de crescimento da microalga em função da diluição do efluente in natura submetido à filtração seguida de desinfecção com luz UV-B.</u>	43
<u>Tabela IV.5: Quantidade de lipídios totais/g de biomassa seca obtida na extração do óleo de <i>C. vulgaris</i> com hexano em soxhlet.</u>	50
<u>Tabela IV.6 – Composição em ácidos graxos do óleo de microalga <i>C. vulgaris</i>.</u>	51

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

O surgimento e desenvolvimento do capitalismo proporcionaram à população que viveu entre os séculos XII e XVII, que possuía uma expectativa de vida de apenas 30 anos, melhores condições de vida, pois até então a mesma convivia com graves problemas de escassez de recursos, fome e doenças (ROCKWELL, 2010). Para Von Mises (2010), neste período a produção industrial veio em benefício da população, com a produção de vestuários e equipamentos, destinados a melhorar o seu trabalho no dia-a-dia. Porém, a modernização da sociedade, por meio do desenvolvimento de novas tecnologias, criou novas demandas (energia e matéria-prima) e problemas a serem solucionados, os quais surgiram pelo avanço e modernização da sociedade. Entre os problemas que podem ser destacados estão os que surgiram com o crescimento da indústria e das cidades sem o devido cuidado com os resíduos gasosos, líquidos e sólidos dispostos no ambiente. Assim, a demanda por energia está diretamente ligada ao crescimento populacional e econômico, sendo esperado um crescimento que ultrapasse 1,4 bilhão de pessoas nos próximos 20 anos, gerando, assim, um aumento no consumo de energia em torno de 40% (BP, 2011). A manutenção do sistema econômico mundial atualmente em funcionamento se deve às opções de matéria-prima e fontes energéticas realizadas no passado (FURTADO, 2003) e, também, no presente.

O fim do petróleo abundante e barato (CAMPBELL & LAHERRÉRE, 1998; VASUDEVAN et al., 2008), juntamente com o choque dos preços do petróleo de 1973 e 1979 ou, ainda, em 1991 com a guerra do Golfo, deixou claro esta dependência que a humanidade possui do “Ouro Negro”. Deste modo, se tornou imprescindível buscar alternativas à principal fonte de energia, deixando para trás a economia do petróleo, para abraçar a economia verde. Isto passou a ser uma preocupação em escala mundial, que está fundamentada nas mais diversas questões que abrangem desde a saúde, a segurança e soberania dos países, e à manutenção e estabilidade econômica (MASIERO & LOPES, 2008).

Os novos desafios impostos pela economia verde propiciaram um cenário positivo para a retomada de tecnologias que até então haviam sido deixadas de lado pelo seu alto custo de desenvolvimento/implantação ou, ainda, pela concorrência com os



custos da energia proveniente do petróleo. Deste modo, a elevação dos preços do óleo tornou possível o acréscimo de energia gerada a partir de fontes alternativas como a eólica, biomassa, biocombustíveis de óleos vegetais e/ou gordura animal etc. Porém, o caminho é longo e audacioso, pois no ano de 2009 aproximadamente 88% da energia primária ainda era gerada a partir de combustíveis fósseis, das quais em torno de 40% era derivado do petróleo, 32% de carvão e 28% de gás natural (BP, 2009). A partir desta necessidade de se superar obstáculos, tanto no suprimento de energia, fornecimento de matéria-prima e solucionar problemas ambientais, inúmeros países têm lançado mão de alternativas que possibilitem a utilização de energias renováveis e/ou utilização de resíduos provenientes de outros processos.

O aproveitamento do potencial bioenergético proveniente da conversão da energia solar em energia química, realizada por meio da fotossíntese (BNDES, 2008), trouxe uma nova perspectiva para o Brasil e outros países em desenvolvimento. A bioenergia pode ser obtida a partir de diversas matérias-primas, como, por exemplo, o bioetanol da cana-de-açúcar, biodiesel de óleos de vegetais ou gorduras animais, carvão vegetal de reflorestamento ou resíduos de madeiras, biogás da decomposição de material orgânico ou tratamento de efluentes ou, ainda, bioeletricidade produzida pela queima de bagaço de cana-de-açúcar, restos de madeiras ou lenha.

Deste modo, o Brasil, no ano de 1975, com o Programa Brasileiro de Etanol (Proálcool), lançou a pedra fundamental para o uso de biocombustíveis em grande escala no transporte veicular, pela adição do etanol como aditivo na gasolina em substituição ao metil terc-butil éter (MTBE) e, também, na forma pura como combustível. Cabe ressaltar que o biodiesel também teve o início de sua trajetória na década de 1970, por meio do plano de produção de óleos vegetais para fins energéticos (Pró-óleo), visando à substituição de até 30% do óleo diesel. Isto se daria a partir do uso de óleos de soja, colza, girassol e amendoim. No entanto, a estabilização nos preços do petróleo e início do funcionamento do proálcool, juntamente com o alto custo de produção dos óleos vegetais, fizeram com que este programa fosse descontinuado. A retomada das metas do Pró-óleo se deu somente no ano de 2003, com o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB).

A retomada dos programas de incentivo ao biodiesel fez com que o setor agroindustrial tivesse uma ampliação na produção de biodiesel. Assim, no ano de 2006

a produção de biodiesel totalizou 69.000m<sup>3</sup> e já no ano de 2011 ultrapassou a marca de 2,5 milhões de m<sup>3</sup> (ANP, 2012). Podendo ser produzido a partir de óleos vegetais como, soja, girassol e palma ou, ainda, de gordura animal. Já o etanol, no Brasil, é oriundo da cana-de-açúcar. Novas alternativas de matérias-primas para a produção de biodiesel vêm sendo pesquisadas, entre as quais se destacam os estudos com pinhão-manso, mamona e microalgas. No entanto, estas culturas ainda apresentam problemas na sua cadeia de produção, desde o cultivo até o produto final.

Neste contexto, o uso da microalga para a produção de biodiesel vem sendo estudada em todo o mundo por apresentar características que podem contribuir para o fornecimento de biocombustíveis, das quais se destacam a alta produtividade por área, rápido crescimento, utilização de efluentes agrícolas, doméstico e industrial, área menor de cultivo e, além disso, pela cultura também não competir com áreas destinadas ao cultivo de alimentos e pastagens (CHISTI, 2007).

Portanto, a presente dissertação teve como objetivo estudar o potencial de produção da espécie *Chlorella vulgaris*, utilizando efluente de reator anaeróbio como meio de cultivo, avaliando a sua capacidade em remover amônia, principal forma do nitrogênio em efluentes sanitários, e também a partir da biomassa produzida, obter ésteres etílicos por meio de reações *in situ*. Como objetivos específicos têm-se:

- Avaliação do crescimento do *Chlorella vulgaris* em meio sintético;
- Avaliação do crescimento do *Chlorella vulgaris* em efluente de reator anaeróbio;
- Remoção de amônia do efluente anaeróbio;
- Avaliação da reação *in situ* para a produção de ésteres etílicos de *Chlorella vulgaris*.

## CAPITULO II

# FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1 – Águas residuárias

Desde os tempos mais remotos, em que o homem passou a se assentar em cidades, iniciaram as preocupações com a coleta de águas servidas ou o esgoto sanitário, como é conhecido. Como exemplo, em 3.750 a. C., há o relato da construção de galerias para este fim, em Nipur na Índia e na Babilônia (AZEVEDO NETTO & HESS, 1984), e na Roma Imperial se fazia ligação direta das casas até os canais. No entanto, isto não significa que a preocupação tenha se refletido nas sociedades, pois ao longo do tempo são vários os relatos na história da humanidade de epidemias ou pandemias que assolaram grandemente as populações. De fato, durante o período de 1345 a 1349 uma pandemia de peste bubônica vitimou mais de 43 milhões de pessoas, sendo que a população mundial à época não ultrapassava 400 milhões de pessoas. No ano de 1826 outra pandemia de cólera atingiu toda a Europa e em 1831 foi a vez da Inglaterra perder 50.000 vidas, devido a uma epidemia de cólera (NUVOLARI, 2011). Todas as doenças acima citadas têm relação com a falta de saneamento das cidades.

Assim, apesar da abundância de fatos que demonstram a necessidade de se realizar a coleta e o tratamento do esgoto sanitário, no Brasil, ainda, a maioria das cidades não apresenta sistemas que realizem esta função. Porém, terão de implantá-los, pois a falta destes põe em risco o abastecimento de água potável para a população, além de acarretar sérios problemas à saúde pública (NUVOLARI, 2011; MACHADO e

CHERNICHARO, 1997). Pode-se verificar, a partir disto, a importância crescente da necessidade de se tratar o esgoto sanitário.

O tratamento de esgoto sanitário apresenta uma diversidade de alternativas, sendo a disposição no solo ou em corpos receptores naturais, como rios, lagos e oceanos, as que foram e ainda continuam sendo as mais empregadas. Porém, conforme a carga orgânica que é lançada no meio, o tratamento pode provocar total degradação dos corpos receptores, sendo necessário realizar a decomposição de contaminantes até níveis adequados para não causar alterações no ecossistema de lançamento (NAGALLI & NEMES, 2009).

O Brasil, segundo dados do SNSA (2012), realiza a coleta de 46,2% do esgoto produzido. No entanto, quando se passa para os índices de tratamento, estes valores diminuem para 37,9% do total produzido, com a região sudeste apresentando a melhor condição em termos de coleta (71,8%) e a região centro-oeste para o tratamento (43,1%), conforme pode ser verificado com mais detalhes na Tabela II.1.

**Tabela II.1: Coleta e tratamento de esgoto sanitário no Brasil.**

<b>Região</b>	<b>Coleta de esgoto (%)</b>	<b>Tratamento do esgoto gerado (%)</b>
<b>Norte</b>	8,1	22,4
<b>Nordeste</b>	19,6	32,0
<b>Sudeste</b>	71,8	40,8
<b>Sul</b>	34,3	34,0
<b>Centro-oeste</b>	46,0	43,1
<b>BRASIL</b>	46,2	37,9

Fonte: SNSA (2012).

Entre os sistemas mais empregados estão os sistemas de tratamento biológico anaeróbio. No Brasil estes sistemas já possuem suas tecnologias consolidadas, além de apresentarem uma série de outras vantagens, como baixo consumo de energia, baixa produção de sólidos, baixa demanda por área e podem ser utilizadas em pequena e grande escala (CHERNICHARO, 2001). Entretanto, uma das principais características deste sistema é a necessidade de pós-tratamento, pois os reatores anaeróbios

difícilmente conseguem atender aos padrões que são estabelecidos pela legislação brasileira. O pós-tratamento tem a função de completar a remoção da carga orgânica, nutrientes (N e P) e organismos patogênicos, tais como vírus, bactéria, protozoários e helmintos (SOUSA *et al.*, 2010, SARAIVA e KOETZ, 2002).

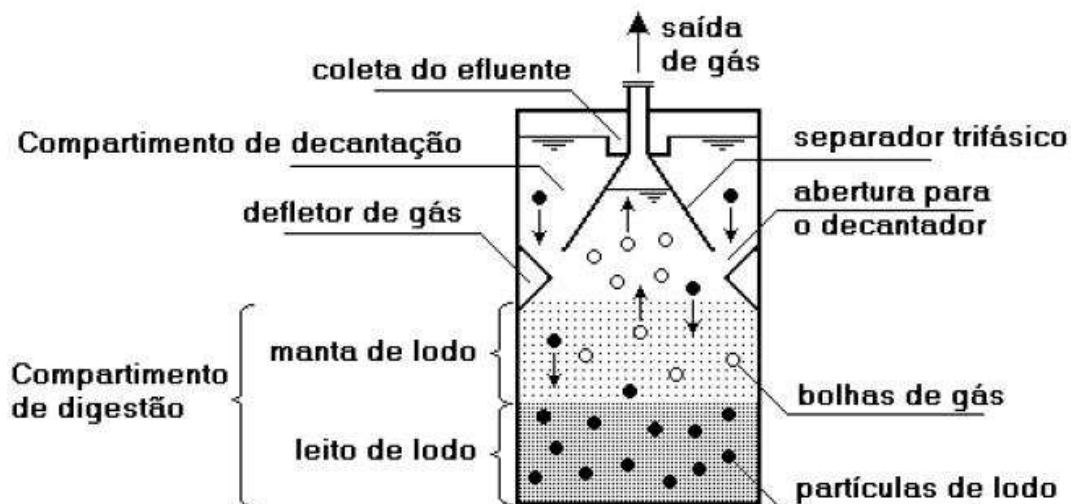
O pós-tratamento é possível com a destinação do efluente para a agricultura e pastagens (FONSECA *et al.*, 2007), ou para a produção de microalgas, que demanda, como principais elementos para o seu desenvolvimento, o nitrogênio e o fósforo (LI *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2011).

## **II.2 – Reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF)**

Os reatores anaeróbios são sistemas de tratamento do esgoto sanitário com tecnologia consolidada e que propicia uma boa eficiência no tratamento dos efluentes (LETTINGA, 1995), que têm sido largamente utilizados no Brasil, desde a década de 1980 e de maneira mais acelerada a partir da década de 1990 (KATO & FLORÊNCIO, 2001). A utilização da tecnologia anaeróbia teve uma boa aceitação devido as suas principais características, como o baixo custo de implantação e manutenção, simples funcionamento e, além disso, são favoráveis à operação em condições de temperatura ambiente (CAMPOS *et al.*, 2005).

O funcionamento do reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF) é simples. Inicialmente, o esgoto é gradeado e desarenado, sendo em seguida conduzido até uma câmara no centro superior, de onde é dividido de maneira igual, alimentando os tubos difusores, os quais conduzem até o fundo do reator. Este tipo de reator é amplamente empregado no estado do Paraná, pela companhia de saneamento – SANEPAR (AISSE & LEITE, 1997). Na parte inferior do reator, o esgoto em fluxo ascendente é misturado a um manto de lodo formado, no qual cresce um consórcio de diferentes tipos de microrganismos. Sem a presença de oxigênio, estes microrganismos realizam a transformação dos compostos orgânicos complexos (proteínas, lipídeos etc.) em produtos simples (metano e gás carbônico) (CAMPOS *et al.*, 2005). Na parte superior do reator existe uma parede defletora, servindo de interface entre a zona de digestão e de decantação. O gás formado é acumulado na parte superior interna que, por meio de

um tubo, é descartado ou aproveitado para fins energéticos (AISSE et al., 2000). Um esquema do RALF pode ser visto na Figura II.1.



**Figura II.1:** Esquema de um reator anaeróbico para o tratamento de esgoto sanitário.

Fonte: <http://adequarliamb.blogspot.com.br/2011/07/estudo-de-viabilidade-tecnica-para.html>.

### II.2.1 – Remoção de nutrientes

O tratamento anaeróbico de efluentes com reatores do tipo RALF apresenta uma capacidade insatisfatória na remoção de nitrogênio e fósforo, que são os principais nutrientes presentes no esgoto. Estes nutrientes, juntamente com os micronutrientes, são essenciais nos processos biológicos presentes na manta de lodo. Assim, torna-se necessário a aplicação de um sistema de pós-tratamento deste efluente (SOUSA et al., 2010), pois a descarga de nutrientes nos cursos de água superficiais provoca a diminuição dos valores de oxigênio e o aumento de biomassa, provocando a eutrofização dos ambientes aquáticos (CHERNICHARO et al., 2001, RICKLEFS, 2011). De fato, alguns autores tem apontado que a eficiência na remoção dos nutrientes (N e P) é quase que desprezível em sistemas anaeróbios (CALIJURI et al., 2009, MIKI, 2010).

### II.3 – Biocombustíveis

Para muitos os biocombustíveis ainda são um assunto desconhecido, pois estes podem ser líquidos, caso do etanol e do biodiesel, sólidos ou ainda gasosos, como o biogás ou hidrogênio. Geralmente, são obtidos a partir de biomassa, tais como: cereais, culturas de açúcar ou de amido, materiais celulósicos, como gramíneas, resíduos de culturas agrícolas, resíduos de cultivo e processamento de florestas e resíduos sólidos urbanos, que são convertidos em álcool, porém, esta alternativa ainda possui um alto custo. Também, pode-se citar a gaseificação de biomassa para a produção de uma variada gama de gases, ou, ainda, gás de síntese, que pode ser convertido em outros combustíveis líquidos, como gasolina e diesel sintético. Uma outra alternativa é a utilização de plantas oleaginosas para a extração dos óleos presentes nas sementes. O óleo é convertido em ésteres alquílicos para a mistura com o diesel derivado do petróleo (AIE, 2004).

O uso de biocombustíveis líquidos tem sido destinado para a frota veicular, por ser o único combustível com maturidade tecnológica e viável economicamente, sendo estes utilizados em motores de ciclo Otto – etanol – e ciclo Diesel - biodiesel. Ambos foram concebidos por seus criadores para o uso de bioetanol e óleo de amendoim, respectivamente. Porém, com o surgimento dos derivados do petróleo – gasolina e diesel – estes foram deixados de lado a partir do início do século XX (BNDES, 2008). No entanto, a demanda atual por energia fez com que sejam buscadas alternativas que venham a substituir parcialmente e/ou complementarmente a matriz energética mundial. Isto pode ser alcançado com a produção e mistura entre combustíveis fósseis e biocombustíveis, diminuindo, assim, o impacto na economia mundial, que seria ocasionado por uma eventual substituição abrupta.

No Brasil, a implantação e uso de biocombustíveis já havia se iniciado no ano de 1975, por meio do Programa Brasileiro de Etanol, o Proálcool, para o uso deste como combustível ou como uma mistura com a gasolina. Também é necessário destacar o Pró-óleo – Programa Nacional de Óleos Vegetais para Produção de Energia, implantado em 1983, mas descontinuado em 1985. Este programa foi retomado no ano de 2003, por meio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) (MASIERO & LOPES, 2008), devido à alta dos preços do petróleo no mercado internacional. A Figura

II.2 ilustra a evolução do uso de biocombustíveis no cenário brasileiro. Neste cenário pode ser destacada a importância que o álcool teve desde a sua implantação, chegando a representar 25% da mistura da gasolina, enquanto que o biodiesel passou a receber a devida importância somente a partir de 2008. Se, por exemplo, for tomado como base o que ocorreu com o álcool, há previsão de aumento considerável no uso de biodiesel no Brasil, iniciado com a implantação do B5 em 2010 e a possibilidade de desenvolvimento de novas tecnologias para produção de biocombustíveis, entre as quais está biodiesel microalgal (CHISTI, 2007).



**Figura II.2: Evolução dos biocombustíveis no Brasil.**

Fonte: ANP (2012).

A partir da promulgação da Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005 foi incluído o uso de biocombustíveis na legislação brasileira. Assim, os biocombustíveis foram



definidos como derivados de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil.

#### **II.4 – Biodiesel**

O biodiesel é um combustível alternativo para motores ciclo diesel, que passou a ter maior atenção após iniciativas de sucesso em vários países (McGINN *et al.*, 2011). Segundo Knothe *et al.* (2006), a primeira patente sobre o que seria o biodiesel hoje é do pesquisador belga G. Chavanne, de 1937, em que o mesmo descreve o uso de ésteres etílicos do óleo de Palma, obtidos por transesterificação em meio ácido. No ano de 1938 foi realizado o primeiro teste com um ônibus, entre as cidades de Bruxelas e Louvan, alimentado com ésteres etílicos de óleo de Palma.

Para que não ocorra uma combustão incompleta, entupimento de bicos injetores, depósitos no motor ou contaminação do lubrificante do bloco do motor, ou ainda, produção de acroleína durante a combustão, substância tóxica e cancerígena é necessário realizar a adequação das características do óleo vegetal ou animal por meio de uma mistura binária com diesel, pirólise, microemulsificação ou transesterificação (RAMOS *et al.*, 2011). Entre as alternativas citadas a mais utilizada industrialmente é a transesterificação para a formação de ésteres metílicos ou etílicos (MA e HANNA, 1999). Segundo Schuchardt *et al.* (1998), a transesterificação, que também é conhecida como alcóolise, é a reação entre um triacilglicerídeo com um álcool, resultando em um glicerol e éster alquílico.

Nas reações de transesterificação a utilização do metanol levará à formação de ésteres metílicos, enquanto que com a utilização de etanol tem-se a formação de ésteres etílicos. A transesterificação metílica de óleos vegetais em meio alcalino é o processo mais utilizado industrialmente na produção de biodiesel. A reação de transesterificação também pode ser utilizada em meio ácido homogêneo, tendo a vantagem, em relação à alcalina, da quantidade de ácidos graxos livres no meio não ser relevante. Além disso, a reação pode ser realizada no mesmo reator, viabilizando, assim, o uso de matéria-prima de qualidade inferior ou com presença de água (RAMOS *et al.*, 2011).

## II.5 – Matéria-prima

A maior parte dos componentes dos óleos vegetais e de gordura animal são os triacilgliceróis (TAG). De maneira simplificada, o TAG é composto por ácidos graxos (AG) ligados a um glicerol. Assim, os ésteres alquílicos são obtidos pela reação de transesterificação, em que o álcool (metanol ou etanol), na presença de um catalisador (comumente básico), é reagido com óleo vegetal ou gordura animal (KNOTHE *et al.*, 2006).

O Brasil apresenta características territoriais e condições edafoclimáticas variadas que se diferenciam ao longo de toda a sua extensão. Estas características propiciam a presença de ampla gama de plantas oleaginosas que podem ser exploradas comercialmente para a obtenção de biocombustíveis (BRASIL, 2007). Entre as espécies que crescem em território nacional e possuem potencial de fornecer matéria-prima para a produção de biocombustíveis estão as oleaginosas como o dendê, a soja, a canola, o algodão, o pinhão manso, a mamona, o girassol, o amendoim (DEMIRBAS, 2011) e a cana-de-açúcar, sendo esta utilizada na produção de etanol (BNDES & CGEE, 2008). Também pode ser realizado o aproveitamento de gordura animal e óleos residuais utilizados na fritura de alimentos (BRASIL, 2007).

A Tabela II.2 apresenta as principais espécies utilizadas na produção dos biocombustíveis, que atualmente são empregados no Brasil, destacando-se entre as mesmas a produtividade da cana-de-açúcar por área, bem como o seu rendimento em álcool.

Recentemente, estudos tem apontado o potencial da utilização de microalgas para a produção de biodiesel (CHISTI, 2008, ZENG *et al.*, 2011, HALIM *et al.*, 2012), pois muitas espécies são ricas em óleo (CHISTI, 2007, CHO *et al.*, 2011), que pode ser transformado em biocombustíveis, por meio de tecnologias já existentes ou a serem desenvolvidas. Além disso, o cultivo de microalgas apresenta inúmeras vantagens, tais como alta eficiência na conversão fotossintética, altas taxas de crescimento, produção de uma grande variedade de produtos, habilidade de sobreviver em diversas condições ambientais, utilização de meios de cultivo alternativos e possibilidade de utilização na

biorremediação de águas contendo poluentes, além não competir por terras agriculturáveis voltadas à produção de alimentos (ZENG et al., 2011, SYDNEY et al., 2011, CHISTI, 2007). Deste modo, ressalta-se a grande potencialidade que as microalgas possuem para a produção de biomassa e biocombustíveis.

**Tabela II.2: Principais espécies utilizadas na produção de biocombustíveis.**

<b>Espécies</b>	<b>Produtividade (t ha<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimento (t de óleo ha<sup>-1</sup>)</b>
<b>Algodão</b>	0,86 a 1,4	0,1 a 0,2
<b>Dendê</b>	15 a 25	3 a 6
<b>Girassol</b>	1,5 a 2	0,5 a 0,9
<b>Mamona</b>	0,5 a 1,5	0,5 a 0,9
<b>Pinhão manso</b>	2 a 12	1 a 6
<b>Soja</b>	2 a 3	0,2 a 0,4
<b>Cana-de-açúcar</b>	70 a 100	6,0 a 8,1 mil*

\* Litros de etanol ha<sup>-1</sup>.

Fonte: BNDES & CGEE, 2008; BRASIL, 2007.

## **II.6 – Microalgas**

Alga é um termo usado popularmente para uma ampla gama de microrganismos, que podem diferenciar-se quanto à morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia. Estes podem ser organismos unicelulares ou multicelulares, tais como os vareques, uma espécie presente nos mares frios (BICUDO e MENEZES, 2005).

As microalgas são um dos organismos mais eficientes na transformação da energia solar em compostos orgânicos por meio da fotossíntese (VONSHAK, 1997). Os organismos fotossintéticos procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos (algas verdadeiras) apresentam alta eficiência na conversão de energia solar e absorção de nutrientes, o que resulta em altas taxas de crescimento e produtividade de biomassa por área, se comparada com plantas utilizadas tradicionalmente na agricultura. Além disso, muitas espécies produzem quantidades significativas de óleo, que pode ser extraído e convertido em biodiesel (CHISTI, 2007, MCGINN et al., 2011).

Com pode ser visualizados na Tabela II.3, algumas espécies de algas são muito atraentes para se estudar, devido à concentração de óleo presente na biomassa. Também, é importante ressaltar que o uso das microalgas na produção de biocombustíveis não compete com o uso de terras aráveis, pois possibilita o uso de áreas reduzidas e que possam não estar aptas para o cultivo. Deve-se destacar ainda que, para o cultivo de microalgas, é possível utilizar como substrato águas residuais agrícolas, domésticas ou industriais, água do mar ou, então, águas salobras para o fornecimento de nutrientes (CHISTI, 2007, McGINN *et al.*, 2011).

**Tabela II.3:** Quantidade de óleo encontrada em algumas espécies de microalga.

Microalga	Quantidade de óleo (% da biomassa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella sp.</i>	28 – 32
<i>Chlorella vulgaris</i>	14 – 22
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25 – 33
<i>Monanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 – 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 – 68
<i>Neochloris oleabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia sp.</i>	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

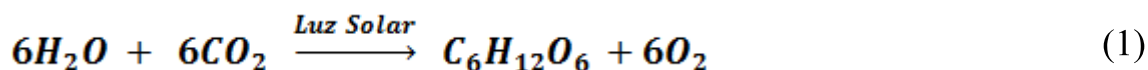
Fonte: Chisti (2007), Becker (2007).

Como se pode observar, as espécies relacionadas na Tabela II.3 apresentam um ótimo potencial na produção de óleo para biocombustíveis. Ao se comparar com a produção da soja, que produz em torno de 20% de óleo (BONATO *et al.*, 2000, CHISTI, 2007), torna-se evidente a diferença de produtividade que há entre essa oleaginosa e as microalgas. Assim, fica claro que as microalgas são promissoras como fonte alternativa para a produção de biocombustíveis, então, por possuírem teor maior de óleo, tempo de cultivo menor, menor área de cultivo, maior produtividade de biomassa, entre outras.

Entre elas está a *Chlorella vulgaris*, microalga utilizada neste estudo. São algas do grupo *Chlorophyta* são conhecidas como algas verdes. Constituem um grupo amplo e variado de algas unicelulares que formam colônias e filamentos (BOLD, 1978). Possuem entre 16 e 22% de lipídeos totais. Estas são aptas para viver em ambientes com baixa ou elevada carga de nutrientes. O grupo das *Chlorophytas* apresenta quatro ordens que tem recebido um maior interesse, sendo elas: *Volvocales*, *Tetraspolares*, *Chlorococcales* e *Desmidiaceae* (DI BERNARDO et al., 2010).

## II.7 – Cultivo de microalgas

Com base nos ciclos biogeoquímicos naturais, a produção de biomassa é resultado da reação de fotossíntese, que depende essencialmente de energia solar, água e dióxido de carbono, para que possa promover a reação:



Para que esta reação forme 1 kg de açúcar (glicose) são consumidos 17,6 MJ de energia ou o equivalente a cerca de meio litro de gasolina. Para 1 kg de glicose são consumidos 0,6 kg de água e 1,4 kg de dióxido de carbono, liberando 1 kg de oxigênio (RICKLEFS, 2011). Para o cultivo de microalgas se torna necessário a agitação do meio, para que ocorra a retirada do excesso do oxigênio produzido pelas microalgas. Quando se tem um excesso de luz ocorre a formação de peróxido de hidrogênio, substância letal para as microalgas. Este fenômeno se dá pela foto-oxidação na presença de oxigênio supersaturado no meio de cultivo (BERTOLDI et al., 2008).

A fotossíntese se dá somente nas camadas superficiais da coluna de água. Como exemplo, os lagos se dividem em duas regiões, a superior conhecida como zona trofогênica, que apresenta uma produção de oxigênio superior à necessária para a respiração em 24 horas, e a inferior ou profunda, onde ocorre o inverso, sendo o consumo superior à produção, devido principalmente à escassez ou ausência de luz. Parte da luz que entra na coluna de água é absorvida pelo material orgânico suspenso,

organismos fotossintéticos. Além disso, em torno de 53% da energia radiante que penetra no ambiente aquático é convertido em calor (DI BERNARDO *et al.*, 2010).

As microalgas podem crescer em ambiente autotrófico ou heterotrófico. As microalgas que crescem em sistemas autotróficos utilizam-se de luz e dióxido de carbono para o seu crescimento, enquanto que nos ambientes heterotróficos são utilizados compostos orgânicos como fonte de energia e carbono. Podem-se utilizar, também, condições mixotróficas, em que além do substrato orgânico é utilizada fonte luminosa para o provimento de energia, além de CO<sub>2</sub> e substrato orgânico como fonte de carbono (BERTOLDI *et al.*, 2008; MULITERNO *et al.*, 2005). Assim, para que o processo de fotossíntese ocorra em uma velocidade maior, passa a ser imperativa a adição de fontes nutricionais, pois em um meio natural que mantém um clímax o crescimento ocorre de modo autotrófico. Para cultivos heterotróficos se utilizam compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, diferente dos sistemas mixotróficos que usam fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia, além de dióxido de carbono e substrato orgânico como fonte de carbono (BECKER, 1994).

Os nutrientes necessários para o desenvolvimento das microalgas podem ser fornecidos por meio sintético ou por fontes alternativas. No entanto, é importante ressaltar que o meio de cultivo pode ser responsável por 40 a 60% do custo total na produção de bioprodutos (BERTOLDI *et al.*, 2008). O fornecimento de nutrientes por meios sintéticos busca atender as necessidades específicas de cada espécie de microalga, bem como os custos econômicos de seu desenvolvimento. Nos últimos anos têm sido desenvolvidas várias alternativas de meios de cultivo, mas não se pode considerar que determinado meio seja o melhor, pois em seu desenvolvimento são levados em consideração vários fatores para alcançar as melhores características, entre as quais (BECKER, 1994) destacam-se:

- i. Concentração total de sal, que é dependente do biotipo da alga;
- ii. Fonte de carbono, pois este representa 50% da biomassa;
- iii. Fonte de nitrogênio adequada e econômica;
- iv. Concentração de elementos principais, como potássio, magnésio, sódio, sulfato e fosfato;
- v. Condições do pH do meio;
- vi. Microelementos;

### vii. Componentes orgânicos promotores de crescimento.

Desta maneira tem se buscado alternativas para o fornecimento de nutrientes, como a realizada por Baumgärtner (2013a), que estudou o cultivo de *Scenedesmus acuminatus* com a utilização de fertilizante comercial, com formulações NPK (10:10:10 e 20:5:10). Também, foi utilizado o meio sintético MC (WATANABE, 1960) como alternativa para a produção de biomassa. Os resultados alcançados mostraram uma produtividade máxima de 29,6 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para a formulação 20:5:10 e 5,92 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para o fertilizante NPK (10:10:10). Entretanto, com o meio sintético MC observou-se uma produtividade de 56,19 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, demonstrando que apesar de ser um microorganismo de fácil adaptação é necessário o equilíbrio entre os nutrientes.

Lam & Lee (2012) estudaram o uso de fertilizante orgânico para suprir a necessidade de *Clorella vulgaris*. Observou-se uma constância no crescimento da mesma, sendo que uma variação de pH entre 4,5 a 8 levou a uma produção máxima de 0,47 a 0,51 g L<sup>-1</sup>, com 10 dias de cultivo. Isto mostra que a *C. vulgaris* se adequa a meios de cultivo alternativos e suporta também grandes variações no pH do meio de cultivo.

#### II.7.1 – Meios de cultivo

Outra forma de uso de microalgas que tem despertado interesse é o cultivo unindo-o a processos de biorremediação dos efluentes líquidos e gasosos, para que possa ser realizada a remoção de nutrientes presentes nos mesmos, de modo que estes atinjam os padrões de lançamento que não poluam o ambiente (BERTOLDI et al., 2008, CAI et al., 2013).

O uso simultâneo do tratamento de esgoto sanitário, agroindustrial ou industrial com a produção de biomassa para a produção de bioenergia se justifica pela diminuição de custos do tratamento de efluentes (CHRISTENSON e SIMS, 2011), pois a presença de nutrientes como o nitrogênio e fósforo pode ocasionar a eutrofização de rios e lagos de despejo (PITTMAN et al., 2011), quando lançados sem o devido tratamento.

Na Tabela II.4 pode-se visualizar a utilização de alguns meios de cultivo alternativos que têm levado a resultados que demonstram a potencialidade de utilização

de efluentes de indústrias e de esgoto urbano como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas.

**Tabela II.4: Tipos de meio de cultivo utilizados na produção de microalgas.**

<b>Autores</b>	<b>Espécie</b>	<b>Meio de cultivo</b>	<b>Rendimento</b>
Lam e Lee, (2012)	<i>Chlorella v.</i>	Água reciclada	0,55 g L <sup>-1</sup>
Muliterno et al. (2005)	<i>Spirulina p.</i>	Zarrouk + glicose	5,38 g L <sup>-1</sup>
Yeh e Chang, (2012)	<i>Chlorella v.</i>	MBM	2 – 5 g L <sup>-1</sup>
Andrade e Costa, (2008)	<i>Spirulina p.</i>	Zarrouk + melação	2,83 g L <sup>-1</sup>
Cho et al. (2011)	<i>Chlorella sp.</i>	Água residuária	0,74 g L <sup>-1</sup>

Os resultados encontrados na literatura têm sido os mais variados, como pode ser observado na Tabela II.4. No entanto, tem se mostrado que é possível a utilização de meios alternativos com alta produtividade, como o alcançado por Zhou et al. (2011), que utilizando efluente de estação de tratamento de esgoto, como fonte nutricional, para o cultivo das microalgas *C. vulgaris* e *Hindakia sp.*. Assim, foram observados produtividades de 120,8 e 275,0 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> para as microalgas *C. vulgaris* e *Hindakia sp.*, respectivamente. Do mesmo modo, Muliterno et al. (2005) e Andrade e Costa (2008) obtiveram os melhores resultados de produção de microalgas, quando uniram o uso de meios sintéticos com uma fonte extra de carbono.

### II.7.2 – Nitrogênio

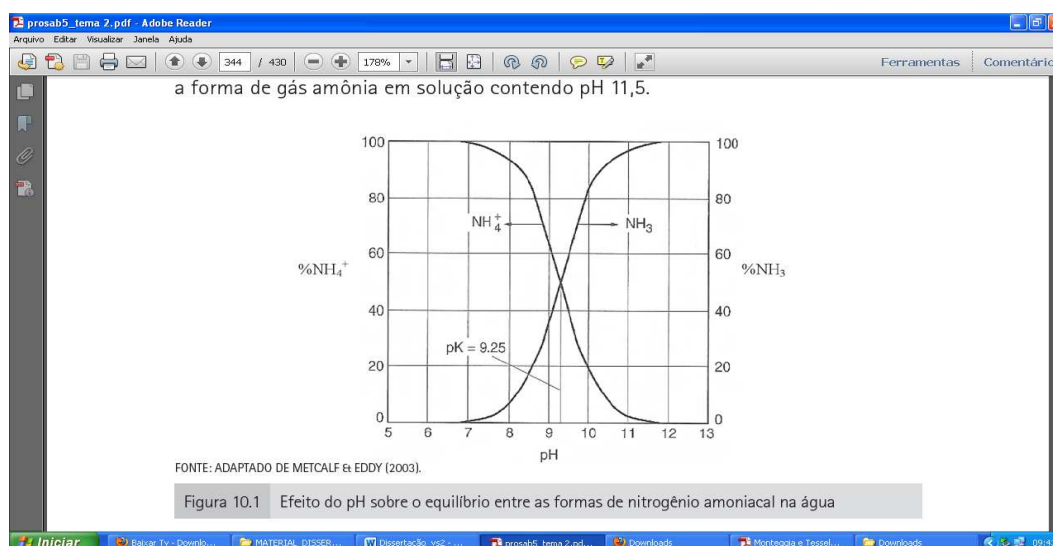
O nitrogênio é um elemento importante no metabolismo das microalgas, contribuindo na formação de proteínas. No entanto, a redução dos valores de nitrogênio no meio de cultivo faz com que ocorra preferencialmente a formação de carboidratos (BERTOLDI et al., 2008) e lipídeos (ZENG et al., 2011).

Para o fornecimento de nitrogênio às microalgas podem ser utilizadas várias fontes, o que permite suprir o mesmo por meio de compostos orgânicos e inorgânicos. O nitrogênio ainda pode atingir valores próximos a 10 – 12% em massa seca de biomassa (BORGHETTI, 2009). As microalgas utilizam o nitrogênio na forma de amônia (PEREZ-GARCIA et al., 2011), sendo que quando este se encontra na forma de nitrato é reduzido pela enzima nitrato-redutase para íon nitrito, que por sua vez é



reduzido a amônia por meio da enzima nitrito-redutase (BERTOLDI *et al.*, 2008), principal forma utilizada no metabolismo.

A amônia está presente em solução na forma de íon ( $\text{NH}_4^+$ ) e na forma livre, não ionizada ( $\text{NH}_3$ ). A sua especiação é regulada pelos valores do pH (Figura II.3), como apresentado por Volschan Jr. *et al.* (2009). Pode-se verificar na Figura II.3 que quando o pH está próximo a 9,5 a presença de ambos  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NH}_3$  livre está próxima a um equilíbrio (aproximadamente 50% de  $\text{NH}_3$  e 50% de  $\text{NH}_4^+$ ). Com o  $\text{pH} > 11$ , praticamente, toda a amônia é encontrada na forma  $\text{NH}_3$ , sendo que é nesta condição que o nitrogênio se desprende do fluido para a atmosfera na forma de gás.



**Figura II.3: Efeito do pH sobre o equilíbrio do nitrogênio amoniacal.**

Fonte: Volschan Jr. *et al.* (2009).

Outro fator que influencia a forma em que o nitrogênio amoniacal se apresenta é a temperatura do fluido. Como mostrado na Tabela II.5, ao se atingir a temperatura de 25 °C a presença de amônia livre é o dobro, quando comparada aos valores encontrados para a temperatura de 15 °C do fluido.

**Tabela II.5: Proporção entre amônia livre e ionizada em função do pH e temperatura.**

pH	T = 15 °C		T = 20 °C		T = 25 °C	
	% NH <sub>3</sub>	% NH <sub>4</sub>	% NH <sub>3</sub>	% NH <sub>4</sub>	% NH <sub>3</sub>	% NH <sub>4</sub>
6,50	0,09	99,91	0,13	99,87	0,18	99,82
7,00	0,27	99,73	0,40	99,60	0,57	99,43
7,50	0,86	99,14	1,24	98,76	1,77	98,23
8,00	2,67	97,33	3,82	96,18	5,38	94,62
8,50	7,97	92,03	11,16	88,84	15,25	84,75
9,00	21,50	78,50	28,43	71,57	36,27	63,73
9,50	46,41	53,59	55,68	44,32	64,28	35,72

Fonte: Von Sperling *et al.* (2009).

Ainda que ocorra o processo de volatilização da amônia livre para a atmosfera, acredita-se que esta é insignificante se comparada com outros mecanismos de remoção do nitrogênio, tais como a nitrificação-desnitrificação e a sedimentação (CAMARGO VALERO *et al.*, 2010).

Ainda, os processos de nitrificação e desnitrificação são pouco representativos em lagoas de estabilização, pois estas possuem baixa profundidade e menor carga orgânica aplicada, o que faz prevalecer a zona aeróbia e reduz as condições de se ter zonas anóxicas, as quais permitem a desnitrificação, e, também, pelas baixas concentrações de nitrito e nitrato em efluentes de lagoas de maturação e polimento (TEIXEIRA PINTO & ONOYAMA, 1991).

O nitrogênio assimilado pelas microalgas na forma de nitrato e amônia é destinado para a síntese de compostos celulares, produção de proteínas e outros compostos que contém nitrogênio. No entanto, a assimilação destes dependerá de outros fatores como temperatura, carga orgânica, tempo de detenção hidráulica e radiação solar. A assimilação da amônia obedece a seguinte relação (MONTEGGIA & TESSELE, 2001):



Como demonstrado acima, a assimilação do nitrogênio amoniacal representa uma quantidade significativa da massa seca da microalga. Segundo Von Sperling *et al.* (2009), o nitrogênio pode representar de 6 a 12% m/m da biomassa. Também, é possível ressaltar que o nitrogênio presente nos efluentes de reatores anaeróbios se encontra na forma amoniacal, o que torna este efluente uma importante opção de suprimento deste elemento para o cultivo de microalgas.

### II.7.3 – pH

O pH do meio é um dos fatores de grande importância que envolve o cultivo de microalgas, pois o mesmo é responsável por determinar a solubilidade do dióxido de carbono e minerais presentes (BECKER *et al.*, 1988, TEIXEIRA PINTO & ONOYAMA, 1991, BERTOLDI *et al.*, 2008). Um exemplo disto é a amônia, que presente na solução em temperatura de 25 °C e pH 7 apresenta 99,3% de  $\text{NH}_4\text{-N}$  e 0,7% de  $\text{NH}_3$  e ao atingir um pH de 9,0 estes valores passam a ser 64,2% de  $\text{NH}_4\text{-N}$  e 35,8% de  $\text{NH}_3$  (MOTA & VON SPERLING *et al.*, 2009). Assim, se faz necessário avaliar mais a fundo o papel do pH no crescimento das microalgas no tratamento de efluentes, pois, o mesmo ainda influencia a fração de  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_2$  livre (CAMARGO VALERO & MARA, 2007, BERTOLDI *et al.*, 2008). A assimilação pelas microalgas do carbono se dá com maior eficiência quando este estiver na forma de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_2$ , sendo necessário para uma maior presença destes compostos que o pH esteja acima de 8,0 (MAYO & NOIKE, 1994). No entanto, o pH é dependente de vários fatores como a composição e capacidade de tamponamento do meio, quantidade de dióxido de carbono, metabolismo dos microrganismos e temperatura (BECKER *et al.*, 1988).

De fato, alguns autores, como Mayo e Noyke (1994), Lau *et al.* (1994) e Silva-Benavides & Torzillo (2011), verificaram que em cultivos de *Chlorella spp.*, estas se desenvolveram em pH que estiveram entre os valores de 5,5 e ~ 9,0. Mayo e Noyke (1994) ainda relataram que a *C. vulgaris* se desenvolveu melhor com pH entre 5,5 e 8,0 e que, quando as condições do pH se tornaram alcalinas, houve uma redução na produção de biomassa.

## II.8 – Utilização de microalgas para produção de ésteres etílicos por meio de reação *in situ*

As reações de esterificação/transesterificação *in situ* de microalgas proporcionam a obtenção de ésteres alquílicos a partir de ácidos graxos livres e triacilglicerídeos, que estão presentes em material biológico. Este processo é favorecido pela adição de álcool, catalisador e um material lipídico em condições de pressão e temperatura variáveis (LEWIS *et al.*, 2000, EHIMEN *et al.*, 2010, BAUMGÄRTNER, 2013b).

O conceito de transesterificação *in situ* tem recebido atenção devido às vantagens que oferece, principalmente, pela substancial redução do tempo e economia de solventes no processo (LEWIS *et al.*, 2000). Ainda assim, a matéria-prima pode representar de 70 a 80% do custo final do biocombustível (SHI e BAO, 2008).

O uso da transesterificação *in situ* utilizando catálise ácida homogênea não é um processo novo na produção de biodiesel de óleo de biomassa, o qual já foi demonstrado por Harrington e D'Arcy-Evans (1985) com girassol. Utilizando este método os autores conseguiram aumentar em 20% o rendimento em biodiesel em relação aos métodos convencionais, devido ao acesso que o meio ácido tem ao óleo na biomassa.

São vários os trabalhos que têm buscado melhorar as condições que há entre os fatores que influenciam as reações *in situ*. Entre estes, está o álcool de cadeia curta que pode ser utilizado, tais como o metanol, etanol, propanol e butanol. No Brasil, o etanol pode ser o álcool mais utilizado, pois este apresenta uma cadeia de produção estruturada e altas produções, o que o torna mais viável economicamente do que o metanol, que é importado (KNOTHE, 2006).█

Ehimen *et al.* (2010) estudaram o efeito do álcool (20 – 100 mL) e da temperatura (23 – 90 °C) na transesterificação *in situ* de *Chlorella sp.* Foi observado que com o aumento do volume de álcool e da temperatura ocorre um aumento no rendimento em ésteres metílicos. No entanto, após alcançar a faixa de temperatura de 60 a 90 °C o rendimento em ésteres metílicos não foi significativo, principalmente, ao atingir o tempo de reação de 2 horas. Além disso, Ehimen *et al.* (2010), ao estudarem a relação que a temperatura possui com o tempo na transesterificação *in situ* de *C.*

*vulgaris*, mostraram que a estabilização no rendimento em ésteres pode ser alcançada com um tempo de reação de 1 hora, em temperaturas de 60 e 90 °C. Entretanto, o uso das temperaturas de 23 e 30 °C fez com que a estabilização no rendimento em ésteres metílicos ocorresse para 2 horas de reação.

Baumgärtner (2011) estudou a transesterificação *in situ* com as microalgas *Scenedesmus sp.*, avaliando a influência do tipo de álcool, metanol e etanol, e do solvente, hexano e clorofórmio. O uso do clorofórmio como solvente em reações com etanol e metanol, levou aos melhores rendimentos em ésteres, na temperatura de 60 °C. Por outro lado, o uso de hexano apresentou os melhores rendimentos em ésteres em uma faixa de temperaturas maior, a qual foi de 60 a 90 °C.

Segundo o estudo de Velasquez-Orta *et al.* (2012), que comparou a transesterificação *in situ* ácida e alcalina, é possível alcançar conversões de óleo de 96,9 e 77,6% de conversão, a partir da biomassa seca, respectivamente. No entanto, estes valores são alcançados utilizando-se tempos de reação diferentes. A transesterificação ácida necessitou de 20 horas, enquanto que a alcalina de somente 75 minutos para que o rendimento máximo em ésteres fosse alcançado, não se diferenciando após estes tempos.

A utilização da transesterificação *in situ* em meio ácido tem necessidade de trabalhar com materiais que apresentam baixo teor de umidade, enquanto que com meio alcalino é possível trabalhar com a presença de umidade na biomassa. Por outro lado, a transesterificação *in situ* em meio ácido apresenta valores de rendimento em ésteres superiores aos obtidos com reação alcalina.

Por fim, cabe salientar que embora as microalgas apresentem um bom potencial para o uso como fonte alternativa para a produção biocombustível, conforme mostrado anteriormente, ainda estas apresentam algumas dificuldades no seu uso e nos processos em grande escala. Entre as maiores dificuldades observadas estão o cultivo, a colheita, a extração do óleo e o processo de produção dos biocombustíveis. Desta maneira, grupos de pesquisa espalhados por todos os continentes têm se empenhado na busca por soluções as essas demandas, de tal maneira que a produção e uso de microalgas na produção de biocombustível se torne verdadeiramente efetiva em toda a sua cadeia produtiva.

## CAPITULO III

# MATERIAIS E MÉTODOS

### III.1 – Cultivo de microalgas

A cepa de *Chlorella vulgaris* foi gentilmente cedida pela Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) - RJ.

Inicialmente, realizou-se um estudo em bancada para se determinar o preparo, cultivo e manutenção da microalga. O crescimento da cultura de microalgas demanda de nutrientes, sendo que o meio nutricional é composto por macro e micronutrientes em níveis diferentes. Entre os que apresentam maior importância estão o nitrogênio, o fósforo, o potássio, o magnésio e o cálcio, enquanto que os elementos boro, cobre, zinco e molibdênio são os que apresentam menor necessidade (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

#### III.1.1 – Meios de cultivo das microalgas

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foi realizado com três meios de cultivo, que foram utilizados após análise da literatura. Foram escolhidos os meios MC, DM, MBM (WATANABE, 1960) e efluente de um reator anaeróbio de leito fluidizado (RALF), o qual foi chamado neste trabalho de efluente *in natura*.

Na avaliação de crescimento da microalga utilizando o meio sintético foi realizada a diluição volumétrica de inóculo: meio nutricional: água deionizada de 1:1:8, enquanto que para o efluente *in natura* se fez as diluições efluente: inóculo de 4:4, 5:3, 6:2 e 7:1.

A composição dos meios de cultivo estudados é apresentada a seguir:

▣ **MEIO MC**

Reagente	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1,25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes)	1 mL L <sup>-1</sup>

Fonte: Watanabe (1960).

▣ **MEIO DM:**

Reagente	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,0
KCl	0,25
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,55
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,26
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes)	1 mL L <sup>-1</sup>

Fonte: Watanabe (1960).

▣ **MEIO MBM:**

Reagente	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,01
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
NaCl	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02
Solução A <sub>5</sub> (micronutrientes)	1 mL L <sup>-1</sup>

---

Fonte: Watanabe (1960).

▣ **SOLUÇÃO A<sub>5</sub>:**

Reagente	Quantidade (g L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,9
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
ZnCl <sub>2</sub>	0,11
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,08
3(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . <sup>o</sup> .7MoO <sub>3</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,018

Fonte: Watanabe (1960).

▣ **EFLUENTE SANITÁRIO:**

O efluente do reator anaeróbico foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto ETE 2 – Sul, da empresa SANEPAR. Esta unidade atende à região sul da cidade de Maringá – PR.

O efluente de reator anaeróbico tipo RALF foi coletado quinzenalmente, a partir da metade do mês de setembro de 2012. Este foi coletado no período matutino, entre as 9:00 e 9:30 horas. O efluente foi acondicionado em um galão de 20 litros e transportado até o laboratório.

No laboratório, foram caracterizados o pH, a quantidade de amônia, os sólidos totais e os sólidos suspensos do efluente, sendo este separado em três alíquotas para a utilização no cultivo. Em torno de 14 litros do efluente *in natura* foram filtrados, para a retenção de partículas 7-12 µm, e do efluente *in natura* filtrado 7 litros foram submetidos ao tratamento de desinfecção por meio de luz ultravioleta, durante 30 minutos.

A Tabela III.1 mostra os parâmetros físico-químicos analisados para o efluente *in natura* coletado na ETE 2 – Sul de Maringá – PR.

**Tabela III.1 – Parâmetros físico-químicos do efluente *in natura*.**

Parâmetro	Valores
-----------	---------



pH	7,5
Amônia	45 mg L <sup>-1</sup>
Sólidos totais	562 mg L <sup>-1</sup>
Sólidos suspensos	425 mg L <sup>-1</sup>
Sólidos dissolvidos	37 mg L <sup>-1</sup>

### III.2 – Cinética de crescimento da microalga

O desenvolvimento do cultivo da microalga foi realizado pelo aumento da biomassa. Primeiramente, foi construída uma curva padrão entre a massa seca da microalga e a turbidez (MULITERNO *et al.*, 2005). As análises de turbidez foram realizadas utilizando-se um turbidímetro portátil HACH – modelo 2100P. A partir disto, foi possível verificar as mudanças que ocorreram na população em função do tempo e das condições de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. Mesmo quando a comunidade ou ecossistema parece não mudar, a densidade, a sobrevivência e as taxas de crescimento da microalga estão passando por ajustes devido a vários fatores, tais como temperatura e nutrientes (RICKLEFS, 2011). Assim, para poder determinar o crescimento populacional, que é representado pela variação do parâmetro N, sendo este o número de organismos ao longo do tempo (t) (ODUM, 1988, RICKLEFS, 2011), tem-se:

$$\frac{dN}{dt} = r \quad (3)$$

Entretanto, devido ao aumento natural das populações em um ambiente ilimitado, a taxa específica de crescimento (r) torna-se constante e máxima sob as condições existentes no ambiente (ODUM, 1988). Portanto, a taxa específica de crescimento é dada por:

$$\frac{dN}{dt} = r \cdot N \quad (4)$$

Integrando e rearranjando a equação (4), tem-se:

$$r = \frac{\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)}{t} \quad (5)$$

Portanto:

$$r \cdot t = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (6)$$

Assim, os valores de  $r$  permitem determinar as taxas máximas de crescimento das microalgas, considerando-se que as condições utilizadas nos cultivos são as melhores.

A produtividade ( $P$  em  $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) da biomassa é determinada por:

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t - t_0)} \quad (7)$$

sendo que:

$X_t$  é a densidade celular no tempo  $t$  em ( $\text{g L}^{-1}$ );

$X_0$  é a densidade celular no tempo  $t_0$  em ( $\text{g L}^{-1}$ );

$t$  é o tempo (dia).

A avaliação da produtividade ( $P$ ) e das taxas específicas de crescimento ( $r$ ) da microalga *C. Vulgaris*, ao longo de determinado período de cultivo, permite obter as melhores condições de cultivo e as limitações dos mesmos, bem como definir os estágios de crescimento das microalgas.

### **III.3 – Métodos analíticos**

#### **III.3.1 – Monitoramento do pH**

O pH é um importante fator no cultivo de microalgas, pois pode influenciar a disponibilidade dos nutrientes, bem como o crescimento das microalgas. Outro parâmetro de cultivo que o pH pode influenciar é a forma em que o nitrogênio amoniacal se encontra no meio.

Assim, o pH dos cultivos foi acompanhado utilizando-se o método potenciométrico, por meio de um medidor de pH, da marca THERMO SCIENTIFIC, modelo Orion Star 4, previamente calibrado com solução tampão de 4,00, 7,00 e 10,0.

#### **III.3.2 – Amônia**

O nitrogênio em efluentes de reatores anaeróbios apresenta-se em maior percentual na forma amoniacal, enquanto que o nitrato possui valores muito inferiores. Além disso, as microalgas metabolizam facilmente a amônia, enquanto que o nitrato somente é consumido pela ausência do nitrogênio amoniacal. Deste modo, a amônia foi analisada com um Eletrodo Seletivo de Íons (ISE), da marca THERMO SCIENTIFIC, modelo Orion Star 4.

#### **III.3.3 – Sólidos suspensos e totais**

Estes parâmetros foram determinados por meio do método gravimétrico descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1995). O procedimento de análise é descrito detalhadamente no Anexo I.

### **III.4 – Recuperação e secagem da biomassa**

A colheita da biomassa é um fator importante que vem sendo pesquisado, devido à dificuldade de separação da microalga do meio. Assim, optou-se pela realização da operação de floculação prévia da biomassa, utilizando-se o floculante natural Tanfloc – SL, (produzido e gentilmente doado pela empresa Tanac). A operação de floculação foi

seguida por decantação e filtração em tela de 20 mesh, para, então, obter-se a biomassa algal.

A secagem da biomassa algal foi realizada em estufa, na temperatura de 60 °C, por um período de 24 horas (D'OCA *et al.*, 2011, MIAO e WU, 2006, BAUMGÄRTNER *et al.*, 2013b). Após a secagem foi realizada a trituração até homogeneização da amostra, peneiramento utilizando-se conjunto de peneiras de 20 e 35 mesh e armazenada em potes plásticos, em temperatura próxima a -8 °C (freezer), para que fossem mantidas as propriedades da biomassa.

### **III.5 – Extração de lipídeos**

A extração de lipídeos totais da microalga foi realizada em extrator soxhlet conforme procedimentos descritos em Spector *et al.* (2008) e Baumgärtner (2011). Desta forma, inicialmente, foi realizada a pesagem de biomassa seca em balança analítica e acondicionada a amostra de microalga seca em um cartucho de papel filtro, para a instalação no interior do extrator soxhlet.

Também, foi pesado um balão de extração ( $P_1$ ) em balança analítica e, posteriormente, foram adicionados 200 mL de hexano, usado como solvente. Após esta operação, o balão foi acoplado ao extrator e à coluna de resfriamento, sendo este aquecido até a temperatura de ebulição do solvente (69 °C), durante 10 horas. O próximo passo foi a evaporação do solvente em um evaporador rotativo, que foi mantido a uma temperatura de 50 °C. Ao final, o balão foi colocado em estufa a 60 °C, para obtenção da massa, constante, da matéria graxa ( $P_2$ ). A massa de lipídeos totais foi determinada pela diferença da massa do balão antes ( $P_1$ ) e após a extração ( $P_2$ ).

#### **III.5.1 – Determinação do perfil de ácidos graxos do óleo de microalga**

Segundo Visentainer e Franco (2006), para determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo é necessário, primeiramente, realizar a derivatização deste, já que os óleos a serem analisados precisam ser convertidos em componente de maior

volatilidade, tais como os ésteres metílicos. Para isto utilizou-se a metodologia de esterificação de lipídios (HARTMANN e LAGO, 1973), descrita a seguir.

Pesaram-se 100 mg de amostra contendo o óleo em um tubo de ensaio. Adicionaram-se 4 mL de solução 0,5 equivalente/L de NaOH em metanol. Fechou-se bem o tubo de ensaio, o qual foi aquecido em banho de água em ebulição, até dissolver os glóbulos de óleo e a solução tornarem-se transparente. Esfriou-se o tubo de ensaio em água corrente e adicionaram 5 mL do reagente esterificante (metanol). O tubo foi novamente aquecido em banho, sendo adicionados 4 mL da solução saturada de cloreto de sódio. Agitou-se vigorosamente o tubo por 30 segundos e, após, adicionaram-se 5 mL do solvente (hexano). O tubo foi novamente agitado por mais 30 segundos. Deixou-se o tubo em repouso por aproximadamente 2 horas, na geladeira. O sobrenadante foi utilizado para análise do óleo por cromatografia em fase gasosa.

### **III.6 – Produção de ésteres**

#### **III.6.1 – Reação *in situ***

Para a produção de ésteres alquílicos foi utilizado o processo de esterificação/transesterificação ácida *in situ* (LEWIS *et al.*, 2000, BAUMGÄRTNER, 2011). Este processo utiliza a biomassa seca, sem a necessidade de operação isolada para a extração do óleo. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A avaliação da produção de ésteres via esterificação/transesterificação ácida *in situ* da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* está baseada no procedimento proposto por Lewis *et al.* (2000), sendo descrito a seguir.

Inicialmente, foi realizada a pesagem de 20 mg de biomassa seca, sendo acondicionadas em tubos de 10 mL, providos com tampa. Ao término da pesagem realizou-se a adição nos tubos de 3 mL de uma solução composta por álcool, catalisador e solvente, em uma razão 10:1:1 (v/v/v). Posteriormente, a solução formada foi agitada manualmente de maneira a suspendê-la e, em seguida, colocada em banho termostaticado, a uma temperatura e tempo pré-determinados. Os tempos de reação estudados foram de 15, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos.

Ainda, para o estudo das reações *in situ* foram avaliados dois solventes (hexano e clorofórmio) e o etanol como álcool. Estas condições foram testadas em temperaturas de 45, 60, 75 e 90 °C.

Ao final do tempo de reação, o tubo foi retirado do banho e resfriado rapidamente, por meio de banho de gelo. Após o resfriamento adicionou-se 1 mL de água desionizada, sendo, em seguida, realizada a adição de 2 mL de uma mistura de hexano:clorofórmio, na proporção de 4:1 (v/v), para promover a separação de fases. Após a formação das fases, a parte sobrenadante foi recolhida em um tubo, sendo este procedimento repetido por três vezes, visando, assim, à completa remoção dos ésteres etílicos produzidos.

O solvente foi, então, evaporado em estufa a 60 °C e os ésteres etílicos produzidos foram diluídos em uma solução de hexano e de éster metílico tricosanóico, utilizado como padrão interno (PI), conforme será descrito a seguir, com uma concentração conhecida. Em seguida, a amostra foi armazenada em freezer a -8 °C, para posterior análise cromatográfica.

### III.7 – Análises cromatográficas

A análise da composição do óleo de microalga *Chlorella vulgaris*, após a conversão dos lipídeos em componentes mais voláteis (ésteres metílicos), foi realizada utilizando-se a cromatografia em fase gasosa, em um Cromatógrafo Varian, modelo CP – 3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP – X70– SGE de 30 m x 0,25 mm. Como gás de arraste utilizou-se o hélio, numa razão Split de 1:10. A programação de temperatura da coluna cromatográfica para a análise iniciou a 140 °C, com aquecimento até 250 °C, a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup>. A temperatura do detector foi de 220 °C e do injetor de 260 °C. Foi injetado 1 µL de amostra por meio de uma seringa cromatográfica para realizar a análise.

Ao final da análise, com a obtenção do cromatograma das amostras, foi realizada a identificação dos ésteres etílicos pela comparação dos tempos de retenção na coluna com aqueles obtidos para uma amostra padrão, na qual os respectivos ésteres metílicos estavam presentes (VISENTAINER e FRANCO, 2006). Assim, para se identificar os ésteres etílicos, foi utilizado um padrão FAME Mix (fatty acid methyl ester) que possui 37 diferentes ésteres, contemplando os ésteres de ácidos graxos presentes em óleos, pós a derivatização, e no “biodiesel” obtido por reação in situ da microalga.

### III.7.1 – Quantificação dos produtos

Para quantificar os produtos da reação de transesterificação *in situ* utilizou-se a metodologia da padronização interna, descrita por Visentainer e Franco (2006). Esta metodologia possui menor sensibilidade a erros de injeções e variações instrumentais, como, por exemplo, o fluxo do gás de arraste, temperatura da coluna etc. Isto ocorre devido à injeção da amostra e do padrão serem feitas conjuntamente, em que os possíveis erros na injeção ou variações instrumentais ocorrem em ambos, anulando-se mutuamente (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

O padrão interno (PI) utilizado foi o éster metílico tricosanóico 99%, adquirido da Sigma-Aldrich. Este éster foi escolhido como PI por não ter sido identificado como componente da amostra de ésteres produzidos. Além disso, é um composto estável e permite a adição de uma quantidade precisa na amostra e, principalmente, apresenta a resposta próxima aos componentes encontrados no biodiesel produzido (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Para o cálculo da massa de ácidos graxos presente na amostra é necessário utilizar fatores de correção para os ésteres, em relação ao padrão interno, que também é um éster. Existem dois fatores para corrigir esta resposta diferencial: o fator de correção experimental (FCE), cujo valor é determinado experimentalmente, e o fator de correção teórico (FCT), determinado teoricamente a partir do número de carbonos ativos (C\*). Para o cálculo do fator de correção teórico (FCT), primeiramente, definiu-se um éster, que foi utilizado como referência. A partir disso, calcula-se a porcentagem mássica de carbonos ativos do composto de referência (estereato de etila), bem como do éster a ser determinado. Desta forma, tem-se:

$$F_{CT} = \frac{P_r}{P_x} \quad (8)$$

sendo que:

Pr = porcentagem mássica de carbonos ativos do composto de referência (estereato de etila);

Px = porcentagem mássica de carbonos ativos do composto analisado.

Considerando o ácido palmítico como exemplo, tem-se: para o composto de referência a MM estereato de etila = 312,50 g/gmol, sendo que a massa de carbonos ativos (Massa de C\*) = 228,20 g/gmol. Assim, para a massa molar de 312,50 g/gmol do

composto de referência (100%), a porcentagem de carbonos ativos (228,20 g/gmol) neste composto corresponderá a 73,03%. Para o ácido palmítico a MM ácido palmítico = 284,48 g/gmol, sendo que a massa de carbonos ativos (Massa de C\*) = 204,19 g/gmol.

Assim, para a massa molar de 248,48 g/gmol do ácido palmítico (100%), a porcentagem de carbonos ativos (204,19 g/gmol) no ácido palmítico corresponderá a 71,78%. Portanto, o fator de correção teórico obtido será:

$$F_{CT} = \frac{73,03\%}{71,78\%} = 1,0174 \quad (9)$$

Repetiu-se o mesmo procedimento para o cálculo do fator de correção teórico dos outros componentes presentes na amostra. Além disso, de acordo com Visentainer e Franco (2006), os componentes injetados são ésteres metílicos/etílicos e para convertê-los para ácido graxo é necessário calcular o fator de conversão. O objetivo disto é corrigir a resposta diferencial do detector entre um éster metílico/etílico e o seu ácido graxo correspondente. Para isso, utilizou-se seguinte relação:

$$F_{CEA} = \frac{MM_{éster}}{MM_{ácido\ graxo}} \quad (10)$$

sendo que:

MM éster = massa molar do éster metílico/etílico (g/gmol);

MM ácido graxo = massa molar do ácido graxo (g/gmol).

A partir da determinação destes parâmetros foi possível calcular a massa de ácido graxo na amostra, bem como a massa de éster metílico/etílico. Assim, para o cálculo da massa de ácido graxo na amostra utilizou-se da seguinte relação:

$$M_x = \frac{A_x \cdot M_p \cdot F_{ct}}{A_p \cdot F_{CEA} \cdot M_a} \quad (11)$$

sendo que:

M<sub>x</sub> = massa do ácido graxo x na amostra analisada em mg/g de lipídios totais;

M<sub>p</sub> = massa do padrão interno em mg;

M<sub>a</sub> = massa de lipídios totais em g;



$A_x$  = área no cromatograma relativa ao ácido graxo x na amostra analisada;

$A_p$  = área no cromatograma relativa ao padrão interno na amostra analisada;

FCT = fator de correção teórico;

$F_{CEA}$  = fator de conversão de éster metílico/etílico para ácido graxo.

## CAPITULO IV

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1 – Cultivo das microalgas

Inicialmente, em escala de bancada, foi realizado o estudo sobre as condições de preparo e cultivo dos inóculos de *Chlorella vulgaris*. A curva de crescimento algal foi acompanhada por meio de análises de turbidez e pH, conforme discutido anteriormente.

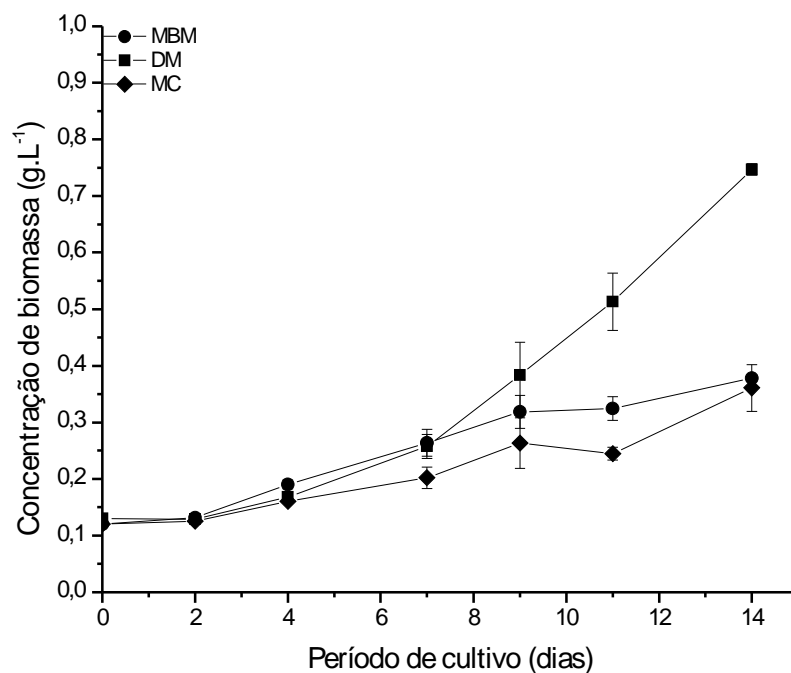
#### IV.1.1 - Avaliação do crescimento de *C. vulgaris* em meio de cultivo sintético

Para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foram testados o efluente in natura e três meios sintéticos (DM, MBM, MC), visando a identificar as melhores condições de crescimento e manutenção da espécie.

A Figura IV.1 mostra as curvas de crescimento obtidas para os diferentes meios de cultivo estudados. De modo geral, o crescimento até o 6º dia foi semelhante para os três meios de cultivo. Pode ser observado, então, que o período de adaptação foi até o 6º dia de cultivo. Também pode ser observado que as curvas de crescimento da microalga para os meios DM, MBM e MC passam a se diferenciar após este período de adaptação. Assim, as curvas mostram um crescimento superior da microalga no meio DM, enquanto que os cultivos de MBM e MC apresentaram um crescimento bem menor.

A produtividade e a taxa de crescimento para os diferentes meios de cultivo são apresentados na Tabela IV.1. Pode-se verificar que o meio MBM apresenta valores maiores de produtividade (P) e taxa de crescimento (r) nos três primeiros dias de cultivo, sendo que, após este período, o crescimento se estabiliza, enquanto que o meio

DM passa a apresentar taxas mais elevadas de crescimento, seguidas do meio MC. Por outro lado, os valores alcançados durante os dias iniciais do cultivo com o meio MC é alcançado somente ao final do período.



**Figura IV.1: Concentração da biomassa de *C. vulgaris* em função do tempo, para os diferentes meios sintéticos de cultivo.**

**Tabela IV.1: Produtividade e taxa de crescimento para os três meios de cultivo sintéticos.**

Intervalo (dias)	Meios de cultivo					
	MBM		DM		MC	
	P	r	P	r	P	r
0 – 2	5,70	0,045	-0,55	-0,004	2,85	0,023
2 – 4	29,45	0,185	19,75	0,134	17,55	0,123
4 – 7	24,57	0,109	29,77	0,142	13,70	0,076
7 – 9	27,30	0,094	62,85	0,199	30,68	0,133
9 – 11	2,95	0,009	64,88	0,146	-9,30	-0,037
11 – 14	17,90	0,051	77,85	0,125	38,75	0,130

P = produtividade (mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>); r = taxa de crescimento (dia<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles apresentados por Henrard (2009) que, ao avaliar condições diferentes de nutrição para *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., alcançaram valores de produtividade de 0,038 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> com o meio MBM e de 0,040 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> para o meio MC, durante 10 dias de cultivo.

#### IV.1.2 – Avaliação do cultivo em efluente de reator tipo RALF

A avaliação seguinte foi realizada para se estudar a melhor condição de produção de biomassa de *Chlorella vulgaris*, tendo como principal fonte de nutrientes o efluente da estação de tratamento de esgoto (efluente *in natura*). Como já discutido anteriormente, o custo dos nutrientes para o crescimento da microalga é um fator importante a ser considerado. No entanto, como demonstrado por Cho *et al.* (2011), quando se busca utilizar fontes alternativas de nutrientes, como no presente caso, a presença de bactérias e protozoários pode influenciar de modo negativo no crescimento da espécie estudada. Pois, a presença de bactérias no cultivo compete por nutrientes e luz, enquanto que, protozoários são responsáveis pela predação das microalgas. Assim, também se avaliou o efeito que processos de pré-tratamento no efluente *in natura* pode ter no crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*.

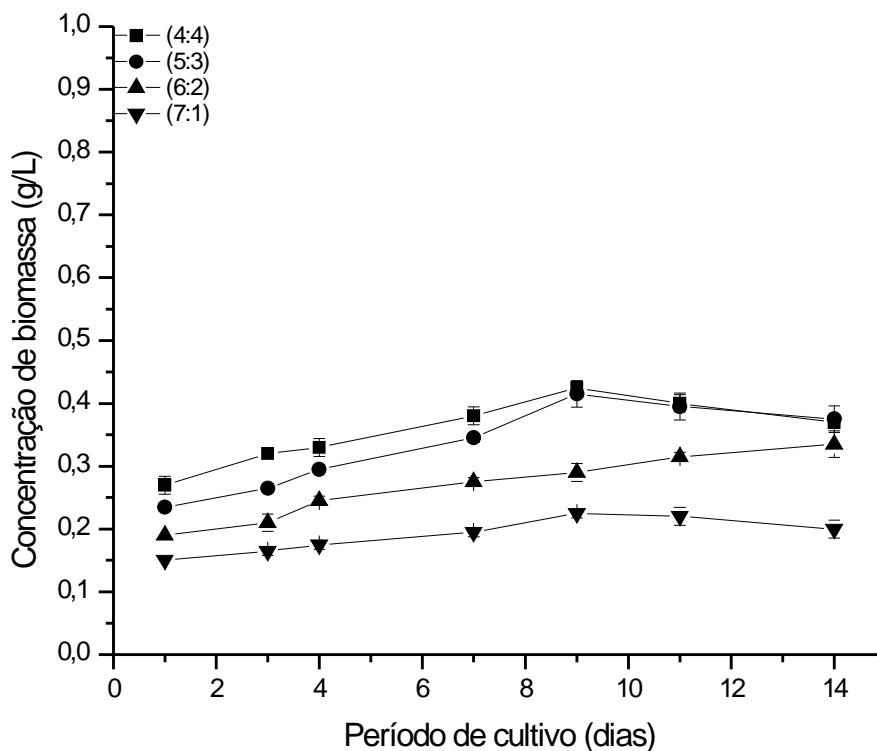
As condições de avaliação do efluente foram limitadas à utilização *in natura*, filtração grosseira e filtração grosseira seguida de desinfecção com luz ultravioleta, conforme apresentado na seção III.1. Primeiramente, foi analisada a influencia da diluição do meio de cultivo, utilizando-se apenas o efluente *in natura*. Os resultados obtidos são mostrados na Figura IV.2, que apresenta as curvas de crescimento algal em função do tempo de cultivo, para as diferentes diluições estudadas.

A partir das curvas apresentadas na Figura IV.2 pode-se verificar que a diluição do meio não influenciou de forma significativa o crescimento da microalga, pois as curvas apresentam comportamento semelhante e valores de concentração de microalga próximos. No entanto, o fator que influenciou no estabelecimento e desenvolvimento da cultura algal foi a ausência de pré-tratamento do meio de cultivo *in natura*.

O teste de Tukey mostrou que não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os cultivos com as concentrações de 4:4, 5:3 e 6:2 durante o período de cultivo. Mas, ao serem comparados com a concentração de efluente 7:1, ou ainda, com o meio de cultivo

sintético DM, que foi o melhor resultado obtido para os meios tradicionais, ocorre diferença significativa entre eles.

Como pode ser observado na Tabela IV.2 os resultados obtidos para a avaliação da produtividade (P) e a taxa de crescimento (r) deixam clara a limitação do crescimento da microalga nestas condições. De fato, ao se compara os valores mais altos de produtividade ( $31,95 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) e taxa de crescimento ( $0,088 \text{ dia}^{-1}$ ) obtidos entre o 7º e 9º dias de cultivo, para a diluição de 5:3, verifica-se que estes são inferiores àqueles obtidos com o meio sintético DM, conforme apresentado na Tabela IV.1.



**Figura IV.2: Concentração de biomassa produzida com efluente *in natura* em função do tempo de cultivo, para as diferentes diluições do meio.**

Os resultados apresentados na Tabela IV.2 também permitem observar que, a partir do 9º dia, passa a ocorrer perda de biomassa em todas as diluições empregadas, mostrando ser inviável o cultivo nestas condições.

Segundo Cho *et al.* (2011), o crescimento bacteriano pode inibir a entrada de luz no meio de cultivo, absorver nutrientes e, ainda, agregar a biomassa. Assim, a baixa produtividade final observada para o cultivo indica que os microorganismos presentes no efluente *in natura* influenciaram de forma significativa o crescimento da microalga. Isto permite pensar que a eliminação parcial ou total destes microorganismos pode conduzir a uma produção efetiva de microalga *Chlorella vulgaris*.

**Tabela IV.2: Produtividade e taxa de crescimento em função da diluição do efluente *in natura*.**

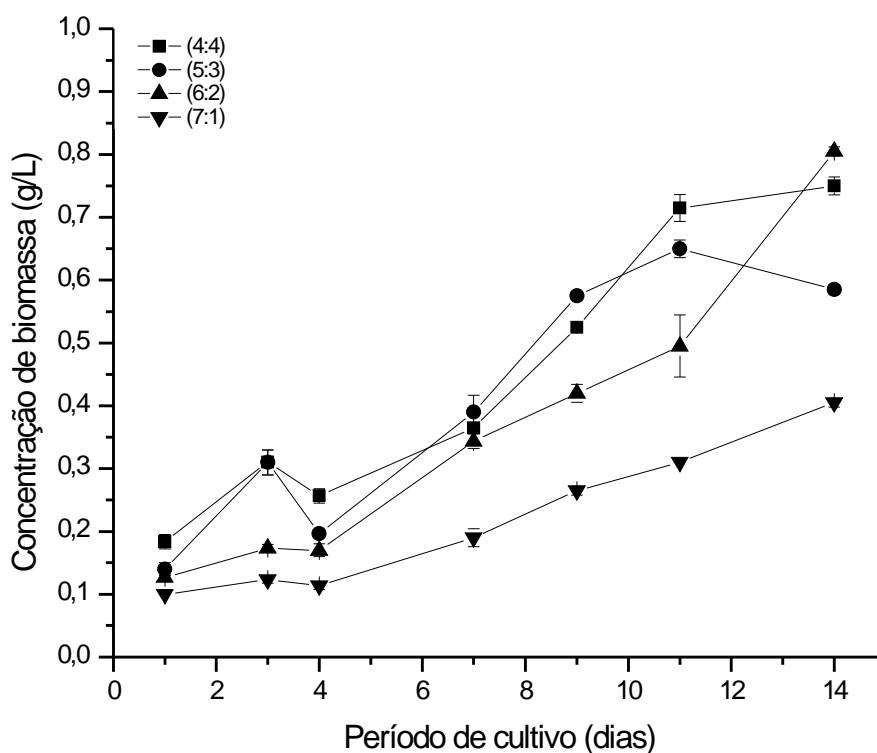
Intervalo (dias)	Diluição do meio							
	4:4*		5:3		6:2		7:1	
	P	r	P	r	P	r	P	r
0-2	25,00	0,085	15,00	0,060	10,00	0,050	7,50	0,048
2-4	5,00	0,015	15,00	0,054	17,50	0,077	5,00	0,029
4-7	16,67	0,047	16,67	0,052	10,00	0,039	6,67	0,036
7-9	22,50	0,056	35,00	0,092	7,50	0,027	15,00	0,072
9-11	-12,50	-0,030	-10,00	-0,025	12,50	0,041	-2,50	-0,011
11-14	-10,00	-0,026	-6,67	-0,017	6,67	0,021	-6,67	-0,032

P = produtividade ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ); r = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ); \* razão efluente : água + inóculo.

A Figura IV.3 apresenta a curva de crescimento da microalga utilizando-se como meio de cultivo o efluente *in natura* filtrado. A filtração do meio de cultivo foi realizada com o objetivo principal de retirar material particulado visivelmente presente, conforme apresentado na seção III.1.

As curvas apresentadas na Figura IV.3 mostram que os cultivos que utilizaram as diluições menores (4:4 e 5:3) mantiveram a fase de crescimento exponencial até o período de 9 – 11 dias, enquanto que para as diluições maiores (6:2, 7:1) esta fase foi mais prolongada. Estes resultados estão compatíveis com aqueles obtidos por Li *et al.* (2011). Estes autores observaram o fim da fase exponencial com 4-5 dias, para o cultivo de *Chlorella sp.* utilizando efluente de esgoto concentrado. A partir desse período, o crescimento se manteve estável até o final do cultivo, obtendo-se uma concentração de

biomassa próxima a  $1,0 \text{ g L}^{-1}$ . Este valor é superior ao alcançado no presente trabalho, que foi em torno de  $0,7 \text{ g L}^{-1}$ , durante o mesmo intervalo de cultivo. Por outro lado, a filtração do efluente levou a um acréscimo significativo nos valores de concentração de biomassa alcançados, quando comparados com o cultivo com efluente *in natura* (Figura IV.2).



**Figura IV.3: Concentração de biomassa produzida com efluente *in natura* filtrado em função do período de cultivo, para as diferentes diluições do meio.**

O teste de tukey mostrou que a utilização das concentrações de 4:4, 5:3 e 6:2 não possuem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os seus resultados. Mas, as concentrações de 4:4 e 5:3 quando comparados com o meio sintético DM, diferenciam-se deste, possuindo resultados superiores ao do meio sintético, enquanto que, a concentração 6:2 não se diferencia, ainda tendo condições de substituir o meio sintético assim como as condições anteriores. No entanto, a concentração 7:1 apresenta uma

diferença significativa e não obtém produtividade que justifique a sua utilização na substituição do meio sintético.

Os valores de produtividade e taxa de crescimento em função do período de cultivo e da diluição do meio são representados na Tabela IV.3. Pode-se verificar que os valores obtidos, com a utilização de efluente *in natura* filtrado, possibilitaram um salto importante na produtividade (P) e na taxa de crescimento da microalga (r). Estes valores se mostraram superiores àqueles obtidos com o efluente *in natura*, indicando que o processo de filtração foi efetivo em eliminar componentes do efluente que estariam afetando de forma negativa o crescimento da microalga.

**Tabela IV.3: Produtividade e taxa de crescimento da microalga em função da diluição do efluente *in natura* filtrado.**

Intervalo (dias)	Diluição do meio							
	4:4*		5:3		6:2		7:1	
	P	R	P	r	P	r	P	r
0 – 2	63,34	0,263	80,00	0,381	23,33	0,157	11,67	0,105
2 – 4	-26,67	-0,094	-27,50	-0,101	-1,67	-0,010	-5,00	-0,042
4 – 7	36,11	0,117	48,33	0,155	57,78	0,234	25,56	0,172
7 – 9	80,00	0,182	92,50	0,194	38,34	0,101	37,50	0,166
9 – 11	95,00	0,154	37,50	0,061	37,50	0,082	22,50	0,078
11 – 14	11,67	0,016	-3,33	-0,005	103,33	0,162	31,67	0,089

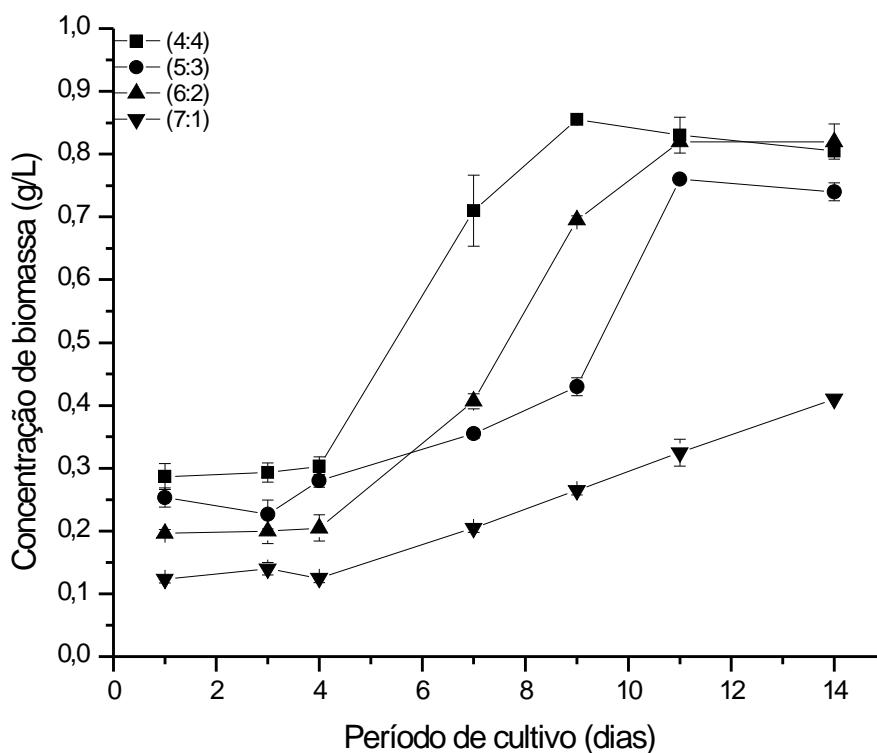
P = produtividade ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ); r = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ); \* razão efluente : água + inóculo.

O resultado para a taxa de crescimento ( $r = 0,390 \text{ dia}^{-1}$ ) está próximo ao valor de  $0,345 \text{ dia}^{-1}$  obtido por Kumar et al. (2010) para o cultivo de *Chlorella vulgaris*, em três dias de ensaio, utilizando efluente de suinocultura. Além disso, os valores de produtividade observados foram bastante satisfatórios, pois estes, assim como as taxas de crescimento da microalga, alcançaram ou superaram os valores que foram obtidos com o meio sintético DM. Isto indica que a utilização de efluente *in natura* filtrado pode ser uma alternativa atrativa para o cultivo de microalgas. Também se pode observar na Tabela IV.3 que a utilização de diluições do meio de 4:3, 5:3 e 6:2 levaram



a taxas de crescimento da microalga ( $r$ ) e produtividade ( $P$ ) próximas entre si, enquanto que a diluição de 7:1 não promoveu um desenvolvimento adequado do cultivo, com valores próximos àqueles obtidos com a utilização do efluente *in natura*.

Ao se ampliar o pré-tratamento, com a utilização de desinfecção com luz ultravioleta, visou-se à eliminação e controle efetivo de microrganismos que venham competir por nutrientes, luz e/ou se alimentem da microalga. De maneira geral, este pré-tratamento resultou numa melhora dos valores de concentração da biomassa obtidos no cultivo, como pode ser visto na Figura IV.4, bem como uma melhoria na produtividade ( $P$ ) e na taxa de crescimento da microalga, conforme pode ser observado na Tabela IV.4.



**Figura IV.4: Concentração de biomassa produzida com o efluente *in natura* filtrado e submetido à desinfecção com luz ultravioleta em função do período de cultivo e da diluição do meio.**

A fase do crescimento exponencial para o cultivo com meio sintético DM foi de 14 dias, no entanto, para o cultivo com o efluente *in natura* filtrado e tratado com luz ultravioleta este período se estendeu até 9-11 dias, apresentando a partir daí o declínio da produção de biomassa. Além disso, a produção de biomassa obtida com o meio DM em 14 dias (Figura IV.1) foi alcançada com apenas 9 dias de cultivo utilizando o efluente *in natura* filtrado e submetido à desinfecção com luz ultravioleta.

O teste de Tukey nos demonstra que a utilização de concentrações de 4:4, 5:3 e 6:2 não se diferenciam significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si. Entretanto, assim como nas condições anteriores a condição 7:1 se diferencia das demais, indicando que a concentração do efluente é um fator limitante.

**Tabela IV.4: Produtividade e taxa de crescimento da microalga em função da diluição do efluente *in natura* submetido à filtração seguida de desinfecção com luz UV-B.**

Intervalo (dias)	Diluição do meio							
	4:4*		5:3		6:2		7:1	
	P	r	P	r	P	r	P	r
0 – 2	3,33	0,0115	-6,67	-0,0270	1,67	0,0084	8,34	0,0634
2 – 4	5,00	0,0168	20,00	0,0771	2,50	0,0123	-7,50	-0,0567
4 – 7	135,56	0,2835	25,00	0,0791	67,22	0,2283	26,67	0,1649
7 – 9	72,50	0,0929	37,50	0,0958	144,17	0,2680	30,00	0,1284
9 – 11	-12,50	-0,0148	165,00	0,2848	62,50	0,0827	30,00	0,1020
11 – 14	-8,33	-0,0102	-6,67	-0,0089	0,00	0,0000	28,33	0,0774

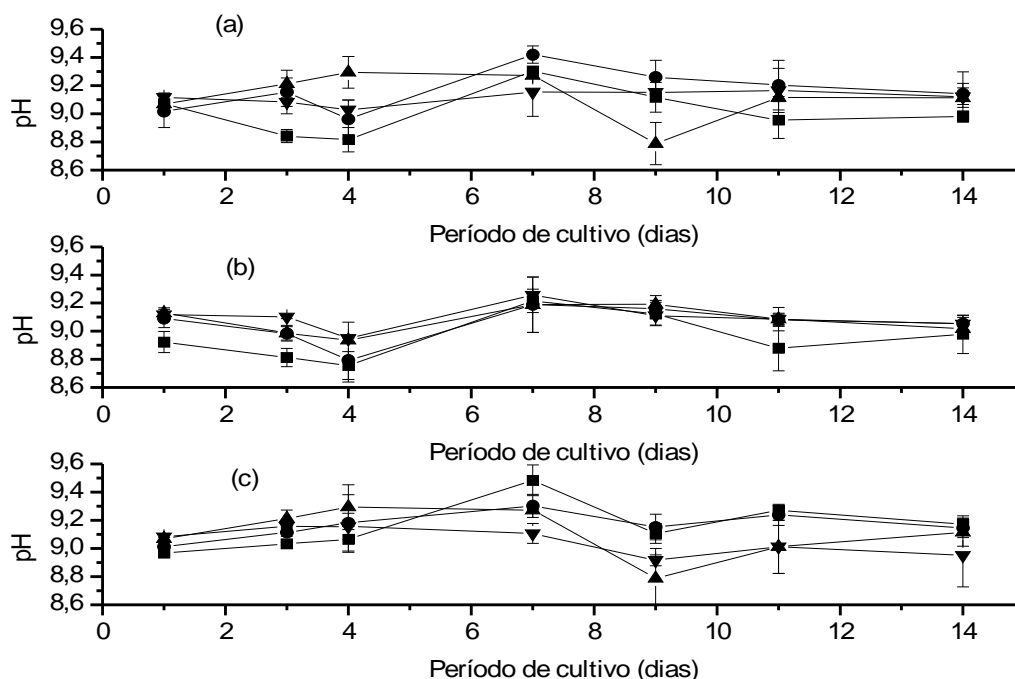
P = produtividade ( $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ); r = taxa de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ); \* razão efluente : água + inóculo.

Estes resultados são compatíveis com aqueles obtidos por Raposo *et al.* (2010), que cultivaram *Chlorella vulgaris* com efluente de cervejaria. Os resultados obtidos mostraram uma taxa de crescimento de  $0,39 \text{ dia}^{-1}$ , em diluição 1:1, e de  $0,12 \text{ dia}^{-1}$ , para a diluição de 1:2 do efluente, enquanto que no presente trabalho os valores obtidos foram de  $0,211 \text{ dia}^{-1}$  e  $0,207 \text{ dia}^{-1}$  para o efluente *in natura* filtrado e para o efluente *in natura* filtrado submetido à luz ultravioleta, respectivamente.

#### IV.1.3 – Avaliação do pH

A Figura IV.5 mostra as curvas de variação do pH para os cultivos de *Chlorella vulgaris* com os diferentes efluentes. As curvas mostram que os valores do pH no

cultivo, para os diferentes efluentes, se mantiveram entre 8,5 e 9,5. As curvas indicaram ainda um aumento no valor do pH a partir do primeiro dia, para todos as condições de cultivo. Durante o cultivo com os três substratos diferentes ocorreu um aumento dos valores iniciais no pH, que estavam em torno de 9,0, para até 9,5. Este aumento culminou com o fim da amônia no meio de cultivo, sendo que a partir disto passa a ocorrer a redução do pH, com aumento de  $\text{NH}_4^+$ .



**Figura IV.5 – Valores de pH do meio de cultivo em função do período de cultivo para: (a) efluente *in natura* filtrado e tratado com luz ultravioleta; (b) efluente *in natura* filtrado; e (c) efluente *in natura*.**

Os valores obtidos do pH estão em uma faixa benéfica para o cultivo de microalgas. De fato, algumas espécies de microalga preferem pH neutro (ZENG et al., 2011), mas estudos têm apontado uma faixa maior para o cultivo de *Chlorella* spp., sendo esta entre 5,5 e 9,0 (KUMAR et al., 2010, LAU et al., 1994).

O aumento do pH pode ocorrer devido a fixação do dióxido de Carbono ( $\text{CO}_2$ ) que está presente no efluente, por meio da respiração das microalgas que proporcionam uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez

carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH<sup>-</sup>) no meio, acarretando um aumento do pH (MOTA e VON SPERLING, 2009, LI et al., 2011).

No entanto, Kumar et al., (2010) ao trabalharem com efluente de suinocultura também identificaram valores altos para o pH, sem alterações significativas ao longo do período de cultivo. A alimentação diária e a cada três dias ocasionaram um comportamento constante do mesmo. Quando alimentado uma única vez, no início do primeiro para o segundo dia, ocorreu uma alteração mais significativa (9,2 – 8,5). Segundo os autores, isto ocorreu devido à diminuição da quantidade de nitrogênio total no meio, consumido pelas algas. A especiação do NH<sub>3</sub> compete com as moléculas de água em reações de oxidação, liberando O<sub>2</sub>.

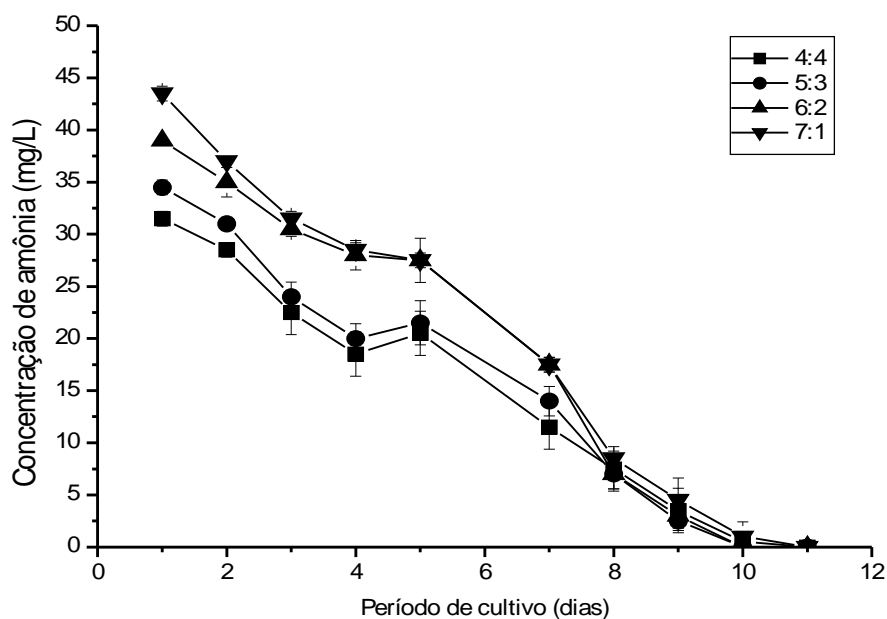
Chevalier et al. (1985) estudaram o cultivo de *Scenedesmus acutus* e *Scenedesmus obliquus* em condições naturais, sem o controle do pH do meio, resultando em valores elevados para o mesmo. O pH se manteve em torno de 9,0, com alguns picos próximos a 9,5, não interferindo no crescimento da microalga. O pH também contribuiu no stripping da amônia presente no esgoto, pois a remoção de amônia livre por meio de stripping ocorre em condições de alcalinidade e temperaturas elevadas (LI et al., 2011).

#### **IV.1.4 – Remoção de nitrogênio amoniacal do efluente**

A Figura IV.6 mostra as curvas de remoção de amônia pelas microalgas, utilizando como meio de cultivo o efluente *in natura*. Dentro das três condições de utilização do efluente para o cultivo de *Chlorella vulgaris*, conforme destacado anteriormente, a utilização de efluente *in natura* foi a que demandou um tempo maior de cultivo, pois o crescimento da microalga não se mostrou satisfatório, fazendo com que ocorresse uma remoção mais lenta da amônia.

Também pode ser observado na Figura IV.6 que o melhor desempenho para a remoção da amônia foi obtido pelos cultivos em que ocorreram uma menor diluição do meio (4:4, 5:3). Assim, durante os primeiros 5 dias de cultivo foram removidos em torno de 35% de amônia, enquanto que os meios de cultivo com maior diluição conduziram a uma remoção menor, próxima a 30%. A partir do 7º dia de cultivo da

microalga a remoção de amônia do meio tende a valores muito próximos entre si, ocorrendo a remoção total da amônia somente a partir do 10º dia de cultivo.

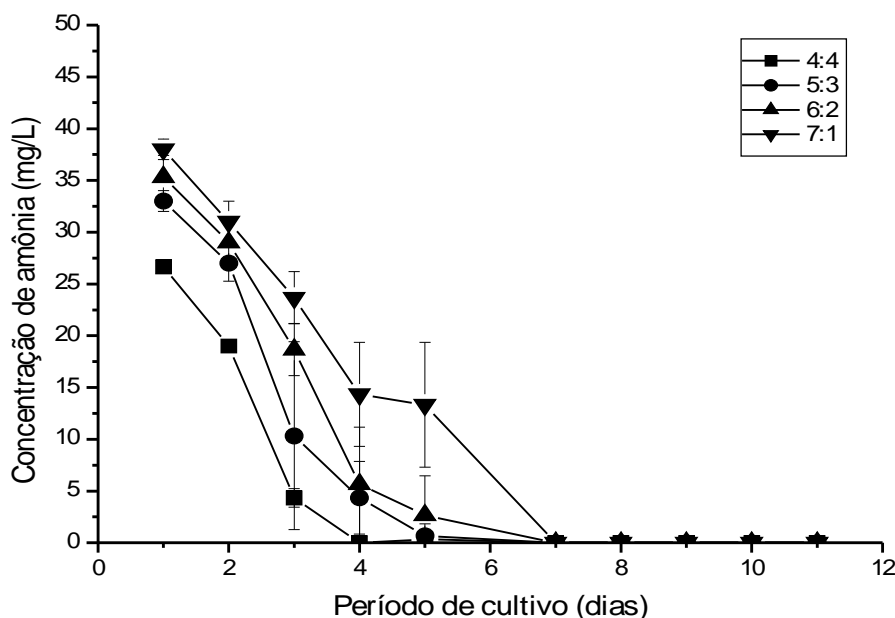


**Figura IV.6: Remoção de amônia em efluente *in natura* em função do período de cultivo, para diferentes diluições de efluente: inóculo.**

Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os que foram encontrados por Lau et al. (1995), que estudaram a influência da concentração celular do inóculo na remoção de nutrientes de águas residuárias. Os autores obtiveram uma remoção de 100% da amônia presente no meio, em 10 dias de cultivo. Enquanto, Li et al. (2011), utilizando esgoto bruto, observaram a remoção completa da amônia em 14 dias, embora durante os 4 dias iniciais de cultivo tenha ocorrido uma remoção de 93,9% da amônia. Como pode se verificar, vários autores têm estudado a viabilidade de utilização de efluentes para a produção de biomassa de microalgas, como exemplo, (RUIZ-MARIN et al., 2010) estudaram o cultivo das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* obtendo uma remoção de 60,1% e 100%, respectivamente, em 48 horas de cultivo.

Também, é possível considerar que as menores diluições do meio de cultivo, por apresentarem uma maior população de microalgas, fazem com que ocorra uma maior remoção de amônia. No entanto, com efluente *in natura* não se observa a manutenção desta tendência, devido à presença de microrganismos no efluente, que podem se alimentar das células de microalgas, ação facilitada pela maior concentração. Assim, ao longo do período de cultivo ocorre uma tendência de se igualar o número de células e, por consequência, a remoção da amônia até a sua totalidade.

A Figura IV.7 mostra as curvas de Remoção de amônia em efluente *in natura* filtrado em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.



**Figura IV.7: Remoção de amônia em efluente *in natura* filtrado em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.**

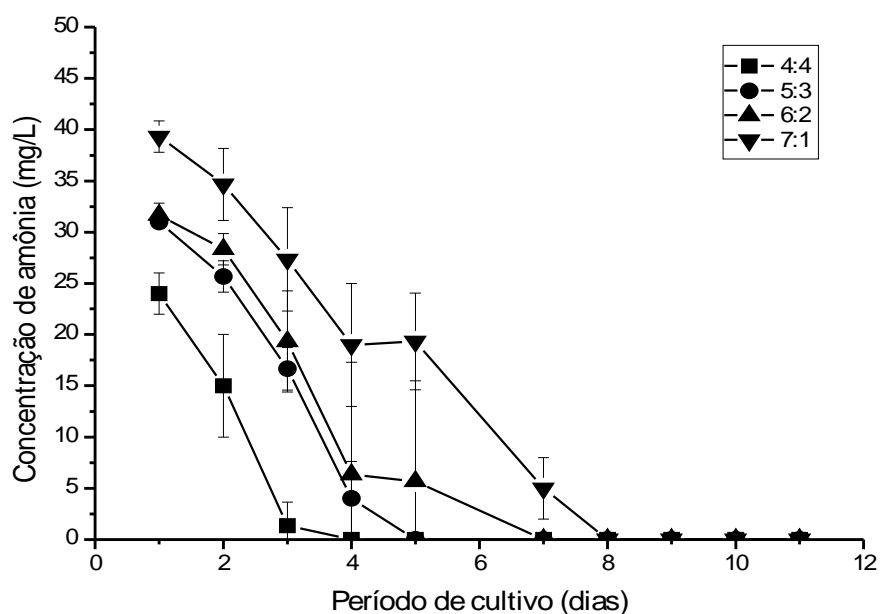
A utilização da filtração como pré-tratamento do efluente *in natura* utilizado como meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* mostrou um aumento significativo na remoção de amônia, que pode ser relacionada às taxas de crescimento mais altas observadas para este cultivo, conforme discutido anteriormente.

O efluente *in natura* filtrado apresentou concentrações iniciais de amônia que estiveram na faixa de 27,5 até 40 mg L<sup>-1</sup>. Com o início dos cultivos a utilização de

diluições de 4:4 e 5:3 levou a remoções de amônia de 100 e 81%, respectivamente, após um período de quatro dias. Para a remoção completa de amônia utilizando-se as maiores diluições do inóculo no efluente (6:2, 7:1) foram necessários 7 dias de cultivo. Isto está diretamente associado ao fato de haver uma menor concentração celular inicial, o que culminou em uma remoção mais lenta da amônia.

De fato, Cho *et al.* (2011), utilizando filtros com tamanho de poros de 0,2, 0,45 e 1  $\mu\text{m}$ , como pré-tratamento do efluente para o cultivo de *Chlorella sp.*, observaram uma remoção mais lenta da amônia, necessitando um tempo superior a nove dias para se atingir valores em torno de 80% do nitrogênio total, tendo iniciado o cultivo com valores de 20  $\text{mg L}^{-1}$ . Estes valores para a amônia são inferiores àqueles observados no presente trabalho. A diferença de valores pode estar relacionada ao mecanismo de absorção de amônia como fonte prioritária para o crescimento das microalgas, no qual o nitrato é convertido inicialmente a nitrito e, posteriormente, a amônia, para que esta seja utilizada pela biomassa.

Ao se utilizar a desinfecção com luz ultravioleta juntamente com a filtração do efluente *in natura*, a remoção da amônia não foi expressiva, em relação aos cultivos que utilizaram somente a filtração do efluente *in natura*. Como pode ser observado na Figura IV.8, a remoção atingiu praticamente 100% de remoção de amônia para o terceiro dia de cultivo com a diluição 4:4.



**Figura IV.8: Remoção de amônia no efluente *in natura* filtrado tratado com luz ultravioleta em função do período de cultivo, para diferentes diluições do meio.**

Para o cultivo em meio diluído na proporção 7:1 os valores de remoção de amônia ficaram um pouco mais altos do que 10% da amônia inicialmente presente, após sete dias de cultivo. Após o 8º dia de cultivo observa-se a remoção completa da amônia do meio, para todas as diluições empregadas.

Os resultados aqui obtidos estão próximos aos observados por (FENG *et al.*, 2011), que utilizaram água residuária artificial, com uma concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>, para cultivo de *C. vulgaris*. O cultivo levou a 90% de remoção de amônia em 2 dias, chegando próximo à remoção total a partir do quarto dia, quando as microalgas estabilizam o seu crescimento e, também, passaram a consumir o nitrato presente no meio.

Deste modo, os fatores de crescimento, pH e remoção de amônia, deixam claro a dependência entre eles. O crescimento das microalgas mostrado nas Figuras IV. 2, IV.3 e IV.4 podem ser associados à assimilação da amônia pelas microalgas, demonstrada pelas curvas de remoção mostradas nas Figuras IV.6, IV.7 e IV.8. Além disso, a produção de biomassa ao final da remoção da amônia coincide com uma redução no crescimento das microalgas, demonstrando que a presença de nitrato no meio não é



significativa. Este mesmo efeito está presente na variação de pH do meio (Figura IV.5), cuja remoção da amônia acarreta redução do pH.

#### IV.2 – Caracterização dos lipídeos extraídos da biomassa de microalga

Os resultados da extração de lipídeos totais são apresentados na Tabela IV.5. Os valores obtidos demonstram que o meio de cultivo utilizado tem influência na quantidade de lipídeos totais produzidos pela microalga. Pode-se considerar, ainda, que a diferença no teor de lipídeos totais pode ser provocada pela presença de outros microorganismos, com menor teor de óleo.

Na extração de lipídeos das microalgas, cultivadas com meio sintético DM, foram obtidos 21,23% de lipídeos totais. A extração de lipídeos totais por solvente em soxhlet alcançou resultados compatíveis com a literatura, em que a *C. vulgaris* possui teores na faixa entre 16 e 22% de lipídeos (BECKER, 2007). Para os demais meios de cultivo observam-se valores inferiores a este.

**Tabela IV.5: Quantidade de lipídios totais/g de biomassa seca obtida na extração do óleo de *C. vulgaris* com hexano em soxhlet.**

Meio de cultivo	% de lipídeos extraídos
DM	21,2
in natura filtrado + UV	17,4
in natura filtrado	13,0
in natura	9,79

A composição em ácidos graxos do óleo extraído de biomassa de *Chlorella vulgaris* com hexano em soxhlet, conforme apresentado na Tabela IV.6, mostrou-se de acordo com a literatura (LAM e LEE, 2012), em que os principais ácidos graxos observados são o C16:0, o C18:1, o C18:2 e o C18:3, que entre os diferentes meios de cultivo foram 81,75% (in natura filtrado + UV), 72,86% (in natura filtrado) e 43,39% (in natura).

**Tabela IV.6 – Composição em ácidos graxos do óleo de microalga *C. vulgaris*.**

	<b>DM</b>	<b><i>in natura</i> filtrado + UV</b>	<b><i>in natura</i> filtrado</b>	<b><i>in natura</i></b>
<b>C14:0</b>	-	0,76	1,45	2,28
<b>C16:0</b>	17,4	32,9	25,7	17,0
<b>C16:1</b>	7,47	1,01	2,32	1,90
<b>C18:0</b>	3,35	1,08	4,04	3,34
<b>C18:1</b>	15,1	31,2	27,0	9,91
<b>C18:2</b>	13,9	14,2	12,8	11,7
<b>C18:3</b>	18,1	2,38	3,23	1,44
<b>C20:0</b>	6,32	0,10	7,24	10,1
<b>C20:1</b>	9,37	1,09	4,29	19,4
<b>Demais</b>	9,03	15,3	11,8	23,0

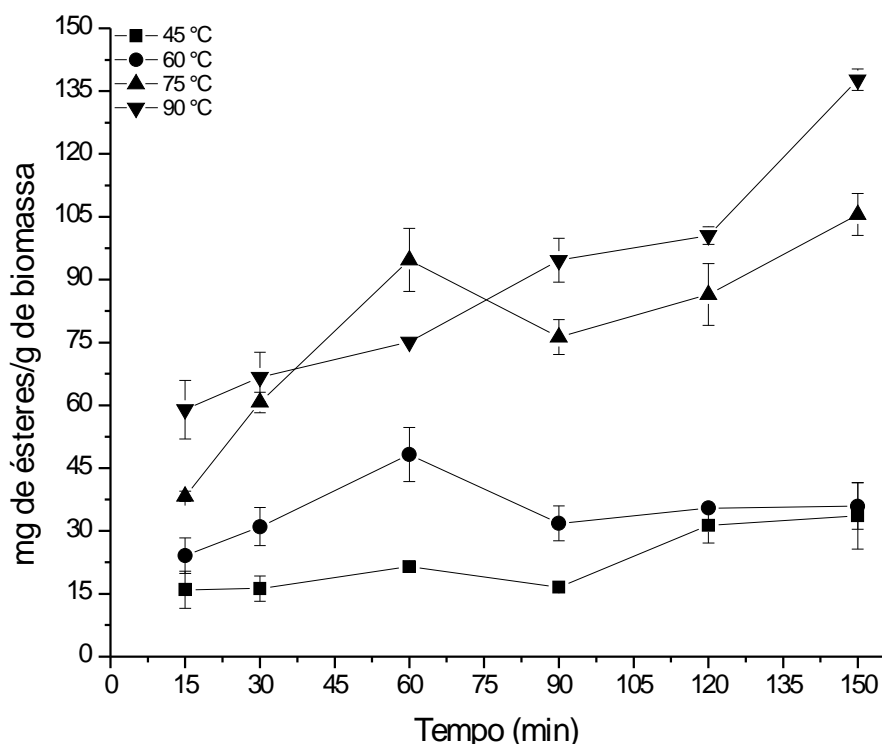
De fato, Lee *et al.* (2010) avaliaram diferentes métodos de extração de óleo de microalgas e observaram uma proporção maior para o ácido linoleico (C18:2), seguido de oleico (C18:1). Lam & Lee (2012) também determinaram a concentração de ácidos graxos de óleo obtido de microalga, a qual também apresentou valores próximos aos determinados neste trabalho, ficando em torno de 85%.

Como pode ser verificado na Tabela IV.6, há uma tendência de diminuição do teor dos principais ácidos graxos produzidos. Isto pode ter sido ocasionado pela presença de microrganismos como bactérias e protozoários em maior quantidade no cultivo de acordo com o encontrado por Cho *et al.* (2011).

Portanto, a composição em ácidos graxos e teor de óleo de biomassa algal obtidos no presente trabalho encontram-se compatíveis com a literatura e dentro dos parâmetros desejáveis para sua aplicação na obtenção de biodiesel. Isto indica o potencial tecnológico que o cultivo de microalgas em meio alternativo, como o efluente *in natura* estudado, apresenta para a sua aplicação na produção de biocombustíveis.

### **IV.3 – Obtenção de ésteres etílicos por reação *in situ* da microalga**

A Figura IV.9 mostra a quantidade de éster (mg) obtida da biomassa seca (g) por reação *in situ* da microalga em função do tempo, utilizando-se n-hexano como solvente, em diferentes temperaturas.



**Figura IV.9: Rendimento em ésteres etílicos obtidos por reação *in situ* da microalga em função do tempo, para o solvente hexano, em diferentes temperaturas.**

Cabe destacar que a quantidade em mg de éster por g de biomassa seca é denominada neste trabalho como rendimento em éster, termo que já vem sendo utilizado pelo grupo em trabalhos anteriores.

As curvas apresentadas na Figura IV.9 mostram que as reações *in situ* utilizando hexano, em temperaturas que ultrapassam os 75 °C, conduziram aos rendimentos mais altos em ésteres etílicos, com máximos de 137,7 mg de éster por g de biomassa a 90 °C e 105,5 mg de éster por g de biomassa a 75 °C. Estes valores são compatíveis com os relatados na literatura, que tem demonstrado que temperaturas de reação maiores resultam em maiores conversões (ÖZGÜL-YÜCEL e TÜRKAY, 2002, WAHLEN *et al.*, 2008, WAHLEN *et al.*, 2011).

Na Figura IV.9 a curva de rendimento em ésteres para 75 °C apresenta uma fase rápida de conversão levando a rendimentos em ésteres etílicos próximos ao máximo que é obtido a tempos elevados. Este comportamento já foi relatado por Ehimen *et al.*

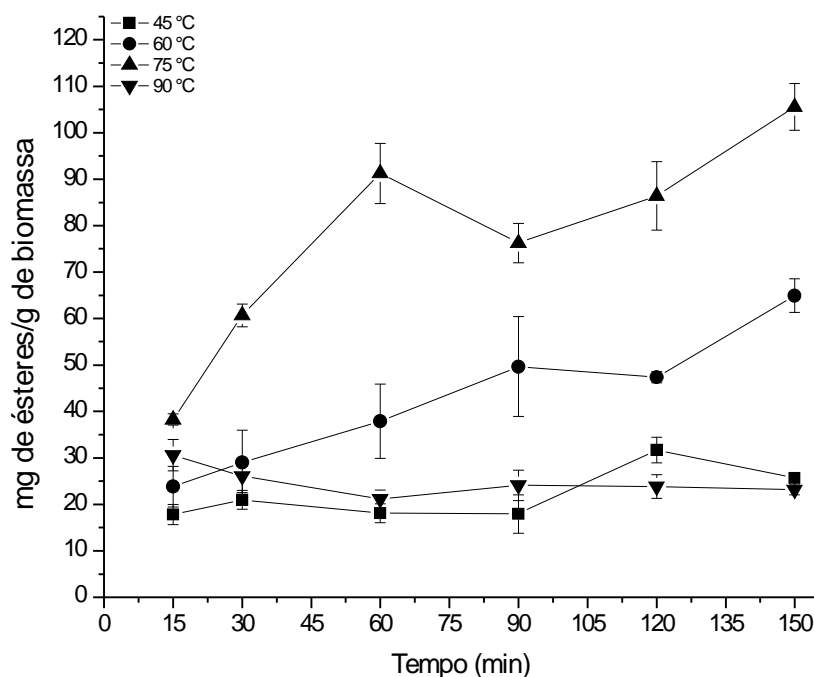
(2010), que também verificaram que esta fase se estende até 60 minutos de reação e a partir deste ponto ocorre a estabilização no rendimento em ésteres. Para o uso de temperatura maior (90 °C) nas reações, verificou-se que a fase rápida de conversão é menor do que 15 minutos. Entretanto, com temperaturas de reação menores as curvas de rendimento em ésteres mostram uma inclinação menor, indicando rendimentos em ésteres etílicos menores, devido a velocidades de reação também menores, o que evidencia a influência significativa da temperatura na reação. Segundo Ehimen *et al.* (2010), a utilização de temperaturas elevadas, juntamente com pressões elevadas, acima do ponto de ebulição dos solventes propicia que ocorra uma maior miscibilidade deste com os lipídeos totais presentes na biomassa, implicando uma redução do tempo de reação na obtenção de ésteres. Entretanto, para as temperaturas próximas ou abaixo do ponto de ebulição do solvente, o rendimento em ésteres é baixo, demonstrando que a atuação da fase rápida da reação é limitada pela temperatura de reação. No caso de reações com 60 °C, a extração dos lipídeos é mais lenta e, portanto, o rendimento em ésteres é menor, como observado na Figura IV.9.

O teste de Tukey para as diferentes temperaturas, utilizando o hexano como solvente, não apresenta diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparamos os resultados de 45 com 60 °C, ou ainda, 75 com 90 °C. Entretanto, se cruzarmos os dados de 45 ou 60 com 75 e 90 °C ocorre diferença significativa entre estes.

A Figura IV.10 mostra as curvas para as reações *in situ* que utilizam clorofórmio como solvente.

A utilização de clorofórmio como solvente conduziu a rendimentos em ésteres etílicos mais altos a 75 °C, em tempos de reação superiores a 60 minutos, enquanto que para a temperatura de 60 °C o rendimento em ésteres foi menor em toda a faixa de tempo de reação.

As curvas apresentadas na Figura IV.10 para as temperaturas de 45 e 90 °C mostraram rendimentos em ésteres etílicos menores, ficando abaixo de 30 mg de ésteres/g de biomassa seca. Assim, as menores temperaturas de reação ocasionaram uma menor velocidade de emulsificação e extração e, por consequência, menores velocidades de reação acarretando menores rendimentos em ésteres. Em conformidade com as reações realizadas com hexano como solvente (Figura IV.9), o aumento no rendimento em ésteres demanda maior tempo de reação.



**Figura IV.10: Rendimento em ésteres etílicos obtido na reação *in situ* em função do tempo de reação, para o solvente clorofórmio, em diferentes temperaturas.**

O rendimento em ésteres etílicos obtidos com o uso de temperatura de 90 °C, utilizando clorofórmio como solvente, foi menor que o observado a 60 °C e próximo aos valores observados e comportamento para a curva a 45 °C. Ao contrário do que ocorreu com o uso de hexano (Figura IV.9), isto pode estar associado à presença de uma fração maior do clorofórmio na forma de vapor, dificultando a extração dos lipídeos. Também não pode ser desconsiderado que a maior volatilização do clorofórmio a 90 °C pode ter provocado vazamentos no sistema de reação, que não tenham sido percebidos, o que alteraria de forma significativa o equilíbrio do sistema reacional. De fato, os casos em que estes vazamentos foram perceptíveis, as reações foram refeitas. Este comportamento não foi observado para as reações realizadas utilizando n-hexano como solvente.

Os resultados obtidos estão de acordo com Baumgärtner (2011), que estudou a transesterificação *in situ* para a produção de ésteres metílicos e etílicos a partir da microalga *Scenedesmus* sp. Na temperatura de 60 °C e tempo de reação de 120 minutos foi observado um rendimento de 67,0 mg de ésteres/g de biomassa, portanto, muito

próximo a 64,9 mg de ésteres/g de biomassa obtidos no presente trabalho, no mesmo tempo de reação.

A avaliação estatística para o uso do clorofórmio como solvente apresentou uma semelhança na utilização das temperaturas de 45 e 90 °C, ou seja, não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) somente para estas condições. Isto se deve a maior presença do solvente na fase de vapor quando utilizado a 90 °C, resultando em uma menor eficiência na extração dos lipídeos. Ambas as temperaturas mencionadas se comparadas com 75 e 60 °C possuem uma diferença significativa nos resultados obtidos.

Portanto, os rendimentos em ésteres etílicos obtidos no presente trabalho apresentaram valores significativos e compatíveis com a literatura, confirmando uma vez mais a potencialidade de utilização da reação *in situ* da microalga como processo de obtenção de ésteres etílicos, visando à produção de biodiesel.

## CAPITULO V

# CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente dissertação mostram que a utilização de um meio de cultivo com efluente doméstico para a nutrição de microalga é uma alternativa barata e promissora, além de se observar uma redução na carga poluidora presente neste meio. Assim, a substituição de meios sintéticos no cultivo por efluente sanitário pode ser explorado como suprimento de nutrientes para a produção de *Chlorella vulgaris* e, além disso, realizar concomitantemente o tratamento de águas residuais. Portanto, os resultados demonstram o potencial que o meio alternativo tem na produção de *Chlorella vulgaris*.

Dentre os meios de cultivo sintéticos estudados, o uso do meio DM apresenta-se como o melhor para o crescimento de microalgas *Chlorella vulgaris*, alcançando uma produção de 0,75 g L<sup>-1</sup> de biomassa, após 14 dias de cultivo.

Os cultivos conduzidos com o efluente *in natura* levaram a uma baixa produção de biomassa em comparação com o meio sintético DM. Isto pode ter ocorrido devido à competição por nutrientes e luz com outros microorganismos, predação da espécie inoculada e dificuldade de estabelecer o domínio da mesma no meio de cultivo *in natura*. A produção de biomassa não apresentou uma diferença significativa o cultivo foi realizado empregando diferentes diluições. Os valores obtidos mostram uma produção de biomassa máxima de 0,43 g L<sup>-1</sup> (4:4) e a menor 0,23 g L<sup>-1</sup> (7:1). No entanto, estes resultados mostram que é necessário a realização de um pré-tratamento no efluente *in natura* para a sua utilização como meio de cultivo de microalgas.

A utilização de efluente *in natura* filtrado no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* mostra um acréscimo significativo na produção de biomassa. O efluente *in natura* filtrado conduziu a valores próximos aos obtidos com a utilização do meio

sintético DM e superou os meios MBM e MC. A melhor produção de biomassa foi obtida com 9 dias de cultivo, utilizando-se as diluições 4:4 e 6:2, com valores de 0,75 e 0,80 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

A utilização como meio de cultivo de efluente *in natura* filtrado seguido de desinfecção com luz ultravioleta mostra valores maiores de produção de biomassa. Com nove dias de cultivo e diluição 4:4, foi obtida uma produção biomassa de 0,86 g L<sup>-1</sup>.

A remoção de amônia do efluente *in natura* foi efetiva no cultivo de microalga. O que diferenciou a remoção foi o uso de pré-tratamento no efluente *in natura*, pois este possibilitou um crescimento maior da microalga, que conseqüentemente resultou em uma rápida remoção da amônia. A remoção de amônia observada para os cultivos com menor diluição do meio foi superior a 83%, para o efluente *in natura* filtrado, e 93% para o efluente *in natura* filtrado e tratado com luz ultravioleta, após o terceiro dia de cultivo. O efluente *in natura* levou a uma redução de somente 10% da concentração inicial de amônia.

O teor de lipídeos totais e a composição em ácidos graxos obtidos com a extração com solvente em soxhlet mostrou-se compatível com a literatura. Os teores de alcançaram valores de 21,2% para cultivos com meio sintético, 17,4% para efluente filtrado com ultravioleta, 13,0% efluente filtrado e 9,79% com efluente *in natura*. Isto indica a necessidade do equilíbrio nos nutrientes do meio para promover o acúmulo de lipídeos totais na microalga. O uso de efluente *in natura* como meio de cultivo levou a uma redução do teor de lipídeos determinados na biomassa.

As reações *in situ* da microalga utilizando solvente hexano mostram o rendimentos mais altos em ésteres etílicos para as temperaturas de 75 e 90 °C. Em temperaturas de 75 °C foi obtido um rendimento de 94,7 mg de éster por grama de biomassa, com 60 minutos de reação, e após este período o rendimento em éster teve uma tendência de se estabilizar. Para a temperatura de 90 °C, com 15 minutos de reação, são obtidos 59,0 mg de éster por grama de biomassa e 137,8 mg grama de biomassa com 150 minutos de reação. Por outro lado, as reações *in situ* utilizando clorofórmio como solvente conduziram a valores menores de rendimento em ésteres etílicos. Os resultados mais expressivos ocorreram em temperaturas de 75 °C, com um rendimento de 91,3 mg de éster por g de biomassa, com 60 minutos de reação, e após este período se estabilizou. Para as reações conduzidas a 60 °C houve uma tendência de



aumento do rendimento em ésteres com o tempo de reação, alcançando um rendimento em ésteres de 65,0 mg de éster por g de biomassa, após 150 minutos de reação.

Portanto, os rendimentos em ésteres etílicos obtidos no presente trabalho apresentaram valores significativos e compatíveis com a literatura, confirmando uma vez mais a potencialidade de utilização da reação *in situ* da microalga como processo de obtenção de ésteres etílicos, visando à produção de biodiesel.

## CAPITULO VI

# REFERÊNCIAS

- AIE. 2004. Biofuels for transport: na international perspective. OECD. França, 210p.
- AISSE, M. M., LEITE, B. Z. 1997. Pós-tratamento de efluentes de reatores tipo ralf em lagoas de estabilização. In: 19º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Anais... Foz do Iguaçu: ABES, p. 910-920.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. 2008. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. *Ciência e agrotecnologia*, 32 (5): 1551-1556.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. 2012. Produção Nacional de Biodiesel Puro - B100. Disponível em [www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br). Acessado em 22 de setembro de 2012.
- AZEVEDO NETTO, J. M. e HESS, M. L. 1984. Cronologia do abastecimento de água. *Revista DAE*, 44 (137): 106-111.
- BAUMGARTNER, T. R. S. 2011. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. para a síntese de ésteres visando a produção de biodiesel. Tese de doutorado. UEM, Maringá-PR.
- BAUMGARTNER, T. R. S., BURRAK, J. A. M., KOGIKOSKI, M. E., SEBASTIEN, N. Y., ARROYO, P. A. 2013a. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociências*, 11(2): 250-255.
- BAUMGARTNER, T. R. S., BURRAK, J. A. M., BAUMGARTNER, D., ZANIN, G. M., ARROYO, P. A. 2013b. Biomass production and ester synthesis by in situ transesterification/esterification using the microalga *Spirulina platensis*. *International Journal of Chemical Engineering*, 2013: 1-7.
- BECKER, E. W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 293p.
- BECKER, E. W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25: 207-210.

BERTOLDI, F. C., SANT'ANNA, E., OLIVEIRA, J. L. B. 2008. Revisão: biotecnologia de microalgas. *B. CEPPA*, 26 (1): 9-20.

BICUDO, C. E. M., MENEZES, M. 2005. Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para Identificação e Descrições. São Carlos: Editora RiMa, 580p.

BNDES, CGEE (org.). 2008. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. BNDES. Rio de Janeiro, 316p.

BONATO, E. R., BERTAGNOLLI, P. F., LANGE, C. E., RUBIN, S. A. L. 2000. Teor de óleo e de proteína em genótipos de soja desenvolvidos após 1990. *Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (12): 2391-2398.

BORGHETTI, I. A. 2009, Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipuladora. UFPR, Curitiba – PR.

BP – BP Statistical review of world energy. 2009.

BP – BP sustainability reporting 2011: The energy future. Disponível em: [www.bp.com/energyfuture](http://www.bp.com/energyfuture) Acessado em Outubro/2012.

BRASIL. 2007. O biodiesel no Brasil e no mundo e o potencial do estado da Paraíba. Disponível em: [http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/tema16/2007\\_1951.pdf](http://www2.camara.leg.br/documentos-e-pesquisa/publicacoes/estnottec/tema16/2007_1951.pdf). Acessado em: outubro de 2012.

CAI, T., PARK, S. Y., LI, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19: 360–369.

CALIJURI, M. L., BASTOS, R. K. X., MAGALHÃES, T. B., CAPELETE, B. C., DIAS, E. H. O. 2009. Tratamento de esgotos sanitários em sistemas reatores UASB/wetlands construídas de fluxo horizontal: eficiência e estabilidade de remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e coliformes. *Revista Engenharia Sanitária Ambiental*, 14 (3): 421-430.

CAMARGO VALERO, M. A., MARA, D. D. 2007. Nitrogen removal in maturation ponds: tracer experiments with <sup>15</sup>N-labelled ammonia. *Water Science & Technology*, 55 (11): 81-85.

CAMARGO VALERO, M. A., READ, L. F., MARA, D. D., NEWTON, R. J., CURTIS, T. P., DAVENPORT, R. J. 2010. Nitrification-denitrification in waste stabilisation ponds: a mechanism for permanent nitrogen removal in maturation ponds. *Water Science and Technology*, 61 (5): 1137-1146 .

CAMPBELL, C. J., LAHERRÈRE, J. H. 1998. The end of cheap oil. *Scientific American*, march: 78–83.

CAMPOS, C. M. M., MOCHIZUKI, E. T., DAMASCENO, L. H. S., BOTELHO, C. G. 2005. Avaliação do potencial de produção de biogás e da eficiência de tratamento do reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) alimentado com dejetos de suínos. *Ciência agrotecnológica*, 29 (4): 848-856.

- CHERNICHARO, C. A. L. (coord.). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Belo Horizonte – MG, 2001, 544p.
- CHEVALIER, P., LA NOÛE, J. 1985. Wastewater nutriente removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 621-624.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294–306.
- CHISTI, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26 (3): 126–131.
- CHO, S., LUONG, T. T., LEE, D., OH, Y., LEE, T. 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae in cultivation for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102: 8639–8645.
- CHRISTENSON, L., SIMS, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29: 686–702.
- DEMIRBAS, A. 2011. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy*, 88(10): 3541-3547.
- DI BERNARDO, L., MINILO, A., DANTAS, A. D. B. 2010. Florações de algas e cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento. São Carlos: Editora LDiBe, 536p.
- D'OCA, M. G. M., VIÊGAS, C. V., LEMÕES J. S., MIYASAKI E. K., MORON-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C. 2011. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and bioenergy*, 35: 1533-1538.
- EHIMEN, E. A., SUN, Z. F., CARRINGTON, C. G. 2010. Variables affecting the *in situ* transesterification of microalgae lipids. *Fuel*, 89: 677–684.
- FENG, Y., LI, C., ZHANG, D. 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, 102 (1): 101-105.
- FONSECA, A. F., HERPIN, U., PAULA, A. M., VICTÓRIA, R. L., MELFI, A. J. 2007. Agricultural use of treated sewage effluents: agronomic and environmental implications and perspectives for Brazil. *Scientia Agricola*, 64 (2): 194-209.
- FURTADO, A. 2003. Crise energética e trajetórias de desenvolvimento tecnológico. *Ciclo de seminários: Brasil em desenvolvimento*. Rio de Janeiro.
- HALIM, R., HARUN, R., DANQUAH, M. K., WEBLEY, P. A. 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*, 91: 116–121.
- HARRINGTON, K. J., D'ARCY-EVANS, C. 1985. A comparison of conventional and *in situ* methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. *Journal Am. Oil Chem. Soc.*, 62: 1009–1013.
- HARTMANN, L., LAGO, R.C.A.. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, 22: 475-477.

- HENRARD, A. A. 2009. Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. Dissertação de mestrado. FURG. Rio Grande-RS.
- KNOTHE, G., GERPEN, J. V., KRAHL, J., RAMOS, L. P. 2006. Manual do Biodiesel. Editora Edgard Blücher.
- KUMAR, M. S., MIAO, Z. H., WYATT, S. K. 2010. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggy effluent culture médium. *Bioresource Technology*, 101: 6012–6018.
- LAM, M. K., LEE, K. T. 2012. Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Applied energy*, 94: 303-308.
- LAU, P.S., TAM, N.F.Y., WONG, Y.S. 1994. Influence of organic-N sources on an algal wastewater treatment system. *Resources, Conservations e Recycling*, 11: 197-208.
- LAU, P.S., TAM, N.F.Y., WONG, Y.S. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*, 89: 59-66.
- LEE, J., YOO, C., JUN, S., AHN, C., OH, H. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101: 75-77.
- LETTINGA, G., VAN LEEUWENHOEK, A. 1995. Anaerobic digestion and wastewater treatment systems. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 67 (1): 3-28.
- LEWIS, T., NICHOLSB, P. D., MCMEEKINA, T. A. 2000. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. *Journal of Microbiological Methods*, 43: 107–116.
- LI, Y., CHEN, Y. F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J., RUAN, R. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102: 5138–5144.
- MA, F., HANNA, M. A. 1999. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, 70: 1–15.
- MACHADO, R. M. G., CHERNICHARO, C. A. L. 1997. Avaliação do desempenho de filtros anaeróbios utilizados para o polimento de efluentes de um reator UASB. In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Foz do Iguaçu – PR. 1997.
- MASIERO, G., LOPES, H. 2008. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. *Revista Brasileira de Política Interntacional*, 51 (2): 60–79.
- MAYO, A. W., NOIKE. T. 1994. Response of mixed culturas of *Chlorella vulgaris* e heterotrophic bacteria to varia of pH. *Water Science Technology*, 30 (8): 285-294.
- McGINN, P. J., DICKINSON, K. E., BHATTI, S., FRIGON, J., GUIOT, S. R., O’LEARY, S. J. B. 2011. Integration of microalgae cultivation with industrial waste

remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynth Res*, 109: 231–247.

MIAO, X., WU, Q. 2006. Biodiesel Production from Heterotrophic Microalgal Oil *Bioresource Technology*, 97: 841–846.

MIKI, M. K. 2010. Dilemas do UASB. *Revista DAE*, 183: 25-37.

MONTEGGIA, L. O., TESSELE, F. 2001. Remoção físico-química de algas e fósforo de efluentes de lagoas de alta taxa. In: Chernicharo, Carlos Augusto de Lemos. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Belo Horizonte, PROSAB, p.97-102.

MOTA, F. S. B., VON SPERLING, M. (Org.). Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 428p.

MULITERNO, A., MOSELE, P. C., COSTA, J. A. V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T. E., COLLA, L.M. 2005. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. *Ciência e Agrotecnologia*, 29 (6): 1132-1138.

NAGALLI, A., NEMES, P. D. 2009. Estudo da qualidade de água de corpo receptor de efluentes líquidos industriais e domésticos. *Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.* 7 (2): 131-144.

NUVOLARI, A. (coord.) 2011. Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola. 2ª ed., Editora Blucher. São Paulo, 565p.

ODUM, E. P. 1988. Ecologia. Ed. Guanabara Koogan, 434p.

ÖZGÜL-YÜCEL, S.; TÜRKAY, S. 2002. Variables affecting the yields of methyl esters derived from in situ esterification of rice bran oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists Society*, 79 (6): 611-614.

PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M. E, DE-BASHAN, L. E., BASHAN, Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, 45: 11–36.

PITTMAN, J. K., DEAN, A. P., OSUDENKO, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102: 17–25.

RAMOS, L. P., SILVA, F. R., MANGRICH, A. S., CORDEIRO, C. S. 2011. Tecnologias de produção de biodiesel. *Revista Virtual de Química*, 3 (5): 385-405.

RAPOSO, M. F., OLIVEIRA, S. E., CASTRO, P. M., BANDARRA, N., MORAIS, M. M. 2010. On the utilization of microalgae for brewery effluent treatment and possible applications of the produced biomass. *Journal of the Institute of Brewing*, 110 (3): 285-292.

RICKLEFS, R. E. 2011. A economia da natureza. Ed. Guanabara Koogan, 546 p.

ROCKWELL, L. 2010. Capitalismo – a grande invenção da humanidade. Disponível em <http://www.mises.org.br> acessado em 12/07/2012.

- RUIZ-MARIN, A., MENDOZA-ESPINOSA, L. G., STEPHENSON, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101 (1): 58-64.
- SARAIVA, L. B., KOETZ, P. R. 2002. Avaliação da remoção de nutrientes em efluente de parboilização de arroz. *Revista Brasileira de Agrociência*, 8 (3): 259-264.
- SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R. M., 1998. Transesterification of vegetable oils: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9 (1): 199-210.
- SHI, H., BAO, Z. 2008. Direction preparation of biodiesel from rapeseed oil leached by two phase solvent extraction. *Bioresource technology*, 99: 9025-9028.
- SILVA-BENAVIDES, A. M., TORZILLO, G. 2011. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal Appl. Phycology*, 24: 267-276.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, O. 2001. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. Editora RiMa, 106p.
- SNSA - SECRETARIA NACIONAL DE SANEAMENTO AMBIENTAL. 2012. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos – 2010. Brasília: SNSA-MCIDADES
- SOUSA, J. T. de, HAANDEL, A. C. V., COSENTINO, P. R. S. ; GUIMARÃES, A. V. A. 2010. Pós-tratamento de efluente de reator UASB utilizando sistemas Wetlands construídos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 4 (1): 87-91.
- SPECTOR C., GOBBI, C. N., CONCEIÇÃO, R. C., ARAÚJO O. Q. F., CHALOUB, R. M. 2008. Cultivo de Microalgas para Seqüestro de CO<sub>2</sub>. In. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Recife – PE, 2008.
- SYDNEY, E. B., SILVA, T. E. da, TOKARSKI, A., NOVAK, A. C., CARVALHO, J. C. de, WOICIECOHWSKI, A. L., LARROCHE, C., SOCCOL, C. R. 2011. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88: 3291–3294.
- XEIRA PINTO, M. A., ONOYAMA, M. T. 1991. Remoção de matéria-orgânica, fósforo e nitrogênio de esgotos domésticos utilizando o processo de lagoa de alta taxa. *Revista DAE*, jul-ago: 6-13.
- VASUDEVAN, P. T., BRIGGS, M. 2008. Biodiesel production – current state of the art and challenges. *Journal Industry Microbiology Biotechnology*, 35: 421–430.
- VELASQUEZ-ORTA, S. B., LEE, J. G. M., HARVEY, A. 2012. Alkaline in situ transesterification of *Chlorella vulgaris*. *Fuel*, 94 (1): 544-550.
- VISENTAINER, J. V., FRANCO, M. R. B. 2006, Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, Editora Varela, São Paulo, 120p.

VON MISES, L. 2010. Ação humana: um tratado de economia. Instituto Ludwig Von Mises Brasil, São Paulo. 1019p.

VON SPERLING, M., ANDRADE NETO, C. O., VOLSCHAN Jr., I., FLORÊNCIO, L. Impacto dos Nutrientes do Esgoto Lançado em Corpos de Água. In: Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. 2009. ABES, Rio de Janeiro, 428p.

VONSHAK, A. 1997. *Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis.

WAHLEN, B. D., BARNEY, B. M., SEEFELDT, L. C. 2008. Synthesis of biodiesel from mixed feedstocks and longer chain alcohols using an acid-catalyzed method. *Energy and Fuels*, 22 (6): 4223-4228.

WAHLEN, B. D., WILLIS, R. M., SEEFELDT, L. C. 2011. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. *Bioresource Technology*, 102: 2724 – 2730.

WATANABE, A. 1960. List of algal strains in collection at the institute of applied microbiology, University of Tokyo. *Journal Gen. Appl. Microbiology*, 6 (4).

YEH, K., CHANG, J. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresource Technology*, 105: 120–127.

ZENG, X., DANQUAH, M. K., CHEN, X. D., LU, Y. 2011. Microalgae bioengineering: from CO<sub>2</sub> fixation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15: 3252 – 3260.

ZHOU, W., LI, Y., MIN, M., HU, B., CHEN, P., RUAN, R. 2011. Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102: 6909–6919.



## ANEXO I

### DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS, VOLÁTEIS E TOTAIS

(APHA, 1995)

#### **Metodologia:**

Determinação de sólidos pelo método gravimétrico.

#### **Materiais, Reagente e Equipamentos:**

Cápsula de porcelana;

Água destilada;

Mufla 550 °C;

Estufa 105 – 110 °C;

Dessecador;

Balança analítica;

Microfiltro de fibra de vidro;

Bomba de sucção à vácuo;

Proveta graduada;

**Procedimento:****Preparo do material para determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST), Fixos (SSF) e Voláteis (SSV):**

Colocar um disco de filtro de fibra de vidro no aparelho de sucção com a bomba de vácuo ligada, lavando o filtro com 3 sucessivos volumes de 20 mL de água destilada. Remover toda a água com a aplicação de vácuo. Retirar o papel filtro de fibra de vidro do aparelho e levar a estufa por 1 hora e após, levar à mufla a 550 °C por 30 min. Deixar no dessecador até resfriamento total.

**Análise de Sólidos Suspensos Totais (SST):**

Pesar o papel de fibra de vidro preparado acima, obtendo-se  $P_1(g)$ . Agitar a amostra e tomar 10 mL em uma proveta graduada e filtrar. Remover cuidadosamente o papel com o resíduo retido. Levar à estufa a 105 – 110 °C, durante 12h, ou até massa constante. Esfriar no dessecador e pesar, obtendo-se  $P_2(g)$ .

Assim, para calcular os sólidos suspensos totais tem-se a fórmula;

$$SST \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(P_2 - P_1) \times 1.000.000}{V_A} \quad (A.1)$$

Sendo que:

$V_A$  é o volume da amostra (mL).

**Análise de Sólidos Suspensos Fixos e Voláteis (SSF e SSV):**

Levar o papel com o resíduo a mufla a 550 °C por 1h. Deixar, em seguida, no dessecador até esfriamento total, pesar, obtendo-se  $P_3(g)$ . As equações para se determinar os sólidos suspensos fixos e voláteis são, respectivamente:

$$SSF \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(P_3 - P_1) \times 1.000.000}{V_A} \quad (A.2)$$

$$SSV \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(P_2 - P_3) \times 1.000.000}{V_A} \quad (A.3)$$

Sendo que:

$V_A$  é o volume da amostra (mL).

A metodologia para determinação dos sólidos dissolvidos é análoga à metodologia para determinação dos sólidos suspensos, sendo que os sólidos dissolvidos são determinados pela amostra filtrada que passou pelo papel de filtro utilizado para a determinação dos sólidos suspensos.

Os sólidos totais podem ser determinados por:

$$ST = SS + SD \quad (A.4)$$

$$STF = SSF + SDF \quad (A.5)$$

$$STV = SSV + SDV \quad (A.6)$$

Sendo que:

ST é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos totais;

SS é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos suspensos;

SD é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos dissolvidos;

STF é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos totais fixos;

SSF é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos suspensos fixos;

SDF é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos dissolvidos fixos;

STV é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos totais voláteis;

SSV é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos suspensos voláteis;

SDV é a concentração mássica ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de sólidos dissolvidos voláteis.