

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICROALGAS PROVENIENTES DE  
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS VISANDO  
A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

**Josieli Pescador Zys**

Mestrado em Química, Área de  
concentração Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Paulo Machado

Cuiabá  
Mato Grosso, Brasil  
2014

**JOSIELI PESCADOR ZYS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICROALGAS PROVENIENTES DE  
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS VISANDO  
A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Dissertação de Mestrado  
apresentada à Universidade Federal de  
Mato Grosso, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Química,  
para obtenção do título de Mestre em  
Química, Área de concentração Química de  
Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Paulo Machado

Cuiabá  
Mato Grosso, Brasil  
2014

### **Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

P473a Pescador Zys, Josieli.  
Avaliação do potencial de microalgas provenientes de estação de tratamento de efluentes domésticos visando a produção de biodiesel / Josieli Pescador Zys. -- 2014  
xvii, 71 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Alexandre Paulo Machado.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Programa de Pós-Graduação em Química, Cuiabá, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Microalgas. 2. Biodiesel. 3. Efluentes domésticos. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**

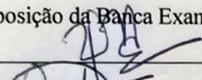
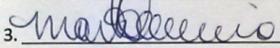
**JOSIELI PESCADOR ZYS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MICROALGAS PROVENIENTES DE  
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS VISANDO  
A PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

Disertação apresentada à  
Universidade Federal de Mato  
Grosso, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Química, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 25 de Setembro de 2014

Composição da Banca Examinadora:

1.  \_\_\_\_\_ Doutor Alexandre Paulo Machado (Presidente Banca / Orientador)
2.  \_\_\_\_\_ Doutor Leandro Carbo (Examinador Externo)
3.  \_\_\_\_\_ Doutora Márcia Teixeira de Oliveira (Examinador Interno)

## DEDICATÓRIA

*Para Thiago, que torna a  
caminhada nesta vida mais  
agradável e feliz!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e paciência para seguir, mesmo quando pensei em desistir. Obrigada Senhor, por me ser o meu amparo.

Ao meu esposo Thiago, pelo amor, apoio, paciência, carinho, companheirismo e compreensão. Obrigada por me fazer feliz.

Aos meus pais, Adelino e Eloina, pelo amor e por me incentivarem, mesmo de maneira torta, a fazer as coisas serem diferentes.

Ao Prof. Dr. Alexandre Paulo Machado pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro Luis Dall'Oglio, pelos conselhos, sugestões e críticas.

Aos professores Dra. Márcia Teixeira de Oliveira, Dra. Virginia Claudi Silva e Dr. Leandro Carbo pelas correções e contribuições para este trabalho.

Ao Dr. Luis Henrique Zanini Branco, professor do Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP - campus de São José do Rio Preto) pela execução do sequenciamento e por responder meus questionamentos sempre de forma muito solícita.

À CAB Cuiabá, por permitir a continuidade de trabalho na ETE CPA III, inclusive após a concessão.

À Vania Tarcila Borges, engenharia sanitária da CAB Cuiabá, por sempre me atender, autorizando as coletas.

À minha grande amiga Lorena Machado, pela convivência dentro e fora do laboratório, pela solidariedade, momentos de descontração e amizade.

À Deborah Isoton, pela contribuição intelectual, conselhos, auxílios e pela amizade que construímos. Valeu BFF!

Ao Wesley Silva pela amizade, diversão e ajuda nos momentos que precisei.

À técnica Liliana, pela alegria, alto astral, palavras de ânimo, motivação e carinho.

À Catarina pelo companheirismo no início deste trabalho.

Ao Carlos Adriano Parizotto, pelo auxílio nas coletas e pelos conselhos.

Ao Júlio César de Menezes, da Cental Analítica de Combustíveis – Ceanc, pelas análises cromatográficas.

À Cristiane Batalini, pelos conselhos que me ajudaram a crescer, superar minhas dificuldades pessoais e acreditar em mim.

Ao grupo de pesquisa do laboratório central Analítica do LPQNP.

À Hocelayne que, mesmo longe, compartilhamos as dificuldades e superamos os obstáculos durante essa empreitada.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À FINEP, pelo apoio financeiro ao projeto através do Edital MCT/CNPq/MPA Nº 26/2008.

À todos meus familiares.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização desse trabalho. Muito obrigada!

## RESUMO

PESCADOR ZYS, Josieli. M. S. Universidade Federal de Mato Grosso, setembro de 2014. Avaliação do potencial de microalgas provenientes de estação de tratamento de efluentes domésticos visando a produção de biodiesel. Orientador: Alexandre Paulo Machado.

A busca por novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis tem estado em evidência nos últimos anos. Com o desenvolvimento de novas tecnologias, a utilização de microalgas como matéria-prima torna-se uma alternativa viável para a produção de biocombustíveis. Em comparação às fontes de matérias-primas convencionais, o cultivo das microalgas ocupa áreas menores e o rendimento do óleo produzido por microalgas é superior. A biomassa de microalgas também pode ser obtida diretamente de um sistema onde ela já esteja disponível naturalmente, como as águas residuais de estações de tratamento de efluentes domésticos ou industriais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de microalgas provenientes da Estação de Tratamento de Efluentes Domésticos CPA III, Município de Cuiabá, visando a produção de biodiesel. Foi realizada identificação taxonômica clássica e molecular da espécie dominante, sendo esta uma cianobactéria classificada como *Planktothrix pseudagardhii*. A desidratação de biomassa e extração de lipídeos foi feita por diferentes metodologias, sendo a secagem em estufa a que apresentou melhor custo-benefício e através do método de Folch et al adaptado por Pescador Zys obteve-se maior rendimento de óleo. Após a obtenção do óleo, este foi convertido em ésteres metílicos e o perfil de ácidos graxos foi analisado por Cromatografia Gasosa. O principal ácido graxo identificado foi o ácido undecanóico (C11:0). O baixo teor de lipídeos presente na biomassa estudada, de aproximadamente 1%, remete à inviabilidade quanto a sua aplicação para a produção de biodiesel

unicamente. No entanto, a utilização dessa biomassa no desenvolvimento de outros produtos é exequível devido ao fato da mesma ter, em sua composição, maiores porcentagens de proteínas e carboidratos.

Palavras-chave: Microalgas, Biodiesel, Efluentes Domésticos.

## ABSTRACT

PESCADOR ZYS, Josieli. M. S. Universidade Federal de Mato Grosso, September, 2014. **Evaluation of the potential of microalgae from domestic wastewater treatment station aiming at the production of biodiesel.** Advisor: Alexandre Paulo Machado

The search for new raw material for the production of biofuel has been in evidence in recent years. With the development of new technologies, the use of microalgae as raw material becomes a viable alternative for the production of biofuel. Compared to the sources of conventional materials, the cultivation of microalgae occupies areas smaller and the yield produced by microalgae oil is superior. The microalgae biomass may also be obtained directly from a system where it is already naturally available, as in domestic or industrial wastewater treatment stations. The present work aimed the evaluation of the potential of microalgae from the CPA III Domestic Wastewater Treatment Station, City of Cuiabá, aiming at the production of biodiesel. Taxonomic and molecular identifications of the predominant species were performed, this being a cyanobacteria classified as *Planktothrix pseudogardhii*. Biomass drying and lipids extraction were performed by different methodologies, being drying in kiln the one that showed the better cost-benefit and the of Folch et al adapted by Pescador Zys method of extraction the one that better oil yield. After oil obtainment, it was converted into methyl esters and the fatty acids were analyzed by Gas Chromatography. The main fatty acid identified was undecanoic acid (C11:0). The low content of lipids present in the studied biomass, approximately 1%, as the impossibility refers to your application for the production of biodiesel alone. However, use of such biomass in the

development of other products is feasible due to the fact that it has higher percentages of protein and carbohydrates in its composition.

Key-words: Microalgae, Biodiesel, Domestic Wastewater.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ETE** – Estação de Tratamento de Efluente

**EISA** – Energy Independence and Security Act

**RFS** – Renewable Fuels Standard

**PROÁLCOOL** – Programa Nacional do Álcool

**PRO-ÓLEO** – Plano de Produção de Óleos Vegetais para fins carburantes

**PROBIODIESEL** – Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico de Biodiesel

**B5** – Mistura de 5% biodiesel ao de diesel petróleo

**B20** – Mistura de 20% biodiesel ao de diesel petróleo

**B100** – Biodiesel 100%

**MCT** – Ministério de Ciência e Tecnologia

**ANP** – Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

**NBB** – National Biodiesel Board

**ASTM** – American Society for Testing and Materials

**PVC** – policloreto de polivinila ou policloroeteno

**GC-MS** – Cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas

**EIA** – Energy Information Administration

**SDS** – (*sodium dodecyl sulfate*) Dodecil Sulfato de Sódio

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético

**Tris HCl** – Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano

**PCR** – (*Polymerase Chain Reaction*) Reação em cadeia da polimerase

**LISTA DE SÍMBOLOS**

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono  
**O<sub>2</sub>** – Oxigênio gasoso  
**(PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup>** – íon fosfato  
**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** – íon amônio  
**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – íon nitrito  
**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** – íon nitrato  
**L** – litro  
**Ha** – hectare  
**m** – metro  
**pH** - potencial hidrogeniônico  
**m<sup>3</sup>** – metro cúbico  
**Qmed** – vazão média  
**d** – dia  
**θh** – tempo de detenção hidráulico  
**cv** – Cavalo-vapor  
” – polegada  
**µm** – micrometro  
**cm** – centímetro  
**mm** – milímetro  
**min** – minuto  
**mL** – mililitro  
**°C** – temperatura em graus Celsius  
° – grau  
**h** – hora

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Reação de transesterificação .....	6
Figura 2: <i>Chlorophyta</i> gênero <i>Micrasterias sp</i> .....	9
Figura 3: <i>Cyanophyta</i> gênero <i>Planktothrix</i> .....	10
Figura 4: Vista aérea de um tanque de pista.....	12
Figura 5: Biorreator vertical.....	13
Figura 6: Biorreator horizontal.....	13
Figura 7: Integração da produção de microalgas com o tratamento de águas residuais.....	17
Figura 8: Localização da ETE CPA III.....	23
Figura 9: Fluxograma da ETE CPA III.....	24
Figura 10: Ponto de coleta na ETE CPA III.....	26
Figura 11: Sistema de coleta completo instalado em lagoa de estação de tratamento.....	27
Figura 12: Sistema de coleta de microalgas.....	28
Figura 13: Esquema de Cultivo de Microalgas.....	30
Figura 14: Biomassa proveniente da ETE CPA III.....	41
Figura 15: Quantidade de biomassa coletada pelo sistema de filtragem referente aos meses em que houve coleta.....	42
Figura 16: Amostra liofilizada.....	44
Figura 17: Amostra seca ao sol e em estufa, respectivamente.....	44
Figura 18: <i>Planktothrix pseudagardhii</i> .....	48
Figura 19: Cromatograma referente a amostra do período chuvoso.....	55
Figura 20: Cromatograma referente a amostra do período de estiagem.....	55

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Comparação do rendimento em óleo das microalgas com o rendimento obtido por algumas oleaginosas.....	7
Tabela 2: Teor de óleo de algumas espécies de microalgas.....	14
Tabela 3: Vazão média e tempo de detenção hidráulico das lagoas.....	25
Tabela 4: Reagentes utilizados para o preparo das soluções que compõe o Meio de Cultura ASM-1 Modificado* .....	31
Tabela 5: Tipo da amostra da biomassa utilizada em cada métodos de extração.....	36
Tabela 6: Avaliação dos diferentes métodos de secagem.....	43
Tabela 7: Classificação taxonômica da espécie predominante identificada.	45
Tabela 8: Porcentagem das principais macromoléculas constituintes da biomassa algal.....	49
Tabela 9: Parâmetros físico-químicos da lagoa de maturação II da ETE CPA III.....	50
Tabela 10: Metodologias de secagem e extração avaliadas.....	52
Tabela 11: Perfil graxo dos lipídeos esterificados obtidos de biomassa coletada em período chuvoso e de estiagem.....	54

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Biodiesel.....	3
2.1.1 Histórico do biodiesel.....	3
2.1.2 Biodiesel no Brasil.....	4
2.1.3 Produção do Biodiesel.....	5
2.1.4 Biodiesel de Microalgas.....	6
2.2. Biologia das microalgas.....	8
2.3. Sistemas para o Cultivo de Microalgas.....	11
2.3.1 Biorremediação de Efluentes.....	14
2.4. Coleta e Secagem.....	17
2.5. Extração de óleos.....	19
2.6. Transesterificação.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. Área de Estudo.....	22
4.1. Caracterização do local de estudo.....	22
4.2. Caracterização da ETE.....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1. Obtenção de biomassa.....	26
5.2. Identificação morfológica e taxonômica.....	29

5.3 Extração de DNA e identificação molecular.....	29
5.3.1. Cultivo.....	30
5.3.2. Extração de DNA genômico.....	32
5.3.3. Amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene RNA ribossomal.....	32
5.3.4. Clonagem e transformação.....	33
5.3.5. Seleção de colônias.....	33
5.3.6. Sequenciamento e processamento das sequências.....	34
5.4. Secagem da biomassa.....	35
5.5. Extração dos lipídeos.....	36
5.5.1. Extração utilizando aparelho de Soxhlet.....	36
5.5.2. Método de Bligh & Dyer adaptado por Zhu et al. (2002).....	37
5.5.3. Método de Folch et al (1957) adaptado por Pescador Zys (2014).....	38
5.6. Análise da Composição Centesimal da Biomassa e Riqueza Nutricional das Águas Residuais.....	39
5.7. Transesterificação.....	39
5.8. Determinação do teor de éster.....	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6.1. Obtenção de biomassa.....	41
6.2. Secagem da biomassa.....	43
6.3. Identificação taxonômica e molecular.....	44
6.4. Análise da composição celular da biomassa e riqueza nutricional das águas residuais.....	49
6.5. Extração de lipídeos.....	51
6.6. Transesterificação.....	53

6.7. Determinação do teor de éster.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias e a busca por novas matérias-primas para a produção de biocombustíveis tem estado em evidência nos últimos anos em razão da especulação sobre a diminuição das reservas de petróleo e da crescente demanda por fontes energéticas (DEMIRBAS, 2007). Além disso, há uma nova percepção do uso dos recursos naturais diante das mudanças climáticas causadas principalmente pelas emissões de gases poluentes provenientes da intensa atividade industrial (KHAN et al., 2009).

Os biocombustíveis são produzidos a partir de biomassa renovável usados em motores de combustão ou em outro tipo de equipamento para geração de energia, podendo substituir, parcial ou integralmente os combustíveis fósseis. No Brasil, o etanol (produzido a partir da cana-de-açúcar) e o biodiesel são os biocombustíveis líquidos mais utilizados (BRASIL, 2012a).

O biodiesel pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas como, óleos vegetais, gordura animal e até pela reutilização de óleo proveniente de fritura. Entretanto, em um futuro previsível o biodiesel produzido por oleaginosas não poderá contribuir expressivamente para a substituição de combustíveis derivados do petróleo. Todavia, este cenário pode ser mudado com o desenvolvimento de novas tecnologias, especialmente por fontes de matéria prima inovadoras, tais como a utilização de microalgas para produção de biodiesel (CHISTI, 2007).

As microalgas têm demonstrado naturalmente uma elevada taxa de crescimento em virtude das suas eficiência fotossintética e estrutura simples. Estima-se que a produtividade de biomassa de microalgas possa ser de até 50 vezes maior do que a de gramíneas, plantas terrestres com maior taxa de crescimento (PATIL *et al.*, 2008). Além do biodiesel, a biomassa de microalgas pode ser usada para produzir outros biocombustíveis, como o hidrogênio, e outros metabólitos secundários com

aproveitamento na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Na década de 1970, durante a primeira crise do petróleo, as microalgas foram inicialmente avaliadas como um potencial substituto para os combustíveis fósseis (LI et al., 2008).

Tradicionalmente, microalgas têm sido cultivadas em tanques abertos e em fotobiorreatores, no entanto os custos destes cultivos para produzir biodiesel ainda são muito elevados, justificando os investimentos em tecnologias inovadoras para tornar competitivo o biodiesel produzido a partir de microalgas (CHISTI, 2007, LI et al., 2008).

Uma alternativa para diminuir os custos de produção de óleo de microalgas, seria obtê-las diretamente de um sistema onde estejam disponíveis naturalmente como em lagoas de estações de tratamento de efluentes domésticos ou industriais (CARDOSO, 2010). O aproveitamento desta biomassa para a produção de biodiesel apresenta-se como alternativa viável, justificado, sob o ponto de vista econômico e ambiental. A instalação de um sistema de recuperação dessa biomassa, que deixa de ser lançada nos córregos minimiza impactos ambientais decorrentes da presença elevada desse material no ambiente (MATA et al, 2010).

Muitos estudos têm sido conduzidos no intuito de viabilizar o uso de microalgas para tratamento de águas residuais. Estes sistemas fornecem uma via para a purificação dessas águas, a remoção de metais pesados, patógenos, contaminantes químicos e, especialmente, para a remoção de nitrogênio e fósforo provenientes de efluentes, que de outro modo podem causar eutrofização, se despejados em corpos d'água (LI et al, 2008; RAWAT et al, 2011; WANG et al, 2008).

Diante disso, a obtenção de biomassa microalgal através do aproveitamento das águas residuais de uma Estação de Tratamento de Efluente (ETE), industriais ou domésticos, com sistema de lagoa de estabilização, vem sendo considerado atualmente como uma alternativa promissora aos processos tradicionais utilizados (MULBRY et al., 2008).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Biodiesel**

#### **2.1.1 Histórico do biodiesel**

A história do biodiesel no mundo data de 1937, quando surgiu a primeira patente belga de autoria de Charles G. Chavanne. Esta patente descrevia a transesterificação de óleos vegetais em uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, utilizando catalisadores básicos, como os hidróxidos de metais alcalinos. Chavanne também realizou diversos testes com biodiesel etílico de óleo de dendê em caminhões, rodando mais de 20.000 quilômetros. Outros países como a França, também realizaram pesquisas utilizando a tecnologia belga obtendo resultados satisfatórios. Nesta mesma época, um processo utilizando óleos brutos com alto índice de acidez e catalisadores ácidos seguidos de catalisadores básicos (evitando a formação de sabão) para produção de biodiesel foi desenvolvido por pesquisadores americanos (SUAREZ E MENEGETTI, 2007).

Com o final da 2ª Guerra Mundial, houve uma normalização no mercado mundial de petróleo, fazendo com que o biodiesel fosse temporariamente abandonado. Quando sucessivas crises do petróleo fizeram com que pesquisadores e governantes retomassem a procura de alternativas renováveis para substituir o petróleo a partir da década de 1980, o biodiesel retornou à cena, como a principal alternativa ao diesel.

Na Europa o processo de industrialização do biodiesel foi iniciado em meados dos anos 1990, fazendo com que esta região se tornasse o maior produtor e consumidor de biodiesel. A principal matéria-prima utilizada para o processamento de biodiesel europeu é a colza (canola) e, em menores proporções, os óleos de soja, de palma e de girassol. A Alemanha, maior produtora e consumidora de biodiesel da Europa, instituiu um importante

programa de produção de biodiesel de canola (RODRIGUES, 2008). A capacidade de produção de biodiesel da União Europeia em 2011 foi de aproximadamente 9,0 bilhões de toneladas (EBB, 2012).

Outro grande consumidor de biodiesel são os Estados Unidos (EUA), cuja produção de biodiesel em 2011 foi de 3,6 bilhões de litros (U.S. EIA, 2012). A busca pela independência quanto ao fornecimento de petróleo estrangeiro tem sido importante fator propulsor no EUA para o uso de biocombustíveis e desenvolvimento de pesquisas das grandes petrolíferas americanas. Cerca de dois terços do petróleo utilizado pelo EUA são importados, dos quais 60% são utilizados para a produção de combustíveis de transporte.

### **2.1.2 Biodiesel no Brasil**

A pesquisa por combustíveis alternativos no Brasil teve início em meados da década de 1920 quando o Instituto Nacional de Tecnologia (INT) passou a realizar experimentos usando biocombustíveis em motores de combustão interna. No entanto, foi após a década de 1960 que houve um apoio efetivo para as pesquisas em biodiesel (DALL'OGGIO E SOUSA Jr.; 2007).

Durante as décadas de 1970 e 1980, em resposta à crise do petróleo, o governo desenvolveu o amplamente conhecido Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL) e o Plano de Produção de Óleos Vegetais para Fins Carburantes (PRO-ÓLEO), organizado pela Comissão Nacional de Energia, através da Resolução nº 007, de 22 de outubro de 1980. O PRO-ÓLEO regulamentava a adição de 30% de óleo vegetal ou derivado no diesel e a total substituição a longo prazo. Porém em 1986 o PRO-ÓLEO foi abandonado quando os preços do petróleo voltaram a cair, contudo, houve continuidade nas pesquisas em biodiesel no Brasil. (SUAREZ E MENEGHETTI, 2007).

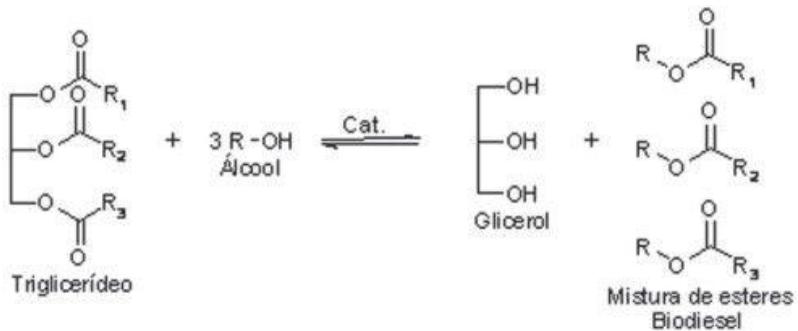
O Governo Federal voltou a discutir o uso de biodiesel no final da década de 1990, realizando vários estudos por comissões interministeriais e

em parceria com universidades e centros de pesquisa. Em 2002 um novo programa de substituição do diesel denominado PROBIODIESEL foi instituído pela Portaria do Ministério de Ciência e Tecnologia nº 702, de 30 de outubro de 2002 (BRASIL, 2012b). Propôs-se substituir até 2005 todo o diesel consumido no Brasil por B5 (mistura de 5% de biodiesel ao diesel petróleo) e até 2020 por B20 (mistura de 20% de biodiesel ao diesel petróleo) (BRASIL, 2012b). Porém, somente a partir de 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a conter 5% de biodiesel (BRASIL, 2012a). Em 2014, A Medida Provisória MP 647/14, decretou o aumento de 5% para 7% o percentual de adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final. (BRASIL, 2014a)

O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo. Em 2013, foram produzidos aproximadamente 2,9 bilhões de litros, e até o mês de agosto de 2014, 2,1 bilhões de litros (BRASIL, 2014b).

### **2.1.3 Produção do Biodiesel**

O biodiesel se refere a um equivalente de combustível diesel, derivado de fontes biológicas. É um éster metílico ou etílico de ácidos graxos de cadeia longa, produzido a partir de uma reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador ácido ou alcalino (GERIS, 2007). A transesterificação, como ilustra a figura 1, é uma reação química entre um éster e um álcool, onde um éster é transformado em outro através da troca do grupo alcoxila (GERIS, 2007; RODRIGUES, 2008). Os produtos formados são os ésteres metílicos ou etílicos de cadeia longa e glicerina como subproduto (DEMIRBAS, 2008).



**Figura 1: Reação de transesterificação. Fonte: DEMIRBAS, 2008.**

Essa reação é feita para reduzir a alta viscosidade dos óleos vegetais, uma vez que o uso direto desses óleos como combustíveis em um motor a diesel é questionável, pois apresenta algumas inconveniências como a combustão incompleta, formação de depósitos de carbono nos sistemas de injeção, eficiência de lubrificação diminuída, entupimento dos filtros de óleo e sistemas de injeção, comprometimento da durabilidade do motor e formação de acroleína, substância tóxica emitida a partir da queima da glicerina (GARCIA, 2006; DEMIRBAS, 2008).

#### 2.1.4 Biodiesel de Microalgas

A proposta para usar as algas como um meio de produção de energia começou na década de 1950, quando Meier (1955) e Oswald e Golueke (1960) sugeriram a utilização da fração de hidrocarbonetos de células de algas para a produção de gás metano através de digestão anaeróbica. Estudos realizados por Benemann et al (1978) indicaram que os sistemas de algas poderiam produzir gás metano a preços competitivos com os mesmos custos projetados para os combustíveis fósseis. A descoberta de que muitas espécies de microalgas podem produzir grandes quantidades de lipídeos como gotículas de óleo celulares, sob certas condições de crescimento remontam a 1940 (U.S. DOE, 2010).

O processo de produção de biodiesel a partir de óleo de algas é semelhante à técnica de fabricação de biodiesel a partir de qualquer outra fonte de óleo. Ao contrário dos vegetais oleaginosos, as microalgas crescem muito rapidamente e são extremamente ricas em óleo (LI et al, 2008).

Em comparação às fontes de matéria primas convencionais, o rendimento de óleo produzido por microalgas é superior e o cultivo ocupa áreas menores sem a necessidade de irrigação ou manejo do solo para criar condições de fertilidade. Na tabela 1, pode ser observado que o rendimento de óleo produzido por plantas tradicionais, por hectare, é muito menor que o produzido por microalgas, mesmo quando considerado microalgas que acumulem apenas 30% de óleo (peso seco) em suas células.

**Tabela 1: Comparação do rendimento em óleo das microalgas com o rendimento obtido por algumas oleaginosas**

Oleaginosa	Rendimento de óleo (L.ha <sup>-1</sup> )
Milho	172
Soja	446
Canola	1.190
Pinhão manso	1.892
Coco	2.689
Palma	5.950
Microalgas <sup>a</sup>	136.900
Microalgas <sup>b</sup>	0

<sup>a</sup>70% de óleo (em peso) em biomassa.

<sup>b</sup>30% de óleo (em peso) em biomassa. Fonte: Adaptado de CHISTI, 2007.

Algumas indústrias com a Algae Biotecnologia®, pertencente ao Grupo Ecogeo S/A (ALGAE BIOTECNOLOGIA LTDA, 2013), e a Solazyme® já estão produzindo biodiesel de microalgas (SOLAZYME, 2013). Em abril

de 2012, a Universidade Federal do Rio Grande do Norte e a Petrobras® inauguraram a Planta Piloto de Cultivo de Microalgas para Produção de Biodiesel, onde será conduzido os estudos sobre a potencialidade das microalgas como nova possibilidade para geração de energia renovável no Brasil (UFRN, 2013).

## **2.2. Biologia das microalgas**

Microalgas são algas unicelulares que habitam águas dulcícolas ou salgadas. Crescem em suspensão nesses ambientes aquáticos, tendo acesso ao dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e outros nutrientes. Podem viver em colônias, em filamentos ou de forma isolada (LEE, 1989).

As microalgas, por possuírem uma estrutura celular considerada simples em relação a outros organismos fotossintetizantes, tais como as plantas, apresentam vantagens por serem mais eficientes na conversão da energia luminosa, juntamente com  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (água), em  $\text{O}_2$  (oxigênio gasoso) e macromoléculas orgânicas, como carboidratos e lipídios (LI et al, 2008; BELLINGER e SIGEE, 2010).

As principais características bioquímicas de microalgas de água doce incluem a pigmentação, as reservas de alimentos e o revestimento externo. Em condições de estresse, tais como alta incidência de luz ou escassez de nutrientes, algumas microalgas acumulam lipídios na forma de triacilgliceróis como seus principais compostos de armazenamento de carbono. Certas espécies de microalgas também acumulam naturalmente grandes quantidades de triacilgliceróis (HU et al., 2008).

As microalgas podem ser classificadas principalmente pelas suas características genéticas e morfológicas, além de características fisiológicas e ecológicas que auxiliam nas suas identificações. Microalgas de água doce podem ser agrupados em 10 grandes divisões (filos) em relação à aparência microscópica e características citológicas e bioquímicas. A cor das microalgas é um aspecto importante para sua classificação, variando de azul esverdeado (*Cyanophyta*) a verde (*Chlorophyta*), dourado

(*Chrysophyta*, *Bacillariophyta*), marrom (*Phaeophyta*) e vermelho (*Rhodophyta*), sendo estas as principais divisões (BELLINGER e SIGEE, 2010; PERPÉTUO et al, 2011).

O fitoplâncton presente em estações de tratamento de efluentes domésticos, mais precisamente nas lagoas de estabilização varia muito pouco, sendo as cianobactérias (algas azuis), algas verdes, os flagelados pigmentados e as diatomáceas os grupos mais comumente encontrados (VON SPERLING, 1996a). Segundo Palmer (1977), por possuírem características especiais, as algas verdes e as cianobactérias são os dois grupos que mais se destacam.

As microalgas verdes (*Chlorophyta*, figura 2 ) são algas principalmente de água doce, apenas cerca de 10% das espécies são marinhas.



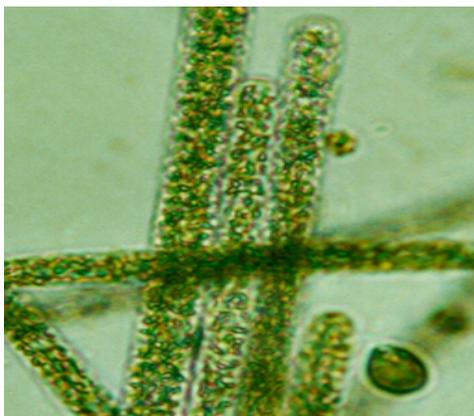
**Figura 2: Chlorophyta gênero *Micrasterias* sp.**  
Fonte - <http://www.thaigoodview.com/files/u41197/Chlorophyta.jpg>

As *Chlorophytas* formam o grupo mais diversificado de algas, com cerca de 17 000 espécies conhecidas. Essa diversidade é refletida pela variada de morfologia, com os organismos a ser agrupados em um intervalo

de formas de crescimento - dependendo se eles são unicelulares, coloniais ou filamentosos.

Eles são caracterizados por uma coloração verde, devido à presença de clorofila-a e b, que não são ocultadas por pigmentos adicionais tais como  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides. Em casos excepcionais, os pigmentos carotenóides podem ocorrer em grandes quantidades, obscurecendo as clorofilas e dando a alga uma cor vermelha brilhante (BELLINGER e SIGEE, 2010).

As cianobactérias (figura 3) também chamadas algas azuis ou algas verdes azuladas, são as únicas microalgas procariotas. Ocorrem amplamente em todos os ambientes de água doce, variam em tamanho e formas, tais como unicelulares ou grandes colônias, que podem ser facilmente visíveis a olho nu, e mostram uma forma globular ou filamentosa simples com mucilagem abundante.



**Figura 3: Cyanophyta gênero Planktothrix. Objetiva de 40x.**

Os pigmentos presentes em cianobactérias variam de acordo com espectro de luz e sua intensidade, o que resulta em uma gama de cores do marrom ao verde-azulado, típico destas algas (BELLINGER e SIGEE, 2010).

A natureza bacteriana fundamental destes organismos os distingue de todas as outras microalgas e determina toda uma gama de funcionalidades, incluindo a biologia, a fisiologia, o tamanho e a estrutura molecular das células e morfologia geral. Vácuolos de gás podem ser formados em algumas espécies planctônicas, ajudando na flutuabilidade e permitindo que as células controlem sua posição na coluna de água. As células podem, em seguida, reunirem-se a uma profundidade, não necessariamente na superfície, de iluminação, concentração de nutrientes ou outro fator importante para a espécie em condições ideais, pois a intensidade da luz pode ser muito grande e causar fotoinibição ou dano celular permanente.

### **2.3. Sistemas para o Cultivo de Microalgas**

As microalgas podem ser cultivadas através de sistemas abertos, como os tanques ou lagoas artificiais, e fechados, como os fotobiorreatores.

Os cultivos abertos realizados em tanques consistem em canais fechados de recirculação tendo cerca de 30 m de profundidade onde a movimentação do fluxo é feita com rodas de pás e bombas d'água. Além da movimentação, a agitação mecânica também serve para diminuir a sedimentação de biomassa (figura 4). Este método de cultivo de microalgas tem sido usado desde 1950, sendo a biomassa produzida, em especial, empregada na indústria alimentícia e farmacêutica. Este sistema de cultivo apresenta pouco rendimento de biomassa e a evaporação da água pode ser significativa. Outro problema se deve à vulnerabilidade quanto à contaminação por microrganismos indesejáveis (CHISTI, 2007).



Figura 4: Vista aérea de um tanque de pista. Fonte: [http://2.bp.blogspot.com/-oH1RSJjUrv0/Tf9P0VRakrI/AAAAAA AAALQ/VF5rgMJhI\\_l/s1600/raceway.jpg](http://2.bp.blogspot.com/-oH1RSJjUrv0/Tf9P0VRakrI/AAAAAA AAALQ/VF5rgMJhI_l/s1600/raceway.jpg)

Os fotobiorreatores são sistemas de cultivo fechado, apresentando algumas vantagens em relação aos sistemas de tanques, tais como permitir o controle da intensidade de luz, da quantidade de micro e macronutrientes essenciais ao crescimento e da temperatura e pH, além da possibilidade de obter cultivos axênicos, da diminuição da contaminação por outras microalgas, de menor sedimentação de biomassa e injeção de gases para aeração ou supressão do  $O_2$  na produção.

Reatores tubulares são os mais utilizados, podendo ser verticais (figura 5) ou horizontais (figura 6); construídos de materiais transparentes rígidos como o acrílico ou sacos de polímeros sintéticos (GRIMA et al., 2003). A produtividade volumétrica de biomassa nos reatores tubulares é maior que em tanques, podendo ser superior a 13 vezes, no entanto seus custos de instalação e manutenção também são elevados (CHISTI, 2007).



Figura 5: Biorreator vertical. Fonte: <http://carros.hsw.uol.com.br/biodiesel-de-algas3.htm>.Figura

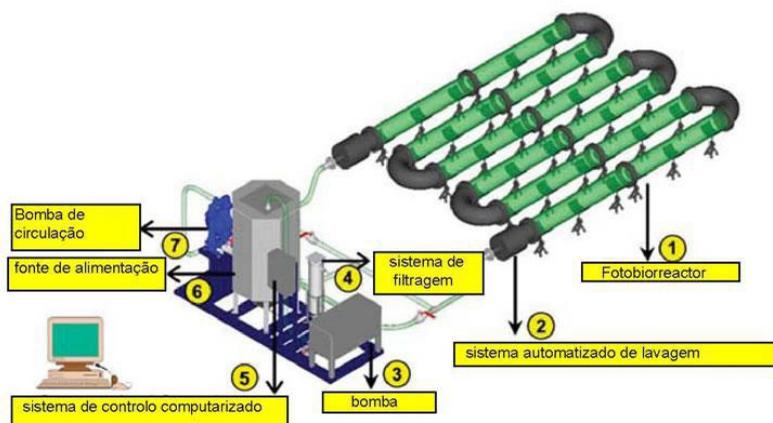


Figura 6: Biorreator horizontal. Fonte: <http://www.excaliburproject.com/pt/producao-biodiesel/>.

A tabela 2 apresenta a porcentagem lipídica em microalgas baseados em produtividade de biomassa experimental em fotobiorreatores.

**Tabela 2: Teor de óleo de algumas espécies de microalgas**

<b>Espécies de Microalgas</b>	<b>Conteúdo de óleo*</b>
Botryococcus braunii	25 – 75
Chlorella sp.	28 – 32
Crypthecodinim cohnii	20
Cylindrotheca sp.	16 – 37
Dunaliella primolecta	23
Isochysis sp.	25 – 33
Monallanthus salina	>20
Nannochloris sp.	20 – 35
Nannochloropsos sp.	31 – 68
Neochloris oleoabundans	35 – 54
Nitzschia sp.	45 – 47
Phaeodactylum tricornutum	20 – 30
Schizochytrium sp.	50 – 77
Tetraselmis sueica	15 – 23

\* em % em massa seca. Fonte: CHISTI, 2007.

### **2.3.1 Biorremediação de Efluentes**

A recuperação da biomassa de microalgas de um ambiente onde elas já estejam acessíveis naturalmente pode ser uma alternativa para reduzir os custos de obtenção do produto final (óleo). As águas residuais provenientes de esgotos domésticos ou industriais costumam possuir condições ótimas, em termos de riqueza nutricional, pH, salinidade e condutividade, para o crescimento desses micro-organismos (RAWAT et al, 2011).

Em reservatórios ou tanques de tratamento de águas residuais, o conjunto de fatores favorece o crescimento dos microrganismos e induz

mecanismos adaptados de resistência, o que propicia a seleção de espécies específicas. Desta forma, o cultivo de microalgas para a produção de biodiesel, utilizando águas residuais como uma fonte de nutrientes, é uma alternativa muito promissora e ambientalmente sustentável (CARDOSO, 2012; DINIS et al, 2004; MOSTAFA et al, 2012; SRIRAM e SEENIVASAN, 2012).

As microalgas têm potencial para tratar efluentes de forma eficiente (OSWALD e GOTAAS, 1957), acumulando nutrientes e metais a partir da água residual (MUNOZ e GUIEYSSE, 2008). As cianobactérias são consideradas ideais para desempenhar um papel duplo do tratamento de águas residuais. O tratamento sustentável de águas residuais utilizando microrganismos fotossintetizantes tem um baixo custo, devido à sua facilidade de cultivo e à sua utilização como uma alternativa para a produção de biomassa visando a geração de energia (RAWAT et al, 2011).

O crescimento de microalgas está relacionado à disponibilidade de nutrientes no meio. Estes microrganismos acumulam nitrogênio e fósforo, transformando-os em substâncias de reservas ou metabólitos secundários que podem ser convertidas em produtos com valor comercial (MUNOZ e GUIEYSSE, 2006; RAWAT et al, 2011).

As microalgas têm a capacidade de incorporar grandes quantidades de nutrientes solúveis, além do necessário para o seu crescimento imediato. Isso, em conjunto com a habilidade de assimilarem outros compostos inorgânicos, orgânicos e contaminantes, como os metais pesados, faz das microalgas microrganismos biorremediadores potencialmente aplicáveis na depuração de águas residuais (DINIS et al., 2004).

Muitos são os nutrientes encontrados nos efluentes, domésticos ou industriais. O fósforo não se encontra livre na natureza, mas pode estar dissolvido na água sob a forma de fosfato inorgânico ( $PO_4^{3-}$ ). Também é encontrado na forma orgânica em suspensão ou incorporado nas estruturas celulares (WANG et al, 2008). Trata-se de um elemento que tem uma

relevância significativa, pois está envolvido nos processos de metabolismo e crescimento celular. O fósforo é um dos elementos que compõem o DNA, o RNA, a membrana celular e o trifosfato de adenosina (ATP), que é essencial nos processos celulares relacionados à transferência de energia (AGREN, 2004).

Depois do carbono, o nitrogênio é o nutriente que mais contribui para a produção de biomassa. A resposta típica à falta de nitrogênio é a descoloração das células microalgais (diminuição das clorofilas e aumento dos carotenoides) e acumulação de compostos como polissacarídeos e hidrocarbonetos. As principais formas de nitrogênio que podemos encontrar nas águas são o nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), os nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e os nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (RUSSO, 2011, WANG et al, 2008).

O tratamento biológico tem sido a forma mais eficiente de remoção da matéria orgânica dos esgotos. As lagoas de estabilização são consideradas como uma das técnicas mais simples de tratamento de efluentes em virtude da ocorrência da proliferação de microrganismos como as microalgas e as bactérias que utilizam a matéria orgânica para sobreviver e, desta forma, são capazes de propiciar a autodepuração dessas águas contaminadas (VON SPERLING, 1996b).

Nos sistemas de lagoas facultativas ou de estabilização mantém-se as condições aeróbias nas camadas superficiais das águas, enquanto que as camadas próximas ao fundo das lagoas sustentam as condições anaeróbias (figura 7). O ambiente externo fornece parte do oxigênio necessário para a manutenção das camadas superiores da lagoa. No entanto, a maior parte do oxigênio é proveniente da fotossíntese das microalgas, as quais utilizam gás carbônico produzido pelas bactérias através da oxidação de matéria orgânica (VON SPERLING, 1996b).

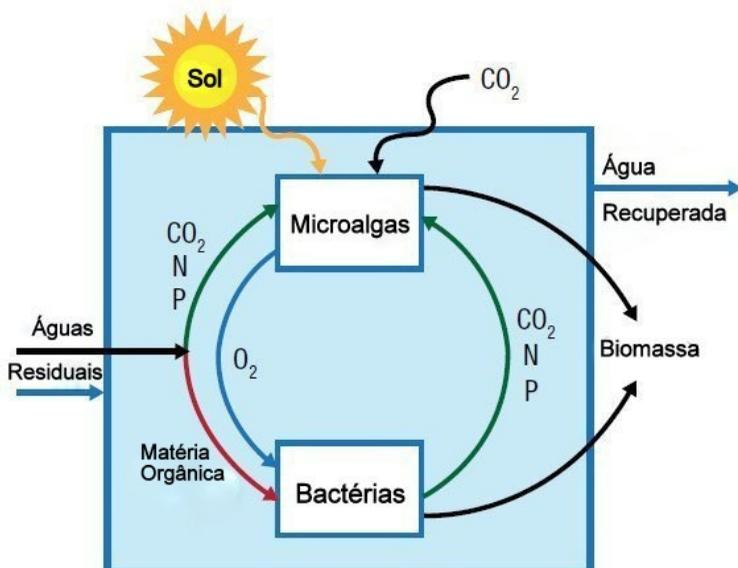


Figura 7: Integração da produção de microalgas com tratamento de águas residuais para a remoção de nutrientes e produção de biomassa. Fonte: U.S. DOE, 2010.

#### 2.4. Coleta e Secagem

Para a extração de óleo a partir das microalgas, a biomassa deve primeiramente ser separada do meio de cultura e depois seca.

A recuperação da biomassa microalgal tem sido responsável por contribuir com 20 a 30% do total de gastos para a produção de biomassa (GUDIN E THERPENIER 1986; GRIMA et al. 2003). A seleção da técnica de recuperação da biomassa depende das propriedades das microalgas, como densidade, tamanho e valor do produto desejado (MORCELLI, 2011). Contudo o método de colheita ideal de microalgas para produção de biocombustíveis deve, independente da espécie, utilizar quantidades mínimas de produtos químicos e energia (CHEN et al., 2011).

Diferentes métodos físicos, químicos e biológicos de separação de fases sólido-líquida podem ser utilizados para o processamento de grandes

volumes de biomassa de microalgas com a remoção de elevadas quantidades de água, envolvendo uma ou mais etapas de execução (GRIMA et al., 2003; BRENNAN E OWENDE, 2010; MATA et al., 2010). Os métodos de coleta comumente utilizados incluem sedimentação, centrifugação, filtração, ultra-filtração, às vezes com uma etapa adicional de floculação ou uma combinação de eletroflotação e floculação (WANG et al., 2008; CHEN et al., 2011).

A filtração convencional pode atuar sob pressão ou sucção e com auxiliares de filtração tais como terra diatomácea ou celulose para melhorar a eficiência, sendo mais adequada para a coleta de microalgas relativamente grandes (dimensões superiores a 70  $\mu\text{m}$ ). Simplicidade de construção e operação, baixo investimento, desgaste desprezível como resultado da ausência de peças em movimento rápido são algumas das vantagens deste método (GRIMA et al., 2003). Para a recuperação de algas de menor tamanho de células (<30  $\mu\text{m}$ ), a micro e a ultra filtração por membranas (processos que utilizam como força motriz a aplicação de pressão através de membranas densas ou porosas) são alternativas tecnicamente exequíveis à filtração convencional (MORCELLI, 2011). A filtração de culturas de microalgas permite remover a totalidade de microalgas do meio de cultura, passando-o por membranas de poros reduzidos (BABEL et al., 2002). Entretanto, este método apresenta algumas limitações já que as membranas podem ficar rapidamente colmatadas, o que reduz a capacidade de filtração (ROSSIGNOL et al., 1999). A sedimentação consiste na concentração da biomassa pelo simples assentamento das células. Este processo é lento e o produto final contém um elevado teor de água. A centrifugação contínua tem sido o método preferido para a separação de biomassa, uma vez que é rápido, eficiente e universal, porém não é economicamente viável para coletas em larga escala devido ao alto consumo de energia (RAWAT et al., 2010). A

concentração por coagulação/floculação permite a recuperação de biomassa com menores custos econômicos em relação à centrifugação. Este processo consiste na adição de produtos químicos capazes de induzir a agregação de células pela formação de ligações entre as microalgas ou por neutralização ou inversão das cargas elétricas das paredes celulares (GODOS et al., 2010). Contudo este método apresenta desvantagens, tais como os coagulantes não serem eficientes para todos os tipos de microalgas, elevada sensibilidade ao pH e possível contaminação da biomassa recuperada pela adição de alumínio ou ferro, comprometendo o seu reaproveitamento (CHEN et al., 2011).

Após a recuperação, a biomassa dever ser desidratada para uma melhor extração dos óleos ou para uma satisfatória conversão direta em biodiesel. Para a secagem podem ser utilizadas a liofilização, aspensão (spray-drying), estufa e secagem direta ao sol (LI et al, 2008).

A secagem ao sol é provavelmente a método mais econômico de secagem que tem sido utilizada para o processamento de biomassa microalgal. É adequada para regiões com climas de baixa umidade, porém exige mais espaço e tempo (U.S. DOE, 2010). A secagem por pulverização (spray-drying) e a liofilização são tecnologias mais eficientes, mas são mais caras. É importante encontrar um equilíbrio entre a eficiência, tanto da coleta como da secagem, e custo-efetividade para tornar acessível a produção de combustíveis a partir de microalgas (LI et al, 2008).

## **2.5. Extração de óleos**

A extração de óleos das microalgas pode ser executada por processos químicos, mecânicos ou combinados. No método utilizando solventes juntamente com o processo mecânico, primeiramente o óleo deve ser extraído utilizando uma prensa. A polpa remanescente pode ser misturada com o hexano, por exemplo, extraindo o conteúdo de óleo

restante. Estas duas fases (prensa a frio e solvente) em conjunto são capazes de retirar mais de 95% do total de óleo presente na alga (OILGAE, 2012).

Outros métodos de extração de óleos comumente empregados são Soxhlet, Folch et al. e Bligh & Dyer. Utilizando-se o aparelho de Soxhlet se faz a extração contínua de determinado sólido. Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano), graças à sifonagem e subsequente condensação do solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (VOGEL et al., 1996).

Folch et al (1957) desenvolveram um método para extração de lipídeos totais usando uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1 v/v), seguida pela adição de solução salina de cloreto de potássio (KCl), visando uma melhor separação das fases lipídicas e aquosa. Bligh & Dyer (1959, apud BRUM et al., 2009) remodelaram o método de Folch em um novo método rápido para extração e purificação de lipídeos totais utilizando clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8 v/v).

Os métodos de Folch et al e Bligh & Dyer são métodos de extração a frio que permitem que a qualidade dos lipídeos removidos não seja prejudicada. Esses métodos podem ainda ser associados à agitação da biomassa de microalgas na presença de pérolas de vidro ou cerâmica e ultrassom para romper pequenas quantidades de biomassa, mas este último método ainda não é aplicável para utilização em larga escala (GRIMA et al., 2003).

## **2.6. Transesterificação**

Os métodos mais comumente usados para a produção de biodiesel envolvem reações de transesterificação. Elas são realizadas em condições alcalinas ou ácidas e envolvem a reação de álcoois com óleos vegetais ou gorduras animais, para se obter os ésteres monoalquílicos e glicerina (DEMIRBAS, 2007). A transesterificação catalisada por um reagente alcalino

é normalmente o método adotado para a produção de biodiesel em larga escala.

Quando uma elevada concentração de ácidos graxos livres está presente, tais como nas matérias-primas de baixo custo ou óleos de fritura, um catalisador ácido deve ser empregado (MEHER et al, 2006). Os catalisadores básicos mais utilizados são NaOH ou KOH, entretanto pode ocorrer a formação de sabão durante produção de biodiesel. Esta é uma reação colateral indesejável porque consome parcialmente o catalisador, diminui o rendimento de biodiesel e dificulta os passos de separação e de purificação. Além disso, a dificuldade associada com a reciclagem e a geração de grandes quantidades de resíduos fazem destes catalisadores tradicionais menos favorável (VICENTE et al, 2007; MEHER et al, 2006).

Os ácidos utilizados como catalisadores para a transesterificação incluem sulfúrico, fosfórico, ácido clorídrico, e ácidos orgânicos sulfônicos (FUKUDA, 2001; LOTERO et al, 2005; MEHER et al, 2006). As reações catalisadas por ácidos são muito mais lentas do que reações catalisadas por álcalis, requerendo temperaturas e pressões mais altas. A catálise ácida é mais adequada nas transesterificações de óleos que contêm uma elevada concentração de ácidos graxos livres e água, como em matérias-primas de baixo custo, tais como óleos de fritura (DALL'OGGIO et al, 2014). Portanto, para a escolha do tipo de catalisador (ácido ou alcalino) em uma reação de transesterificação deve-se levar em consideração a natureza do óleo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliação do potencial de microalgas coletadas em lagoa de maturação da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE CPA III) para a extração de lipídios, visando a aplicabilidade tecnológica quanto à produção experimental de biodiesel.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

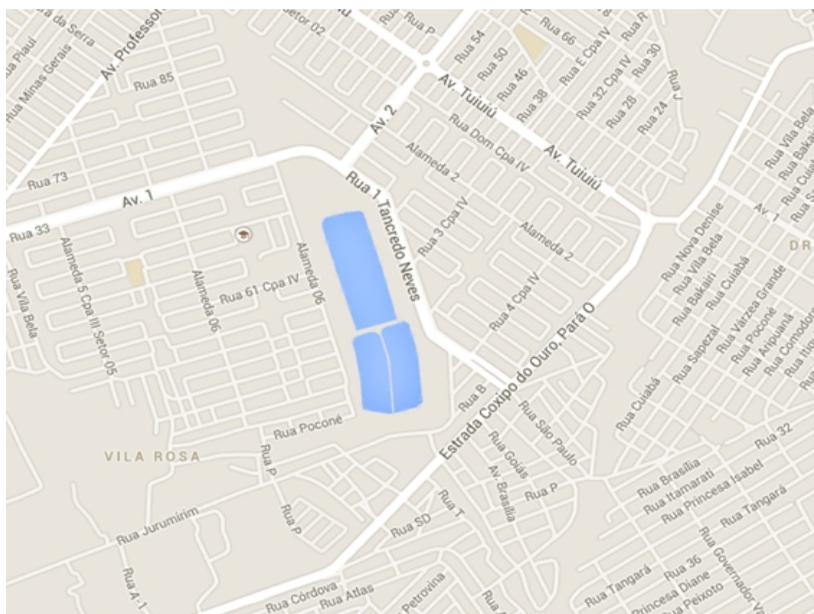
- Coletar microalgas em uma lagoa de maturação da ETE CPA III.
- Identificar a espécie dominante por métodos clássico e molecular.
- Caracterizar a composição centesimal da biomassa coletada.
- Realizar a extração de lipídeos da biomassa, por diferentes métodos.
- Converter o óleo extraído em ésteres.
- Caracterizar as frações lipídicas.

### **4. Área de Estudo**

#### **4.1. Caracterização do local de estudo**

O local de estudo se localiza na região denominada Baixada Cuiabana, centro-sul do Estado de Mato Grosso. De acordo com a classificação climática de Köppen, Cuiabá enquadra-se dentro de um clima do tipo Aw (quente tropical semiúmido), com temperatura média anual de 26°C. Possui temperaturas máximas médias diárias por volta dos 36°C em setembro e as mínimas de 15°C em julho. A temperatura é mais elevada no período de setembro a novembro. Há dois períodos bem distintos que marcam a sazonalidade, definidos pelas precipitações pluviométricas: estiagem, geralmente de maio a setembro, e chuvoso, de outubro a abril (INMET, 2014).

A ETE onde foram coletadas as microalgas localiza-se na Avenida Tancredo Neves, S/N, Bairro Morada Da Serra (CPA III) no Município de Cuiabá/MT (figura 8).



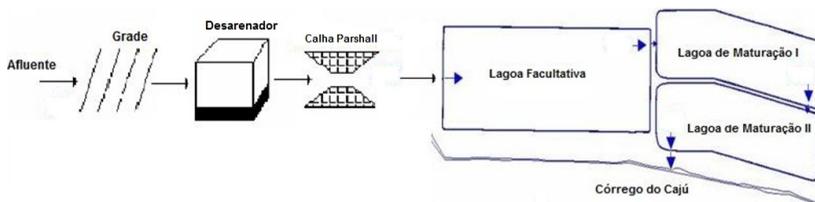
**Figura 8: Mapa de localização da ETE CPA III. Fonte: <http://www.google.com.br/maps/@-15.5644847,-56.0416671,15z>**

#### **4.2. Caracterização da ETE**

A ETE CPA III, constituída de Lagoas de Estabilização, foi construída, em 1986 pela SANEMAT (Companhia de Saneamento do Estado de Mato Grosso), para atender a uma população aproximada de 50 mil habitantes, presente nos bairros CPA II, III, IV e Novo Mato Grosso. Em abril de 2012, iniciou-se o contrato de concessão de 30 anos dos serviços de água e esgoto de Cuiabá, pela Companhia de Águas Brasil (CAB

Ambiental) que pertence ao Grupo Galvão, sendo denominada de CAB Cuiabá.

O Sistema desta estação é constituído por tratamento preliminar, uma lagoa Facultativa e duas Lagoas de Maturação, atuando em série. A figura 9 ilustra as etapas de tratamento da ETE CPA III.



**Figura 9: Fluxograma da ETE CPA III. Fonte: DESTRO, 2007.**

O tratamento preliminar é constituído de uma grade de barras de ferro, dispostas paralelamente e inclinada em 45°, de limpeza manual, seguida por desarenador, cujo propósito é separar a areia de outros detritos do meio. O esgoto passa então, por uma Calha Parshall (um dispositivo de medição de vazão na forma de um canal aberto com dimensões padronizadas) e segue para a lagoa facultativa.

Na lagoa facultativa com dimensões de 155,8 m de largura, 427,8 m de comprimento e 1,25 m de profundidade, as condições aeróbias são mantidas nas camadas superiores das águas, enquanto as condições anaeróbias predominam em camadas próximas ao fundo da lagoa e retém o esgoto por um período de tempo longo o suficiente para que os processos naturais de estabilização da matéria orgânica se desenvolvam.

Nas lagoas de maturação (cada uma com 97,6 m de largura, 335,3 m de comprimento e 0,90 m profundidade), o tratamento do efluente é complementado. A função destas lagoas é fazer a remoção de patógenos, pela radiação ultravioleta fornecida pela luz solar. Depois de tratado pela ETE, o efluente é lançado no corpo d'água receptor, o Córrego do Caju que

é um dos afluentes do Rio Coxipó (DESTRO, 2007). A tabela 3 apresenta a vazão média e o tempo de detenção hidráulico das lagoas ( $\theta_h$ ) facultativa e maturação.

**Tabela 3: Vazão média e tempo de detenção hidráulico das lagoas**

<b>Lagoa</b>	<b>Volume m<sup>3</sup></b>	<b>Qmed afluente (m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\theta_h</math> (dias)</b>
<b>Facultativa</b>	83.314,05	4.713,0675	17,7
<b>Maturação I</b>	29.443,97	4.713,0675	6,2
<b>Maturação II</b>	29.443,97	4.713,0675	6,2

Fonte: DESTRO, 2007.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no período de janeiro de 2013 a março de 2014 na ETE CPA III, na segunda lagoa de maturação. Todas as coletas foram realizadas pela manhã, entre 9h00min e 12h00min, durante o período de janeiro de 2013 a março de 2014, não havendo necessariamente coleta em todos os meses. O marcador vermelho na figura 10 indica o ponto específico onde foram feitas as coletas. Este local foi escolhido por proporcionar um ponto de apoio para a instalação do equipamento para a coleta da biomassa.

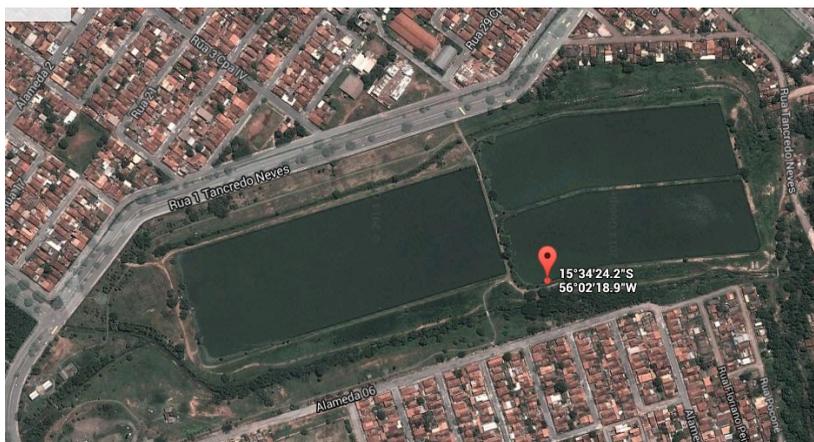
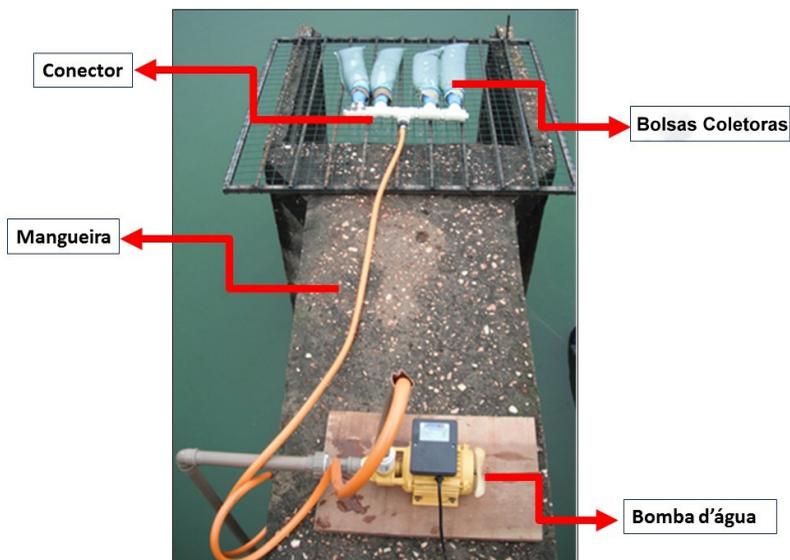


Figura 10: Ponto de coleta na ETE CPA III. Coordenadas 15°34'24.25"S 56°02'18.9"W. Fonte: GOOGLE MAPS, 2014.

### 5.1. Obtenção de biomassa

A coleta de biomassa foi realizada utilizando-se um sistema com bomba d'água e bolsas coletoras (figura 11).



**Figura 11:** Sistema de coleta completo instalado em lagoa de estação de tratamento, contendo sacos coletoras, conectores, mangueira e bomba d'água.

O sistema de filtração foi composto por uma bomba d'água periférica 1/4 CV (Ferrari, modelo IDB-35) que succionou a água da lagoa até um distribuidor constituído de cinco TEs de PVC rosqueáveis de 1" (polegada), ligados paralelamente com niples de 1" e as extremidades fechadas com plugues de PVC de 1". Uma válvula de pé (fundo de poço) recoberta com uma tela nylon foi acoplada no cano de PVC de 1" que ficou submerso na lagoa e este foi conectado à bomba.

Na saída de cada TE, com exceção do TE central, foi fixada uma válvula de pé modificada, onde foram presas, por rosqueamento, as bolsas coletoras. Estas foram confeccionadas com tecido de nylon monofilamentado (porosidade de 10  $\mu\text{m}$ , Limnotec, São Carlos, SP, Brasil) medindo 45 cm de comprimento cada. O TE central foi conectado a uma mangueira que foi acoplada na saída da bomba (figura 12).

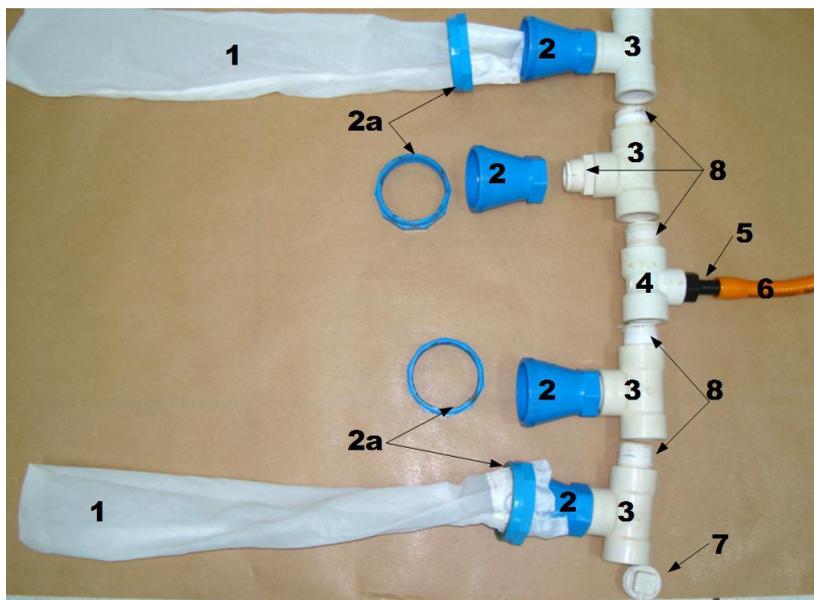


Figura 12: Sistema de coleta de microalgas, composto por: 1 – Bolsas coletoras; 2 e 2a – Válvula de pé modificada; 3 – Tubos TÊ periféricos; 4 – Tubo TÊ central; 5 – Conexão com ponta tipo espigão; 6 – Mangueira que se conecta à bomba d'água; 7 – Plugue de PVC; 8 – Niple.

Antes de acoplar o sistema coletor na mangueira era medida a vazão da bomba conforme a equação a seguir:

$$\text{Vazão} = \text{Volume (L)}/\text{tempo (min)}$$

O sistema coletor ficava ligado por 30 minutos, aguardava-se o escoamento do excesso de água e ligava-se novamente por mais 30 minutos. Após esse período o excesso de água era removido por compressão manual. A biomassa retida nas bolsas coletoras era transferida para recipiente com tampa e armazenada em caixa térmica para o transporte até o laboratório, onde era medida, aliquotada e congelada em freezer -20°C.

## **5.2. Identificação morfológica e taxonômica**

Amostras de água da lagoa para identificação das populações dominantes de microalgas foram recolhidas em frascos âmbar e acondicionadas em caixa térmica para o transporte até o laboratório Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Microrganismos Aquáticos - LATEMAS, do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso. Estas amostras foram preservadas com 3% de formaldeído 37%, de acordo com Bicudo e Menezes (2006), para posterior identificação por microscopia.

A análise qualitativa foi realizada sob microscópio óptico binocular Olympus CH30 equipado com câmera digital colorida e ocular milimetrada. As características morfológicas e morfométricas da vida vegetativa e reprodutiva de valor taxonomico foram analisadas de acordo com Komárek e Anagnostides (2005).

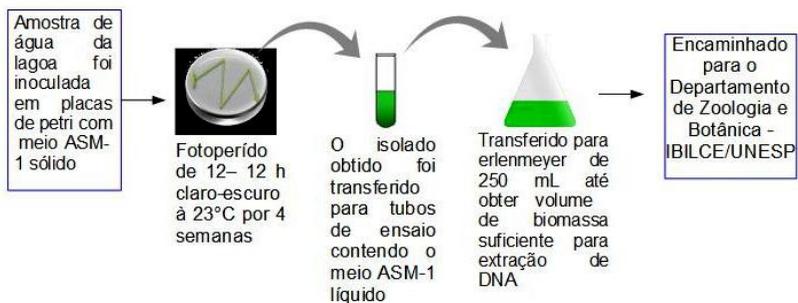
Durante a análise qualitativa foram observadas as características morfométricas de 30 indivíduos da população dominante a fim de registrar a variabilidade populacional.

As medidas necessárias foram representadas pelos limites métricos máximo e mínimo da população. A fim de salientar algumas características importantes para caracterização da espécie dominante, utilizou-se quando necessário nanquim e cloreto de zinco iodado para evidenciar bainha e septos, respectivamente.

O sistema de classificação adotado foi o de Hoffman *et al.* (2005) para cianobacteria e a sequência de classe segue a mesma ordem que as apresentadas por Bicudo e Menezes (2006).

## **5.3 Extração de DNA e identificação molecular**

Foram desenvolvidos cultivos partindo da uma única amostra de água obtida no mesmo ponto de coleta da biomassa para a extração de DNA e identificação molecular ( figura 13).



**Figura 13: Esquema do cultivo da amostra.**

### 5.3.1. Cultivo

A amostra de água foi coletada em frasco de vidro transparente e transportado ao laboratório em condições herméticas à temperatura ambiente. Procedeu-se à inoculação de gotas da amostra bruta em placas de petri contendo o meio de cultura ASM-1 (tabela 4) sólido e cicloheximida ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) como antibiótico. As placas permaneceram em condições controladas de iluminação (12 – 12 h claro-escuro) e temperatura ( $23^\circ \text{ C}$ ) até se observar o crescimento das microalgas. Decorrido o período de quatro semanas, o isolado obtido foi transferido para tubos de ensaio contendo o meio ASM-1 líquido com cicloheximida e posteriormente para erlenmeyers de 250 mL para aumentar o volume de biomassa.

**Tabela 4: Reagentes utilizados para o preparo das soluções que compõe o Meio de Cultura ASM-1 Modificado\***

<b>Solução Estoque</b>	<b>Nutrientes</b>	<b>Quantidade (g)</b>
<b>Solução A</b>	NaNO <sub>3</sub>	8,50
	MgSO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O	2,45
	MgCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	2,05
	CaCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	1,45
<b>Solução B</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,70
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 12 H <sub>2</sub> O	17,80
<b>Solução C</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,40
	MnCl <sub>2</sub> + 4 H <sub>2</sub> O	13,90
	FeCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	10,80
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35
	CoCl <sub>2</sub> + 6 H <sub>2</sub> O	0,19
	CuCl <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	0,014
<b>Solução D</b>	EDTA titriplex	18,60

Para cada solução (A, B, C e D) os compostos foram diluídos em 1.000 mL de água deionizada e armazenados no freezer em frascos plásticos. Para preparar 1 L de meio são necessários: 20 mL de solução estoque A; 2 mL de solução estoque B; 0,1 mL de solução estoque C; 0,4 mL de solução estoque D. pH do meio de cultura 7,4. \*AGUIAR E AZEVEDO in CETESB, 1992.

Após a obtenção de cultura, com quantidade de biomassa suficiente para extração de DNA, esta foi encaminhada a temperatura ambiente ao Laboratório de Biologia, Ecologia, Taxonomia de Algas do Departamento de Zoologia e Botânica, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

(UNESP - campus de São José do Rio Preto), onde foi realizado a extração de DNA, amplificação e sequenciamento de genes ribossomais.

### **5.3.2. Extração de DNA genômico**

As células foram concentradas por meio de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado para a retirada dos nutrientes do meio de cultura e possíveis contaminantes. A lavagem consistiu na adição de 500 µL de Solução I (Tris-HCl 1M pH 8,0, EDTA 0,5M e NaCl 5M) e 50 µL de SDS 2%, sendo posteriormente agitado em vórtex e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de Solução I, agitado em vórtex novamente e centrifugado a 7.000 rpm. O *pellet* foi usado para extrair o DNA genômico, utilizando o kit MoBio PowerSoil DNA Isolation (Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Alíquotas de 1 µL dos DNAs extraídos foram acrescidas de tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,5%, glicerol 0,3%, EDTA 0,5M) e GelRedTM 0,6X (Biotium, Hayward, E.U.A.) e a integridade das mesmas foi verificada em gel de agarose 1%, após corrida eletroforética em tampão TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Como padrão de tamanho de DNA foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder de 1 Kb (Life Technologies). O material foi armazenado à temperatura de -20°C até o momento da próxima análise.

### **5.3.3. Amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase) do gene RNA ribossomal**

A amplificação do RNAr 16S foi realizada primeiramente utilizando os iniciadores 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') (NEILAN et al., 1997) e 23S30R (5'CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT3') (TATON et al., 2003) em termocicladores Techgene TC-312 e TC-512 (Techne, Burlington, Inglaterra). Cada reação consistiu em: 5 µL de tampão de PCR 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µL de dNTPs 10 mM, 5 pmol de cada iniciador, 1,5 U de Platinum®

Taq DNA Polimerase (Life Technologies, Carlsbad, E.U.A.), 10 ng de DNA, água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA) esterilizada, para um volume final de 25  $\mu$ L. O ciclo utilizado para amplificação foi de 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 10 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 2 minutos, 25 ciclos a 92 °C por 45 segundos, 54 °C por 45 segundos, extensão final a 72 °C por 7 minutos. A verificação dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 5.3.2.

#### **5.3.4. Clonagem e transformação**

A clonagem das sequências do RNAr 16S produzidas na PCR foram realizadas utilizando-se o kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  foi feita através de choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). Alíquotas de 10  $\mu$ L do produto de ligação e 50  $\mu$ L de suspensão de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram misturadas em um microtubo esterilizado, o qual foi incubado no gelo durante 30 minutos. O microtubo foi transferido imediatamente para banho-maria a 42 °C por 30 segundos. Em seguida, foi novamente resfriado em gelo por 2 minutos. Posteriormente, adicionou-se a ele 250  $\mu$ L de meio LB líquido à temperatura ambiente e, em seguida, este foi incubado por 2 horas a 37 °C, sob agitação de 180 rpm. As células competentes transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina e X-Gal, ambos em concentrações finais de 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de meio. As placas foram incubadas por 13-16 horas, a temperatura de 37 °C.

#### **5.3.5. Seleção de colônias**

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, cinco colônias de cor branca foram selecionadas e utilizadas para novas reações de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado foi adicionada a 25  $\mu$ L de reação de PCR (conforme descrito no item 5.3.3)

contendo os iniciadores CYA359F (5'GGGGAATTTTCCGCAATGGG3'), 781a (5'GACTACTGGGGTATCCTAATCCCATT3') e CYA781b (5'GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT3') (NÜBEL et al., 1997). O ciclo utilizado para amplificação foi de: 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 63 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, extensão final a 72 °C por 7 minutos. A verificação da presença dos produtos da PCR foi feita conforme descrito no item 5.3.2.

### 5.3.6. Sequenciamento e processamento das sequências

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos dos marcadores estudados foi feita usando-se o kit “Big Dye Terminator” versão 3.0 (Life Technologies). Utilizou-se 200 ng de plasmídeo contendo o inserto, 5pmol dos iniciadores M13F (5'GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA3'), 357F (5'CCTACGGGAGGCAGCAG3'), 704R (5'TCTACGSTATTCACCSCTAC3'), 1114F (5'GCAACGAGCGCAACCC3'), 1494R (5'TACGGCTACCTTGTACGAC3') e Sp6R (5'ATTTAGGTGACACTATAGAA3') (NEILAN et al., 1997), 1,5 µL de “Big Dye”, 3,5 µL de tampão 2,5 X “Terminator” e água ultrapura para volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram as seguintes: 25 ciclos a 95 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Após a amplificação dos fragmentos realizou-se a precipitação de acordo com as instruções do kit “Big Dye Terminator” versão 3.0” e submetidas ao sequenciamento no sequenciador capilar 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems), na empresa “Genomic Engenharia Molecular” (<http://www.genomic.com.br>).

Os dados gerados pelo sequenciador foram coletados e processados pelo programa “ABI PRISM R DNA Sequencing-Analysis Software” versão 3.7 (Life Technologies). As sequências geradas foram processadas para remoção das bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade < 20) com auxílio do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998) em sistema

operacional Linux. A sequência obtida foi comparada com sequências depositadas no GenBank (banco de dados de sequências de DNA e aminoácidos) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), utilizando-se a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” – Blast®, acessado pela internet.

#### **5.4. Secagem da biomassa**

A biomassa foi desidratada utilizando as técnicas de liofilização, secagem em estufa e secagem ao sol para avaliar qual seria o melhor método. Parte da biomassa microalgal obtida foi submetida a liofilização, sendo o material primeiramente congelado a uma temperatura de aproximadamente -20 °C por 24 horas. Em seguida, foi desidratado em liofilizador (Terroni, modelo LS3000) por um período de 24 horas. Após a liofilização, a biomassa era macerada em gral com pistilo, obtendo-se um pó solto e uniforme.

A secagem em estufa foi realizada a partir de amostras previamente congeladas a temperatura de -20 °C. O descongelamento ocorria a temperatura de aproximadamente 8 °C por cerca de 15 horas. A biomassa, depois de descongelada, era deixada em estufa (Fanem, modelo 320-SE) a 60 °C até ficar completamente seca. Após a secagem, a biomassa era macerada em gral com pistilo para obter um pó solto e uniforme.

Para a secagem das amostras ao sol, o descongelamento também era realizado a temperatura de aproximadamente 8 °C por cerca de 15 horas. A amostra descongelada era, então, depositada em uma malha porosa de nylon monofilamentado (Wimak) e colocada em local isolado, ao ar livre e exposto ao sol até a secura total. No dia em que foi realizado este teste a temperatura ambiente estava entre 24 e 37 °C e a umidade relativa do ar entre 63 e 70%.

A massa da biomassa era medida antes e depois de cada secagem para cálculo do teor de umidade.

$$\text{Umidade (\%)} = [(M1-M2) \times 100] / M1$$

Em que:

M1 = massa (g) da amostra, antes da secagem

M2 = massa (g) da amostra depois

### 5.5. Extração dos lipídeos

Para definição do método de extração de óleo da biomassa mais adequado foram testadas três metodologias: Soxhlet, Bligh & Dyer modificado e Folch et al (1957) modificado com diferentes tipos de amostra da biomassa (tabela 5).

**Tabela 5: Tipo da amostra da biomassa utilizada em cada métodos de extração**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Massa utilizada (g)</b>
Liofilizada	Bligh and Dyer	25
Biomassa úmida	Bligh and Dyer	166*
Seca em estufa	Bligh and Dyer	25
Seca em estufa	Soxhlet	25
Liofilizada	Soxhlet	25
Liofilizada	Folch	25
Seca em estufa	Folch	25

\*Equivalente a 25 g biomassa seca.

#### 5.5.1. Extração utilizando aparelho de Soxhlet

Na extração do óleo de microalgas com aparelho de Soxhlet, foram usados 500 mL de n-hexano como solvente e 25 g da biomassa seca em estufa. A biomassa foi colocada num cartucho de papel de filtro e em seguida no extrator, que foi conectado a um balão de 1000 mL contendo o solvente. O condensador foi conectado ao extrator. O aquecimento foi realizado em manta aquecedora com regulagem de temperatura por

termostato. Foi obtido um extrato de coloração amarela após oito horas de refluxo. Em seguida, foi retirado o excesso de solvente por evaporador rotativo (RV 10 digital, IKA). O conteúdo restante do balão foi solubilizado em n-hexano e purificado com uma mistura de carvão ativo, celite e sílica gel. Essa mistura foi filtrada e lavada com n-hexano até o solvente sair incolor. Para a biomassa liofilizada procedeu-se da mesma forma.

#### **5.5.2. Método de Bligh & Dyer adaptado por Zhu *et al.* (2002)**

A extração pelo método de Bligh & Dyer adaptado por Zhu *et al.* (2002) foi realizado para a biomassa seca. Para a biomassa úmida, o procedimento descrito por Johnson e Wen (2009).

Em relação à biomassa seca em estufa, os experimentos foram realizados de acordo com Zhu *et al.*, 2002. Com almofariz e pistilo, 25 g da biomassa seca foi macerada e transferida para a câmara do disruptor celular tipo Mini Bead-beater (Bio Spec Products, Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA). Foram adicionadas pérolas de vidro (1 mm) e 18 mL de solução de metanol:clorofórmio (2:1 v/v) para cada grama de biomassa seca. A mistura foi processada durante 5 minutos e transferida para um frasco âmbar com tampa rosqueável. Em seguida, colocou-se em banho ultrassônico (Quimis, modelo Q3360) por 30 minutos. Após esse período, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro, microporosidade de 6 µm.

O processo de banho ultrassônico e filtração foi repetido num total de três vezes. Foi adicionado, aos extratos obtidos, igual volume de água destilada e transferiu-se para um funil de decantação. Esperou-se decantar e a fase orgânica foi recolhida. O solvente foi recuperado em balão de condensação por rotaevaporação (RV 10 digital, IKA) a vácuo na temperatura de 45 °C. O conteúdo restante do balão foi solubilizado em n-hexano e purificado com uma mistura de carvão ativo, celite e sílica gel. Essa mistura foi filtrada e lavada com n-hexano até o solvente sair incolor. Para a biomassa liofilizada procedeu-se da mesma forma.

Para extração de óleos da biomassa úmida, os ensaios foram realizados conforme Johnson e Wen (2009). 166 g da biomassa úmida de algas (equivalente a 25 g de biomassa seca) foi colocada na câmara do disruptor celular tipo Mini Bead-beater.

A água contida na biomassa úmida (aproximadamente 85 %, m/m) serviu como água utilizada para extração. Foram adicionadas pérolas de vidro (1mm) e 18 mL de solução de metanol:clorofórmio 2:1 (v/v) para cada 7 (sete) gramas de biomassa úmida. A mistura foi processada durante 5 minutos e transferida para um frasco âmbar com tampa rosqueável. Em seguida, foi deixada em banho ultrassônico por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados clorofórmio e água destilada, sendo 6 mL de cada solvente para cada 7 gramas de biomassa úmida.

Tal solução foi homogeneizada e transferida para tubos específicos, os quais foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 min. A camada orgânica contendo o óleo de algas foi então transferida para um balão, onde o solvente foi evaporado à vácuo na temperatura de 45° C. O conteúdo restante foi solubilizado em n-hexano e purificado com uma mistura de carvão ativo, celite e sílica gel. Essa mistura foi filtrada e lavada com n-hexano até o solvente sair incolor.

### **5.5.3. Método de Folch et al (1957) adaptado por Pescador Zys (2014)**

Foram macerados com almofariz e pistilo 25 g da biomassa seca em estufa e transferida para a câmara do disruptor celular tipo Mini Bead-beater. Foram adicionadas pérolas de vidro (1 mm) e 10 mL de solução de clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) para cada grama de biomassa. A mistura foi processada durante 5 minutos e transferida para um frasco âmbar com tampa rosqueável, em seguida colocou-se em banho ultrassônico por uma hora. Após esse período, a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro com microporosidade de 6 µm. O solvente foi recuperado em evaporador rotativo. O processo banho ultrassônico-filtragem-rotativa foi

repetido num total de três vezes, reaproveitando a mistura de solventes recuperados por rotaevaporação. O conteúdo restante do balão foi solubilizado em n-hexano e purificado com uma mistura de carvão ativo, celite e sílica gel. Essa mistura foi filtrada e lavada com n-hexano até o solvente sair incolor. Para a biomassa liofilizada procedeu-se da mesma forma.

### **5.6. Análise da Composição Centesimal da Biomassa e Riqueza Nutricional das Águas Residuais**

Uma amostra de biomassa liofilizada foi encaminhada ao Laboratório de Análise de Alimentos, Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, onde foram realizadas análises físicas e químicas de porcentagem de proteínas, lipídeos totais e carboidratos totais pelos métodos de Kjeldahl, Soxhlet e Lane-Eynnon, respectivamente.

Para verificar a riqueza nutricional da lagoa foi realizada uma análise pontual dos parâmetros: nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio Kjeldahl, nitrogênio total, ortofosfato e fósforo. Os procedimentos de coleta e preservação das amostras seguiram as normas da CETESB (2011), NBR 9898/87 e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA/AWWA, 2005) e as análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos no *Standard Methods* (2005).

### **5.7. Transesterificação**

A transesterificação foi realizada a partir de óleo extraído de uma amostra de biomassa coletada no período seco e de outra coletada no período chuvoso. Estas amostras foram secas em estufas e procedeu-se à extração dos óleos pelo método de Folch et al (1957) adaptado por Pescador Zys (2014). Os óleos extraídos foram convertidos em ésteres metílicos por transesterificação via catalise ácida. Pesou-se 0,5 g de óleo e adicionou-se 10 mL de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3% em metanol e 2 mL de n-hexano. A reação ocorreu em sistema fechado (digestor de teflon) em banho

de óleo mineral a 90°C +/- 5°C por 4 horas. O biodiesel obtido foi neutralizado, lavado e desidratado.

### **5.8. Determinação do teor de éster**

A análise do perfil graxo foi realizada na Central Analítica de Combustíveis – CEANC. As amostras na forma de ésteres metílicos foram analisadas em Cromatógrafo Gasoso GC-2010 Shimadzu® com injetor split/splitless em modo split razão 1:50; coluna Agilent JW DB-WAX 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; programação: injetor e detector constantes a 250 °C; programação do forno: 60 °C por 2 min, aumento de 10 °C/min até 200 °C, 5°C/min até 240 °C com permanência por 16 min; padrão interno utilizado foi heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich) e a quantificação foi baseada pela identificação e comparação de acordo com o F.A.M.E. MIX (Supelco) C4-C24. A norma EN 14103 determina a quantificação a partir de C14 até C24, mas para este experimento a quantificação foi feita a partir do C6 pois a matéria-prima continha composição diferente do usual (biodiesel de soja).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão expostos e dissertados os resultados obtidos durante o desenvolvimento do presente trabalho.

### 6.1. Obtenção de biomassa

A vazão média da bomba do sistema coletor, descrito no item 5.1, correspondeu a  $28 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , assim, estimou-se que foi coletado, em média,  $160\text{mgL}^{-1}$  de biomassa. A biomassa úmida coletada apresentava coloração verde e consistência pastosa (figura 14).



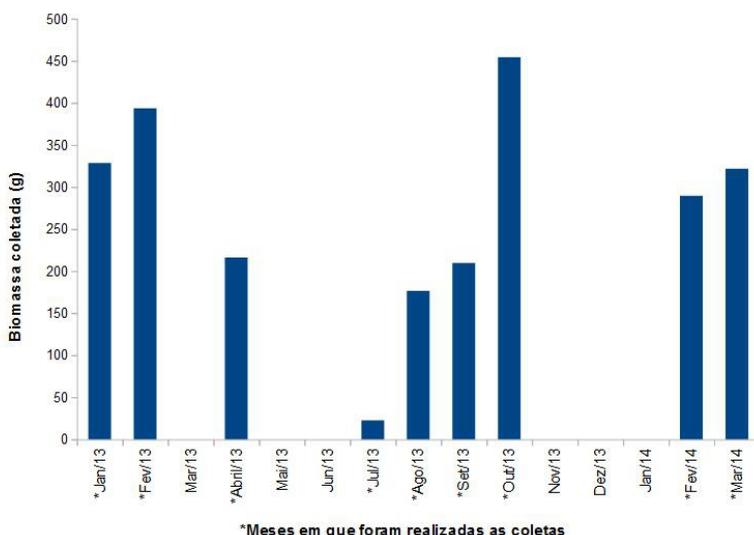
**Figura 14: Biomassa coletada na ETE CPA III.**

O teor de umidade correspondeu à média de 85%, semelhante à encontrada por Sathish e Sims (2012) e Cheng et al. (2013), que utilizaram centrifugação como método de recuperação de biomassa. Isso indica que o sistema coletor de biomassa desenvolvido para este trabalho foi eficiente, sendo uma alternativa de custo acessível, já que o método de centrifugação não é economicamente viável para coletas em larga escala devido ao alto consumo de energia (RAWAT *et al*, 2011).

Outra vantagem do sistema desenvolvido foi a possibilidade de seu uso no local onde as microalgas estavam presentes, transportando-se até o laboratório somente a biomassa, otimizando a coleta. No entanto este

método também apresenta algumas desvantagens, como a colmatação, que aumenta a pressão interna, e não permite que o sistema fique em funcionamento contínuo, tendo que ser desligado de 30 em 30 minutos para escoamento do excesso de água e liberação dos poros. Se este procedimento não for realizado, a vida útil das bolsas coletoras fica comprometida, já que as costuras, feitas a máquina doméstica com viés na lateral para reforço, podem se romper. Este problema pode ser sanado aplicando-se outra técnica de fechamento das bolsas coletoras para que suportem a pressão sofrida.

A figura 15 apresenta a quantidade de biomassa coletada em cada mês em que houve coleta durante o período de janeiro de 2013 a março de 2014.



**Figura 15: Quantidade de biomassa obtida pelo sistema de filtragem referente aos meses de coleta.**

Os resultados também indicam que pode haver uma correlação entre o período das chuvas e o aumento da quantidade biomassa. Conforme ocorreu a diminuição da precipitação durante o período de maio a setembro,

também ocorreu uma queda na produtividade de biomassa na área estudada e um aumento significativo de outubro até abril.

Embora estudos apontam que a quantidade elevada de chuvas exerce um efeito diluidor contribuindo para a diminuição da densidade do fitoplâncton (SOLDATELLI, 2007), foi no período de estiagem que ocorreu a diminuição de biomassa no local de estudo. Por haver maior incidência de luz sobre a lagoa, pode ocorrer que o crescimento das microalgas seja comprometido devido ao processo chamado de fotoinibição, acarretando uma menor produção celular e o decréscimo na quantidade de biomassa (WEN E CHEN, 2003).

A complexibilidade sobre crescimento de microalgas indica que, geralmente, os comportamentos não são lineares em resposta à alteração de diversos parâmetros ambientais tais como temperatura, luz e nutrientes, e as interações entre esses fatores não se encontram bem definidos. (DINIS et al., 2004,).

## 6.2. Secagem da biomassa

O teor de umidade foi determinado verificando a massa antes e após cada um dos processos de secagem, todos em triplicada, sendo a média apresentada na tabela 6.

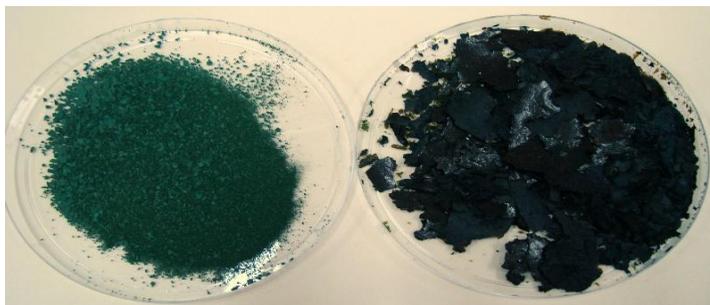
**Tabela 6: Avaliação dos diferentes métodos de secagem**

<b>Método de secagem</b>	<b>Massa inicial (g)</b>	<b>Massa final (g)</b>	<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Tempo de secagem (h)</b>
Liofilização	50	7,60	84,81	24
Estufa	50	7,36	85,28	2
Insolação	50	7,19	85,62	4

Constatou-se que o teor de umidade independe do método utilizado para desidratar a biomassa (figura 16 e 17).



**Figura 16: Amostra liofilizada**



**Figura 17: Amostra seca ao sol e em estufa, respectivamente.**

Pelos resultados apresentados, verificou-se que a secagem ao sol mostra-se vantajosa em relação aos outros métodos, por apresentar baixo custo energético podendo ser viável em regiões com alta incidência solar durante a maior parte do ano, porém exige grandes espaços para ser executada e ainda são necessários mais testes para confirmação desta hipótese. A secagem em estufa é mais rápida, mais econômica em relação a energia consumida e custo com equipamento quando comparada à liofilização.

### **6.3. Identificação taxonômica e molecular**

As amostras de água da lagoa de maturação da ETE CPA III foram analisadas por microscopia e verificou-se a dominância de uma espécie de cianobactéria, identificada por métodos morfológicos e moleculares e

definida como *Planktothrix pseudagardhii*, cuja classificação científica está descrita na tabela 7:

**Tabela 7: Classificação taxonômica da espécie predominante identificada**

<b>Domínio</b>	<i>Prokaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Eubacteria</i>
<b>Sub-reino</b>	<i>Negibacteria</i>
<b>Filo</b>	<i>Cyanobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Cyanophyceae</i>
<b>Subclasse</b>	<i>Oscillatoriophyceae</i>
<b>Ordem</b>	<i>Oscillatoriales</i>
<b>Família</b>	<i>Phormidiaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Phormidioideae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Planktothrix</i>
<b>Espécie</b>	<i>P. pseudagardhii</i>

**Fonte: Bicudo e Menezes (2006); Hoffman et al. (2005).**

Os ambientes de água doce do Brasil, especialmente aqueles que comportam enormes quantidades de nutrientes, podem propiciar o crescimento das espécies de *Planktothrix*. Entretanto, trabalhos dedicados exclusivamente aos estudos desse gênero ainda são escassos no Brasil e a maioria das informações é proveniente de levantamentos de floras regionais e de listagem de espécies (SILVA, 2009). Por se tratar de uma lagoa de tratamento de efluente doméstico, onde há nutrientes disponíveis em abundância (RAWAT et al., 2011), justifica-se encontrar nesse local este gênero de cianobactéria, que possui características de crescimento heterotrófico e capacidade de sobreviver em anaerobiose.

O gênero *Planktothrix* Anagnostidis & Komárek (1988) foi originalmente classificado como *Oscillatoria*, devido às características similares, como tricomas sem bainhas e solitários. No entanto, há vesículas gasosas localizadas irregularmente dentro de todo o volume celular e seu

tipo de vida planctônica é específica. Com tais características, o gênero *Planktothrix* foi desmembrado do gênero *Oscillatoria* em respeito a ultraestrutura, estratégia de vida diferente e aparência fenotípica (SILVA, 2009).

Esta separação também foi comprovada mediante sequenciamento molecular (SUDA et al., 2002). Mesmo o gênero *Planktothrix* sendo satisfatoriamente caracterizado e delimitado por fenótipo, ultraestrutura e, principalmente, por critérios genéticos, a sua diversidade intergenérica (relevante para estudos ecológicos, como eutrofização de reservatórios de água e toxicidade) é complicada, e a classificação no nível específico, igualmente difícil (KOMÁREK E KOMÁRKOVÁ, 2004).

Em vista disso, foi realizada a técnica de identificação molecular para complementar a identificação taxonômica, que descreve as características fenotípicas convencionais e identificou a espécie dominante como *Planktothrix agardhii*. Partindo de uma amostra de água do local de estudo, foram feitos cultivos, isolando-se a cianobactéria predominante. Após obtenção de quantidade suficiente de células cultivadas, o material genético foi extraído e quantificado para amplificação, sequenciamento e classificação filogenética. As sequências obtidas foram comparadas com outras existentes no GenBank através do programa Blast®. Houve similaridade de 99% com *Planktothrix pseudagardhii*.

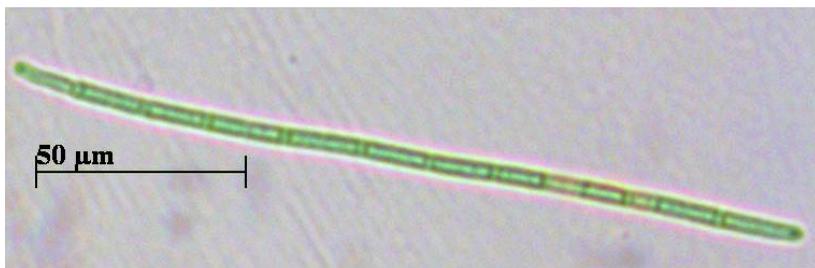
Autores como Suda et al (2002) consideram *P. pseudagardhii* sinonímia de *P. agardhii* que, embora pareça ser distinta de espécies próximas do ponto de vista filogenético, é muito difícil ser diferenciada morfológicamente, havendo sobreposição de informações sobre a espécie (KOMÁREK 2003, KOMÁREK E KOMÁRKOVÁ 2004). Outro estudo considera que *Planktothrix agardhii* e *Planktothrix pseudagardhii* são espécies crípticas, isto é, são espécies que divergem em aspectos genéticos e bioquímicos, mas são idênticas morfológicamente (LIN et al., 2010). No entanto, foi demonstrado pela análise molecular que a espécie

estudada tratava-se de *P. pseudogardhii*, devido à alta homologia entre as sequências.

As informações mais frequentes para a taxonomia microbiana estão relacionadas com o gene ribossomal 16S, portanto através deste marcador a caracterização molecular foi realizada. A amplificação realizada se deu por meio de um segmento de um espaçador intergênico entre as regiões 16S-23S e um pequeno fragmento do gene 23S. Como a amostra tratava-se de um procaríoto, algumas vezes o processo de amplificação que utiliza os "primers" citados pode copiar também fragmentos de DNA de outros contaminantes bacterianos.

Quando a clonagem é feita, a partir do produto de PCR, um único fragmento gênico dos DNAs amplificados vai se ligar ao cromossomo de uma única bactéria modificada. Dessa forma, isola-se um único fragmento de DNA em uma única célula, que quando se multiplica, reproduz o inserto de DNA em todas suas células-filhas. Quando várias divisões ocorrerem, será formada uma colônia em que todas as células terão o inserto. A partir das colônias, amplifica-se novamente o DNA, mas agora seguramente constituído por um único tipo, e depois o inserto é extraído. Essa técnica produz posteriormente sequências mais puras com melhor qualidade, pois elimina a possibilidade de haver mais de um DNA na amostra.

O comprimento dos filamentos de *Planktothrix pseudogardhii* (figura 18) variou de 13 µm a 390 µm e a sua largura variou 3,5 a 5,0 µm. O mês de fevereiro apresentou o filamento mais longo com 390 µm e os meses de março e abril os filamentos mais curto (13 µm de comprimento). Os tricomas eram solitários, retos, não constrictos, gradualmente atenuados, apresentando células isodiamétricas ou mais curtas que largas com células apicais variando entre 4 - 5 µm de diâmetro e 2,5-4,2 µm de comprimento.



**Figura 18: *Planktothrix pseudagardhii* cultivada em laboratório**

A dinâmica sazonal do fitoplâncton evidenciou que além da dominância de *Planktothrix pseudagardhii*, houve ocorrência de *Phacus longicauda* (188 indivíduos/ml) e *Phacus tortus* (628 indivíduos/ml) no início das chuvas (outubro) e ocorrência de *Microcystis aeruginosa* (20.125 indivíduos/ml) no período de seca (agosto).

A densidade de *Planktothrix pseudagardhii* na lagoa variou de 1.194 filamentos a 31.446 filamentos por mL. No período de seca (julho a agosto) ocorreu a maior densidade com registro de 31.446 filamentos por mL, seguido pelas amostras coletadas no início das chuvas (outubro) com 16.163 filamentos por mL. No período de chuvas houve uma variação de 1.194 a 8.113 filamentos por mL (fevereiro a março), neste período houve duas coletas em fevereiro e uma coleta no mês de março.

As principais variações morfológicas encontrada nos filamentos foram observadas na porção terminal, como presença ou ausência de calyptra e presença ou ausência dos aerótopos (vesículas gasosas). Dentre as diferenças morfológicas, a hormogonia, foi evidente em todo o período estudado, os filamentos eram curtos, simétricos e às vezes assimétricos, podendo apresentar aerótopos ou não.

A presença de aerótopos foi observada em filamentos com formas e tamanhos variados, também evidentes em todos os meses de coleta, a coloração escura e mais brilhante foi observada no período de seca (agosto) e nas chuvas (março). A caliptra foi observada apenas nos meses de julho e agosto (seca).

#### 6.4. Análise da composição celular da biomassa e riqueza nutricional das águas residuais

Na tabela 8, apresenta-se o resultado dos ensaios físico-químicos para quantificação das principais macromoléculas constituinte da biomassa microalgal, com dominância de *Planktothrix pseudagardhii* recolhida da ETE CPAIII.

**Tabela 8: Porcentagem das principais macromoléculas constituintes da biomassa algal**

Composição	%
Proteínas	65,9
Lipídeos totais	1,1
Carboidratos totais	10,1

Observa-se que a amostra estuda apresenta baixo teor de lipídeos totais (tabela 8). Os valores mínimos deste parâmetro são observados em algas azuis (por exemplo, representantes dos gêneros *Anabaena* e *Oscillatoria* cerca de 2%, em *Spirulina* - 6-7%), e os valores máximos em diatomáceas, entre 35 a 44% de óleo (BASOVA, 2005).

Alguns autores relatam que o baixo teor de lipídeos acumulado pode ser explicado pelo provimento de nitrogênio e fósforo abundante nos meios (artificiais ou águas residuais) onde se desenvolvem as microalgas (MENG et al., 2009). A presença de nitrogênio propicia um aumento na concentração de proteínas e a concentração de fósforo ocasiona a formação de fosfolipídios (PENTEADO, 2010).

Opostamente, tem-se um aumento do estresse fisiológico quando a concentração desses nutrientes diminui no meio, alterando o metabolismo das microalgas. Nessa condição, os processos metabólicos são modificados para preparar a célula para o período de escassez, produzindo lipídeos de reserva (BEARDALL; YOUNG; ROBERTS, 2001).

A limitação de fósforo parece favorecer a metabolização de lipídeos de interesse como os triglicérides saturados e lipídeos neutros, o que seria interessante na produção de biodiesel (SIRÓN; GIUSTI; BERLAND, 1989). Outros fatores podem influenciar consideravelmente o teor e a composição de lipídeos das microalgas e cianobactérias, tais como a intensidade de luz, CO<sub>2</sub> e temperatura (TAHER et al., 2011).

Na tabela 9, pode-se observar pelo resultado obtido que a água da lagoa de maturação II da ETE CPA III, onde ocorreram as coletas de biomassa, possui grande quantidade de nitrogênio e fósforo, que influenciam na composição celular das microalgas.

**Tabela 9: Parâmetros físico-químicos da lagoa de maturação II da ETE CPA III.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Limite de detecção mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>Resultado mg.L<sup>-1</sup></b>
Nitrato	0,010	0,582
Nitrito	0,001	0,680
Nitrogênio Amoniacal	0,010	10,160
Nitrogênio Kjeldahl	0,010	17,100
Nitrogênio Total	0,021	18,362
Ortofosfato	0,010	0,050
Fósforo	0,010	9,720

Na lagoa de maturação II, onde o tratamento do efluente é complementado, o nível de fósforo total encontra-se dentro dos limites estabelecidos para esgoto doméstico bruto (4 – 12 mg/L), sendo que nesta etapa o esgoto já está parcialmente tratado (PROSAB, 2009). O resultado deste ensaio pontual demonstra que o local estudado recebe grande aporte dos nutrientes nitrogênio e fósforo, ou seja, as microalgas estão num ambiente em que não sofrem estresse fisiológico, explicando o baixo teor de lipídeos da biomassa e o grande teor de proteínas totais (tabela 8).

Portanto, a biomassa coletada composta predominantemente da espécie identificada como *Planktothrix pseudagardhii* parece não ser tão interessante para produção de biodiesel por ter demonstrado baixo acúmulo celular de lipídeos.

No entanto, há estudos indicando que a biomassa de microalgas podem ser empregadas na produção de etanol, fertilizantes e outros coprodutos (MIRANDA, 2011; DERNER et al., 2006; VIÉGAS, 2010; KHAN et al., 2009; U.S. DOE, 2010, MULBRY et al., 2008).

Além disso, a retirada de biomassa de um local onde ela já esteja disponível naturalmente, como nas lagoas das estações de tratamento de efluentes domésticos, pode aprimorar o sistema de tratamento, pois pode diminuir a sedimentação de biomassa, a produção de lodo e o odor desagradável da região que circunda a ETE. A remoção da biomassa das ETEs melhora a qualidade da água que é despejada nos corpos d'água receptores de efluentes, já que promovem a remoção de nutrientes eutrofizadores.

### **6.5. Extração de lipídeos**

A extração dos lipídeos foi realizada utilizando-se três metodologias, com biomassa seca em estufa, liofilizada e úmida, a fim de avaliar qual resulta em maior rendimento quanto à produção de óleos (tabela 10). Os métodos que apresentaram melhores rendimentos quanto a extração de lipídeos foram com a biomassa liofilizada e seca conforme método descrito por Folch et al. adaptado por Pescador Zys, 2014.

**Tabela 10: Metodologias de secagem e extração avaliadas.**

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Método de extração</b>	<b>Massa utilizada (g)</b>	<b>Óleo (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Liofilizada	Bligh and Dyer	25	30,5	0,121
Biomassa úmida	Bligh and Dyer	166*	32,1	0,128
Seca em estufa	Bligh and Dyer	25	31,2	0,125
Seca em estufa	Soxhlet	25	33	0,132
Liofilizada	Soxhlet	25	27	0,108
Liofilizada	Folch	25	92,3	0,369
Seca em estufa	Folch	25	91,7	0,369

**\*Equivalente a 25 g biomassa seca.**

Os menores resultados encontrados para as extrações foram as realizadas com n-hexano, indicando que a quantidade de componentes lipídicos apolares como triacilgliceróis na amostra é baixa, evidenciando que lipídeos da amostra estão na forma de lipídeos polares, o que também pode observado em outras espécies de microalgas (BASOVA, 2005).

A extração com a biomassa úmida apresentou resultado similar aos métodos de Bligh & Dyer e Soxhlet utilizando biomassa seca em estufa e liofilizada. O método de Soxhlet não foi testado com biomassa úmida pois não haveria interação entre o solvente (hexano) e a biomassa, por esta conter água. Portanto, o método de Folch et al. modificado por Pescador Zys (2014) foi escolhido para a extração dos lipídeos por apresentar melhor rendimento. A desidratação em estufa foi escolhida por ser mais rápida e econômica quanto a liofilização.

O método original desenvolvido por Folch et al. (1957) utilizava uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1 v/v), seguida pela adição de solução salina de KCl ou outro sal apropriado, tendo em vista que essa técnica foi desenvolvida para extração de lipídeos de tecidos que naturalmente contém água em sua composição. A etapa em que é adicionada a solução salina não foi utilizada no método modificado, pois se constatou que a adição de água prejudicava o processo de extração e dificultava a repetição do procedimento com a biomassa recuperada. A etapa de disruptura celular utilizando disruptor celular tipo Mini Bead-beater e ultrassonicação também foi incluída. Após essas alterações no protocolo original obteve-se maior rendimento do óleo extraído.

### **6.6. Transesterificação**

Foram esterificados via catálise ácida os óleos extraídos de duas amostras distintas, uma a partir de biomassa coletada no período de estiagem e outra no período chuvoso. Óleo bruto de microalgas geralmente apresenta alto índice de acidez, portanto a catálise básica, embora seja mais rápida, não é recomendada para a transesterificação desse tipo de óleo (FUKUDA et al., 2001; WU et al., 2006). No presente trabalho não foi possível determinar experimentalmente o índice de acidez devido à pequena quantidade de óleo extraído e, portanto, foi utilizada a catálise ácida.

### **6.7. Determinação do teor de éster**

Posteriormente à esterificação dos óleos, foi realizada a determinação da composição dos ésteres metílicos por cromatografia gasosa. O objetivo era identificar os principais ácidos graxos das frações extraídas e verificar se houve variações dos mesmos. Em geral, não houve diferença entre o perfil graxo obtido das frações extraídas da amostra do período chuvoso e seco (Tabela 11, figura 19 e 20), apesar de haver variação na quantidade de biomassa coletada. A percentagem de cada ácido graxo também foi similar.

**Tabela 11: Perfil graxo dos lipídeos esterificados obtidos de biomassa coletada em período chuvoso e de estiagem.**

<b>Éster metílico</b>	<b>Tempo de retenção (min.)</b>	<b>Chuvoso (% m/m)</b>	<b>Estiagem (% m/m)</b>
C6:0 capríco	6,157	0,05	< L.D.
C8:0 caprílico	9,251	0,08	< L.D.
C10:0 cáprico	12,139	1,06	0,690
C11:0 undecanóico	13,139	84,49	69,984
C12:0 láurico	14,745	0,22	0,103
C13:0 tridecanóico	15,948	0,23	0,058
C14:0 mirístico	17,154	0,35	0,966
C14:1 miristoleico	17,630	0,22	0,433
C15:0 pentadecanóico	18,391	0,11	0,305
C15:1 pentadecenóico	18,899	0,23	0,065
C16:0 palmítico	19,699	1,17	7,178
C16:1 palmitoleico	20,075	0,83	n.d.
C17:0 heptadecanóico	21,043	< L.D.	0,252
C17:1 heptacenóico	21,449	0,05	< L.D.
C18:0 esteárico	22,458	0,13	0,349
C18:1 oleico	22,796	0,44	0,774
C18:2 linoleico	23,477	0,10	0,116
C18:3 linolênico	24,453	0,15	0,208
Não identificado	-	10,31	18,519
Total	-	100	100

< L. D.: menor que o limite de detecção.

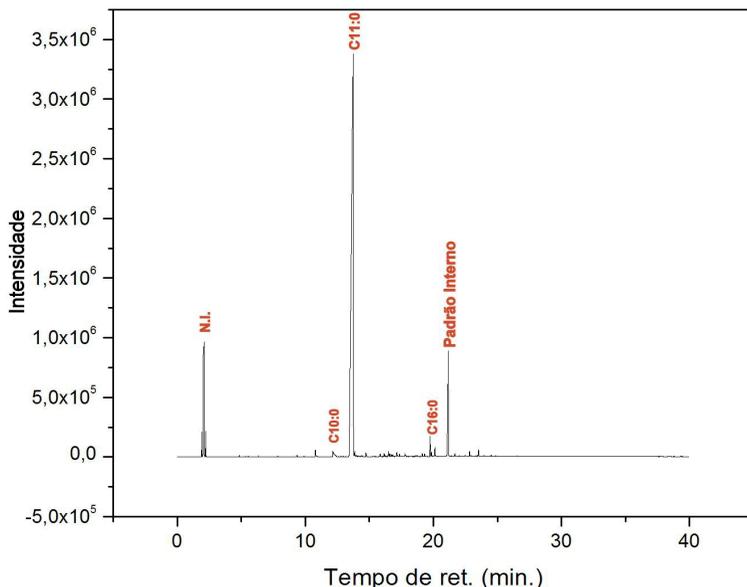


Figura 19: Cromatograma referente a amostra do período chuvoso

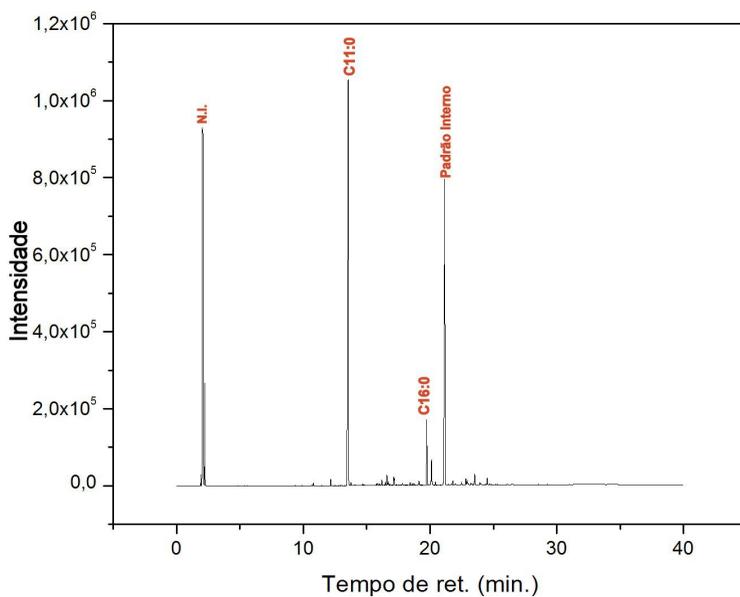


Figura 20: Cromatograma referente a amostra do período de estiagem.

Supõe-se que o componente não identificado nos dois ensaios corresponda a óleo que não foi convertido em metil éster. Assim estimou-se que a taxa de conversão para a amostra do período chuvoso foi de 89,69 % e de 81,48 % para a amostra do período de estiagem. O teor de ésteres metílicos no biodiesel é um parâmetro previsto na norma EN 14214 e na RANP 07/2008, cuja porcentagem mínima exigida de éster é de 96,5% em massa, a ser determinada através do método cromatográfico EN ISO 14103. A massa do éster é obtida através da comparação da área total dos picos correspondentes com a área do pico heptadecanoato de metila, utilizado como referência (LÔBO et al., 2009).

A norma EN 14103 determina a quantificação de C14 até C24, contudo, para este experimento realizou-se a quantificação a partir do C6, pois os ésteres metílicos foram obtidos através da transesterificação do óleo extraído de cianobactérias (*Planktothrix pseudagardhii*), matéria-prima não tradicional.

O principal ácido graxo identificado foi o undecanóico (C11:0), além de menores percentagens do cáprico (C10:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Segundo Lôbo et al. (2009), a densidade do biodiesel está diretamente ligada à estrutura das suas moléculas. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica do alquiléster, maior será a densidade. No entanto, este valor decrescerá quanto maior for o número de insaturações presentes na molécula. Portanto, pelo fato do ácido undecanóico ser considerado de cadeia média, o biodiesel produzido apresenta menor densidade.

A porcentagem de ésteres metílicos polinsaturados correspondeu a 2,02% e 1,59%, para a amostra do período chuvoso e do período de estiagem, respectivamente. As amostras não apresentaram ésteres metílicos com mais de três insaturações. A norma européia EN 14214 estabelece o controle da concentração de ésteres polinsaturados no biodiesel, devido a sua propensão à oxidação, fixando um valor máximo de

12% (massa) para o linolenato de metila e 1% (massa) para ésteres metílicos com mais de três insaturações (LÓBO et al., 2009; DABDOUB et al., 2009).

Como a matéria-prima dos óleos não é pura e provém de uma lagoa de estação de tratamento de efluentes, pode haver contaminantes que possam ter interferido na composição de lipídeos. Comparando o perfil de ácidos graxos encontrados para a espécie estudada com outros gêneros de microalgas, notou-se ser comum detectar o ácido graxo C11:0, porém em concentrações muito menores (FRANCISCO, 2010; RÓS, 2012; HU et al., 2008).

Para uma melhor avaliação do biodiesel obtido a partir espécie *Planktothrix pseudagardhii*, outros parâmetros estabelecidos pelas normas de qualidade ASTM 6751 D, EN 14214, ANP 07/2008 devem ser investigados. Portanto, analisar a composição química detalhada do óleo ou gordura, independente de sua origem, é muito importante porque a qualidade (características físicas e químicas) do biodiesel obtido é função direta da composição química do óleo ou gordura usado.

Não foram encontrados na literatura trabalhos similares a este, que avaliou a espécie *Planktothrix pseudagardhii* para a extração de óleos visando a produção de biodiesel e a análise do perfil lipídico, portanto não há como fazer uma comparação com outros estudos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de filtração desenvolvido neste trabalho mostrou-se eficiente e pouco dispendioso em comparação com os métodos convencionais de recuperação de biomassa de microalgas para a produção de biodiesel e outros produtos. Futuros estudos podem ser desenvolvidos para melhorar e adaptar o sistema para a concentração de biomassa microalgal em escala industrial.

A metodologia para a extração de lipídeos mais apropriada para a amostra estudada foi a de Folch et al., adaptada por Pescador Zys, 2014, e o método de secagem de biomassa mais rápido e com menor custo foi a secagem em estufa.

A espécie dominante na lagoa estudada, *Planktothrix pseudagardhii* apresentou biomassa com baixo teor de lipídeos (aproximadamente 1%), desestimulando uma possível exploração comercial em termos de produção de biodiesel, devido ao alto custo para produção de um único produto.

A viabilidade produtiva de outros coprodutos, como fertilizantes e etanol, também pode ser interessante devido à alta concentração de carboidratos e proteínas da espécie de alga dominante no local estudado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGREN, Goran I. The C: N: P stoichiometry of autotrophs – theory and observations. **Ecology Letters**, n.7, p.185–191, 2004.

ALGAE BIOTECNOLOGIA LTDA. <<http://www.algae.com.br/algae>>. Acessado em 20-01-2013.

APHA, **AWWA, WPCF Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington D.C.: American Public Health Association. 2005.

BABEL, S.; TAKIZAWA, S.; OZAKI, H. Factors affecting seasonal variation of membrane filtration resistance caused by *Chlorella* algae. **Water Research**, v. 36, n. 5, 1193-1202, 2002.

BASOVA, M.M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v 7, p. 33, 2005.

BEARDALL, J.; YOUNG, E.; ROBERTS, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, v. 63, p. 44-69, 2001.

BELLINGER, E. G.; SIGEE, D. C. **Freshwater algae** - identification and use as bioindicators. Great Britain: Wiley-Blackwell, 285 p., 2010.

BENEMANN, J.R.; PURSOFF, P.; OSWALD, W.J. Engineering Design and Cost Analysis of a Large-Scale Microalgae Biomass System. Final Report to the US Energy Department, NTIS# H CP/ T, 1605(UC-61), 91, 1978 in **U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, DOE**. National Algal Biofuels Technology Roadmap. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. Segunda edição, RiMa, São Carlos, 502p., 2006.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; CAN. **Journal Biochemistry Physiology**. 1959, 37, 911. *In*: Brum, A. A. S; Lia Ferraz de Arruda, L. F.; Regitano-d'Arce, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v.32, n.4, p.849-854, 2009.

BRASIL. Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Disponível em: <[www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br)>. Acesso em: 12-06-2012a.

BRASIL. **Ministério de Ciência e Tecnologia**. Portaria MCT nº 702, de 30 de outubro de 2002. Disponível em <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/14600.html>>, Acessado em: 17-11-2012b.

BRASIL. Medida Provisória n. 647 , de 28 de maio de 2014. Dispõe da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2014. Seção 1, p. 1. Disponível em <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=16/07/2014&jornal=1&pagina=1>>, Acessado em 29-10-2014a

BRASIL. **Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP)**. Disponível em: <[www.anp.gov.br/?dw=8740](http://www.anp.gov.br/?dw=8740)>, Acessado em 29-10-2014b

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRUM, Aelson Aloir Santana; ARRUDA, Lia Ferraz de; REGITANO-D'ARCE; Marisa Aparecida Bismara. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CARDOSO, A. S. **Avaliação do potencial das microalgas residuais como uma alternativa à cadeia produtiva do biodiesel.** Disponível em: <[http://memoria.cnpq.br/premios/2010/pjc/docs/3lugar\\_superior.pdf](http://memoria.cnpq.br/premios/2010/pjc/docs/3lugar_superior.pdf)>. Acessado em: 01-07-2012.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. ZAGATTO, P.A.; ARAGÃO, M.A. **Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas.** São Paulo. Relatório Técnico. 23p.,1992.

CHEN, C-Y.; YEH, K-L.; AISYAH, R.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.

CHENG, J.; YU, T.; LI, T.; ZHOU, J.; CEN, K. Using wet microalgae for direct biodiesel production via microwave irradiation. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 531–535, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25, n. 3, p.294-306, 2007

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DALL' OGLIO, E. L.; SOUZA JR, P. T.; OLIVEIRA, P. T. J.; VASCONCELOS, L. G.; PARIZOTTO, C. A.; KUHNEN, C. A. Use of Heterogeneous Catalysts in Methylic Biodiesel Production Induced by Microwave Irradiation. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 411-417, 2014.

DALL' OGLIO, E. L.; SOUSA JÚNIOR, P. T. **Os programas brasileiros de biocombustíveis uma discussão concisa.** Curso MBA, 2007.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, n. 1, p.1–18, 2007

DEMIRBAS, A. **Biofuels Securing the Planet's Future Energy Needs**. Green Energy and Technology. Ed. Springer, p. 158-162, 2008.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DESTRO, C. A. M.; AMORIM, R. **Avaliação do desempenho do sistema de Lagoas de Estabilização do Bairro CPA III em Cuiabá/MT, a partir de variáveis físico-químicas e biológicas**. I Simpósio de Recursos Hídricos do Norte e Centro-Oeste. A Busca pelo Uso Sustentável dos Recursos Hídricos das Regiões Norte e Centro-Oeste, Cuiabá – MT, 2007.

DINIS, A.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. O tratamento de águas residuais: O papel das microalgas, Universidade do Porto, 2004. doi:10.4061/2011/468292. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/er/2011>. Acesso em: 12 de jun. 2012.

EUROPEAN BIODIESEL BOARD, EBB. Disponível em: <<http://www.ebb-eu.org/stats.php>> Acessado em 16-11-2012.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. **Journal Biological Chemistry**, v. 226, n.1, p.497-509, 1957.

FRANCISCO, Erika Cristina. **Biofixação de dióxido de carbono por microalgas acumuladoras de materiais graxos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H.; Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405, 2001.

GARCIA, Camila Martins. **Transesterificação de óleos vegetais**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Campinas, 2006.

GERIS, R.; SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de Soja – Reação de Transesterificação Para Aulas Práticas de Química Orgânica. **Química. Nova**, Vol. 30, n. 5, 1369-1373, 2007.

GODOS, I. de; GUZMAN, H. O.; SOTO, R.; GARCIA-ENCINA, P. A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R.; VARGAS, V. A. Coagulation/flocculation-based removal of algal-bacterial biomass from piggery wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, 923-927, 2010.

GOOGLE MAPS. Disponível em: < <https://maps.google.com.br/>>. Acessado em: 11-07-2012.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. *Consed*: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MEDINA, R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491–515, 2003.

GUDIN, C.; C. THERPENIER. "Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae." **Advances in biotechnological processes**, v.6, p. 73-110, 1986.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KASTOVSKÝ, J. System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) – state in 2004. **Algological Studies**, v. 117,95-115, 2005.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v.54, n. 4, p.621–639, 2008.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**.  
<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisclimatologicas>.  
Acesso em: 17-03-2014.

JOHNSON, M.B.; WEN, Z. Production of Biodiesel Fuel from the Microalga *Schizochytrium limacinum* by Direct Transesterification of Algal Biomass. **Energy Fuels**, v.23, n.10, p.5179–5183, 2009.

KHAN, S. A.; RASHMI.; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U.C. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.13, n.9, p.2361–2372, 2009.

KOMÁREK, J. Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In: J. D. Wehr & R. G. Sheath (eds.). *Freshwater algae of North America: Ecology and Classification*. **Elsevier Science (USA)**, 918 p., 2003.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprocaryota 2: Oscillatoriales. In B. Büdel, L.Krienitz, G. Gardner & M. Schagerl (eds.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa* Elsevier, **Spektrum Akademischer Verlag**, 2005.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Taxonomic review of the cyanoprocaryotoc genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. **Czech Phycology**, Olomouc, v. 4, n. 1, 1-18, 2004.

LEE, R. E. **Phycology**. Second ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645p.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v.24, n.4, p.815-820, 2008.

LIN, S.; LI, R.; YU, B.; ZHU, M.; YU, G.; WUA, Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. **Harmful Algae**, v. 9, n.1, p. 87-97, 2010.

LÔBO, I. p.; FERREIRA., S. L. C. Biodiesel: Parâmetros de Qualidade e Métodos Analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPES, D. E.; SUWANNAKARN, D. A. B.; GOODWIN, J. G. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, n. 14, p. 5353-5363, 2005.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.14, n.1, p217–232, 2010.

MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, n.3, p. 248–268, 2006.

MEIER, R.L. Biological cycles in the transformation of solar energy into useful fuels. *Solar Energy Research*, p. 179–183 1955 in **U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, DOE**. National Algal Biofuels Technology Roadmap. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010.

MENG, X; YANG, J.; XU, X; ZHANG, L; NIE, Q.; XIAN, M.; Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MIRANDA, J. R. P. C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologia Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Universidade Nova de Lisboa, 2011.

MORCELLI, A. **Estudo da eficiência de diferentes agentes coagulantes na sedimentação de microalgas cultivadas em fotobioreatores.**

Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/36898/000793008.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 23 ago. 2012.

MOSTAFA, S.S.M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 4, n.1, p. 56-65, 2012.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 2, n. 3, p. 639-648, 2009.

MULBRY, W. et al. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8137-8142, 2008.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, n. 15, p. 2799 – 2815. 2008

NEILAN, B.A., JACOBS, J., DEL DOT, T., BLACKALL, L.L., HAWKINS, P.R. COX, P.T.; GOODMAN, A.E. rDNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 693-697, 1997.

NÜBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; MUYZER, G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3327-3332, 1997.

OILGAE. Disponível em: <<http://www.oilgae.com/algae/cult/pbr/pbr.html>>. Acesso em: 18-06-2012.

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. **Trans American Society Civil Engineer**, v. 122, p 73–105, 1957.

OSWALD, W.J.; GOLUEKE, C.G. Biological transformation of solar energy. *Adv. Appl. Microbiol.*, n.11, p. 223–242, 1960 in **U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, DOE**. National Algal Biofuels Technology Roadmap. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010.

PALMER, C. M. **Algae and water pollution**. Cincinnati, Ohio, 1977.

PARKER, P.L., VAN BAALEN, C., MAURER, L. Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. *Science*, v. 155, p. 707–708, 1967.

PATIL, V.; TRAN, K-Q.; GISELRØD, H.R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Science*, v. 9, n. 7, p. 1188-1195, 2008.

PENTEADO, D. M. R. **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* para produção de lipídios**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba/PR, 2010.

PERPÉTUO, L.; PERPÉTUO, N.; GUIMARÃES, J.; AMARAL, R.; SANTOS, M.F.; SANTOS, L.M.A. **Colheita, identificação e conservação de microalgas**. Algoteca de Coimbra, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2011.

PROSAB. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico. MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. (org.). **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. v. 2, 424p, Rio de Janeiro: ABES, 2009.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.

RODRIGUES, V. **Desenvolvimento de nova tecnologia para produção de biodiesel em meio ácido com indução por micro-ondas**. Dissertação

(Mestrado em Física e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá – MT, 2008.

RÓS, P.C.M. **Avaliação de Óleos de Cianobactérias como Matéria-Prima Lipídica para Síntese de Biodiesel pela Rota Etílica**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2012

ROSSIGNOL, N.; VANDANJON, L.; JAOUEN, P.; QUÉMÉNEUR, F. (1999). Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. **Aquacultural Engineering**, v. 20, n. 3, 191-208, 1999.

RUSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia), Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. Cold Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SATISH, A.; SIMS, R. C. Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure. **Bioresource Technology**, v 118, p. 643–647, 2012.

SILVA, D. **Revisão do gênero *Planktothrix Anagnostidis & Komarek, 1988 (Cyanobacteria/ Oscillatoriales)*, no Brasil**. Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

SIRÓN, Robert; GIUSTI, Gérard; BERLAND, Brigitte. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. **Marine Ecology Progress Series**, v. 55, p. 95-100, 1989.

SOLAZYME. Disponível em <<http://solazyme.com/pt-br/combustiveis>>. Acessado em 20-01-2013.

SOLDATELLI, Volnei Flávio. **Avaliação da comunidade Fitoplanctônica em Lagoas de Estabilização Utilizadas no Tratamento de Efluentes Domésticos – Estudo de Caso – ETE – UCS**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2007

SRIRAM, S.; SEENIVASAN, R. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v.3, n. 2, p.9- 13, 2012.

SUAREZ, P.A. Z.; MENEGHETTI, S.M. P. 70º Aniversário do Biodiesel em 2007: Evolução Histórica e Situação Atual no Brasil. **Química Nova**, v.30, n.8, São Paulo: 2007.

SUDA, S.; WATANABE, M.M.; OTSUKA, S.; MAHAKAHANT, A.; YONGMANITCHA, W.; NOPARTNARAPORN, N.; LIU, Y.; DAY, J. G. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1577–1595, 2002.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. M. A Review of Enzymatic Transesterification of Microalgal Oil-Based Biodiesel Using Supercritical Technology. **Enzyme Research**, v. 2011, Article ID 468292, 25 pages, 2011.

TATON, A.; GRUBISIC, S.; ERTZ, D.; HODGSON, D.A.; PICCARDI, R.; BIONDI, N.; TREDICI, M.R.; MAININI, M.; LOSI, D.; MARINELLI, F.; WILMOTTE, A. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. **Journal of Phycology**, v 42, n. 6, p. 1257-1270, 2006.

U.S ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION, EIA. **Biodiesel Production Capacity and Production**. Disponível em: <<http://www.eia.gov/biofuels/biodiesel/production/table1.pdf>> Acessado em 16-11-2012.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, DOE. **National Algal Biofuels Technology Roadmap**. Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE. **UFRN e Petrobras inauguram projeto de Biodiesel**. Portal UFRN, abr. 2012. Disponível em: <<http://www.sistemas.ufrn.br/portalufrn/PT/noticia/7706042>>. Acessado em 27-02-2013.

VASCONCELOS, L. G. **Produção De Biodiesel Etilico Em Meio Ácido Induzido Por Micro-Ondas (2,45 GHz) Em Reator De Escala Piloto**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal De Santa Catarina, 2011.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J.; Optimisation of integrated biodiesel production.Part I. A study of the biodiesel purity and yield. **Bioresource Technology**, v. 98, n.8, p. 1724 -1733, 2007.

VIÊGAS, Carolina Vieira. **Extração e Caracterização dos Lipódeos da Microalga Chlorella pyrenoidosa Visando à Produção de Ésteres Graxos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, 2010.

VIMALARASAN, A.; PRATEEBA, N.; ASHOKKUMAR, B.; SIVAKUMAR, N.; VARALAKSHMI, P. Production of biodiesel from cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) by alkali and enzyme mediated transesterification. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.70, p.959-967, 2011.

VOGEL, A.I. et al. **Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, p.164 -165, 1996.

VON SPERLING, M. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias**. V. 2. Princípios básicos do tratamento de esgotos, 211 p .DESA/UFMG, Belo Horizonte, 1996b.

VON SPERLING, M. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias**. V. 3. **Lagoas de estabilização**, 196 p. DESA/UFMG, Belo Horizonte, 1996a.

WAHLEN, B.D.; WILLIS, R.M.; SEEFELDT, L.C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v.102, n.3, p. 2724–2730, 2011.

WANG, Bei. Li, Yanqun; Wu, Nan; Lan, Christopher Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, n. 5, p.707–718, 2008.

WEN, Z-Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 4, p. 273-294, 2003.

WU, Qingyu; XU, Han; MIAO, Xiaoling. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126 p. 499–507, 2006.

ZHU, M.; ZHOU, P. P.; YU, L.J.; Extraction of lipids from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal lipids. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 93-95, 2002.