



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**BIOMASSA DE MICROALGAS DE UMA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO
FACULTATIVA: CARACTERIZAÇÃO E USO PARA A OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEL**

Mestrando: ADERLÂNIO DA SILVA CARDOSO

Orientadora: Dra. Glaucia Eliza Gama Vieira

**PALMAS – TO
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA**

**BIOMASSA DE MICROALGAS DE UMA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO
FACULTATIVA: CARACTERIZAÇÃO E USO PARA A OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEL**

Mestrando: Aderlânio da Silva Cardoso

Orientadora: Glauca Eliza Gama Vieira

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Agroenergia da Universidade
Federal do Tocantins como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Agroenergia (Tecnologias de
Transformação).**

**PALMAS – TO
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Palmas

C628b Cardoso, Aderlânio da Silva
 Biomassa de microalgas de uma lagoa de estabilização facultativa:
 caracterização e uso para a obtenção de bicomcombustível / Aderlânio da
 Silva Cardoso. - Palmas, 2013.
 104 f.

 Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins,
 Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, 2013.
 Linha de pesquisa: Tecnologias de Transformação.
 Orientador: Prof. Dra. Gláucia Eliza Gama Vieira.

 1. Esgoto. 2. Microalgas. 3. Biocombustível. I. Vieira, Gláucia Eliza
 Gama. II. Universidade Federal do Tocantins. III. Título.

CDD 628.2

Bibliotecária: Emanuele Santos

CRB-2 / 1309

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

**BIOMASSA DE MICROALGAS DE UMA LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO
FACULTATIVA: CARACTERIZAÇÃO E USO PARA A OBTENÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEL**


MESTRANDO: Aderlânio da Silva Cardoso

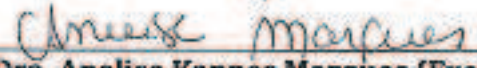
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:


Dra. Glaucia Eliza Gama Vieira

Examinadores:


Dr. Sergio Donizeti Ascencio (Examinador Interno)


Dra. Anelise Kappes Marques (Examinadora Externa - UFT)


Dr. Erieli Colicchio (Examinador Interno)

Data da Defesa: 22 / 02 / 2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da Dissertação foram contempladas


(GLAUCIA ELIZA GAMA VIEIRA)

DEDICATÓRIA

A toda a minha família e amigos, dedico este trabalho, por toda a ajuda e confiança em mim depositados, pois no contrário eu não teria atingido mais essa meta em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades e por sempre estar presente em minha vida, fazendo com que eu consiga obter meus objetivos sem deixar de ser uma pessoa cujos princípios vão de acordo com os Seus ensinamentos;

A toda a minha família que, apesar do pouco que tem, sempre batalhou e não mediu esforços para que eu conseguisse estudar e me tornar a pessoa que sou hoje;

Agradeço a todos os meus amigos, principalmente os que conquistei em Palmas-TO: Nataly Benício, Radson Lima e Liliane Carvalho. Muito obrigado por todos os ensinamentos transmitidos e companheirismo. Aprendi muito com vocês;

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dra. Gláucia Eliza Gama Vieira por todas as oportunidades oferecidas, pela grande ajuda, paciência e orientação durante esses quase 6 anos em que fiz parte do Laboratório LEDBIO, onde aproveitei todas as oportunidades oferecidas e sempre busquei retribuir a confiança em mim depositada procurando sempre realizar um ótimo trabalho, fazer a diferença;

Agradeço a todos que fazem e fizeram parte do Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento em Biomassa e Biocombustível – LEDBIO e que sempre estiveram dispostos a me ajudar: Evandro Reina, Wesley Mafra, Fernanda Rêgo, Gerso Alexandre, Reginaldo Paiva, Dyego Silveira, Radson Figueiredo, Ailton Yabeta, Liliane Carvalho, Murillo Carvalho, Marcelo Mendes, Carolina Barbosa, Daniela Rocha, Rogério Olavo, Aymara Colen, Iara Silveira, Leandra Alencar, Lúgia Correia, Gezer Lamounier, Luana Fagundes, Carlos Eduardo, Ricardo Kaminish. A todos, muito obrigado por todos os ensinamentos e experiências.

À Saneatins, em especial à equipe do laboratório da ETE Vila União, pela grande ajuda e pelo fornecimento da estrutura;

Ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Setor de Hidrobiologia, da Universidade Federal do Tocantins, em especial à professora Paula Benevides de Moraes, à Dayane Juliate e à Anelise Kappes Marque pela grande contribuição nas análises das espécies de microalgas e amizade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pela bolsa de mestrado;

A todos os professores, colegas e amigos do mestrado em Agroenergia pelos conhecimentos e experiências passados e pela convivência.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
OBJETIVOS	11
1. Objetivo geral	12
2. Objetivos específicos	12
CAPÍTULO II	13
JUSTIFICATIVA.....	13
CAPÍTULO III	15
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
1. Microalgas: seres microscópios com composição bioquímica diversificada	16
2. Obtenção de biomassa de microalgas: a utilização de águas residuárias como meio de cultivo	17
3. Obtenção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas	21
3.1. Biodiesel.....	21
3.2. Etanol	23
3.3. Metano	24
3.4. Hidrogênio	25
3.5. Bio-óleo	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
CAPÍTULO IV	33
Caracterização química, qualitativa e quantitativa das microalgas de uma lagoa de estabilização facultativa.....	33
Resumo	34
Palavras-chave.....	34
1. Introdução	35
2. Materiais e Métodos.....	36
2.1. Características da ETE Vila União	36
2.2. Caracterização qualitativa e quantitativa das espécies de microalgas	37
2.3. Caracterização e coleta da biomassa de microalgas	37
3. Resultados e Discussão.....	38
3.1. Espécies de microalgas da LEF	38
3.2. Biomassa de microalgas e tratamento de esgotos.....	38
3.3. Análise de lipídios e carboidratos	39
4. Conclusão	40
Referências	41
CAPÍTULO V	45
Identificação por CG/EM de metil ésteres de ácidos graxos a partir de microalgas presentes em uma lagoa de estabilização facultativa	45
Resumo	46
Palavras-chave.....	46
1. Introdução	47
2. Metodologia.....	48
2.1. Coleta de biomassa de microalgas	48
2.2. Caracterização e extração de lipídios brutos.....	49
2.3. Obtenção e caracterização dos metil ésteres de ácidos graxos.....	49
3. Resultados e discussão	50

3.1. <i>Biomassa de microalgas e lipídios brutos</i>	50
3.2. <i>Composição das amostras de metil éster de ácidos graxos</i>	52
4. Conclusão	53
Referências	54
ANEXOS	60
ANEXO A – Artigos publicados e a serem submetidos.	61

APRESENTAÇÃO

O aumento do consumo de biocombustíveis mundialmente fez levantar uma preocupação acerca da sustentabilidade desses combustíveis devido à utilização de biomassas com baixo rendimento e processos não tão eficientes. Logo, pesquisas têm sido feitas na busca de novas biomassas e/ou para melhorar o rendimento e produtividade das já utilizadas. A primeira opção tem sido a mais bem vista, uma vez que as biomassas tradicionais como a soja, por exemplo, mesmo com melhoramentos genéticos possuem um limite de produtividade e geralmente este só é aumentado com a expansão agrícola sob o território. Com isso, biomassas com elevada produtividade (e.g. microrganismos) e alternativas (e.g. resíduos agroindustriais) vêm sendo alvo de pesquisas.

A biomassa de microalgas aparece como um potencial fornecedor de vários produtos com uma possível produtividade elevada. Ela é obtida principalmente a partir do cultivo em laboratório ou em grande escala em sistemas fechados ou lagoas aeradas com a utilização de meio de cultura. Nestes sistemas, há a predominância pelo uso de uma espécie de microalga cultivada por processos autotrófico e/ou heterotrófico. Porém, esses sistemas ainda são processos caros (\$8,00/Kg a \$70,00/Kg de biomassa, dependendo do sistema e da metodologia de avaliação de viabilidade econômica utilizados) fazendo, por exemplo, com que o preço do óleo de microalgas seja alto (aproximadamente \$7,50/Kg para sistema aberto e \$33,00/Kg para sistema fechado) e impedindo a sua utilização em larga escala. Isto está relacionado aos gastos com infraestrutura (e.g. construção de tanques e fotobiorreatores) para cultivo, utilização de meios de cultura, processos de separação da microalga do meio líquido, entre outros.

Como uma forma de minimizar os custos dos produtos de microalgas, estas podem ser obtidas a partir do uso de efluentes, em uma estação de tratamento de esgoto doméstico e/ou industrial, utilizando lagoa de estabilização configurada especialmente para, além de realizar o polimento do esgoto, produzir biomassa de microalgas para o seu aproveitamento na geração de biocombustível. Isso levará a uma economia de água e nutrientes, como nitrogênio e fósforo. Além disso, com a remoção das células

das microalgas do efluente, estas deixarão de ser lançadas no meio hídrico, eliminando possíveis impactos ambientais e sociais no local de destino do efluente. Portanto, uma lagoa de estabilização apresenta-se como um potencial fornecedor de biomassa de microalgas.

Em virtude disso, a fim de contribuir para a efetiva inserção da biomassa de microalgas na cadeia produtiva de biocombustíveis, este trabalho foi elaborado com a finalidade de analisar e caracterizar a biomassa de microalgas da Lagoa Facultativa da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Vila União, localizada em Palmas-TO, visando à obtenção de biocombustíveis. O trabalho foi dividido em cinco capítulos. Inicialmente, o capítulo I apresentará os objetivos geral e específico de todo o trabalho. O capítulo II traz a justificativa geral. Já o capítulo III apresentará uma Revisão de Literatura, que auxiliará em um entendimento geral acerca do tema, cujo objetivo foi o de discutir sobre como tem sido feita a produção de biomassa de microalgas, como é a sua composição bioquímica, assim como o seu uso para a obtenção de diferentes biocombustíveis. No capítulo IV, serão apresentados os resultados, a conclusão e como foi realizada a caracterização qualitativa e quantitativa das espécies de microalgas, bem como a caracterização da sua biomassa no que diz respeito ao seu teor de lipídeos e carboidratos, compostos muito utilizados para a obtenção de biocombustíveis. E para finalizar, o trabalho apresenta o capítulo V, que traz os métodos utilizados para obtenção e análise de lipídios e ésteres de ácidos graxos a partir da biomassa de microalgas da ETE Vila União, bem como os resultados e conclusão obtidos.

Os capítulos IV e V foram feitos em formato de artigo científico e serão submetidos a revistas especializadas na área. O Anexo A apresenta alguns artigos publicados e a serem submetidos feitos a partir deste trabalho.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Caracterizar a biomassa e as espécies de microalgas da lagoa facultativa da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada na Vila União, Palmas-TO, visando à aplicação para biocombustível.

2. Objetivos específicos

Identificar qualitativa e quantitativamente as espécies de microalgas presentes no efluente da lagoa facultativa da ETE localizada na Vila União, Palmas-TO.

Caracterizar a biomassa de microalgas quanto ao seu teor de lipídeos e carboidratos.

Avaliar a possibilidade de obtenção de ésteres metílicos a partir das amostras de lipídeos brutos e analisá-los via Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG/EM).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA

A biomassa de microalgas é obtida principalmente a partir do cultivo em laboratório ou industrial em sistemas fechados ou lagoas aeradas alimentadas com meio de cultura o que faz com que os custos do produto final sejam elevados. Adicionalmente, as microalgas podem ser obtidas diretamente de um sistema onde elas já estejam disponíveis naturalmente, devido ao fornecimento de condições ambientais ótimas para o seu desenvolvimento. As microalgas alimentadas por esgoto doméstico, em um sistema de lagoa de estabilização, por exemplo, podem ser utilizadas para a obtenção de um bioproduto mais barato quando comparado aos obtidos por sistemas de cultivos. Isso levará a uma economia de água e nutrientes, bem como servirá para a remoção de nutrientes do esgoto como nitrogênio e fósforo.

Como uma alternativa aos sistemas de cultivo de microalgas tradicionais, tem-se a lagoa facultativa. Por estar rica em nutrientes (oriundos do efluente de um sistema anaeróbio, por exemplo) e por possuir uma zona aeróbia e totalmente luminosa, proporciona o desenvolvimento de microalgas. Estas produzem uma concentração elevada de biomassa, a qual é atualmente lançada, juntamente com o efluente, no meio hídrico natural, onde este poderá ter as suas características físicas, químicas e biológicas alteradas. Portanto, esse meio apresenta-se como um fornecedor de biomassa de microalgas com conseqüente possibilidade de mitigação de possíveis impactos negativos que poderiam ser causados se esta biomassa for lançada em cursos d'água.

As microalgas produzem proteínas, carboidratos e lipídeos durante a realização de seu metabolismo na forma de produtos de reserva e/ou para constituir a estrutura celular. Esses compostos são formados a partir de processo autotrófico e/ou heterotrófico (com uso de diferentes fontes de carbono) e suas características químicas e físicas dependem da espécie, do indivíduo e do meio de cultura que está sendo utilizado. Assim, por se desenvolverem em um meio que está rico em nutrientes (Nitrogênio, Fósforo, Carbono orgânico e inorgânico), as microalgas da Lagoa Facultativa da ETE Vila União, Palmas-TO, podem produzir diferentes bioprodutos, os quais podem ser utilizados para a obtenção de combustíveis ou outros produtos.

CAPÍTULO III

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Microalgas: seres microscópios com composição bioquímica diversificada

As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos cujas células possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, etc.) e essa composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e ao meio de cultura utilizado (Miao e Wu, 2006, Zamalloa *et al.*, 2011). Como exemplo, tem-se um trabalho realizado por Xu *et al.* (2006), o qual mostra que células da microalga *Chlorella protothecoides* têm a sua composição bioquímica diferenciada quando cultivada de forma autotrófica e heterotrófica.

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Em microalga verde, por exemplo, o complexo sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenoide captura energia solar na forma de fótons. Esta energia é utilizada pelo fotossistema II na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e molécula de O₂. Os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do tilacóide, o qual é utilizado para conduzir a produção de ATP via ATP sintase. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO₂ é fixado em moléculas de 3 átomos de carbono que são assimilados em açúcares, amido, lipídeos, ou outras moléculas exigidas para o crescimento celular. Já o substrato para a hidrogenase, H⁺ e e⁻, são supridos tanto via cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos como via fermentação do carboidrato (amido) armazenado (Beer *et al.*, 2009).

Logo, devido a essa diversidade de produtos existentes em biomassa de microalga, esta é utilizada pelo homem para o fornecimento de suplementos alimentares, obtenção de fármacos, produção de biocombustíveis (Borowitzka, 1999; Venkatesan, 2006), uso da biomassa de microalga, juntamente com o efluente de lagoas de estabilização, na

agricultura e piscicultura (Sousa, 2007; Mata *et al.*, 2010), entre outros usos. Adicionalmente, as microalgas vêm sendo utilizadas no saneamento ambiental através do uso de sistemas de filtros biológicos e lagoas de estabilização (i.e. facultativa e de maturação). As microalgas presentes em lagoas de estabilização facultativa e de maturação são bastante diversificadas devido às condições ambientais favoráveis (e.g. presença de nutrientes, temperatura, pH, etc). Em virtude disso, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para a utilização de águas residuárias no cultivo de espécies de microalgas, visando à diminuição de custos na obtenção de biomassa de microalgas e a obtenção de biocombustível a partir desta biomassa. No entanto, segundo Soldatelli (2007), as espécies de microalgas presentes em uma lagoa de estabilização podem variar em termos quantitativos e qualitativos. Com isso, é necessária a sua caracterização principalmente quando se pretende utilizar a biomassa formada por essas espécies, pois as características dos produtos obtidos dependem das espécies que compõem a biomassa.

2. Obtenção de biomassa de microalgas: a utilização de águas residuárias como meio de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser realizado por processo autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (Brennan e Owende, 2010; Chen *et al.*, 2011) com o uso de fotobiorreatores, os quais podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados de alta taxa e com extremidades elípticas (*raceway ponds*), lagos, etc), e sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal, fermentador, etc) (Dasgupta *et al.*, 2010). Os sistemas de fotobiorreatores fechados apresentam-se como os mais adequados para microalgas que podem ser rapidamente contaminadas por outros microrganismos, exceto para microalgas que conseguem sobreviver em condições ambientais extremas como alto pH (*Spirulina*, por exemplo) e alta salinidade (*Dunaliella*, por exemplo) ou podem crescer muito rapidamente (*Chlorella*, por exemplo) em tanques abertos (Brennan e Owende, 2010). Já os sistemas de tanques abertos são talvez os mais adequados para o cultivo de microalgas em

sistema autotrófico para a produção de biodiesel devido ao seu baixo custo de operação. O sistema mais utilizado são os tanques aerados de alta taxa. A fonte de carbono pode ser obtida diretamente da atmosfera, na superfície. Mas aeradores submersos podem ser instalados para aumentar a absorção do CO₂ (Brennan e Owende, 2010; Dasgupta *et al.*, 2010).

Para a produção de um biocombustível a baixo custo para que todos os consumidores venham ter acesso, a escolha de um ou outro sistema de obtenção de microalgas para este fim é de fundamental importância, para que maiores investimentos sejam feitos nessa área. Para isso, seria necessário o aperfeiçoamento do sistema de cultivo mais economicamente viável, com conseqüente redução de custos em todas as áreas (uso de água, nutrientes, energia, infra-estrutura, entre outros). Uma alternativa que vem sendo pensada, atualmente, é o aproveitamento de efluentes industriais ou domésticos (como fonte de nutrientes) e a própria infra-estrutura (ou com adições) de uma Estação de Tratamento de Efluente (ETE), com sistema de lagoa de estabilização, para a obtenção de biomassa de microalgas (Mulbry *et al.*, 2008).

Quando águas residuárias são utilizadas para o cultivo de microalgas, naturalmente ocorre a formação de uma mistura de espécies e uma dominância. Apesar da composição do meio e condições de crescimento não serem tão controladas, a quantidade de lipídeos da biomassa composta por várias espécies desenvolvidas em água residuária municipal tem alcançado teores em torno de 11,3% e de 29% quando crescidas em efluente de digestor anaeróbio (Woertz *et al.*, 2009). Griffiths (2009) obteve um teor de metil ésteres de ácidos graxos de 23,4% com o uso de transesterificação *in situ* da biomassa obtida a partir da mistura de espécies crescidas em efluente municipal.

A maioria das estações de tratamento de esgoto que utiliza lagoas no Brasil e nos Estados Unidos da América não remove as algas (Von Sperling, 1986; Salerno *et al.*, 2009). Em plantas que removem algas, uma coagulação química seguida de sedimentação ou flotação por ar dissolvido é o método mais utilizado (Friedman *et al.*, 1977), com a flotação com ar dissolvido geralmente sendo o método mais efetivo que a sedimentação no tratamento de águas ricas em algas (Teixeira e Rosa, 2006). Apesar de sua efetividade

em larga escala, a adição de coagulantes químicos transforma um potencial recurso em lodo residual que deve ter uma disposição final adequada (Hoffmann, 1998; Christenson e Sims, 2011).

Os nutrientes presentes nas águas residuárias como nitrogênio e fósforo devem ser removidos antes de serem dispostos nos cursos d'água naturais e eles podem ser removidos no processo de formação da biomassa de microalgas. Água residuária já tem sido utilizada para o cultivo de microalgas, mas com foco apenas na remoção de nutrientes (Hammouda *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 2010; de Godos *et al.*, 2010). Recentemente, o cultivo de microalgas em águas residuárias tem sido utilizado tanto para a remoção de nutrientes quanto como uma fonte de água e nutrientes para a obtenção de biomassa de microalgas como matéria-prima para a obtenção de biodiesel (Yun *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010; Chinnassamy *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2011).

No tratamento de águas residuárias com a utilização de lagoa facultativa, as microalgas fornecem o O₂ necessário para as bactérias realizarem a mineralização da matéria orgânica, aumentar a remoção de nutrientes e fornecem a maior eficiência de remoção de patógenos entre os tratamentos biológicos de águas residuárias (Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Schumacher *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2010). Os tratamentos com uso de microalgas utilizam a luz solar como fonte de energia, o que faz com que haja uma diminuição da quantidade de energia requerida no processo. Este menor consumo de energia, juntamente com a assimilação natural de CO₂ através da fotossíntese, reduz uma parte significativa das emissões de gases de efeito estufa associados ao tratamento de águas residuárias (Mulbry *et al.*, 2005).

A utilização de sistemas de tratamento de águas residuárias com o uso de microalgas pode também auxiliar no desenvolvimento da agricultura sustentável: o alto requerimento de nutrientes das culturas vegetais utilizadas na alimentação animal pode ser suprido por biofertilizante de microalgas produzidas a partir de tratamento de efluentes. Nesse contexto, o potencial de um fotobioreator utilizado para cultivar algas, em consorcio com bactérias, como meio de recuperação de nutrientes e de obtenção de biomassa de microalgas tem sido constantemente provado (Olguín *et al.*, 2003; de Godos

et al., 2009; Mulbry *et al.*, 2005). Além disso, microalgas de processo de bioremediação têm sido utilizadas com sucesso como uma fonte de proteínas de alta qualidade para a alimentação animal (Zepka *et al.*, 2010).

Entretanto, apesar dessas vantagens, a implantação desta tecnologia é frequentemente dificultada pelo custo da coleta da biomassa. Assim, a presença de microalgas suspensas (caracterizadas pela baixa velocidade de sedimentação) sempre dificulta a remoção eficiente da demanda química de oxigênio (DQO) e nutrientes em fotobioreatores com algas e bactérias, apesar do uso de agitadores para realizar a mistura em lagoas de alta taxa sobre a formação de flocos. Infelizmente, espécies livremente suspensas como *Chlorella* e *Scenedesmus* são ubíquas em lagoas de tratamento de águas residuárias devido a sua elevada tolerância a ambientes contaminados (Canovas *et al.*, 1996). Logo, o desenvolvimento de métodos de baixo custo para a remoção de microalgas em processos de tratamento de águas residuárias é de suma importância para garantir eficiências consistentes no tratamento. A coleta de microalgas pode ser realizada via centrifugação, filtração e coagulação/floculação (Molina-Grima *et al.*, 2003).

Enquanto a centrifugação apresenta um custo energético proibitivo no contexto do tratamento de águas residuárias (processo de baixo valor adicional), as tecnologias de filtração somente são úteis para a recuperação de espécies grandes como *Spirulina*. Filtros prensa de baixo custo frequentemente falham na coleta de microalgas pequenas como *Chlorella* ou *Scenedesmus*. O processo de coagulação/floculação pode, entretanto, auxiliar na remoção de uma elevada quantidade de biomassa a custo razoável (Molina-Grima *et al.*, 2003). Estes processos baseiam-se na adição de produtos químicos capazes de induzir a agregação de células individuais de microalgas. Assim, enquanto os coagulantes neutralizam ou invertem a repulsão elétrica entre as células de microalgas, os floculantes promovem a formação de agregados celulares pela criação de pontes entre as microalgas neutralizadas. Esta técnica de coleta tem sido utilizada com sucesso na aquicultura, produção de biocombustível, tratamento de água residuária e remoção de microalgas de reservatórios de água doce (Buelna *et al.*, 1990; Danquah *et al.*, 2008; Knuckey *et al.*, 2006; Henderson *et al.*, 2008; de Godos *et al.*, 2011).

3. Obtenção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas

3.1. Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível formado a partir da reação de esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de glicerídeos, ambos presentes em óleos vegetais, gorduras animais e óleos e gorduras residuais. Atualmente, a principal biomassa utilizada para a obtenção de biodiesel é a soja (*Glycine sp.*), atendendo mais de 80% da produção de biodiesel no Brasil. Entretanto, a soja não será capaz de auxiliar a produção desse biocombustível sem a destinação de áreas agricultáveis exclusivamente para esse fim, devido à baixa produtividade dessa biomassa (0,2-0,4 tonelada por hectare). Logo, é preferível que as biomassas utilizadas proporcionem uma ótima produtividade em lipídeos e com um menor uso do solo (BiodieselBR, 2010; Chist, 2007; Neto, 2011).

As microalgas surgem como uma biomassa com teor lipídico que pode variar entre 1 e 70%, mas sob certas condições, algumas espécies podem atingir 90% do peso seco (Chist, 2007; Mata *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). O conteúdo de óleo em microalgas pode atingir 75% em peso em relação à biomassa seca, mas associado com baixa produtividade, como em *Botryococcus braunii*, por exemplo. Algas mais comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) têm níveis de óleo entre 20 e 50%, mas produtividades maiores podem ser atingidas (Mata *et al.*, 2010). A fonte de carbono utilizado pelas microalgas pode ser tanto carbono inorgânico (CO₂) quanto orgânico (glucose, acetato, etc) para a formação de ácidos graxos e, conseqüentemente, lipídeos, sendo a quantidade destes em cada célula diferente entre espécies. As rotas de formação de ácidos graxos e triglicerídeos em microalgas podem ser divididas nas seguintes etapas: formação da acetil coenzima A (acetil-coA) no citoplasma; o alongamento e insaturação da cadeia de carbono de ácidos graxos, dependente principalmente dos sistemas enzimáticos acetil-coA carboxilase (ACCE) e ácido graxo sintase (FAS); e a biossíntese de triglicerídeos, tendo L- α -

fosfoglicerol e acetil-coA como os dois maiores iniciadores (*primers*) (Hu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010).

Os lipídeos das microalgas são constituídos por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, alguns deles da família do ω -3 e ω -6 (Hu *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). Geralmente, os ácidos graxos saturados e mono-insaturados predominantes são C16:0 e C16:1 em Bacillariophyceae; C16:0 e C18:1 em Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenophyceae e Eustigmatophyceae; C16:0, C16:1 e C18:1 em Cryptophyceae, Prymnesiophyceae, e Cianobactéria; C16:0 em Dinophyceae e Rhodophyceae; e C14:0, C16:0 e C16:1 em Xanthophyceae. Já os poliinsaturados são C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3 em Bacillariophyceae; C18:2 e C18:3 ω 3 em algas verdes e Euglenophyceae; C20:5, C22:5 e C22:6 em Crysophyceae; C18:3 ω 3, C18:4 e C20:5 em Cryptophyceae; C20:3 e C20:4 ω 3 em Eustigmatophyceae; C18:3 ω 3 e C20:5 em Prasinophyceae; C18:5 ω 3 e C22:6 ω 3 em Dinophyceae; C18:2, C18:3 ω 3 e C22:6 ω 3 em Prymnesiophyceae; C18:2 e C20:5 em Rhodophyceae; C16:3 e C20:5 em Xanthophyceae; e C16:2, C18:2 e C18:3 ω 3 em Cianobactéria (Hu *et al.*, 2008, Řezanka *et al.*, 2003, Zhukova e Aizdaicher, 1995). As microalgas são freqüentemente compostas por triglicerídeos e ácidos graxos poliinsaturados que não são tradicionalmente utilizados para a obtenção de biodiesel, sendo propensos às reações de oxidação indesejáveis. Além disso, o óleo de microalga pode apresentar uma elevada acidez (Miao e Wu, 2006). Para isso, podem ser feitas modificações no metabolismo e no meio de cultura (modificações na quantidade de nitrogênio, fósforo e enxofre, por exemplo) para que os lipídeos de interesse sejam produzidos (Beer *et al.*, 2009), assim como catalisadores ácidos podem ser utilizados no processo reacional de obtenção do biodiesel (Miao e Wu, 2006; Xu *et al.*, 2006).

As características dos ácidos graxos que compõem os lipídeos devem ser levadas em consideração porque as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção, dependem fortemente deles. As propriedades mais influenciadas incluem a qualidade da ignição (número de cetano, por exemplo), as propriedades de fluxo a frio e estabilidade oxidativa. Apesar da saturação e do perfil dos ácidos graxos das microalgas não terem muito impacto sobre a obtenção de biodiesel a partir da reação de

transesterificação (por ser o mesmo processo utilizado nas outras oleaginosas, via catálise básica ou ácida), eles podem afetar as propriedades do biocombustível. Por exemplo, óleos saturados produzem um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetano, mas propriedades indesejáveis a baixas temperaturas, sendo susceptível ao estado sólido. Biodiesel produzido a partir de biomassa que possui um elevado teor de ácidos poliinsaturados possui boas propriedades à baixa temperatura. Entretanto, esses ácidos graxos são muito susceptíveis à oxidação, possuindo problemas de instabilidade quando armazenado por muito tempo (Hu *et al.*, 2008). No entanto, esses problemas podem ser resolvidos com o uso de aditivos para tornar o combustível mais estável, como já é feito atualmente. Em relação às microalgas, o biodiesel obtido a partir delas possui características físicas e químicas semelhantes aos de biomassas tradicionais (soja, pinhão-manso, babaçu, óleo residual, etc, por possuir lipídeo com características similares a estas) e do diesel (Chist, 2007; Miao e Wu, 2006; Vijayaraghavan e Hemanathan, 2009; Xu *et al.*, 2006).

3.2. Etanol

O etanol é um biocombustível obtido via processo bioquímico, através da fermentação de biomassas sacaríneas e, após hidrólise, de amiláceas e celulósicas, e por processo termoquímico (gaseificação da biomassa). As biomassas freqüentemente empregadas na obtenção de etanol, como o milho e a cana-de-açúcar, têm problemas em comum: são muito utilizadas na alimentação e é necessária a disponibilização de terras agricultáveis para serem produzidas. Em virtude disso, tem existido um interesse atualmente na produção de etanol a partir dos carboidratos (celulose, xilose, galactose, arabinose, glicose e manose) presentes em microalgas (Harun *et al.*, 2009).

As microalgas fornecem carboidratos que podem ser fonte de carbono para a fermentação (Brennan e Owende, 2010; Harun *et al.*, 2010; Singh e Gu, 2010). Entretanto, a produção de etanol de microalgas ainda está sob investigação e esta tecnologia ainda não tem sido comercializada, visto que, o processo de obtenção de etanol a partir de microalgas é o mesmo utilizado quando da obtenção de etanol a partir de biomassas amiláceas e celulósicas e a obtenção da biomassa de microalgas ainda é um processo caro. Além

disso, antes da fermentação, os lipídeos devem ser removidos (rompimento da célula via extração por solvente e/ou mecânica), pois assim tanto os carboidratos presentes na membrana celular e no meio intracelular (armazenados no cloroplasto, por exemplo) estarão disponíveis para a fermentação, aumentando o rendimento (Harun *et al.*, 2009).

Outra forma de obtenção de elevados teores de carboidrato é o condicionamento do meio de cultura para que a microalga venha produzir mais esse composto em detrimento de outros. Dragone *et al.* (2011) testaram a influência da concentração de nitrogênio e ferro sobre o acúmulo de amido em *C. vulgaris* P12. Os autores observaram que o maior teor de amido (acima de 41%, em relação à massa seca da biomassa) foi obtido quando a quantidade de nitrogênio e ferro foi menor. Entretanto, a quantidade de biomassa foi menor que quando maiores concentrações desses nutrientes foram utilizadas. Logo, eles sugerem que o cultivo seja feito em duas etapas: a primeira para obtenção de biomassa (maiores concentrações de nitrogênio e ferro) e a segunda para o aumento do teor de amido (meio livre de nitrogênio e ferro por poucos dias de cultivo).

Hirano *et al.* (1997) obtiveram etanol a partir de células de *C. vulgaris*. Após a ruptura celular (por radiação ultrassônica, por exemplo), o extrato obtido foi centrifugado e lavado com uma solução 95% (v/v) de água deionizada e metanol. O extrato foi incubado em α -amilase a 100°C e pH 6,0 e glucoamilase a 60°C e pH 4,5. O açúcar resultante foi fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*. Harun *et al.* (2009) obtiveram etanol, por fermentação com *Saccharomyces bayanus*, a partir de células intactas e rompidas da espécie *Chlorococum sp.* e concluíram que o maior rendimento foi o obtido a partir das células previamente rompidas.

3.3. Metano

A tecnologia de fermentação para a obtenção de metano para algas tem recebido considerada atenção porque ela produz compostos de valor agregado no mercado, como biogás, por exemplo. O biogás consiste principalmente de uma mistura de metano (55-75%) e CO₂ (25-45%) produzidos por microrganismos durante a digestão anaeróbica. O metano da

digestão anaeróbica pode ser utilizado como gás combustível e também ser convertido para a geração de eletricidade. Já o CO₂ da digestão anaeróbia e da queima do metano, assim como o proveniente de indústrias, poderia ser utilizado para o cultivo das microalgas, injetando-o no sistema de cultivo (Morais e Costa, 2008; Wang *et al.*, 2008). A biomassa residual da digestão anaeróbia pode também ser reprocessada para fazer fertilizante. Além de ser renovável e sustentável, haveria o estímulo às práticas agrícolas sustentáveis (diminuindo o uso de produtos químicos) e reduziria os custos da produção das microalgas.

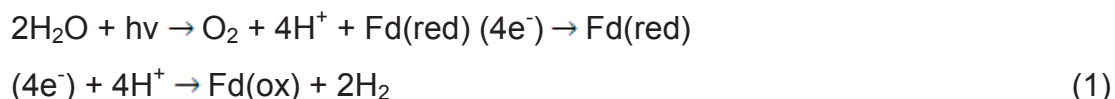
As microalgas não contêm elevados teores de lignina e possuem uma menor quantidade de celulose. Isso faz com que o processo apresente uma boa estabilidade e uma alta eficiência na conversão a biogás. O biogás produzido deste processo de digestão anaeróbia é principalmente afetado pela sua carga orgânica, temperatura, pH e tempo de detenção no reator. Basicamente, um longo tempo de detenção do sólido e uma alta carga orgânica proporcionam um maior rendimento de metano. Além disso, a digestão anaeróbia pode ser operada em condições mesofílicas (35°C) e termofílicas (55°C) (Brennan e Owende, 2010; Harun *et al.*, 2010; Singh e Gu, 2010).

3.4. Hidrogênio

A produção de hidrogênio a partir de microalgas é realizada pelo uso de sistemas fotobiológicos em fotobiorreatores (os mesmos utilizados para a obtenção de biomassa) com condições de cultivo (concentração de CO₂ e O₂ dissolvido, pH, nitrogênio, temperatura, luz e agitação) controladas para favorecer a produção de hidrogênio pelas células. No que diz respeito às microalgas verdes e cianobactérias, o hidrogênio pode ser formado por biofotólise direta e biofotólise indireta (Benemann, 2000; Dasgupta *et al.*, 2010).

A biofotólise direta é um processo biológico que quebra a molécula de água para a produção de hidrogênio e oxigênio pela utilização da luz solar. As algas verdes possuem um fotossistema II (PSII) e o fotossistema I (PSI) para a captura de luz solar e realizam a fotossíntese oxigênica como as

plantas superiores. Na ausência de oxigênio, os elétrons (e^-) da ferredoxina reduzida (Fd) podem ser utilizados também pela hidrogenase para reduzir prótons (H^+) formando hidrogênio (H_2) (Eq. 1) (Benemann, 2000; Dasgupta *et al.*, 2010).



Uma inibição parcial do PSII pode gerar uma condição anaeróbica para a célula dentro do fotobiorreator. Com isso, há uma menor atividade de oxidação da água para produzir O_2 e o O_2 residual é utilizado pela respiração. Já a biofotólise indireta é um processo muito eficiente para separar as fases de formação do H_2 e O_2 (As equações 2 e 3 são muito observadas em cianobactérias). O carboidrato armazenado é oxidado para a produção de H_2 (Benemann, 2000). As reações gerais são as seguintes:



Em condição anaeróbia e na ausência de luz, a oxidoreductase ferredoxina piruvato (PFOR), responsável pela descarboxilação do piruvato (formação de CO_2) para acetil-CoA, está ligada à produção de H_2 via produção da ferredoxina. Na presença de luz, a ferredoxina é reduzida pelo NADH produzido durante o catabolismo do piruvato pela desidrogenase piruvato (PDH). A cianobactéria fixadora de nitrogênio produz H_2 principalmente pela nitrogenase (fixando N_2 a NH_3) em vez de produzir via hidrogenase bidirecional. Entretanto, em várias cianobactérias não fixadoras de N_2 , a obtenção de H_2 é também observada pela hidrogenase bidirecional (Dasgupta *et al.*, 2010).

Em bactérias filamentosas, a nitrogenase é localizada nos heterocistos com um PSI funcional (sem atividade do PSII). Os elétrons são doados para o PSI no heterocisto vindo da reserva de carbono transportado da célula vegetativa vizinha. Entretanto, a produção de hidrogênio é energeticamente sobrecarregada devido à biossíntese e à manutenção dos heterocistos e da

quantidade significativa de ATP requerida pela nitrogenase (Eqs. 4 e 5) (Dasgupta *et al.*, 2010).



3.5. Bio-óleo

Comparado a outras tecnologias de conversão térmica (gaseificação, liquefação), a pirólise (conversão da biomassa em média a alta temperatura (350-700°C), na ausência de ar) de biomassa de microalgas é bastante aplicada e tem alcançado resultados promissores e confiáveis que poderiam levá-la a uma exploração comercial. Dentre os produtos que podem ser obtidos da pirólise (gases, líquidos e sólidos), tem-se o bio-óleo (líquido de cor negra composto por diferentes produtos químicos que podem ser aproveitados como combustível ou utilizado para outras finalidades) cujas características estão relacionadas ao tipo de microalga utilizada, ao tipo de cultivo em que estas foram submetidas (autotrófico ou heterotrófico) e das condições de pirólise (taxa de aquecimento, tempo de residência dos gases no reator, temperatura, fluxo do gás de arraste, entre outros). Logo, dependendo das condições anteriormente citadas, o bio-óleo de microalgas pode possuir uma qualidade superior ao bio-óleo obtido de biomassas lignocelulósicas (Brennan e Owende, 2010; Grierson *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2004; Miao e Wu, 2004; Wang *et al.*, 2008) (Tab. 01). Entretanto, existem desafios técnicos que precisam ser resolvidos para a utilização de bio-óleos como combustível, pois eles são altamente ácidos, instáveis, viscosos e contêm sólidos e água quimicamente dissolvida (Brennan e Owende, 2010).

Tabela 1. Comparação das propriedades típicas do óleo de petróleo e dos bio-óleos da pirólise rápida de madeira e microalgas.

	Bio-óleo		Óleo de petróleo
	Madeira	Microalgas	
C (%)	56,4	62,07	83,0-87,0
H (%)	6,2	8,76	10,0-14,0
O (%)	37,3	11,24	0,05-1,5
N (%)	0,1	9,74	0,01-0,7
Densidade (kg.L ⁻¹)	1,2	1,06	0,75-1,0
Viscosidade (Pas)	0,04-0,20 (a 40 °C)	0,10 (a 40 °C)	2-1000
PCS (MJ.kg ⁻¹)	21	29-45,9	42

Fonte: Brennan e Owende (2010).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEER, L. L., BOYD, E. S., PETERS, J. W. & POSEWITZ, M. C. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 264-271.

BENEMANN, J. R. 2000. Hydrogen production by microalgae. *Journal of applied Phycology*, 12: 291-300.

BIODIESELBR. 2010. Gargalos do biodiesel preocupam BNDES. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/gargalos-biodiesel-preocupam-bndes.htm>>. Acesso em: 22/06/2010.

BOROWITZKA, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70: 313-321.

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

BUELNA, G., BHATTARI, K.K., de la NOÛE, J., TAIGANIDES, E.P., 1990. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig-waste. *Biol. Wastes* 31 (3), 211–222

CANOVAS, S., PICOT, B., CASELLAS, C., ZULKI, H., DUBOIS, A., BONTOUX, J., 1996. Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high rate algae pond. *Water Sci. Technol.* 33 (7), 199–206.

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

CHINNASSAMY, S., BHATNAGAR, A., HUNT, R.W., DAS, K.C., 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol.* 101, 3097–3105.

CHIST, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.

CHO, S., LUONG, T.T., LEE, D., OH Y-K, LEE T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour Technol* 2011;102(18): 8639-8645.

CHO, S., LUONG, T.T., LEE, D., OH, Y. & LEE, T. 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biodiesel production. *Bioresource Technology*. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.037>>.

CHRISTENSON, L. e SIMS, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>>.

CHRISTENSON, L., SIMS, R. Poduction and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol Adv* (2011), doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015.

- DANQUAH, M.K., ANG, L., UDUMAN, N., MOHEIMANI, N., FORDE, G.M., 2008. Dewatering of Microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (7), 1078–1083.
- DASGUPTA, C. N., GILBERT, J. J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S. A., SKJANES, K. & DAS, D. 2010. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 10218-10238.
- de GODOS, I., GONZÁLEZ, C., GARCÍA-ENCINA, P., BÉCARES, E., MUÑOZ, R., 2009. Simultaneous nitrification–denitrification, phosphorous and carbon removal during pre-treated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (1), 187–194.
- de GODOS, I., VARGAS, V.A., BLANCO, S., GONZALEZ, B.C., Soto, R., GARCIA-ENCINA, P.A., BECARES, E., MUNOZ, R., 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresour. Technol.* 101, 5150–5158.
- DRAGONE, G., FERNANDES, B. D., ABREU, A. P., VICENTE, A. A. & TEIXEIRA, J. A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88: 3331-3335.
- SOLDATELLI, V. F. Avaliação da comunidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização utilizadas no tratamento de efluentes domésticos. Estudo de caso – ETE-UCS. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de Pós-graduação em Ecologia, 182p., 2007.
- FRIEDMAN, A.A., PEAKS, D.A., NICHOLS, R.L. Algae separation from oxidation pond effluents. *J Water Pollut Control Fed* 1977;49:111–119.
- GRIERSON, S., STREZOV, V., ELLEM, G., MCGREGOR, R. & HERBERTSON, J. 2009. Thermal characterization of microalgae under slow pyrolysis conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85: 118-123.
- GRIFFITHS, E. Removal and utilization of wastewater nutrients for algae biomass and biofuels. All Graduate Theses and Dissertations 2009; Paper 631. Available from: <http://digitalcommons.usu.edu/etd/631>.
- HAMMOUDA, O., GABER, A., ABDEL-RAOUF, A., 1995. Microalgae and wastewater treatment. *Ecotox. Environ. Safe.* 31, 205–210.
- HARUN, R., DANQUAH, M. K. & FORDE, G. M. 2009. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 85(2): 199-203. <<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2287>>.
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. & DANQUAH, M. K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037-1047.
- HENDERSON, R., PARSONS, S.A., JEFFERSON, B., 2008. The impact of algal properties and pre-oxidation on solid–liquid separation of algae. *Water Res.* 42, 1827–2845.

- HIRANO, A., UEDA, R., HIRAYAMA, S. & OGUSHI, Y. 1997. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22: 137-142.
- HOFFMANN, J.P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *J Phycol* 1998;34:757–763.
- HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GUIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. & DARZINS, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54: 621-639.
- HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87: 38-46.
- JIANG, L., LUO, S., FAN, X., YANG, Z. e GUO, R. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, 88: 3336-3341.
- KNUCKEY, R.M., BROWN, M.R., ROBERT, R., FRAMPTON, D.M.F., 2006. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacul. Eng.* 35, 300–313.
- LIM, S., CHU, W., PHANG, S., 2010. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 7314–7322.
- MATA, T. M., MARTINS, A. A. & CAETANO, N. S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
- MIAO, X., WU, Q. & YANG, C. 2004. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71: 855-863.
- MOLINA-GRIMA, E., BELARBI, E.-H., ANCIÉN FERNÁNDEZ, F.G., Robles-MEDINA, A., CHISTI, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515.
- MORAIS, M. G. e COSTA, J. A. V. 2008. Bioprocessos para a remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*, 31(5): 1038-1042.
- MULBRY, W., KEBEDE-WESTHEAD, E., PIZARRO, C., SIKORA, L., 2005. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresour. Technol.* 96, 451–458.
- MULBRY, W., KONDRAD, S., PIZARRO, C., KEBEDE-WESTHEAD, E. 2008. Treatment of dairy manure effluente using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, 99: 8137-8142.
- NETO, S. A. R. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conjuntura mensal. Biodiesel. Período maio de 2011. 2011. Disponível em:
<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_07_08_34_00_conjuntura_biodiesel_mai_2011..pdf>. Acesso em: 18/07/2011.

OLGUÍN, E.J., GALICIA, S., MERCADO, G., PÉREZ, T., 2003. Annual productivity of *Spirulina* (Arthrospira) and nutrients removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J. Appl. Phycol.* 15, 249–257.

ŘEZANKA, T., DOR, I., PRELL, A. & DEMBITSKY, V. M. 2003. Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. *Folia microbiologica*, 48: 71-75.

RUIZ-MARIN, A., MENDOZA-ESPINOSA, L.G., STEPHENSON, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 58–64.

SALERNO, M., NURDOGAN, Y., LUNDQUIST, T.J. Biogas production from algae biomass harvested at wastewater treatment ponds. 2009 Bioenergy Engineering Conference. ASABE conference presentation; 2009. Oct. Paper No.: Bio098023.

SCHUMACHER, G., BLUME, T., SEKOULOV, I., 2003. Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatments plants by algal biofilm. *Water Sci. Technol.* 47, 195–202.

SINGH, J., GU, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 2596-2610.

SOUSA, M. P. 2007. *Organismos planctônicos de sistemas de lagoas de tratamento de esgotos sanitários como alimento natural na criação de Tilápia do Nilo*. 60 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SPERLING, M.V. Lagoas de estabilização. Belo Horizonte: UFMG; 1986.

TEIXEIRA, M.R, ROSA, M.J. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: part I: the key operating conditions. *Sep Purif Technol* 2006;52:84–94.

VENKATESAN, R., VASAGAM, K. P. K., BALASUBRAMANIAN, T. 2006. Culture of marine microalgae in shrimp farm discharge water: a sustainable approach to reduce the cost production and recovery of nutrients. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 1(3): 262-269.

VIJAYARAGHAVAN, K., HEMANATHAN, K. 2009. Biodiesel production from freshwater algae. *Energy Fuels*, 23: 5448-5453.

WANG, B., LI, Y., WU, N., LAN, C. Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 707-718.

WANG, L., Li, Y., CHEN, P., MIN, M., CHEN, Y., ZHU, J., RUAN, R., 2010. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 101, 2623–2628.

WOERTZ, I., FEFFER, A., LUNDQUIST, T., NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *J Environ Eng* 2009; 135:1115 – 1122.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126: 499-507.

XU, H., MIAO, X. & WU, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126: 499-507.

YUN, Y., LEE, S., PARK, J., LEE, C., YANG, J., 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 451–455.

ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J. & VERSTRAETE, W. 2011. *Bioresource Technology*, 102: 1149-1158.

ZEPKA, L.Q., JACOB-LOPES, E., GOLDBECK, R., SOUZA-SOARES, L.A., QUEIROZ, M.I., 2010. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscópica* Nägeli. *Bioresour. Technol.* 101, 7107–7111.

ZHUKOVA, N. V. e AIZDAICHER, N. A. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39(2): 351-356.

CAPÍTULO IV

Caracterização química, qualitativa e quantitativa das microalgas de uma lagoa de estabilização facultativa

A ser submetido à revista *Biomass & Bioenergy* (ISSN: 0961-9534)

Caracterização química, qualitativa e quantitativa das microalgas de uma lagoa de estabilização facultativa

Aderlano da S. Cardoso^a, Anelise Kappes Marques^b, Glaucia Eliza G. Vieira^a

^aUniversidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento em Biomassa e Biocombustível - LEDBIO. Avenida NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brasil.

^bUniversidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental, Avenida NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brasil.

Resumo

A quantidade de estações de tratamento de esgotos com sistemas de lagoas de estabilização vem aumentando no Brasil. Com isso, para ajudar na sustentabilidade do processo de tratamento e aumentar a qualidade do efluente lançado no meio hídrico, a biomassa de microalgas formada durante o tratamento poderia ser utilizada para a produção de biocombustível. Entretanto, as características dessa biomassa têm que ser determinadas. Em virtude disso, este trabalho objetivou realizar a caracterização taxonômica das espécies de microalgas da lagoa de estabilização facultativa (LEF) da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada na Vila União, Palmas-TO, Brasil, assim como a caracterização química (e.g. lipídios totais, caracterização química dos lipídios via análise CG-EM e carboidratos pelo método fenol-ácido sulfúrico) da biomassa. O efluente da LEF foi composto por várias espécies pertencentes aos taxa cianobactéria e euglenofíceas. Os lipídios brutos apresentaram valores de 14,21%, em relação à biomassa seca. O resultado da análise CG-EM mostrou a presença de diferentes compostos químicos com predominância de ácidos graxos saturados. A quantidade de carboidratos foi de 3,49%. A elevada presença no meio hídrico natural de espécies encontradas neste trabalho podem trazer problemas ambientais. Assim, a obtenção de biomassa de microalgas da LEF provavelmente fornecerá um ganho econômico e ambiental.

Palavras-chave: tratamento de efluente, caracterização de microalga, biocombustível.

1. Introdução

O tratamento de águas residuárias vem aumentando no Brasil sendo as lagoas de estabilização o sistema de tratamento mais utilizado devido às condições climáticas (i.e. elevada temperatura do ar, disponibilidade de luz solar, entre outros) e à quantidade de área disponível em seu território [1]. As lagoas de estabilização possuem condições naturais que garantem o crescimento do fitoplâncton. Isto é em consequência da presença de nutrientes no efluente e dos nutrientes liberados dentro do sistema de tratamento pela degradação bacteriana. Geralmente, depois que o esgoto é tratado em um sistema de lagoas de estabilização, a biomassa de microalgas formada é lançada dentro de um meio hídrico natural [2]. Entretanto, durante o processo de crescimento, essas microalgas podem acumular vários compostos bioquímicos que poderiam ser utilizados em diferentes aplicações como na produção de biocombustível [3] [4].

Os biocombustíveis tem sido uma alternativa renovável e sustentável utilizada para superar os problemas relacionados ao uso de combustíveis de petróleo e são produzidos a partir de diferentes biomassas. Entretanto, devido ao aumento do consumo de biocombustível, a produção de biomassa para combustível tem que aumentar para garantir as necessidades da indústria. Além do aumento da produção das biomassas tradicionais, novas biomassas devem ser exploradas. Como uma alternativa que vem sendo estudada, as microalgas aparecem como uma fonte promissora de diferentes produtos (e.g. lipídios, carboidratos, hidrogênio) que podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de combustível [5]. Isto é possível devido ao rápido crescimento e capacidade de utilizar CO₂ atmosférico e outros nutrientes dos meios de cultura para garantir sua reprodução e desenvolvimento celular.

Os sistemas de cultivo utilizados para a obtenção de biomassa de microalgas possuem um preço alto, fazendo a utilização de elevada quantidade de nutrientes como os à base de nitrogênio (N) e fósforo (P). Como uma alternativa, nutrientes residuais (e.g. efluentes de ETE) vêm ganhando muita atenção em laboratórios de pesquisa.

Utilizando os nutrientes disponíveis em efluentes para a obtenção de biomassa de microalgas, pode-se melhorar o sistema de tratamento, porque este estará com uma menor quantidade de nutrientes e sem a presença massiva de células de microalgas cuja presença no meio hídrico pode causar impactos ambientais.

A utilização de biomassa de microalgas das lagoas facultativas para a obtenção de energia e combustível poderia ser uma ótima aplicação, uma vez que a biomassa geralmente não tem um uso como, por exemplo, na alimentação humana porque esta pode ser tóxica [6], devido a sua composição ser em grande parte formada por espécies pertencentes aos taxa Cianobactéria e Euglenoficea [2]. Assim, isso poderia reduzir o elevado custo dos produtos a partir de microalgas e poderia contribuir para aumentar o uso desta biomassa, obtendo um biocombustível mais barato. Mas para isso, inicialmente é necessário que seja feita uma caracterização qualitativa e quantitativa das microalgas da lagoa de estabilização assim como sua caracterização química. Logo, este trabalho objetivou realizar a caracterização qualitativa e quantitativa das espécies presentes no efluente da LEF da ETE Vila União, Palmas-TO, e quantificar os lipídios e carboidratos totais visando o potencial dessas espécies para obter produtos químicos que podem ser utilizados para a obtenção de biocombustível.

2. Materiais e Métodos

2.1. Características da ETE Vila União

A ETE é localizada no setor norte da cidade de Palmas (-10°8'43.59'', -48°21'25.18''), estado do Tocantins, e pertence à Companhia de Saneamento do Tocantins (Saneatins), consistindo de pré-tratamento (i.e. grade, caixa de areia e caixa de gordura), um Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) seguido por uma LEF (comprimento: 256m; largura: 110m; área: 28,16 m²; volume: 42,24 m³; profundidade: 1,5m) para o pós-tratamento do efluente tratado secundariamente no reator RAFA (Fig. 1). O meio hídrico que recebe o efluente da ETE é o córrego Água Fria cuja foz é o reservatório da Usina Hidroelétrica Luís Eduardo Magalhães, sendo o ponto de lançamento do efluente próximo à foz do córrego. Além disso, a população local faz uso do córrego para vários propósitos (e.g. recreação, pesca e lavar roupa) [7]. As características do esgoto afluente e do efluente no período estudado estão descritos na Tabela 1, as quais foram obtidas com o uso do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21th Edition*.

2.2. Caracterização qualitativa e quantitativa das espécies de microalgas

A metodologia utilizada para a análise qualitativa das microalgas da LEF foi a descrita por Marques [8]. A análise quantitativa foi realizada de acordo com o método descrito por Uthermöhl [9], o qual consiste na distribuição aleatória dos indivíduos no fundo da câmara de sedimentação. O volume sedimentado foi de 10 mL, em função da concentração da amostra. A contagem foi realizada em microscópio invertido cujos campos de contagem foram distribuídos em transectos verticais paralelos, cobrindo praticamente toda a área da câmara, sorteados aleatoriamente. O tempo de sedimentação foi de no mínimo 3 horas para cada centímetro de altura da câmara [10]. Na contagem das microalgas, foi considerado como um indivíduo organismos unicelulares, filamentos, tricomas, colônias e cenóbios. O número de campos contados foi a quantidade necessárias para alcançar 100 indivíduos da espécie mais frequente, ou estabilizar o número de espécies adicionadas por campo (área mínima de compensação). Lund et al. [11] consideraram o erro de contagem inferior a 20%, a um nível de significância de 95%. Os resultados da contagem foram expressos em indivíduos por mL, calculada de acordo com Nogueira e Rodrigues [12]. Essa caracterização foi realizada nos meses de Maio e Junho de 2011, no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, setor Hidrobiologia.

2.3. Caracterização e coleta da biomassa de microalgas

O processo de coleta utilizado para a obtenção de biomassa de microalgas foi o descrito em [13] e o volume de efluente filtrado foi de 60 ± 10 L. A extração de lipídios foi igualmente realizada de acordo com o método descrito anteriormente em nosso trabalho [13], o qual tem por base o método descrito por Bligh e Dyer [14]. A quantidade de 5,3mg de lipídios brutos foi caracterizada utilizando um equipamento de CG (Varian 3800) com espectrômetro de massas Varian Saturn 2200, depois da amostra ter sido derivatizada com 10 μ L do reagente de silição N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) por 15 min à temperatura ambiente e dissolvido em 1mL de diclorometano. As condições da análise CG-EM foram: a coluna utilizada foi uma FactorFourTM (Coluna Capilar) VF-5ms (30m x 0,25mm D.I.; 0,25 μ m). A temperatura inicial do forno da coluna foi de 50°C por 5min com um aumento sequencial para 190°C a 5°C min⁻¹, 215°C a 0,5°C min⁻¹ e para 320°C a 4°C

min⁻¹, seguido de isoterma a 320°C por 3min. Temperatura do injetor: 250°C com uma taxa de divisão de 10 e o volume da amostra injetada foi de 1µL. Hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1mL min⁻¹. No espectrômetro de massas as temperaturas do *manifold*, *ion trap* e *transfer line* foram de 40°C, 190°C e 200 °C, respectivamente. O seguimento de massa utilizado foi de 40 m/z a 650 m/z, com modo de ionização por impacto de elétrons com 70eV. Já em relação ao conteúdo de carboidratos totais, este foi realizado pelo método fenol-ácido sulfúrico de acordo com Myklestad e Haug [15] e Lourenço [16].

3. Resultados e Discussão

3.1. Espécies de microalgas da LEF

As espécies de microalgas encontradas no efluente da LEF durante os meses de Maio e Junho de 2011 estão descritos na Tabela 2. As espécies pertencem aos grupos Bacillariophyceae, Cyanobacteria, Chlorophyceae, Cryptophyceae e Euglenophyceae. Em maio, as espécies *Planktolyngbya limnetica* (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg, *Lepocinclis salina* Frits. e *Micractinium pusillum* (Prin.) Kom.-Legn. foram as que apresentaram a maior quantidade de indivíduos por mililitro. Já em junho, a maior quantidade de células de microalgas pertence ao grupo Euglenófito (*Euglena caudata* (Cunha) Conr., *Lepocinclis salina* Frits. e *Lepocinclis* sp.1, respectivamente) (Fig. 2). Isso mostra que pode existir uma variação em termos quantitativos e qualitativos na LEF. Segundo Soldatelli [17], quando um meio rico em compostos nitrogenados, como o efluente do reator RAFA, é utilizado, haverá uma predominância dessas espécies.

3.2. Biomassa de microalgas e tratamento de esgotos

A quantidade de biomassa de microalga obtida por filtração do efluente da LEF foi de 1290,32 ± 1062,48mg. Em um meio rico em nitrogênio, algumas espécies tendem a produzir mais biomassa que produtos celulares como carboidrato e lipídios [4] [18]. A amônia é facilmente removida pelas células de microalgas. Entretanto, a elevadas concentrações, seu crescimento pode ser inibido [19]. Segundo Von Sperling [2], a remoção de N e P em uma LEF é menor que 35%. Esta é normalmente utilizada para

a redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), especialmente de efluentes com baixa carga, como o apresentado nesse trabalho. Entretanto, tanto o N quanto o P assimilado pelas algas não seriam removidos uma vez que a biomassa é lançada no meio hídrico natural e isso pode contribuir com a eutrofização do meio. Por outro lado, quando esta biomassa é recuperada como fonte de produtos químicos, nutrientes serão removidos, aumentando a eficiência do processo de tratamento.

Em várias espécies de microalga, a nitrato redutase é expressa em células em ambiente onde a única fonte de N disponível é o nitrato e reprimida em meio rico em amônia, assim como em uma mistura de amônia e nitrato, como observado no efluente estudado [20]. Entretanto, o N na forma de nitrato teve uma maior remoção que o N amoniacal, 54,79% e 6,22%, respectivamente. Apesar disso, as águas residuárias podem ser utilizadas para reduzir os custos do cultivo de microalgas, aumentando a sustentabilidade do processamento da biomassa e preservando os recursos aquáticos naturais [21] porque, segundo Petry [22], quando o meio aquático natural apresenta a combinação de algas e compostos halogenados, trialometanos podem ser formados. Petry [22] mostra que amostras de água contendo algas clorofíceas podem conter trialometanos, mesmo em pequenas quantidades comparado a águas ricas em ácidos húmicos. Em um trabalho feito por Naval et al. [7], a ETE estudada neste trabalho pode gerar vários impactos negativos em vários ambientes (água, solo e ar) e sobre a população que venha utilizar o córrego que recebe o efluente da ETE.

3.3. Análise de lipídios e carboidratos

O conteúdo de lipídios (14,21%) foi maior que a de carboidratos (3,49%). Para produzir lipídios, as microalgas podem utilizar o carboidrato presente nas células como fonte de carbono. Assim, quando a quantidade de lipídios aumenta a quantidade de carboidrato tende a diminuir [6]. Além disso, um meio de cultura rico em nutrientes com N geralmente favorece a produção de biomassa em vez de lipídios e carboidratos [18]. Por outro lado, uma elevada concentração de amônia no meio pode ser tóxica para o crescimento das microalgas [4]. Já em relação ao tipo de lipídeo, as características deste podem ser determinadas pelo açúcar remanescente quando a quantidade de N no meio de cultura exaure. Além disso, a saturação dos ácidos graxos

pode ser determinada pela quantidade de açúcar e condições de crescimento (e.g. autotrófico, heterotrófico). Algumas espécies podem acumular mais lipídios, principalmente triglicerídeos, sob condições heterotróficas. Ao contrário, culturas autotróficas formam mais ácidos graxos poli-insaturados (lipídios polares). Outra causa na variação do acúmulo de lipídios pode ser a fonte de nitrogênio, amônia pode favorecer o acúmulo de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (C14:0, C16:0, C16:1) e nitrato e ureia pode favorecer o acúmulo de ácidos poli-insaturados (C20:4 e C20:5). O efluente estudado neste trabalho apresentou uma alta concentração de amônia, a qual pode favorecer a formação de diferentes ácidos graxos saturados que foram encontrados no extrato. Além disso, a presença de nitrato no efluente auxilia no acúmulo de ácidos graxos com elevada cadeia carbônica (C20 e C27) [20].

Os lipídios brutos apresentaram alto grau de saturação e com a presença de ácido graxo monoinsaturado (Tabela 3). Segundo Hu et al. [23], microalgas pertencentes às taxa encontradas neste trabalho produzem ácidos graxos que podem ser utilizados para a produção de biodiesel como C16:0 e C18:1, além de ácidos graxos com cadeia carbônica grande (e.g. C20 e C22). Além disso, os ácidos graxos C16:0 e C18:1 encontrados nas amostras, por exemplo, são comumente utilizados para a produção de biodiesel quando biomassas tradicionais são utilizadas [1], fazendo da biomassa obtida a partir do efluente da LEF estudada uma possível fonte para obtenção de biocombustível, mas utilizando uma reação não tradicional devido à alta quantidade de ácidos graxos livres presentes nas amostras. Além disso, o carboidrato presente nas microalgas também pode ser utilizado para a obtenção de biocombustível [24] [25] [26].

4. Conclusão

O efluente da LEF é composto por diferentes espécies de microalgas. Os grupos Chlorophyceae, Cyanobacteria e Euglenophyceae apresentam um maior número de espécies, respectivamente. Entretanto, com respeito ao número de indivíduos, as espécies pertencentes às taxa cianobactéria e euglenofíceas são dominantes. As microalgas identificadas produzem lipídios e ácidos graxos, os quais podem ser utilizados para a obtenção de biodiesel.

A biomassa recuperada do efluente da LEF possui elevado teor lipídico e baixa quantidade de carboidrato, 14,21% e 3,49%, respectivamente, os quais podem ser

utilizados para obter biocombustível. De um ponto de vista econômico e ambiental, a obtenção de biomassa de microalgas diretamente da LEF mostra-se como uma alternativa aos processos tradicionalmente utilizados para obtenção de biomassa de microalgas (fotobiorreatores e tanques aerados) e, simultaneamente, minimizar impactos ambientais oriundos da elevada presença desse material no ambiente.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de mestrado do Aderlanio da Silva Cardoso, à Saneatins, e aos laboratórios Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento de Biomassa e Biocombustível.

Referências

- [1] Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M. Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16: 143-169.
- [2] Sperling MV. Lagoas de estabilização. Belo Horizonte: UFMG; 1986.
- [3] Cho S, Luong TT, Lee D, Oh Y-K, Lee T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour Technol* 2011;102(18): 8639-8645.
- [4] Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol* 2011;102: 17-25.
- [5] Cardoso AS, Vieira GEG, Marques AK. The use of microalgae for the production of biofuels. *Rev Bras Biocienc* 2011;9(4): 542-549.
- [6] Sydney EB, da Silva TE, Tokarski A, Novak AC, de Carvalho JC, Woiciechowski A. L. Screening of microalgae with potential for biofuel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl Energy* 2011;88: 3291-3294.
- [7] Naval LP, Barros DSB, Silva CDF. Aplicação de métodos de avaliação de impactos ambientais a uma ETE operando em escala real com a respectiva proposição de medidas mitigadoras. 08.30.2012. <<http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/danger.pdf>>.
- [8] Marques AK. Análise da diversidade fitoplanctônica na reservatório da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães, no médio Tocantins - TO: estrutura da comunidade, flutuações temporais e espaciais. 08.30.2012. <http://www.site.uft.edu.br/component/option,com_docman/Itemid,69/task,doc_details/gid,974/>.
- [9] Uthermol H. Zur Vervollkomnigung der quantitativen Phytoplankton. *Methodik Mitteilungen Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie* 1958;9: 1-38.
- [10] Margalef R. *Limnologia*. Barcelona: Omega S/A; 1983.
- [11] Lund JWG, Kipling C, Lecren ED. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia* 1958;11: 143-170.

- [12] Nogueira IS, Rodrigues LNC. Planctonic algae of an artificial lake of Chico Mendes botanical gardens, municipality of Goiania, state of Goias: floristic and some ecological considerations. *Rev Bras de Biol* 1999;16: 155-174.
- [13] Vieira GEG, Cardoso AS, Marques AK, Pickler AC. Assessment of the potential of residuary microalgae from a stabilization pond for the production of biofuel. *WIT Trans on Ecol Envir* 2011;167: 170-181.
- [14] Dyer BA. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 1959;37: 911-917.
- [15] Mykkestad S, Haug A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chatoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 1972;9: 125-136.
- [16] Lourenço SO. *Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações*. São Carlos-SP: Rima; 2006.
- [17] Soldatelli VF. Avaliação da comunidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização utilizadas no tratamento de efluentes domésticos. Estudo de caso – ETE-UCS. 11.15.2012. <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/10953>>.
- [18] Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl Energy* 2011;88: 3331-3335.
- [19] Rawat I, Kumar RR, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: phicoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energy* 2011;88: 3411-3424.
- [20] Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res* 2011; 45: 11-36.
- [21] Wang B, Lan CQ. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresour Technol* 2011;102: 5639-5644.
- [22] Petry AT. Efeito potencial de gradiente trófico em rio urbano na formação de trihalometanos. 11.30.2012. <http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetailheObraForm.do?select_action=&co_obra=117560>.
- [23] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Guirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J* 2008;54: 621-639.
- Munoz R, Guieysse B. Algal-bacterial process for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res* 2006;40: 2799-2815.
- [24] Harun R, Jason WSY, Cherrington T, Danquah MK. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Appl Energy* 2011;88: 3464–3467.
- [25] Quintana N, Kooy FVD, Rhee MDVD, Voshol GP, Verpoorte R, Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91: 471-490.
- [26] Bush RA, Hall KM. Process for the production of ethanol from algae. U.S. Patente 7.135.308; 2006.



Figura 1. Componentes da ETE localizada na Vila União, Palmas-TO, Brasil. O esgoto bruto passa através da grade e os sólidos grosseiros são retidos. As quantidades de areia e gordura são retidas nas caixas de areia e gordura, respectivamente. A estação elevatória conduz o esgoto pré-tratado para o tratamento biológico no reator RAFA. O efluente do reator RAFA vai para a lagoa facultativa onde os nutrientes e a matéria orgânica particulada serão removidos, permitindo o desenvolvimento de várias espécies. O lodo anaeróbico formado no reator RAFA é disposto no leito de secagem e transportado para valas e aterro.

Tabela 1. Características do influente e efluente da LEF no período de Maio e Junho de 2011.

Parâmetro	Concentração (mg L ⁻¹)	
	Influente	Efluente
DBO ¹	131,000 ± 48,398	50,833 ± 24,815
DQO ¹	343,500 ± 90,264	187,333 ± 40,658
Amônia ¹	58,659 ± 7,398	55,009 ± 6,006
Nitrito ²	0,019 ± 0,006	0,006 ± 0,002
Nitrato ²	3,833 ± 0,471	1,733 ± 0,367
Fosfato Total ¹	6,286 ± 0,737	5,535 ± 1,244

¹Análise na saída do reator RAFA e na entrada (Influente) e saída (Efluente) da LEF.

²Análise do esgoto bruto (Influente) e da saída da LEF (Efluente).

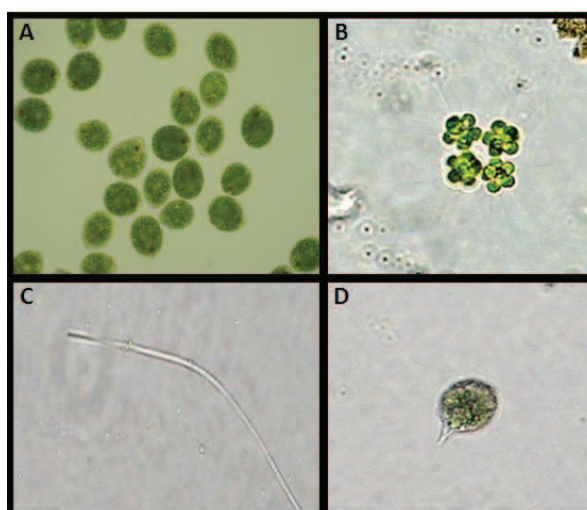


Figura 2. Espécies de microalgas mais abundantes no efluente da LEF da ETE Vila União. *L. salina* Frits. (A), *M. pusillum* (Prin.) Kom.-Legn (B), *P. limnetica* (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg (C) e *Lepocinclis* sp. (D).

Tabela 2. Espécies de microalgas encontradas na LEF da ETE Vila União, Palmas-TO, Brasil, nos meses de Maio e Junho de 2011.

Espécies	Presença das Espécies		Densidade (Ind. mL ⁻¹)	
	Maio	Junho	Maio	Junho
Bacilariofiticea				
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.	X	X	85	42
<i>Fragillaria</i> sp.	X	-	42	-
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitz.) Comp.	-	X	-	42
Cianobactéria				
<i>Aphanizomenon</i> sp.	-	X	-	42
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (W.) Seen. & Sub. Rajú	-	X	-	42
<i>Geitlerinema unigranulatum</i> (Singh) Kom. & Azevedo	X	-	42	-
<i>Planktolingbya limnetica</i> (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg	X	X	2928	42
<i>Planktothrix isothrix</i> Bory	X	-	637	-
Clorofíceas				
<i>Chlorella</i> sp.	X	-	85	-
<i>Coelastrum reticulatum</i> (Dang.) Senn.	-	X	-	85
<i>Elakatothrix gelatinosa</i> Wille	X	-	42	-
<i>Elakatothrix genevensis</i> Hind.	-	X	-	42
<i>Eudorina elegans</i> Ehr.	X	-	42	-
<i>Eutetramorus planctonicus</i> (Kors.) Bourr.	X	-	42	-
<i>Micractinium pusillum</i> (Prin.) Kom.-Legn.	X	-	806	-
<i>Radiococcus planctonicus</i> Lund.	X	-	-	-
Criptofíceas				
<i>Cryptomonas cf pirenoidifera</i> Gleitler	X	-	127	-
Euglenofíceas				
<i>Euglena caudata</i> (Cunha) Conr.	-	X	-	4499
<i>Lepocinlis salina</i> Frits.	X	X	1867	1910
<i>Lepocinlis</i> sp.	X	X	42	340
<i>Strombomonas fluviatilis</i> (Lemm.) Defl.	-	X	-	42
<i>Trachelomonas volvocina</i> Ehr.	X	-	-	-

Tabela 3. Compostos encontrados no lipídio bruto obtido da biomassa composta por várias espécies de microalgas.

Compostos	Fórmula Molecular	Quantidade (% área)	Tempo de retenção (min)
Ácido 2-hidroxi propanóico	C3H6O3	0.37	13.27
Ácido 2-butenóico	C4H6O2	0.53	23.06
Ácido decanóico	C10H20O2	0.47	24.80
Dimetil ester do ácido nonanedióico	C11H20O4	0.23	27.09
Ácido dodecanóico	C12H24O2	2.53	29.45
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	C20H40O	1.82	33.45
Metil éster do ácido 14-methyl-pentadecanóico	C17H34O2	19.53	35.75
Ácido hexadecanóico	C16H32O2	31.97	39.61
Metil éster do ácido (E)-9-Octadecenóico	C19H36O2	20.06	42.02
Metil ester do ácido Octadecanóico	C19H38O2	5.70	43.19
Ácido (Z,Z)-9,12-Octadecadienóico	C18H32O2	5.83	47.36
Ácido 9-octadecenóico	C18H34O2	4.34	47.82
Ácido Octadecanóico	C18H36O2	6.62	47.82

CAPÍTULO V

Identificação por CG/EM de metil ésteres de ácidos graxos a partir de microalgas presentes em uma lagoa de estabilização facultativa

A ser submetido à revista *Bioresource Technology* (ISSN: 0960-8524)

Identificação por CG/EM de metil ésteres de ácidos graxos a partir de microalgas presentes em uma lagoa de estabilização facultativa

**Aderlanio da Silva Cardoso^a, Wesley Adonai Mafra^a, Anelise Kappes Marques^b,
Glaucia Eliza G. Vieira^a**

^a*Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento em Biomassa e Biocombustível - LEDBIO. Avenida NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brasil.*

^b*Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Microbiologia Ambiental, Avenida NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brasil.*

Resumo

As microalgas apresentam-se como uma fonte de lipídios que podem ser utilizadas para a produção de biodiesel. Assim, este trabalho visa realizar uma caracterização química dos lipídios brutos e metil ésteres de ácidos graxos (MEs) a partir da biomassa composta por diferentes espécies de microalgas presentes no efluente de uma lagoa de estabilização facultativa (LEF) localizada na região Norte do Brasil, em diferentes períodos e sem purificação. Inicialmente, os lipídios foram extraídos com hexano via extrator Soxhlet. Em seguida, os lipídios foram caracterizados por análise CG-EM, assim como os MEs obtidos via reação de esterificação com H₂SO₄. Os lipídios brutos apresentaram alto percentual em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (29,47-64,06%) e ácidos graxos saturados (AGS) (20,98-52,61%), além de pequenas quantidades de outros produtos químicos. O conteúdo lipídico foi menor quando a quantidade de biomassa foi maior e vice-versa. Os lipídios brutos da biomassa das microalgas da LEF estudada podem ser utilizados para a produção de biocombustível, assim como para outras aplicações.

Palavras-chave: efluente, microalgas, lipídeos, metil ésteres.

1. Introdução

A produção e o consumo mundial de biodiesel vêm aumentando e sua produção tem sido realizada utilizando diferentes matérias-primas ricas em glicerídeos na reação de transesterificação e a partir de biomassas ricas em ácidos graxos via reação de esterificação. As principais matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel são óleos vegetais e gordura animal (Lang et al., 2001; Jeong et al., 2009). O uso dessas biomassas está relacionado à sua disponibilidade no mercado, baixo preço, conhecimento sobre o cultivo da oleaginosa e domínio tecnológico. Entretanto, as oleaginosas mais utilizadas para a obtenção de biodiesel são a soja no Brasil e Estados Unidos da América (César e Batalha, 2010), colza na Europa, dendezeiro no Sudeste Asiático (Noureddini e Zhu, 1997), as quais têm sido utilizadas na alimentação humana e sua produtividade pode ser menor quando comparada a de algumas espécies de microalgas (Chist, 2007).

Como uma promissora fonte de lipídios, as microalgas podem apresentar uma elevada concentração de lipídios totais (acima de 50%), os quais podem ser naturalmente obtidos a partir da conversão do CO₂ atmosférico pelo processo de fotossíntese, auxiliando na remoção desse composto da atmosfera (Cardoso et al., 2011; Chist, 2007). Esses lipídios são compostos por pigmentos, fosfolipídeos, glicolipídeos, triacilglicerídeos, ácidos graxos livres (AGL), hidrocarbonetos, esteróis, ésteres de esteróis e de cera e alcoóis livres. O conteúdo e composição dos lipídios totais são influenciados pelos fatores ambientais (e.g. luz, temperatura, concentração e fonte de nitrogênio e concentração de CO₂ (Morais e Costa, 2008)), biológicos (e.g. contaminação por microrganismos e outras espécies de microalgas) e tecnológicos (e.g. sistemas de processamento e cultivo). Podem ser obtidos via processo mecânico e pelo uso de solventes, assim como é feito com as biomassas tradicionais (Chist, 2007).

Geralmente, os lipídios das microalgas são obtidos após a biomassa ter sido cultivada e processada (i.e. remoção do meio de cultivo e secagem) e seu conteúdo lipídico ter sido extraído. Essas etapas fazem com que o óleo de microalgas tenha um preço elevado. Em virtude disso, a fim de superar os problemas econômicos relacionados à obtenção dos lipídios, o processo de cultivo poderia ser realizado, por exemplo, através do uso de sistemas de lagoa de estabilização, os quais já são capazes de tratar

esgotos e, conseqüentemente, garantir condições adequadas à produção de biomassa de microalgas para a obtenção de produtos químicos (Olguín, 2012).

Os sistemas de lagoa de estabilização têm sido os processos mais comumente utilizados para o tratamento de esgotos no Brasil devido às condições ambientais, quantidade de área disponível e por ser um dos sistemas mais baratos. Quando o esgoto é tratado na lagoa de estabilização (e.g. lagoa aeróbia, facultativa e de maturação), diferentes compostos são utilizados pelas microalgas (Sperling, 1986), as quais utilizam nutrientes com N e P para produção de biomassa e armazenamento de compostos químicos celulares. Logo, esses sistemas poderiam ser utilizados como uma fonte de biomassa de microalgas. Assim, este trabalho objetivou realizar a caracterização química dos metil ésteres de ácidos graxos obtidos via reação de esterificação dos lipídios brutos extraídos da biomassa composta por diferentes espécies de microalgas presentes no efluente de uma LEF.

2. Metodologia

2.1. Coleta de biomassa de microalgas

A biomassa de microalgas foi coletada do efluente da LEF que faz parte da estação de tratamento de esgotos (ETE) localizada na Vila União, setor norte da cidade de Palmas, TO, Brasil (-10° 8' 43.59'', -48° 21' 25.18''), e pertence à Companhia de Saneamento do Tocantins. A LEF (comprimento: 256,0m; largura: 110,0m; área: 28,16 m²; volume: 42,24 m³; profundidade: 1,5m) é utilizada como tratamento terciário, recebendo efluente do Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA). As características do esgoto afluente (o que entra na lagoa e/ou no reator RAFA) e do efluente (o que sai da lagoa) no período estudado foram as descritas na Tabela 1. A concentração de biomassa de microalgas foi realizada utilizando um sistema de filtração a vácuo, em cinco períodos diferentes (5 amostras) durante o início e meio dos meses de Julho e Agosto e o início de Setembro de 2011, utilizando um papel de filtro quantitativo de 8µm de porosidade. Em seguida, a amostra foi seca a 40°C por 5 horas. O efluente foi filtrado sem purificação para analisar as características dos lipídios brutos obtidos da biomassa de microalgas e observar se esses lipídios podem ser utilizados para a obtenção de biodiesel sem qualquer etapa de purificação.

A caracterização qualitativa e quantitativa das espécies de microalgas presentes no efluente da LEF foi realizada de acordo com o método descrito por Marques (2006), no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, setor Hidrobiologia. O efluente foi composto predominantemente pelas espécies descritas na Tabela 2.

2.2. Caracterização e extração de lipídios brutos

A massa total de microalgas obtida pela filtração de 60L de efluente da LEF foi utilizada para a obtenção de lipídios, a qual foi realizada com o uso de um extrator Soxhlet e n-hexano por 4 horas. Uma quantidade de $5,54 \pm 0,167$ mg de lipídios brutos foi derivatizada com 10 μ L do reagente de sililação N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) por 15min à temperatura ambiente. Além disso, a mistura foi diluída em 1mL de diclorometano e 1 μ L foi utilizado na análise química, a qual foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso Varian 3800 equipado com um espectrômetro de massas Varian Saturn 2200 (CG-EM). As condições da análise CG-EM foram: a coluna utilizada foi uma coluna capilar FactorFour™ VF-5ms, (30m x 0.25mm D.I; 0.25 μ m). A temperatura inicial do forno da coluna foi de 50°C por 5min. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 190°C a uma taxa de 5°C min⁻¹; para 215°C a uma taxa de 0.5°C min⁻¹; e para 320°C a uma taxa de 4°C min⁻¹, seguido de isoterma a 320°C por 3min. A temperatura do injetor foi de 250°C com uma taxa de divisão de 10. O fluxo de gás Hélio (He) utilizado foi de 1mL min⁻¹. A identificação de cada composto foi determinada utilizando o banco de dados da biblioteca NIST Mass Spectral Database. No espectrômetro de massas as temperaturas do *manifold*, *ion trap* e *transfer line* foram de 40°C, 190°C e 200 °C, respectivamente. O seguimento de massa utilizado foi de 40 m/z a 650 m/z, com modo de ionização por impacto de elétrons com 70eV.

2.3. Obtenção e caracterização dos metil ésteres de ácidos graxos

Uma quantidade de $5,32 \pm 0,164$ mg de lipídios brutos foram utilizados em uma reação de esterificação, a qual foi realizada pelo uso de uma relação molar metanol:óleo de 56:1, H₂SO₄ (100% em relação à massa do lipídio) como catalisador, como descrito por Xu et al. (2006), n-heptano (200 μ L) como solvente apolar e a temperatura e tempo de reação foram de 80°C e 30min, respectivamente. Os MEs brutos formados

foram purificados pelo uso de 400 μ L de água destilada e 200 μ L de n-heptano foi adicionado. A fase superior foi separada, o solvente evaporado a 100°C e os tipos de MEs presentes nas amostras foram determinados via análise CG-EM, a qual foi realizada utilizando o mesmo equipamento de análise CG-EM descrito anteriormente. As condições de análise CG-EM foram: a coluna utilizada foi uma coluna capilar FactorFourTM VF-5ms (30m x 0,25mm D.I.; 0,25 μ m). A temperatura inicial do forno da coluna foi de 50°C por 5min. Em seguida, a temperatura foi aumentada para 205°C a uma taxa de 5°C min⁻¹; para 240°C a uma taxa de 1,0°C min⁻¹; para 300°C a uma taxa de 5°C min⁻¹, seguido de uma isoterma a 300°C por 2min. A temperatura do injetor foi de 250°C com uma taxa de divisão de 10. O fluxo do gás He utilizado na coluna foi de 1mL min⁻¹. A identificação dos compostos foi determinada utilizando a biblioteca NIST Mass Spectral Database. As condições de análise do espectrômetro de massas foram as mesmas utilizadas na análise dos lipídeos brutos.

3. Resultados e discussão

3.1. Biomassa de microalgas e lipídios brutos

As quantidades de biomassa e lipídios brutos obtidos estão listadas na Figura 1. No período estudado, as menores quantidades de lipídios foram obtidas nas amostras com as maiores quantidades de biomassa. Quando as microalgas produzem uma maior quantidade de lipídios, sua reprodução é reduzida, fazendo a produtividade de lipídios reduzir. Além disso, um meio de cultura rico em N favorece muito mais a produção de biomassa em vez do aumento do conteúdo lipídico (Feng et al., 2011). O efluente era composto por uma elevada concentração de matéria orgânica e amônia, ambos crescendo da amostra 1 à 5 (Tabela 1). A amostra com a maior quantidade de biomassa e AGPIs (i.e. amostra 5) foi obtida quando o efluente apresentou a maior concentração de matéria orgânica, amônia, nitrito e nitrato (em Setembro). Em relação aos nutrientes com N, a biossíntese de AGS e monoinsaturados (AGMI) é favorecida pelo uso da amônia. Adicionalmente, o nitrato favorece a biossíntese de AGPIs (Perez-Garcia et al., 2011; Wen e Chen, 2001). Apesar da amônia ser a fonte de N mais utilizada pelas microalgas por ser de fácil assimilação, a remoção de nitrato (52,63-63,83%) e nitrito (58,82-80,0%) foi maior que a de amônia (5,58-6,86%) e os lipídios brutos foram formados predominantemente por AGSs nas amostras de 1 a 4.

Além disso, quando em elevada concentração ($>20\text{mg NH}_4^+-\text{N}$), a amônia pode ser tóxica e inibir o crescimento das microalgas (Larsdotter, 2006). Assim, isto pode ser um dos motivos que explica a baixa redução de amônia, apesar da alta concentração disponível. Outrossim, segundo Von Sperling (1986), uma LEF tem a capacidade para reduzir menos que 50% de amônia e é utilizada preferencialmente para remoção de outros compostos (e.g. compostos orgânicos) em vez de N e P.

A Tabela 3 mostra os compostos químicos presentes nos lipídios brutos. As amostras eram compostas por ácidos graxos que podem ser facilmente convertidos em MEs em uma reação via catálise ácida. Todas as amostras foram compostas por AGSs e AGPIs, onde os mais abundantes foram o $\text{C}_{18:3\omega 3}$ e $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ nas amostras de 1 a 4, e o $\text{C}_{18:3\omega 3}$ e $\text{C}_{18:2\omega 6}$ na amostra 5. Assim, os lipídios brutos apresentaram ácidos graxos cujas cadeias carbônicas são altamente saturados (amostras 1 a 4) ou poli-insaturadas (amostra 5) (Figura 2). Entretanto, os ácidos graxos insaturados são preferidos para a produção de biodiesel em vez de saturados porque aqueles podem garantir as características ideais para o biodiesel, principalmente em regiões frias (Hoekman et al., 2011). Além disso, as maiores quantidades de AGPIs (64,06% e 43,11%) foram encontradas nas amostras onde as quantidades de biomassa foram as maiores e o rendimento de lipídios foi o menor. Segundo Perez-Garcia et al. (2011), várias espécies de microalgas podem produzir AGPIs em elevada quantidade quando a produtividade de biomassa é alta e quando algumas condições ambientais (e.g. elevada disponibilidade de nitrato, se a temperatura de crescimento é ótima ou não) são utilizadas. Em relação aos AGSs, houve uma predominância de ácidos graxos C_{14} , C_{15} e C_{16} , onde o C_{16} foi predominante da amostra 1 à 4 e o C_{14} na 5. Os ácidos graxos C_{16} e $\text{C}_{18:1}$ são os tipos mais produzidos pelas microalgas durante a biossíntese de ácidos graxos (Hu et al., 2008).

Além dos ácidos graxos, os lipídios brutos eram compostos por ésteres, hidrocarbonetos, alcoóis e glicerídeos (Tabela 3). Os ésteres eram predominantemente ésteres de cera formados por ácidos graxos e alcoóis de elevada cadeia carbônica. Estes ésteres de cera são formados por diferentes espécies de microalgas, como as pertencentes ao táxon Englenoficea, quando em um ambiente rico em carbono orgânico e em aerobiose (Inui et al., 1982). O hidrocarboneto mais abundante nos lipídios brutos foi o 5.alpha.-colest-3-eno. Os alcoóis presentes em todas as amostras foram predominantemente esteróis, onde a menor cadeia carbônica foi C_{27} e a maior C_{43} . Estes esteróis podem ser facilmente encontrados em espécies de microalgas

(Volkman, 2003). O 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol pode ser obtido tanto pela formação da clorofila *a* e outros compostos celulares, como pela degradação da clorofila *a* em ambiente ácido. Esses alcoóis são essenciais na formação dos componentes celulares (Streit et al., 2005; Piepho et al., 2010).

Além desses compostos, nas amostras 2, 4 e 5 foi detectada a presença do triglicerídeo 1,2,3-propanetriil éster do ácido docosaheptaenoico, em quantidades de aproximadamente 3,26, 5,88 e 6,53%, respectivamente. A biomassa de microalgas utilizada neste trabalho cresceram sob condição fotoautotrófica natural, a qual favorece a formação de AGPIs em vez de triglicerídeos em algumas espécies devido à elevada quantidade de energia requerida para a biossíntese de triglicerídeos, quando comparada com a dos AGPIs (Perez-Garcia et al., 2011). As condições (e.g. disponibilidade de nutrientes, condições ambientais) necessárias para a produção desses compostos foram encontradas na LEF (i.e. temperatura do efluente foi de $26,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, pH 8,0-8,5, tempo de detenção hidráulico de aproximadamente 15 dias) onde as biomassas de microalgas foram coletadas.

3.2. Composição das amostras de metil éster de ácidos graxos

Para obter MEs, uma reação via catálise ácida foi utilizada devido à alta concentração de ácidos graxos livres nas amostras de lipídios brutos utilizadas. Geralmente, é necessário utilizar uma elevada razão molar óleo:álcool, alta temperatura e/ou tempo de reação para aumentar o rendimento de MEs quando uma transesterificação e/ou esterificação via catálise ácida é utilizada (Vyas et al., 2010). O rendimento dos MEs brutos foi de $76,6 \pm 5,89\%$, em relação à massa de lipídeos brutos utilizado. Uma ótima composição do biodiesel deve ter baixos níveis de AGSs e AGPIs e alta concentração de AGMIs. Todas as 5 amostras foram compostas por elevada quantidade de MEs com AGPIs, principalmente o C18:3. O ME derivado de AGMI foi somente o C16:1. Os ácidos graxos C16:1 e C18:1 são os ácidos cujo biodiesel apresenta as melhores características (Hoekman et al., 2011). Entretanto, as 5 amostras são altamente saturadas e/ou poli-insaturadas, com baixa quantidade de monoinsaturados (Figura 3). O que pode gerar um biodiesel com características diferentes das padrões (Bucy et al., 2012). Portanto, considerando somente a composição química, os MEs brutos da amostra 3 (obtida em Agosto) poderiam ser os

ideais para ser utilizado como biodiesel devido a menor quantidade de MEs derivados de AGPIs (29,58%).

Os compostos presentes nos MEs brutos depois da reação de esterificação estão descritos na Tabela 4. Mesmo depois do processo de esterificação, a mistura obtida foi formada por compostos diferente de MEs como hidrocarbonetos, alcoóis e éter. A presença desses compostos no biodiesel pode causar problemas no motor, principalmente, quando operado sob condições de clima frio (Chupka et al., 2012). A maioria dos hidrocarbonetos presentes nas amostras foi os à base de esteróis. Além disso, os alcoóis de cadeia longa podem reduzir as características do biodiesel como o poder calorífico, lubrificidade e podem provocar um adiantamento da injeção do biodiesel no motor (Hoekman et al., 2011).

Houve algumas diferenças qualitativas e quantitativas entre os compostos encontrados nos lipídios brutos e nos MEs brutos. Entretanto, mesmo sem purificação e utilizando uma biomassa composta por várias espécies de microalgas (a maioria dos trabalhos utiliza apenas uma espécie), os lipídios brutos e os MEs obtidos apresentaram elevada concentração de AGSs e AGPIs comumente presentes em matérias-primas tradicionalmente utilizadas para a produção de biodiesel (e.g. soja, pinhão-manso, etc).

4. Conclusão

A utilização de lipídeos derivados de biomassa formada por diferentes espécies de microalgas oriundas de lagoa de estabilização facultativa permite a obtenção de MEs a partir de ácidos graxos de cadeia longa, os quais são altamente poli-insaturados ou saturados. A biomassa utilizada neste trabalho possui potencial para ser utilizada como fonte de diferentes compostos e vários ácidos graxos, os quais podem ser transformados em biocombustível por métodos não tradicionais como reação de esterificação via catálise ácida.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de mestrado do Aderlânio da Silva Cardoso, à Saneatins, e aos laboratórios Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento de Biomassa e Biocombustível.

Referências

- Bucy, H.B., Baumgardner, M.E., Marchese, A.J., 2012. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl eicosapentaenoate and methyl docosahexaenoate. *Algal Research*. 1, 57-69.
- Cardoso, A.S., Vieira, G.E.G., Marques A.K., 2011. The use of microalgae for the production of biofuels. *Braz. J. Biosci.* 9, 542-549.
- César, A.S., Batalha, M.O., 2010. Biodiesel production from castor oil in Brazil: a difficult reality. *Energ. Policy*. 38, 4031-4039.
- Chist, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.
- Chupka, G.M., Fouts, L., McCormick, R.L., 2012. Effect of low-level impurities on low-temperature performance properties of biodiesel. *Energy Environ. Sci.* 5, 8734-8742.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S., Zhang, W., 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour. Technol.* 102, 6710-6716.
- Hoekman, S.K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M., 2011. Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 143-169.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Guirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621-639.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S., 1982. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS LETTERS*. 150, 89-93.
- Jeong, G.T., Yang, H.S., Park, D.H., 2009. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100, 25-30.
- Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B., 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.* 80, 53-62.
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae - a literature review. *Vatten*. 62, 31-38.
- Marques, A.K., 2006. Análise da diversidade fitoplanctônica na reservatório da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães, no médio Tocantins - TO: estrutura da comunidade, flutuações temporais e espaciais. 08.30.2012.
<http://www.site.uft.edu.br/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=974&Itemid=69>.
- Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2008. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Quím. nova*. 31, 1038-1042.
- Noureddini H., Zhu D., 1997. Kinetics of transesterification of soybean oil. *JAOCs*. 74, 1457-1463.
- Olguín, E.J., 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031-1046.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water*

Res. 45, 11-36.

Piepho, M., Martin-Creuzburg, D., Wacker, A., 2010. Simultaneous effects of light intensity and phosphorus supply on the sterol content of phytoplankton. PLoS One. 5, p. doi: 10.1371/journal.pone.0015828.

Sperling, M.V., 1986. Lagoas de estabilização, UFMG, Belo Horizonte.

Streit, N.M., Canterle, L.P., do Canto, M.W., Hecktheuer, L.H.H., 2005. As clorofilas. Ciência Rural. 35, 748-755.

Volkman, J.K., 2003. Sterols in microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. 60, 495-506.

Vyas, A.P., Verma, J.L., Subrahmanyam, N., 2010. A review on FAME production processes. Fuel. 89, 1-9.

Wen, Z.-Y., Chen F., 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. Enzyme Microb. Tech. 29, 341-347.

Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. J. Biotech. 126, 499-507.

Tabela 1. Características do esgoto afluente e do efluente da LEF da ETE Vila União, Palmas-TO, no período entre Julho a Setembro de 2011.

Parâmetro	Concentração (mg L ⁻¹)					
	Julho		Agosto		Setembro	
	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
DBO ¹	48.000	28.000	135.000	28.000	165.000	59.000
DQO ¹	292.000	177.000	298.000	163.000	391.000	170.000
Amônia ¹	61.198	57.745	63.337	58.993	65.453	61.800
Nitrito ²	0.017	0.007	0.025	0.005	0.027	0.009
Nitrato ²	3.900	1.600	3.800	1.800	4.700	1.700
Fosfato Total ¹	6.594	6.534	7.069	6.385	6.725	6.116

¹Análise na saída do reator RAFA e na entrada (Influente) e saída (Efluente) da LEF.

²Análise do esgoto bruto (Influente) e da saída da LEF (Efluente).

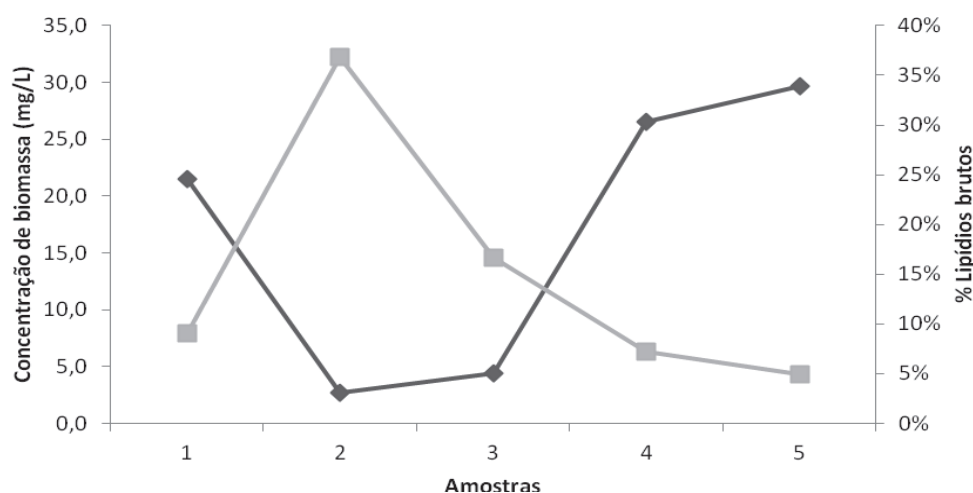


Figura 1. Relação entre as quantidades de biomassa de microalgas (◆) e seu conteúdo de lipídios brutos (■) em cada uma das 5 amostras.

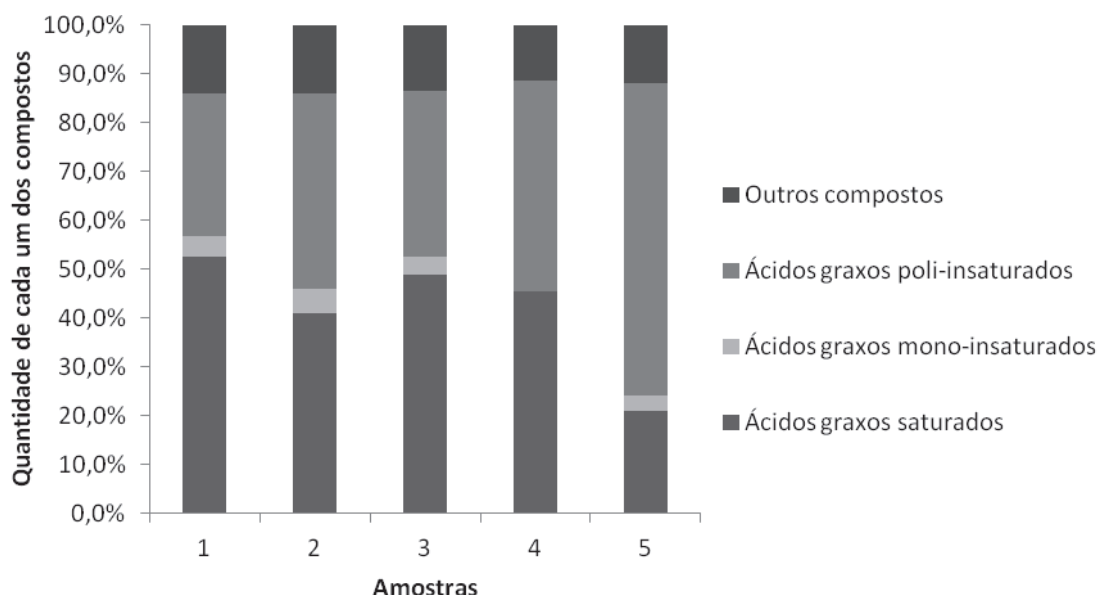


Figura 2. A quantidade total de ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e de outros compostos presentes nas 5 amostras dos lipídios brutos da biomassa de microalgas da LEF da ETE Vila União, Palmas-TO.

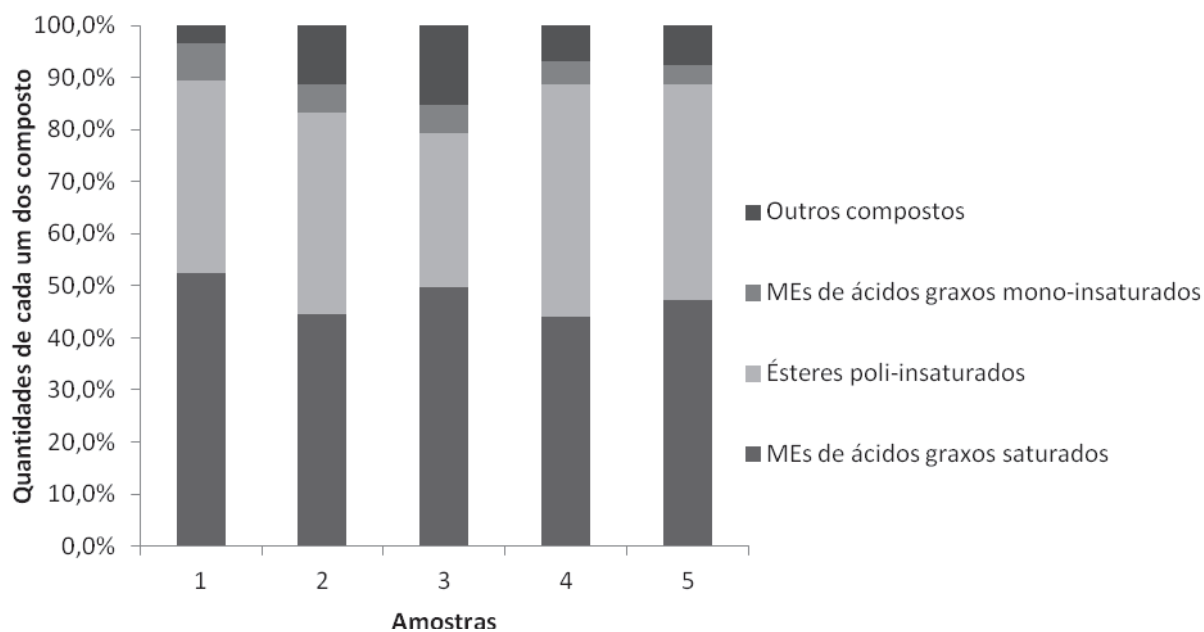


Figura 3. A quantidade total ácidos graxos saturados, monoinsaturados, poli-insaturados e de outros compostos presentes nas 5 amostras de MEs brutos.

Tabela 2. Espécies de microalgas presentes no efluente da LEF estudada.

Taxa	Espécies
<i>BACILLARIOPHYCEAE</i>	<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehr.) Sim. var. <i>granulata</i> <i>Fragillaria</i> sp1
<i>CYANOBACTERIA</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (W.) Seen. e Sub. Rajú <i>Geitlerinema amphibium</i> (Agardh. Ex Gomont) Anag. <i>Geitlerinema unigranulatum</i> (Singh) Kom. e Azevedo <i>Lemmermaniella</i> sp <i>Merismopedia tenuissima</i> Lemm. <i>Planktolyngbya circuncreta</i> (G. S. West) Anagn.et Kom <i>Planktolyngbya limnetica</i> (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg <i>Planktothrix isothrix</i> Bory <i>Planktothrix</i> sp
<i>CHLOROPHYCEAE</i>	<i>Coelastrum reticulatum</i> (Dang.) Senn. <i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Näg. <i>Dictyosphaerium pulchellum</i> Wood <i>Eudorina elegans</i> Ehr. <i>Monoraphidium arcuatum</i> (Kors.) Hind. <i>Monoraphidium irregulare</i> (G. M. Sm.) Kom.-Legn. <i>Pediastrum duplex</i> Mey. <i>Radiococcus planctonicus</i> Lund. <i>Treubaria schmidlei</i> (Schr.) Fott & Kov.
<i>CRYPTOPHYCEAE</i>	<i>Cryptomonas cf pirenoidifera</i> Gleitler
<i>EUGLENOPHYCEAE</i>	<i>Euglena caudata</i> (Cunha) Conr. <i>Euglena</i> sp. <i>Lepocinclis ovum</i> (Ehr.) Lemm. <i>Lepocinclis salina</i> Frits. <i>Lepocinclis</i> sp1 <i>Phacus longicauda</i> (Ehr.) Duj. <i>Phacus longicauda var tortus</i> (Lemm.) Skorvotzov <i>Phacus</i> sp. 1 <i>Trachelomonas volvocina</i> Ehr.
<i>ZYGNEMAPHYCEAE</i>	<i>Cosmarium pseudoconatum</i> Nordst. <i>Mougeotia cf. delicata</i> Beck <i>Staurastrum curvimarginatum</i> Scott & Gronblad <i>Staurastrum iversenii</i> Nyg. <i>Staurastrum leptocladum</i> Nordst. var. <i>leptocladum</i> Nordst <i>Staurastrum sebaldi</i> Reins. <i>Staurodesmus mamillatus</i> Norsted
<i>DINOPHYCEAE</i>	<i>Peridinium cf. volzii</i> Lemm.

Tabela 3. Compostos presentes (em % relativo) nos lipídios brutos de cada uma das amostras de biomassa das microalgas.

Compostos		Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
	Fórmula					
<i>Ácidos graxos saturados</i>						
Propanoic acid, 2-hydroxy.	C3H6O3	0,053	ND	ND	ND	ND
Hexanoic acid.	C6H12O2	0,026	ND	0,087	0,027	0,047
2-Ethylhexanoic acid.	C8H16O2	ND	0,135	ND	ND	ND
Decanoic acid.	C10H20O2	ND	ND	ND	ND	0,070
Undecanoic acid.	C11H22O2	ND	ND	0,057	0,103	ND
Dodecanoic acid.	C12H24O2	2,409	0,792	0,902	2,272	1,407
Tridecanoic acid.	C13H26O2	2,298	0,475	1,433	3,625	1,822
Tetradecanoic acid.	C14H28O2	9,000	3,879	7,206	11,953	8,651
n-Pentadecanoic acid.	C15H30O2	5,662	3,205	5,635	6,482	5,260
Hexadecanoic acid.	C16H32O2	22,875	27,053	29,316	18,945	3,718
Heptadecanoic acid.	C17H34O2	3,348	1,807	3,687	2,084	ND
Octadecanoic acid.	C18H36O2	6,074	ND	ND	ND	ND
Nonadecanoic acid.	C19H38O2	0,373	ND	ND	ND	ND
Eicosanoic acid.	C20H40O2	0,297	0,462	0,615	ND	ND
Docosanoic acid.	C22H44O2	ND	0,566	ND	ND	ND
Hexacosanoic acid.	C26H52O2	0,198	ND	ND	ND	ND
<i>Ácido graxo monoinsaturado</i>						
9-Octadecenoic acid (Z)-	C18H34O2	4,004	5,048	3,706	ND	2,984
<i>Ácidos graxos poli-insaturados</i>						
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	C18H32O2	11,135	16,269	13,091	17,529	24,591
9,12,15-Octadecatrienoic acid. (Z,Z,Z)-	C18H30O2	16,748	21,247	20,765	25,579	39,471
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid. (all-Z)-. Arachidonic acid.	C20H32O2	1,588	ND	ND	ND	ND
<i>Ésteres</i>						
Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-, 3-hydroxy-, 2,4,4-trimethylpentyl ester.	C12H24O3	0,323	0,318	ND	0,151	ND
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester.	C16H22O4	0,234	3,328	1,080	ND	ND
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl Ester.	C17H34O2	0,281	ND	ND	0,412	0,232
Benzeneacetic acid, alpha-hydroxy-alpha-phenyl-, 1-azabicyclo(2,2,2)oct-3-yl ester.	C21H23NO3	ND	ND	0,264	0,156	ND
5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester. (all-Z)-.	C21H32O2	0,956	2,445	0,335	1,017	2,023
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester. Hexanedioic acid, dioctylester. D(2-ethylhexyl)adipate.	C22H42O4	1,019	0,684	ND	ND	ND
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester.	C24H38O4	3,792	ND	ND	ND	ND
Phthalic acid, nonyl 4-octyl ester.	C25H40O4	ND	0,142	ND	ND	ND
Tetradecanoic acid, tetradecyl ester.	C28H56O2	ND	ND	ND	2,091	ND
Tetradecanoic acid, hexadecyl ester.	C30H60O2	ND	ND	ND	6,899	ND
<i>Glicerídeos</i>						
Docosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester.	C69H98O6	ND	3,262	ND	5,881	6,527
<i>Alcoóis</i>						
Hexadecanol.	C16H34O	ND	0,784	ND	ND	ND
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol.	C20H40O	0,678	2,513	0,972	2,555	3,075
Cholesterol	C27H46O	2,987	10,195	5,935	2,443	ND
Cholestan-3-ol, (3 beta, 5 alpha)-.	C27H48O	3,506	1,474	7,272	0,992	0,781
Stigmasterol.	C29H48O	0,860	1,048	2,092	ND	ND
β-Sitosterol.	C29H50O	2,058	1,978	1,782	0,704	1,001
Cholest-5-ene, 3-(hexadecyloxy)-, (3 beta)-.	C43H78O	ND	ND	ND	ND	1,893
<i>Hidrocarbonetos</i>						
Cholest-3-ene, (5 alpha)-.	C27H46	6,433	5,955	10,778	1,141	ND
Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-.	C10H14	0,197	0,261	0,072	0,089	0,123
<i>Total de ácidos graxos saturados Total</i>						
<i>Total de ácidos graxos poli-insaturados</i>						
		52,613	40,902	48,938	45,490	20,975
		29,470	39,988	33,856	43,108	64,062

Tabela 4. Compostos presentes (em % relativo) nos MEs brutos de cada uma das amostras de biomassa das microalgas.

Compostos	Fórmula	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
<i>MÉs de ácidos graxos saturados</i>						
Dodecanoic acid, methyl Ester	C13H26O2	2.294	0.728	0.569	0.562	1.096
Undecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester	C13H26O2	ND	ND	ND	2.123	ND
Tridecanoic acid, methyl Ester	C14H28O2	2.557	0.443	1.191	4.315	1.675
Tridecanoic acid, 1,2-methyl-, methyl Ester	C15H30O2	11.468	4.249	6.610	0.164	8.287
Pentadecanoic acid, methyl ester	C16H32O2	5.589	3.187	4.952	9.280	12.269
Tetradecanoic acid, 12-methyl-, methyl Ester	C16H32O2	ND	ND	0.558	0.124	0.204
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl Ester	C17H34O2	21.573	22.292	20.045	18.705	14.967
Cyclopropanoic acid, 2-hexyl-, methyl Ester	C18H34O2	0.109	ND	0.997	0.095	ND
Hexadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	C18H36O2	2.478	0.873	ND	1.835	1.282
Heptadecanoic acid, methyl ester	C18H36O2	0.473	0.725	4.114	1.695	1.449
Octadecanoic acid, methyl Ester	C19H38O2	5.873	11.901	9.730	4.531	5.023
Cyclopropanoic acid, 2-octyl-, methyl Ester	C20H38O2	ND	0.162	0.355	0.397	0.839
Octadecanoic acid, 17-methyl-, methyl Ester	C20H40O2	ND	ND	ND	0.187	0.182
Eicosanoic acid, methyl ester	C21H42O2	ND	ND	0.519	ND	ND
<i>MÉs de ácidos graxos monoinsaturados</i>						
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C17H32O2	7.079	5.286	4.824	4.260	3.721
2-Hexadecenoic acid, methyl ester, (E)-	C17H32O2	ND	0.047	0.099	0.088	0.063
11-Hexadecenoic acid, 15-methyl-, methyl Ester	C18H34O2	ND	ND	0.665	ND	ND
<i>Ésteres de ácidos graxos poli-insaturados</i>						
7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	C17H28O2	ND	ND	0.307	7.378	5.564
7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	C17H30O2	ND	0.743	0.221	2.286	1.444
8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	C19H34O2	9.913	14.498	12.670	ND	ND
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl Ester, (Z,Z,Z)-	C19H32O2	19.330	17.401	15.207	27.736	27.112
5,8,11,14-Eicosapentaenoic acid, methyl Ester, (all-Z)-	C21H32O2	1.529	1.088	0.460	3.104	2.202
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, ethyl Ester, (all-Z)-	C22H36O2	0.641	1.073	0.712	2.063	3.005
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl Ester, (all-Z)-	C23H34O2	5.598	0.105	ND	0.615	0.651
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl Ester	C24H38O4	ND	3.783	ND	1.532	1.414
<i>Hidrocarbonetos</i>						
Naphthalene	C10H8	ND	ND	0.021	0.012	ND
Cholesta-3,5-diene	C27H44	ND	1.172	1.596	ND	ND
Cholest-4-ene	C27H46	0.463	1.357	4.384	ND	0.296
Ergosta-4,6,22-triene	C28H44	ND	ND	0.624	ND	ND
Stigmastan-3,5,22-trien	C29H46	ND	ND	0.560	ND	ND
Stigmastan-4,22-diene;	C29H48	ND	ND	0.171	ND	ND
<i>Alcoóis</i>						
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C20H40O	1.817	7.442	4.512	2.727	4.363
Cholestan-3-ol, acetate, (3.beta., 5. Alpha.)-	C29H50O2	0.235	ND	3.326	ND	0.109
1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	C30H50O	0.981	0.531	ND	0.689	ND
Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3.beta.)-	C27H44O	ND	0.134	ND	ND	ND
<i>Éter</i>						
Tetrahydropyranyl ether of citronellol	C15H28O2	ND	0.784	ND	3.496	2.781
Total de MÉs de ácidos graxos saturados						
		52.414	44.560	49.641	44.013	47.273
Total de ésteres poli-insaturados						
		37.012	38.689	29.576	44.714	41.393

ANEXOS

ANEXO A – Artigos publicados e a serem submetidos.

Chemical and species characterizations of the microalgae from a wastewater stabilization pond

Aderlanio da S. Cardoso^a, Anelise Kappes Marques^b, Glauca Eliza G. Vieira^a

^aFederal University of Tocantins, Laboratory of Essay and Development in Biomass and Biofuel - LEDBIO. Avenue NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brazil.

^bFederal University of Tocantins, Environmental Microbiology Laboratory, Avenue NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brazil.

Abstract

The quantity of wastewater treatment plant using stabilization ponds has increased in Brazil. Thus, to help in the sustainability of the treatment process and to increase the quality of the effluent release into the receiving water, the biomass composed by microalgae formed during the treatment could be used for biofuel production. However, the characteristics of this biomass have to be determined. Therefore, this work aimed to do the taxonomic characterization of the microalgae species from the facultative stabilization pond (FSP) of the Wastewater Treatment Plant located in the Vila União, Palmas-TO, Brazil, along with the chemical characterization (e.g. total lipids, chemical characterization of the raw lipids by GC-MS analysis and total carbohydrate by the phenol sulphuric acid method) of the biomass. The effluent of the FSP is composed in large quantities by species belong to the Cyanobacteria and Euglenophyceae taxa. The raw lipids obtained presented values of 14.21% in relation to the dried biomass. The GC-MS analysis showed the presence of different chemical compounds with predominance of saturated fatty acids. The total carbohydrate was 3.49%. The high presence in a natural watercourse of the species found in this work can bring environmental and human problems. Thus, the obtainment of microalgal biomass from wastewater stabilization pond probably provides an economic and environmental gain.

Keywords: wastewater treatment, microalga characterization, biofuel.

1. Introduction

The wastewater treatment has increased in Brazil and the stabilization ponds have been the treatment most used due to the Brazilian climatic conditions (high air temperature, high sun-light, etc) and the large quantity of area available in its territory [1]. The stabilization ponds have natural conditions that guarantee the growth of a rich phytoplankton. This is consequence of the nutrients present in the wastewater and the nutrients released into the system after the bacterial degradation of chemical compounds. Generally, after the wastewater has been treatment in a stabilization pond system, the microalgal biomass is released into the receiving water [2]. However, during the growing process, these microalgae can storage several biochemical compounds that could be used in different applications such as biofuel production [3] [4].

The biofuels have been a sustainable and renewable alternative used to overcome the problems related to the using of petroleum-based fuels. Biofuels are produced by the use of different biomasses, which are renewable. However, due to increased biofuel consumption, the production of biomass to obtain biofuel has to increase to supply the necessities of the industry. Thus, the microalgae appear as a promising source of different products (e.g. lipids, carbohydrates, hydrogen) that can be used as a feedstock to biofuel production [5]. This has happened because the microalgae have a rapid growing and transform the atmospheric CO₂ and nutrients from the culture medium into biochemical products to guarantee its reproduction and cellular development.

The culture systems used to microalgae biomass obtainment are very expensive, making the utilization of large quantities of nutrients such as N and P-based nutrients. As an alternative, residual nutrients (e.g. residential wastewater) have gained a large attention in research laboratories. Using the nutrients from wastewaters can improve the treatment system, because it will be with low quantity of nutrients and without microalgae cells whose presence in the received water may cause environmental impacts.

Thereby, using the microalgal biomass to energy and biofuel production, it will be a good destination, since this biomass, generally, has not been utilization such as food supplement because it can be toxic [6]. As a result, this could be a good alternative to

reduce the high cost of products from microalgae and could contribute to the widespread use of this biomass to produce biofuel cheaper. But, the microalgae from stabilization ponds have to be characterized to know what species are capable to grow in this environment rich in nutrients as well as its biochemical composition. Thus, this work aims to do a taxonomic and quantitative characterization of the microalgae species presented in the effluent of the FSP of the Wastewater Treatment Plant (WWTP) located in Vila União, city of Palmas-TO, and to take place the quantification of total lipids and total carbohydrates focusing on the potential of these species to produce chemical products that can be used for biofuel obtainment.

2. Material and Methods

2.1. Characteristics of the WWTP

The WWTP is located in the northern sector of the city of Palmas ($-10^{\circ} 8' 43.59''$, $-48^{\circ} 21' 25.18''$), state of Tocantins, and belongs to the Sanitation Company of Tocantins (Saneatins), consisting of pre-treatment (grating, box of sand and grease trap), an Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor followed by a FSP (Length: 256m; Width: 110m; Area: 28.160 m²; Volume: 42.240 m³; Depth: 1.5m) for a post-treatment of the secondarily treated effluent in the UASB reactor (Fig. 1). The receiving water of the effluent from the WWTP is the Stream Agua Fria whose mouth is the reservoir of the Luis Eduardo Magalhães Hydroelectric Plant, where the release point of the effluent is located near the mouth of the stream. Moreover, the local population makes use of this stream for various purposes (recreation, fishing and doing the laundry) [7]. The influent and effluent characteristics in the period studied were the described in the Table 1.

2.2. Qualitative and quantitative characterizations of the microalgae species

The methodology used for the qualitative analysis of the microalgae from the FSP was described by Marques [8]. The quantitative analysis was performed according to the method described by Uthermöhl [9], which is based on the random distribution of individuals in the bottom of the sedimentation chamber. The supernatant volume was 10 mL. The count was performed on an inverted microscope whose counted fields were distributed in parallel vertical transects, covering almost the entire area of the

chamber, drawn randomly. The sedimentation time was at least 3 hours for each inch of height of the camera [10]. In calculation of the phytoplankton, it was considered as an individual the unicellular organisms, filaments, trichomes, colonies and cenobio. The number of fields counted was the necessary to reach 100 individuals of the more frequent species, or stabilizing the number of species added per field (minimum area of compensation). Lund et al. [11] considered the counting error less than 20% at a significance level of 95%. The count results were expressed as individuals per mL, according to Rodrigues and Nogueira [12]. These characterizations were made on May and June of 2011.

2.3. Microalgae biomass recovery and characterization

The recovery process used to obtain microalgae biomass was described in our previously study [13] and the volume of effluent filtered was 60 ± 10 L. The extraction of lipids from the biomass was also performed according to our previously study [13], that is based on the method described by Bligh and Dyer [14].

A quantity of 5.3mg of the raw lipids extracted was characterized using a Varian 3800 gas chromatography equipment interfaced with a Varian Saturn 2200 mass spectrometer detector (GC-MS), after the extract has been derivatized by using 10 μ L of the silylation reagent N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) for 15min at room temperature and dissolved in 1mL of dichloromethane. The conditions of GC-MS analysis were: the column used was a FactorFourTM (Capillary Column) VF-5ms (30m x 0.25mm I.D.; 0.25 μ m). The initial column oven temperature was 50°C for 5min with a sequential increase to 190°C at 5°C min⁻¹, 215°C at 0.5°C min⁻¹ and to 320°C at 4°C min⁻¹, followed by an isothermal hold at 320°C for 3min. Injector temperature: 250°C with a split ratio of 10 and the sample volume injected was 1 μ L. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1mL min⁻¹. In relation to the total carbohydrate content, it was determined by the phenol sulphuric acid method according to Myklestad and Haug [15] and Lourenço [16].

3. Results and Discussion

3.1. Microalgae species from the FSP

The species of microalgae found in the effluent from the FSP during the months of May and July of 2011 are shown in the Table 2. The microalgae belong to the groups Bacillariophyceae, Cyanobacteria, Chlorophyceae, Cryptophyceae and Euglenophyceae. The largest number of individuals per milliliter in May was the species *P. limnetica* (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg, *L. salina* Frits. and *M. pusillum* (Prin.) Kom.-Legn. In July, the largest quantity of microalgae cells belong to species of the Euglenophyceae group (*E. caudata* (Cunha) Conr., *L. salina* Frits. and *Lepocinclis* sp.1, respectively) (Fig. 2). The quantity of cells of microalgae shows that there is a large variety in the FSP. According to Soldatelli [17], when a culture medium rich in N compounds, such as the effluent from UASB reactor, is used, there will be the predominance of these groups.

3.2. Microalgal biomass production and wastewater treatment

The amount of microalgal biomass obtained by filtration of the effluent from the FSP was $1,290.32 \pm 1,062.48$ mg. In a medium rich in nitrogen (e.g. the effluent from UASB reactor), some microalgae tend to produce more biomass than other cell products such as carbohydrates and lipids [4] [18]. The ammonia is easily removed by cells of microalgae. However, in high concentrations it can inhibit the algal growth [19]. The removal of N and P in the FSP is less than 35%, this pond is usually more used for reduction of biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD), especially in effluents with low load, as presented in this work [2]. Therefore, neither the N nor P assimilated by the algae would be removed since the algal biomass is released into the receiving water and it can assist the eutrophication process of the waterbody. On the other hand, when such biomass is recovered as source of chemical products, nutrients will be removed, increasing the efficiency of the wastewater treatment process.

In several microalga species, the nitrate reductase is expressed in cells grown in an environment where the only available form of N is nitrate and it is repressed in a culture medium containing high amount of ammonia nitrogen and a mixture of ammonia and nitrate, as observed in the effluent studied [20]. However, the N in the form of nitrate had a greater removal than the ammonia nitrogen (removing of 6.22% of ammonium and 54.79% of nitrate). Despite of this, wastewater can be used to reduce costs of the microalgae cultivation, increasing the sustainability of their

biomass processing and preserving precious freshwater resources [21], because, According to Petry [22], when the receiving water has a combination of algae and halogenated compounds, trihalomethanes can be produced. Petry [22] discussed that samples of water containing chlorophyceae algae can form trihalomethanes, even in small quantities compared with waters rich in humic acids. According to Naval *et al.* [7], the WWTP studied in this work generates several negative impacts in various environments (water, soil and air) and on the population that uses the stream water that receives the effluent from the WWTP.

3.3. Lipid and carbohydrate analysis

The lipid content (14.21%) was higher than the carbohydrate one (3.49%). To produce lipids, the microalgae use the carbohydrate present in the cells as carbon source. Thus, as the lipids content increases the carbohydrate tend to reduce [6]. In addition, a culture medium rich in N-based nutrients tend to favor the biomass production instead of lipids and carbohydrates [18]. On the other hand, a high quantity of ammonium can be toxic to microalgae growth [4]. In relation to the type of lipid, this can be determined by the remaining sugars when the quantity of nitrogen in the culture medium exhausted. Furthermore, the saturation of the fatty acids can be determined by the quantity of sugars and growth conditions (e.g. autotrophic, heterotrophic). Some species can accumulate more lipids, mainly triglycerides, under heterotrophic than autotrophic conditions. In contrast, autotrophic cultures form more highly unsaturated fatty acids (polar lipids). A cause of variations in accumulating lipids can be the source of nitrogen, ammonia can favorite saturated and mono-unsaturated fatty acids (C14:0, C16:0, C16:1) and nitrate and urea can promote polyunsaturated fatty acids (C20:4 and C20:5). The effluent used in this work shows a large quantity of ammonia, which can favor the formation of the different saturated fatty acids found in the extract. Furthermore, the presence of nitrate in the wastewater helps the microalgae accumulate fatty acid with a large carbon chain (C20 and C27) [20].

The raw lipid was highly saturated and with a large quantity of monounsaturated fatty acid (Table 3). According to Hu *et al.*, [23] microalgae belonging to the taxa found in this work produce fatty acids that can be used to biodiesel production such as C16:0 and C18:1, along with fatty acids with high carbon chain (e.g. C20 and C22). Besides,

the fatty acids C16:0 and C18:1 found in the samples, for instance, are commonly used to biodiesel production when traditional biomasses are used [1], making the biomass obtained from the effluent of the FSP studied a possible resource for biofuel obtainment, but using a non-traditional biodiesel reaction due to the large quantity of free fatty acids present. In addition to the fatty acids, the carbohydrates present in the microalgae cells may be used to obtain biofuel [24] [25] [26].

4. Conclusion

The effluent of the FSP is composed by different species. The taxa Chlorophyceae, Cyanobacteria and Euglenophyceae present the highest number of species, respectively. However, with regard to the number of individuals per milliliter, species belonging to taxa Cyanobacteria and Euglenophyceae are predominant. The identified microalgae produce lipids and fatty acids, which could be used to obtain biodiesel. Biomass recovered from the effluent of the FSP has a lipid and carbohydrate contents of 14.21% and 3.49%, respectively, which may have potential for use in biofuel obtaining. From the economic and environmental standpoint, obtaining microalgal biomass directly from the FSP shows an alternative to the traditionally used procedures (photobioreactors and aerated tanks) to obtain algal biomass and, simultaneously, to minimize environmental impacts of the possible high presence of this material in the environment.

Acknowledgment

The authors are grateful for the Aderlanio da Silva Cardoso's Master Scholarship funded by CNPq and for the partner Saneatins, Environmental Microbiology Laboratory and the Laboratory of Essay and Development in Biomass and Biofuel both of the Federal University of Tocantins.

References

- [1] Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M. Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renew Sust Energ Rev* 2012;16: 143-169.
- [2] Sperling MV. Lagoas de estabilização. Belo Horizonte: UFMG; 1986.

- [3] Cho S, Luong TT, Lee D, Oh Y-K, Lee T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour Technol* 2011;102(18): 8639-8645.
- [4] Pittman JK, Dean AP, Osundeko O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour Technol* 2011;102: 17-25.
- [5] Cardoso AS, Vieira GEG, Marques AK. The use of microalgae for the production of biofuels. *Rev Bras Biocienc* 2011;9(4): 542-549.
- [6] Sydney EB, da Silva TE, Tokarski A, Novak AC, de Carvalho JC, Woiciechowski A. L. Screening of microalgae with potential for biofuel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl Energy* 2011;88: 3291-3294.
- [7] Naval LP, Barros DSB, Silva CDF. Aplicação de métodos de avaliação de impactos ambientais a uma ETE operando em escala real com a respectiva proposição de medidas mitigadoras. 08.30.2012. <<http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/danger.pdf>>.
- [8] Marques AK. Análise da diversidade fitoplanctônica na reservatório da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães, no médio Tocantins - TO: estrutura da comunidade, flutuações temporais e espaciais. 08.30.2012. <http://www.site.uft.edu.br/component/option,com_docman/Itemid,69/task,doc_details/gid,974/>.
- [9] Uthermol H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton. Methodik Mitteilungen Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie 1958;9: 1-38.
- [10] Margalef R. *Limnologia*. Barcelona: Omega S/A; 1983.
- [11] Lund JWG, Kipling C, Lecren ED. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia* 1958;11: 143-170.
- [12] Nogueira IS, Rodrigues LNC. Planctonic algae of an artificial lake of Chico Mendes botanical gardens, municipality of Goiania, state of Goias: floristic and some ecological considerations. *Rev Bras de Biol* 1999;16: 155-174.
- [13] Vieira GEG, Cardoso AS, Marques AK, Pickler AC. Assessment of the potential of residuary microalgae from a stabilization pond for the production of biofuel. *WIT Trans on Ecol Envir* 2011;167: 170-181.
- [14] Dyer BA. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 1959;37: 911-917.
- [15] Myklestad S, Haug A. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chatoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 1972;9: 125-136.
- [16] Lourenço SO. Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações.

São Carlos-SP: Rima; 2006.

[17] Soldatelli VF. Avaliação da comunidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização utilizadas no tratamento de efluentes domésticos. Estudo de caso – ETE-UCS. 11.15.2012.

<<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/10953>>.

[18] Dragone G, Fernandes BD, Abreu AP, Vicente AA, Teixeira JA. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Appl Energy* 2011;88: 3331-3335.

[19] Rawat I, Kumar RR, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: phicoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energy* 2011;88: 3411-3424.

[20] Perez-Garcia O, Escalante FME, de-Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res* 2011; 45: 11-36.

[21] Wang B, Lan CQ. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. *Bioresour Technol* 2011;102: 5639-5644.

[22] Petry AT. Efeito potencial de gradiente trófico em rio urbano na formação de trihalometanos. 11.30.2012.

<http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_acion=&co_obra=117560>.

[23] Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Guirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J* 2008;54: 621-639.

Munoz R, Guieysse B. Algal-bacterial process for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res* 2006;40: 2799-2815.

[24] Harun R, Jason WSY, Cherrington T, Danquah MK. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Appl Energy* 2011;88: 3464–3467.

[25] Quintana N, Kooy FVD, Rhee MDVD, Voshol GP, Verpoorte R, Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91: 471-490.

[26] Bush RA, Hall KM. Process for the production of ethanol from algae. U.S. Patente 7.135.308; 2006.

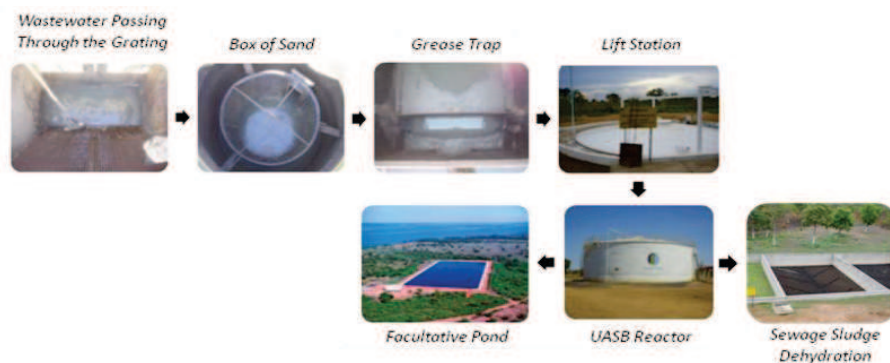


Figure 1. Components of the Wastewater Treatment Plant located at Union Village, Palmas-TO, Brazil. The raw influent passes through the grating and the coarse solids are retained. The amount of sand and fat is retained in the box of sand and grease trap respectively. The lift station conducts the pretreated wastewater for the biological treatment in a UASB reactor. The effluent of the UASB reactor goes to the facultative pond where nutrients and particulate organic matter will be removed, allowing the development of several species of microalgae. The anaerobic sludge formed in the UASB reactor is disposed in the drying bed and transported to ditches and landfill.

Table 1. Characteristics of the influent and effluent of the FSP in the period from May to June of 2011.

Parameter	Concentration (mg L ⁻¹)	
	Influent	Effluent
BOD ¹	131.000 ± 48.398	50.833 ± 24.815
COD ¹	343.500 ± 90.264	187.333 ± 40.658
Ammonia nitrogen ¹	58.659 ± 7.398	55.009 ± 6.006
Nitrite nitrogen ²	0.019 ± 0.006	0.006 ± 0.002
Nitrate nitrogen ²	3.833 ± 0.471	1.733 ± 0.367
Total phosphate ¹	6.286 ± 0.737	5.535 ± 1.244

¹Analysis on the output of the UASB reactor and inlet (Influent) and output (Effluent) of the FP.

²Analysis of raw sewage (Influent) and outlet of the FP (Effluent).

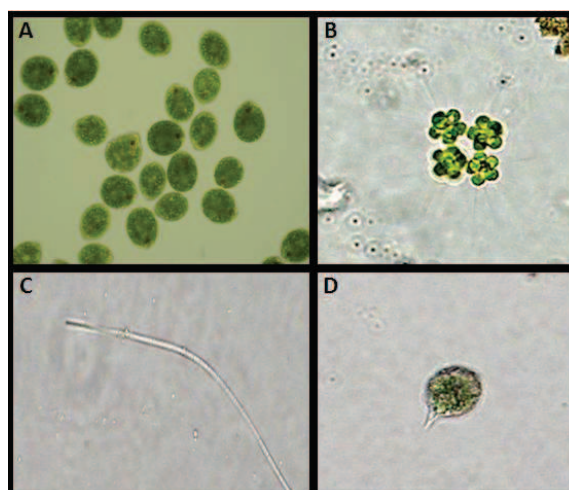


Figure 2. Species of microalgae most abundant in the effluent of the FP of WWTP Union Village. *L. salina* Frits. (A), *M. pusillum* (Prin.) Kom.-Legn (B), *P. limnetica* (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg (C) and *Lepocinclis* sp. (D).

Table 2. Species of microalgae found in the FP of the WWTP Union Village, Palmas-TO, Brazil, in the months of May and July of 2011.

Species	Presence of the species		Density (Ind. mL ⁻¹)	
	May	July	May	July
Bacillariophyceae				
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kütz.	X	X	85	42
<i>Fragillaria</i> sp.	X	-	42	-
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitz.) Comp.	-	X	-	42
Cyanobacteria				
<i>Aphanizomenon</i> sp.	-	X	-	42
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (W.) Seen. & Sub. Rajú	-	X	-	42
<i>Geitlerinema unigranulatum</i> (Singh) Kom. & Azevedo	X	-	42	-
<i>Planktolingbya limnetica</i> (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg	X	X	2928	42
<i>Planktothrix isothrix</i> Bory	X	-	637	-
Chlorophyceae				
<i>Chlorella</i> sp.	X	-	85	-
<i>Coelastrum reticulatum</i> (Dang.) Senn.	-	X	-	85
<i>Elakatothrix gelatinosa</i> Wille	X	-	42	-
<i>Elakatothrix genevensis</i> Hind.	-	X	-	42
<i>Eudorina elegans</i> Ehr.	X	-	42	-
<i>Eutetramorus planctonicus</i> (Kors.) Bourr.	X	-	42	-
<i>Micractinium pusillum</i> (Prin.) Kom.-Legn.	X	-	806	-
<i>Radiococcus planctonicus</i> Lund.	X	-	-	-
Cryptophyceae				
<i>Cryptomonas cf pirenoidifera</i> Gleitler	X	-	127	-
Euglenophyceae				
<i>Euglena caudata</i> (Cunha) Conr.	-	X	-	4499
<i>Lepocinlis salina</i> Frits.	X	X	1867	1910
<i>Lepocinlis</i> sp.	X	X	42	340
<i>Strombomonas fluviatilis</i> (Lemm.) Defl.	-	X	-	42
<i>Trachelomonas volvocina</i> Ehr.	X	-	-	-

Table 3. Compounds found in the raw lipid obtained from the mixture of the microalgae cells.

Compounds	Molecular structure	Quantity (% area)	Retention Time (min)
Propanoic acid, 2-hydroxy	C3H6O3	0.37	13.27
2-Butenoic acid	C4H6O2	0.53	23.06
Decanoic acid	C10H20O2	0.47	24.80
Nonanedioic acid, dimethyl ester	C11H20O4	0.23	27.09
Dodecanoic acid	C12H24O2	2.53	29.45
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C20H40O	1.82	33.45
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	C17H34O2	19.53	35.75
Hexadecanoic acid	C16H32O2	31.97	39.61
9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)	C19H36O2	20.06	42.02
Octadecanoic acid, methyl ester	C19H38O2	5.70	43.19
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	C18H32O2	5.83	47.36
Oleic acid	C18H34O2	4.34	47.82
Octadecanoic acid	C18H36O2	6.62	47.82

FAME from a biomass composed by different species of microalgae growing in a residential wastewater treatment plant located in northern Brazil

**Aderlanio da Silva Cardoso^a, Wesley Adonai Mafra^a, Anelise Kappes Marques^b,
Glauca Eliza G. Vieira^a**

^aFederal University of Tocantins, Laboratory of Essay and Development in Biomass and Biofuel - LEDBIO. Avenue NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brazil.

^bFederal University of Tocantins, Environmental Microbiology Laboratory, Avenue NS 15, ALCNO 14, 109 Norte, 77001-090, Estação Experimental, Palmas, Tocantins, Brazil.

Abstract

Microalgae appear as a source of lipids for biodiesel production. Thus, this work aimed to perform a chemical characterization of the raw lipids and fatty acid methyl esters (FAMES) from the biomass composed by different species of microalgae present in the effluent of a facultative stabilization pond (FSP) located in a tropical region, in different periods and without any purification. Initially, the lipids were extracted by Soxhlet apparatus with hexane. Further, the lipids were characterized by GC-MS analysis as well as the FAMES obtained by H₂SO₄ esterification. The raw lipids were composed by large quantities of PUFAs (29.47-64.06%) and saturated fatty acids (20.98-52.61%), along with low quantities of other chemical products. The lipid content was lower when the biomass was higher and vice versa. The raw lipids from the microalga biomass of the FSP studied can be used to produce biofuel as well as for other applications.

Keywords: wastewater, microalgae, lipid, FAMES.

1. Introduction

The production and consumption of biodiesel have increased worldwide. This biofuel has been produced by using different glyceride-rich feedstocks in the transesterification reaction and free fatty acid (FFA)-rich feedstocks in the esterification reaction. The main raw materials used to biodiesel production are derived from vegetable oils and animal fats (Lang et al., 2001; Jeong et al., 2009). The use of these biomasses is related to its market availability, low price, knowledge about the oil seed culture and technology domain. However, the oil seed crops most used to biodiesel production are the soybean in Brazil and USA (César and Batalha, 2010), rapeseed oil in Europe, palm oil in Asian Southeast (Noureddini and Zhu, 1997), which have been used as human food and their productivity can be lower than some species of microalgae (Chist, 2007).

As a promising source of lipids, microalgae appear as a source of high quantities of total lipids (over 50%), which are naturally obtained from the conversion of atmospheric CO₂ by the photosynthesis process, assisting in the removal of this compound from the atmosphere (Cardoso et al., 2011; Chist, 2007). These lipids are composed by pigments, phospholipids, glycolipids, triacylglycerols (TAGs), FFAs, hydrocarbons, sterols, wax and sterol esters and free alcohol. The content and composition of the total lipids is influenced by environmental (e.g. light, temperature, concentration and source of nitrogen and concentration of CO₂ (Morais and Costa, 2008)), biological (e.g. microorganisms contamination and specie of algae used) and technological factors (e.g. culture and processing systems), and can be obtained by mechanical (press) and/or the use of solvents as well as it is done with traditional biomass (Chist, 2007).

Generally, the lipids from microalgae are obtained after the microalgae biomass has been cultivated and processed (recovered and dried) and their cellular lipid content has been extracted. These steps make the oil from microalgae has a high cost. Therefore, to overcome the economic problems related to the microalgae lipid obtainment, the cultivation process could be done, for instance, by using wastewater as nutrient source, through the use of stabilization pond systems that are already capable to perform the wastewater treatment and, in consequence, to promote an ideal

condition to microalgae biomass production for chemical products obtainment (Olguin, 2012).

The stabilization pond systems have been the most common process for residential wastewater treatment in Brazil due to the environmental conditions, large quantity of area available and because it is one of the cheapest wastewater treatment systems in Brazil. When wastewater is treated in a stabilization pond (e.g. aerobic, facultative and maturation ponds), different compounds are used by microalgae (Sperling, 1986), which use N and P-based nutrients to biomass production and cellular compounds storage. Therefore, these systems could be used as a good source of microalgae biomass. Thus, this work aimed to perform a chemical characterization of the fatty acid methyl esters (FAMEs) obtained from the esterification process of the raw lipids extracted from the biomass composed by different species of microalgae present in the effluent of a wastewater facultative stabilization pond (FSP).

2. Methodology

2.1. Harvesting of the microalgae biomass

The microalgae biomass was collected from the effluent of the FSP that made part of the WWTP located in Vila União, northern sector of the city of Palmas (-10° 8' 43.59'', -48° 21' 25.18''), state of Tocantins, Brazil, and belongs to the Sanitation Company of Tocantins. The FSP (Length: 256.0m; Width: 110.0m; Area: 28.160 m²; Volume: 42.240 m³; Depth: 1.5m) is used as a tertiary treatment, receiving effluent from an Up-flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor. The influent and effluent characteristics in the period studied were the described in the Table 1. The concentration of microalgal biomass was carried out using a vacuum filtration system, in 5 different periods (5 samples) during the beginning and middle of the months of July and August and in the beginning of September, and using a quantitative filter paper of porosity 8µm. Then, the biomass was dried at 40°C for 5h. The effluent was filtrated without purification to analyze the characteristics of the raw lipids obtained from the microalgae biomass and to observe if these lipids can be used to obtain biodiesel without any purification step.

The taxonomic characterization of the microalgae species present in the effluent of the FSP was performed according to the method described by Marques (2006). The effluent was composed predominantly by the taxa described in the Table 2.

2.2. Extraction and characterization of raw lipids

All the quantity of microalgae biomass obtained by the filtration of 60L of effluent from the FSP was used to obtain lipids. A Soxhlet apparatus and n-hexane were used for 4h to extract the lipids. A quantity of 5.54 ± 0.167 mg of raw lipids was derivatized using 10 μ L of the silylation reagent N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) for 15min at room temperature. Besides, the reaction mixture was diluted in 1mL of dicloromethane and 1 μ L was used to do a chemical analysis, which was performed using a Varian 3800 gas chromatography interfaced with a Varian Saturn 2200 mass spectrometer detector (GC-MS). The conditions of GC-MS analysis were: the column used was a FactorFourTM (Capillary Column) VF-5ms, (30m x 0.25mm I.D; 0.25 μ m). The initial column oven temperature was 50°C for 5min. Then, the temperature was increased to 190°C at a heating rate of 5°C min⁻¹; to 215°C at a rate of 0.5°C min⁻¹; and to 320°C at a rate of 4°C min⁻¹, followed by a isothermal hold at 320°C for 3min. The injector temperature was 250°C with a split ration of 10. Helium (He) gas flow used in the column was 1mL min⁻¹. The identification of each compound was determined using the NIST Mass Spectral Database.

2.3. Obtainment and characterization of the FAMES

A quantity of 5.32 ± 0.164 mg of raw lipids were used in an esterification reaction, which was performed by using a methanol:oil molar ration of 56:1, H₂SO₄ (100% in relation to the raw lipid mass) as a catalyst as described by Xu et al. (2006), n-heptane (200 μ L) as apolar solvent, the reaction time and temperature used were 30min and 80°C, respectively. The FAMES formed were washed using 400 μ L of distillated water and 200 μ L of n-heptane was added. The upper phase was separated, the solvent was evaporated at 100°C and the types of FAMES present in the sample were determined by GC-MS analysis, which was performed using the same GC-MS equipment described before. The conditions of the GC-MS analysis were: the column used was the FactorFourTM (Capillary Column) VF-5ms (30m x 0.25mm I.D;

0.25 μm). The initial column oven temperature was 50°C for 5min. Then, the temperature was increased to 205°C at a heating rate of 5°C min⁻¹; to 240°C at a rate of 1.0°C min⁻¹; to 300°C at a rate of 5°C min⁻¹, followed by an isothermal hold at 300°C for 2min. Injector temperature was 250°C with a split ratio of 10. Helium (He) gas flow used in the column was 1mL min⁻¹. The identification of each compound was determined using the NIST Mass Spectral Database.

3. Results and discussions

3.1. Microalgae biomass and raw lipids

The quantities of the biomass and raw lipids obtained are listed in the Figure 1. In the period studied, the quantity of raw lipids decreased when the biomass increased. When the microalgae produce a large quantity of lipids, their reproduction is reduced, making the quantity of biomass reduces. In addition, a culture medium rich in N-based nutrients favors much more the production of biomass instead of the increasing in the lipid content (Feng et al., 2011). The wastewater was composed by a large quantity of organic matter and ammonium, both increasing from the samples 1 to 5 (Table 1). The largest quantity of biomass and polyunsaturated fatty acids was found when the wastewater had the highest quantity of organic matter, ammonium, nitrite and nitrate. In relation to the available N-based nutrients, the biosynthesis of saturated and monounsaturated fatty acids is favored by the use of ammonium. Besides, nitrate favors the PUFAs biosynthesis (Perez-Garcia et al., 2011) (Wen and Chen, 2001). Although the ammonium is the preferable N-based nutrient used by microalgae, the removal of nitrate (52.63-63.83%) and nitrite (58.82-80.00%) were higher than ammonium (5.58-6.86%) and the raw lipids were formed, predominantly, by saturated fatty acids in the samples 1 to 4. In addition, when in high concentration (>20mg NH₄⁺-N), the ammonium can be toxic and inhibit the microalgal growth (Larsdotter, 2006). Thus, this can be one of the reasons that explain the lowest reduction on ammonium, despite of the large quantities available. Furthermore, according to Von Sperling (1986), a FSP has the capability to reduce less than 50% of ammonium and it is used preferable to reduce other compounds (e.g. organic compounds) instead of N and P.

The Table 3 shows the chemical compounds present in the raw lipids. There is a large quantity of FFAs that can be easily converted into FAMES in an acid-based catalyst

reaction. All the samples are composed by saturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs), where the most abundant are the C18:3 ω 3 and C₁₆H₃₂O₂ in the samples 1 to 4, and the C18:3 ω 3 and C18:2 ω 6 in the sample 5. Thus, the raw lipids showed a highly saturated (samples 1 to 4) or polyunsaturated (sample 5) carbon chain (Figure 2). However, the unsaturated fatty acids are preferred for biodiesel production instead of saturated because they can provide desirable characteristics to the biodiesel mainly in cold regions (Hoekman et al., 2011). Besides, the highest quantities of PUFAs (64.06% and 43.11%) were found in the samples where the quantity of biomass was the highest and the yield of lipid was the lowest. According to Perez-Garcia et al. (2011), several species of microalgae can produce PUFAs in large quantities when the biomass productivities are high and when some environmental conditions (e.g. high nitrate available, if the optimal growth temperature is available or not) are used. In relation to the saturated fatty acid, there was a predominance of C14, C15 and C16 fatty acids, where the C16 was predominant from the sample 1 to 4 and C14 in the 5. The C16 and C18:1 fatty acids are the types most produced by microalgae during the fatty acid biosynthesis (Hu et al., 2008).

In addition to the fatty acids, the raw lipids are composed by esters, hydrocarbons, alcohols and glyceride (Table 3). The esters are predominantly wax esters formed by fatty acids and alcohol with long carbon chains. These wax esters are formed by different microalgae species, such as those belonging to Englenophyceae taxon, when in an organic carbon-rich culture medium and in aerobiosis, using the paramylon content (Inui et al., 1982). The hydrocarbon most abundant in the raw lipids samples was the 5.alpha.-Cholest-3-ene, which can be formed by the oxidation of sterols. The alcohols present in all samples were predominantly sterols where the lowest carbon chain was C27 and the highest was C43. These sterols can be easily found in microalgae species (Volkman, 2003). The 3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol can be obtained either by the chlorophyll *a* and other cellular components formation or by the degradation of chlorophyll *a* in acidic environment. These alcohols are essential in the formation of cellular components (Streit et al., 2005) (Piepho et al., 2010). Additionally, the samples 2, 4 and 5 were composed by the triacylglyceride docosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester in a quantity of approximately 3.26, 5.88 and 6.53%, respectively. The microalgae biomass used in this work grown under natural photoautotrophic condition, which favors the formation of PUFAs instead of

TAG in some species of microalgae due to the large quantity of energy required to TAG biosynthesis, when compared with PUFAs (Perez-Garcia et al., 2011). The conditions (e.g. nutrients availability, environmental conditions) necessary to produce these compounds were found in the WWTP (temperature of the effluent of FSP was $26.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$, pH 8.0-8.5, hydraulic retention time of approximately 15 days) where these microalgal biomasses were recovered.

3.2. Composition of the FAME samples

To obtain FAMES, the acid-catalyzed reaction was used due to the high FFA content in the raw lipid samples used in the reaction. Generally, it is necessary to use high oil:alcohol molar ratios, high temperature and/or high reaction time to improve the FAME yield when an acid-catalysed transesterification and/or esterification is used (Vyas et al., 2010). The yield of the raw FAMES was $76.6 \pm 5.89\%$, in relation to the mass of the raw oil. The good biodiesel composition would have low levels of saturated and polyunsaturated fatty acids and high levels of monounsaturated fatty acids. All the 5 samples have large quantities of FAMES with PUFAs, mainly the C18:3. The FAMES derived from monounsaturated are only C16:1. The C16:1 and C18:1 are the fatty acids that provide a biodiesel with good characteristics (Hoekman et al., 2011). However, the 5 samples are highly saturated and/or polyunsaturated, with low quantities of monounsaturated (Figure 3), which may result in a biodiesel with characteristics different from the standards (Bucy et al., 2012). Therefore, considering only the chemical composition, the raw FAMES sample 3 could be the ideal to be used as biodiesel due to the lowest quantity of FAMES derived from PUFAs (29.58%).

The compounds present in the raw FAMES obtained after the esterification reaction are described in the Table 4. Even after the esterification process, the product obtained is formed by compounds different from FAMES such as hydrocarbon, alcohol and ether. These compounds can cause problems in the engine mainly when it is operating under cold condition (Chupka et al., 2012). The hydrocarbons most present in the samples are sterol-based hydrocarbon. In addition, the long chain alcohols can reduce the characteristics of the biodiesel such as calorific value, lubricity, and it can provide an earlier injection of the biodiesel into the engine (Hoekman et al., 2011). Besides, the Figure 4 shows the 5 chromatograms of the raw

FAMEs. It is clearly observed that there are several similarities between the samples in terms of the types of the compounds and some differences related to the quantities of each one.

There are some qualitative and quantitative differences between the compounds found in the raw lipids and the raw FAMEs. However, even without any purification process and using a heterogeneous microalgae biomass, the raw lipids and FAMEs obtained have a large quantity of saturated and PUFAs commonly present in the traditional feedstock used to obtain biodiesel (e.g. soybean, jathropha, etc). Therefore, the raw lipids from heterogeneous biomass formed by microalgae species have a potential to be used not only as a source of FFAs but also other different chemical compounds.

4. Conclusion

The use of raw lipids derived from the biomass formed by different species of microalgae from the FSP of the WWTP of the Vila União, Palmas-TO, Brazil, allows the obtainment of FAMEs from FFAs with long carbon chains, which are highly polyunsaturated and/or saturated, depending on the period of the biomass recovery. The FAMEs most produced by the microalga species from the FSP in all samples are $C_{19}H_{32}O_2$ and $C_{17}H_{34}O_2$, which can give an intermediate behavior (i.e. the both characteristics attributed to the saturated and/or polyunsaturated FFAs can be observed) when they are used. The biomass used in this work has potential to offer lipids that can be used to ester-based biofuel production by non-traditional methods such as esterification reaction.

Acknowledgment

The authors are grateful for the Aderlanio da Silva Cardoso's Master Scholarship funded by CNPq and for the partner Saneatins, Environmental Microbiology Laboratory and the Laboratory of Essay and Development in Biomass and Biofuel both of the Federal University of Tocantins.

References

Bucy, H.B., Baumgardner, M.E., Marchese, A.J., 2012. Chemical and physical properties of algal methyl ester biodiesel containing varying levels of methyl

- eicosapentaenoate and methyl docosaheptaenoate. *Algal Research*. 1, 57-69.
- Cardoso, A.S., Vieira, G.E.G., Marques A.K., 2011. The use of microalgae for the production of biofuels. *Braz. J. Biosci.* 9, 542-549.
- César, A.S., Batalha, M.O., 2010. Biodiesel production from castor oil in Brazil: a difficult reality. *Energ. Policy*. 38, 4031-4039.
- Chist, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.
- Chupka, G.M., Fouts, L., McCormick, R.L., 2012. Effect of low-level impurities on low-temperature performance properties of biodiesel. *Energy Environ. Sci.* 5, 8734-8742.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S., Zhang, W., 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresour. Technol.* 102, 6710-6716.
- Hoekman, S.K., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M., 2011. Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16, 143-169.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Guirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621-639.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., Kitaoka, S., 1982. Wax ester fermentation in *Euglena gracilis*. *FEBS LETTERS*. 150, 89-93.
- Jeong, G.T., Yang, H.S., Park, D.H., 2009. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100, 25-30.
- Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B., 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.* 80, 53-62.
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae - a literature review. *Vatten*. 62, 31-38.
- Marques, A.K., 2006. Análise da diversidade fitoplanctônica na reservatório da Usina Hidrelétrica Luis Eduardo Magalhães, no médio Tocantins - TO: estrutura da comunidade, flutuações temporais e espaciais. 08.30.2012.
<http://www.site.uft.edu.br/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=974&Itemid=69>.
- Morais, M.G., Costa, J.A.V., 2008. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Quím. nova*. 31, 1038-1042.
- Noureddini H., Zhu D., 1997. Kinetics of transesterification of soybean oil. *JAOCs*. 74, 1457-1463.
- Olguín, E.J., 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a biorefinery. *Biotechnol. Adv.* 30, 1031-1046.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11-36.
- Piepho, M., Martin-Creuzburg, D., Wacker, A., 2010. Simultaneous effects of light intensity and phosphorus supply on the sterol content of phytoplankton. *PLoS*

One. 5, p. doi: 10.1371/journal.pone.0015828.

Sperling, M.V., 1986. Lagoas de estabilização, UFMG, Belo Horizonte.

Streit, N.M., Canterle, L.P., do Canto, M.W., Hecktheuer, L.H.H., 2005. As clorofilas. *Ciência Rural*. 35, 748-755.

Volkman, J.K., 2003. Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60, 495-506.

Vyas, A.P., Verma, J.L., Subrahmanyam, N., 2010. A review on FAME production processes. *Fuel*. 89, 1-9.

Wen, Z.-Y., Chen F., 2001. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microb. Tech.* 29, 341-347.

Xu, H., Miao, X., Wu, Q., 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotech.* 126, 499-507.

Table 1. Characteristics of the influent and effluent of the FP in the period between July to September of 2011.

Parameter	Concentration (mg L ⁻¹)					
	July		August		September	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent
BOD ¹	48.000	28.000	135.000	28.000	165.000	59.000
COD ¹	292.000	177.000	298.000	163.000	391.000	170.000
Ammonia nitrogen ¹	61.198	57.745	63.337	58.993	65.453	61.800
Nitrite nitrogen ²	0.017	0.007	0.025	0.005	0.027	0.009
Nitrate nitrogen ²	3.900	1.600	3.800	1.800	4.700	1.700
Total phosphate ¹	6.594	6.534	7.069	6.385	6.725	6.116

¹Analysis on the output of the UASB reactor and inlet (Influent) and output (Effluent) of the FP.

²Analysis of raw sewage (Influent) and outlet of the FP (Effluent).

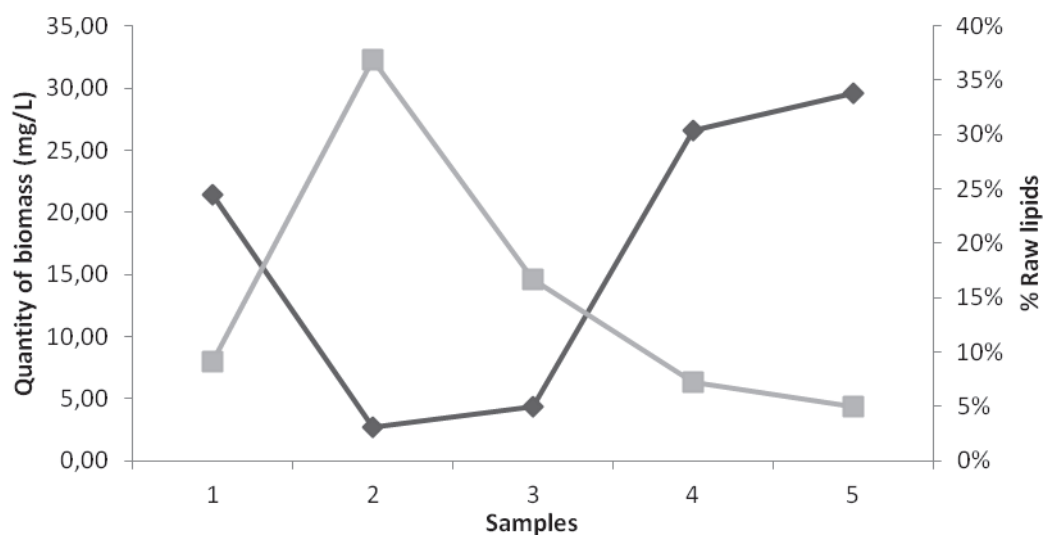


Figure 1. Relationship between the quantities of microalgae biomass (◆) and its raw lipids (■) content in each 5 samples.

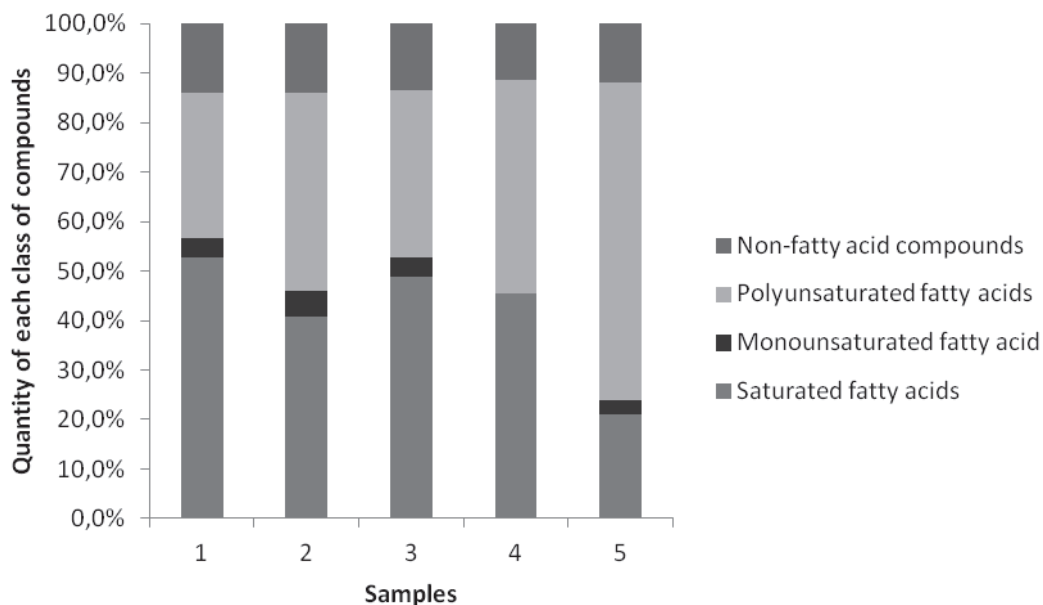


Figure 2. The total quantity of saturated, monounsaturated, polyunsaturated and non-fatty acid compounds present in the 5 samples of raw lipids from the microalgae biomass of the wastewater stabilization pond.

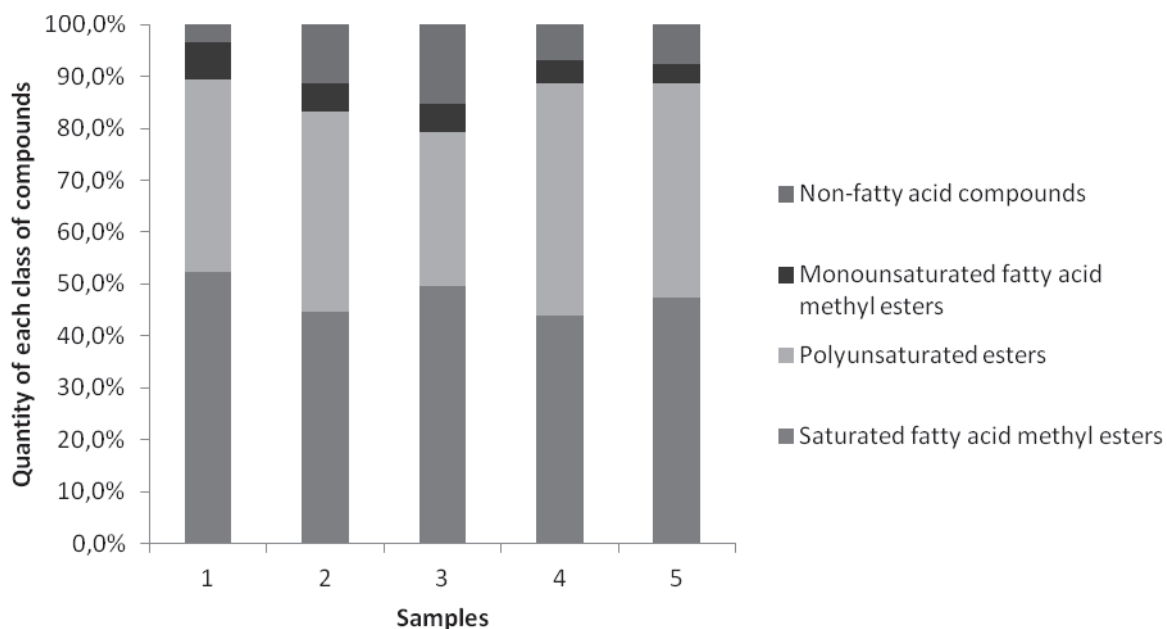


Figure 3. The total quantity of saturated, monounsaturated, polyunsaturated and non-fatty acid compounds present in the 5 samples of raw FAMEs.

Table 2. Species of microalgae present in the effluent of the FSP studied.

Taxon	Species
<i>BACILLARIOPHYCEAE</i>	<i>Aulacoseira granulata</i> (Ehr.) Sim. var. <i>granulata</i> <i>Fragillaria</i> sp1
<i>CYANOBACTERIA</i>	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (W.) Seen. e Sub. Rajú <i>Geitlerinema amphibium</i> (Agardh. Ex Gomont) Anag. <i>Geitlerinema unigranulatum</i> (Singh) Kom. e Azevedo <i>Lemmermaniella</i> sp <i>Merismopedia tenuissima</i> Lemm. <i>Planktolyngbya circuncreta</i> (G. S. West) Anagn.et Kom <i>Planktolyngbya limnetica</i> (Lemm.) Kom.-Legn. ET Gronberg <i>Planktothrix isothrix</i> Bory <i>Planktothrix</i> sp
<i>CHLOROPHYCEAE</i>	<i>Coelastrum reticulatum</i> (Dang.) Senn. <i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> Näg. <i>Dictyosphaerium pulchellum</i> Wood <i>Eudorina elegans</i> Ehr. <i>Monoraphidium arcuatum</i> (Kors.) Hind. <i>Monoraphidium irregulare</i> (G. M. Sm.) Kom.-Legn. <i>Pediastrum duplex</i> Mey. <i>Radiococcus planctonicus</i> Lund. <i>Treubaria schmidlei</i> (Schr.) Fott & Kov.
<i>CRYPTOPHYCEAE</i>	<i>Cryptomonas cf pirenoidifera</i> Gleitler
<i>EUGLENOPHYCEAE</i>	<i>Euglena caudata</i> (Cunha) Conr. <i>Euglena</i> sp. <i>Lepocinclis ovum</i> (Ehr.) Lemm. <i>Lepocinclis salina</i> Frits. <i>Lepocinclis</i> sp1 <i>Phacus longicauda</i> (Ehr.) Duj. <i>Phacus longicauda var tortus</i> (Lemm.) Skorvotzov <i>Phacus</i> sp. 1 <i>Trachelomonas volvocina</i> Ehr.
<i>ZYGNEMAPHYCEAE</i>	<i>Cosmarium pseudoconatum</i> Nordst. <i>Mougeotia cf. delicata</i> Beck <i>Staurastrum curvimarginatum</i> Scott & Gronblad <i>Staurastrum iversenii</i> Nyg. <i>Staurastrum leptocladum</i> Nordst. var. <i>leptocladum</i> Nordst <i>Staurastrum sebaldi</i> Reins. <i>Staurodesmus mamillatus</i> Norsted
<i>DINOPHYCEAE</i>	<i>Peridinium cf. volzii</i> Lemm.

Table 3. Compounds present (in %) in the raw lipids of each microalgae biomass samples.

Compound	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
<i>Saturated fatty acid</i>					
Propanoic acid, 2-hydroxy.	0.053	ND	ND	ND	ND
Hexanoic acid.	0.026	ND	0.087	0.027	0.047
2-Ethylhexanoic acid.	ND	0.135	ND	ND	ND
Decanoic acid.	ND	ND	ND	ND	0.070
Undecanoic acid.	ND	ND	0.057	0.103	ND
Dodecanoic acid.	2.409	0.792	0.902	2.272	1.407
Tridecanoic acid.	2.298	0.475	1.433	3.625	1.822
Tetradecanoic acid.	9.000	3.879	7.206	11.953	8.651
n-Pentadecanoic acid.	5.662	3.205	5.635	6.482	5.260
Hexadecanoic acid.	22.875	27.053	29.316	18.945	3.718
Heptadecanoic acid.	3.348	1.807	3.687	2.084	ND
Octadecanoic acid.	6.074	ND	ND	ND	ND
Nomadecanoic acid.	0.373	ND	ND	ND	ND
Eicosanoic acid.	0.297	0.462	0.615	ND	ND
Docosanoic acid.	ND	0.566	ND	ND	ND
Hexacosanoic acid.	0.198	ND	ND	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid</i>					
9-Octadecenoic acid (Z)-	4.004	5.048	3.706	ND	2.984
<i>Polyunsaturated fatty acid</i>					
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-.	11.135	16.269	13.091	17.529	24.591
9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	16.748	21.247	20.765	25.579	39.471
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, (all-Z)-. Arachidonic acid.	1.588	ND	ND	ND	ND
<i>Ester</i>					
Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydroxy-2,4,4-trimethylpentyl ester.	0.323	0.318	ND	0.151	ND
1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester.	0.234	3.328	1.080	ND	ND
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl Ester.	0.281	ND	ND	0.412	0.232
Benzeneacetic acid, alpha-hydroxy-alpha-phenyl-, 1-azabicyclo(2,2,2)oct-3-yl ester.	ND	ND	0.264	0.156	ND
5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl ester, (all-Z)-.	0.956	2.445	0.335	1.017	2.023
Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester. Hexanedioic acid, diethyl ester. Di(2-ethylhexyl)adipate.	1.019	0.684	ND	ND	ND
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester.	3.792	ND	ND	ND	ND
Phthalic acid, nonyl 4-octyl ester.	ND	0.142	ND	ND	ND
Tetradecanoic acid, tetradecyl ester.	ND	ND	ND	2.091	ND
Tetradecanoic acid, hexadecyl ester.	ND	ND	ND	6.899	ND
<i>Glyceride</i>					
Docosahexaenoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester.	ND	3.262	ND	5.881	6.527
<i>Alcohol</i>					
Hexadecanol.	ND	0.784	ND	ND	ND
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol.	0.678	2.513	0.972	2.555	3.075
Cholesterol	2.987	10.195	5.935	2.443	ND
Cholestan-3-ol, (3 beta, 5 alpha)-.	3.506	1.474	7.272	0.992	0.781
Stigmasterol.	0.860	1.048	2.092	ND	ND
β-Sitosterol.	2.058	1.978	1.782	0.704	1.001
Cholest-5-ene, 3-(hexadecyloxy)-, (3 beta)-.	ND	ND	ND	ND	1.893
<i>Hydrocarbon</i>					
Cholest-3-ene, (5.alpha.)-.	6.433	5.955	10.778	1.141	ND
Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-.	0.197	0.261	0.072	0.089	0.123
<i>Total of Saturated fatty acid</i>	52.613	40.902	48.938	45.490	20.975
<i>Total of Polyunsaturated fatty acid</i>	29.470	39.988	33.856	43.108	64.062

Table 4. Compounds present (in %) in the raw FAME of each microalgae biomass samples.

Compound	Formula	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
<i>Saturated fatty acid methyl ester</i>						
Dodecanoic acid, methyl Ester	C13H26O2	2.294	0.728	0.569	0.562	1.096
Undecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester	C13H26O2	ND	ND	ND	2.123	ND
Tridecanoic acid, methyl Ester	C14H28O2	2.557	0.443	1.191	4.315	1.675
Tridecanoic acid, 12-methyl, methyl Ester	C15H30O2	11.468	4.249	6.610	0.164	8.287
Pentadecanoic acid, methyl ester	C16H32O2	5.589	3.187	4.952	9.280	12.269
Tetradecanoic acid, 12-methyl-, methyl Ester	C16H32O2	ND	ND	0.558	0.124	0.204
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl Ester	C17H34O2	21.573	22.292	20.045	18.705	14.967
Cyclopropanoic acid, 2-hexyl-, methyl Ester	C18H34O2	0.109	ND	0.997	0.095	ND
Hexadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	C18H36O2	2.478	0.873	ND	1.835	1.282
Heptadecanoic acid, methyl ester	C18H36O2	0.473	0.725	4.114	1.695	1.449
Octadecanoic acid, methyl Ester	C19H38O2	5.873	11.901	9.730	4.531	5.023
Cyclopropanoic acid, 2-octyl-, methyl Ester	C20H38O2	ND	0.162	0.355	0.397	0.839
Octadecanoic acid, 17-methyl-, methyl Ester	C20H40O2	ND	ND	ND	0.187	0.182
Eicosanoic acid, methyl ester	C21H42O2	ND	ND	0.519	ND	ND
<i>Monounsaturated fatty acid methyl ester</i>						
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	C17H32O2	7.079	5.286	4.824	4.260	3.721
2-Hexadecenoic acid, methyl ester, (E)-	C17H32O2	ND	0.047	0.099	0.088	0.063
11-Hexadecenoic acid, 15-methyl-, methyl Ester	C18H34O2	ND	ND	0.665	ND	ND
<i>Polyunsaturated fatty acid ester</i>						
7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	C17H28O2	ND	ND	0.307	7.378	5.564
7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	C17H30O2	ND	0.743	0.221	2.286	1.444
8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester	C19H34O2	9.913	14.498	12.670	ND	ND
9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl Ester, (Z,Z,Z)-	C19H32O2	19.330	17.401	15.207	27.736	27.112
5,8,11,14-Eicosapentaenoic acid, methyl Ester, (all-Z)-	C21H32O2	1.529	1.088	0.460	3.104	2.202
5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, ethyl Ester, (all-Z)-	C22H36O2	0.641	1.073	0.712	2.063	3.005
4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, methyl Ester, (all-Z)-	C23H34O2	ND	0.105	ND	0.615	0.651
1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl Ester	C24H38O4	5.598	3.783	ND	1.532	1.414
<i>Hydrocarbon</i>						
Naphthalene	C10H8	ND	ND	0.021	0.012	ND
Cholesta-3,5-diene	C27H44	ND	1.172	1.596	ND	ND
Cholest-4-ene	C27H46	0.463	1.357	4.384	ND	0.296
Ergosta-4,6,22-triene	C28H44	ND	ND	0.624	ND	ND
Stigmastan-3,5,22-trien	C29H46	ND	ND	0.560	ND	ND
Stigmasta-4,22-diene,	C29H48	ND	ND	0.171	ND	ND
<i>Alcohol</i>						
3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C20H40O	1.817	7.442	4.512	2.727	4.363
Cholestan-3-ol, acetate, (3.beta., 5. Alpha.)-	C29H50O2	0.235	ND	3.326	ND	0.109
1,6,10,14,18,22-Tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	C30H50O	0.981	0.531	ND	0.689	ND
Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3.beta.)-	C27H44O	ND	0.134	ND	ND	ND
<i>Ether</i>						
Tetrahydropyranyl ether of citronellol	C15H28O2	ND	0.784	ND	3.496	2.781
Total of Saturated fatty acid methyl ester		52.414	44.560	49.641	44.013	47.273
Total of Polyunsaturated fatty acid methyl ester		37.012	38.689	29.576	44.714	41.393

Assessment of the potential of residuary microalgae from a stabilization pond for the production of biofuel

G. E. G. Vieira¹, A. da S. Cardoso¹, A. K. Marques² & A. Pickler³

¹*Federal University of Tocantins, Laboratory of Essay and Development in Biomass and Biofuel – LEDBIO, Palmas-Tocantins, Brazil*

²*Federal University of Tocantins, Environmental Microbiology Laboratory, Palmas-Tocantins, Brazil*

³*Cenpes/Petrobras, Rio de Janeiro-Rio de Janeiro, Brazil*

Abstract

Biomass with high lipids are necessary to the biodiesel industry since the demand for this biofuel is increasing in Brazil and the main oilseed crop used for producing biodiesel in Brazil will not be able to aid the production of biodiesel without arable lands destined only for that purpose. Thus, the microalgae emerge as a potential biomass and they are being used as a source of products for biofuel production because of their high productivity and rapid growth. However, the high cost of microalgal biomass production is the main factor that prevents the use of its products on a large scale. Thus, this work is aimed at using microalgal biomass already present in effluents from aerobic and anaerobic lagoon ponds used for processing the effluent of the UASB reactor; to obtain products and it is proposed to use these as a biofuel. Initially, a qualitative and quantitative characterization of the microalgae species present in the aerobic anaerobic lagoon was performed. The biomass was recovered from the effluent using a vacuum filtration system and sun-dried. For the extraction of total lipids a mixture of polar and apolar solvents was used. The extract was analyzed using FTIR and GC/MS. The results showed that, in quantitative terms, the taxa Cyanobacteria and Euglenophyceae were predominant. In relation to the species found, the species with the largest number of individuals per milliliter were *Lepocinclis salina* Frits., *Plankthotrix isothrix* Bory and *Euglena* sp. The extract obtained presented values of 16 wt%. The infrared spectrum showed the presence of ester and alkanes just like the GC/MS analysis. The microalgae



identified are producers, predominantly, of lipids with saturated fatty acids and hydrocarbon. The high presence of microalgae in a natural watercourse can bring environmental problems. Thus the obtainment of microalgal biomass aerobic and anaerobic from a lagoon pond might provide an economic and environmental gain.

Keywords: effluent from aerobic and anaerobic lagoon, lipids, hydrocarbon, biodiesel from microalgae, environmental impacts.

1 Introduction

Biomass with high lipids have been the target of research to ensure the supply of triglycerides for biodiesel plant (simple alkyl esters of fatty acids), since the demand for this biofuel is increasing in Brazil (3.6% per year) and it is observed that the main oilseeds used to obtain biodiesel in Brazil (soybeans, serving 75% of biodiesel production) will not be able to aid the production of this biofuel without the allocation of agricultural lands solely for that purpose, due to the low productivity of biomass (0.2–0.4 tons per hectare). Therefore, it is preferable that the biomasses used provide an optimum productivity in lipids with the use of a smaller surface area of land [1–3].

As a promising source of lipids for the biodiesel production chain, microalgae appear as a biomass that have high quantities of lipid (20%–50%), which is obtained naturally from the conversion of atmospheric carbon dioxide by the use of photosynthesis and assisting in the removal of CO₂ from the atmosphere [1]. These lipids are composed of glycerol, sugars or esters of saturated or unsaturated fatty acids (12 to 22 carbon atoms) [4], with its content and composition influenced by factors such as light, temperature, concentration and source of nitrogen and concentration of CO₂ [5] and can be obtained by mechanical (press) and/or the use of solvents, as it is done with traditional biomass [1]. What is observed is that the lipid content of microalgae and their productivity is much higher than some oilseed traditionally used to produce biodiesel.

The microalgal biomass is mainly obtained from cultivation in the laboratory or industrial closed systems (photobioreactors), or aerated ponds fed with culture medium [6]. In these, there is a predominance of one species by the use of microalgae cultivated by autotrophic and/or heterotrophic processes. In a way to minimize the costs of the final product (microalgae oil), microalgae can be obtained directly from a system where they are already available naturally, due to the provision of optimal environmental conditions for its development. The microalgae fed by effluent in a stabilization pond system, for example, can be used to obtain cheaper oil when compared to those obtained by a cropping system [7]. This will lead to saving water and nutrients as well as serve to remove nutrients from wastewater, such as nitrogen and phosphorus.

The aerobic and anaerobic lagoon stabilization pond is rich in nutrients in the aerobic zone in a pond of this system is the development of a species of microalgae. These, when performing the process of photosynthesis, provide oxygen for respiration of the bacteria present in this system [8, 9]. In addition,

the effluent from the pond with high macroalgal biomass concentration is usually released into water, and it may cause impacts on the characteristics of areas fed by the water [9, 10]. Therefore, this medium presents itself as a potential supplier of microalgal biomass.

The high cost of oil from microalgae is the main factor that hinders its widespread use. This is related to spending on infrastructure (construction of tanks and photobioreactors, for example) for cultivation, use of media, and separation processes of microalgae from the medium liquid. Thus, in order to contribute to reducing the value of the oil from the microalgae and remove the large amount of biomass released into natural water, after treatment of the effluent in aerobic and anaerobic lagoon, we intend to use the microalgal biomass (called residual microalgae) already present in the effluent from aerobic and anaerobic lagoon ponds of the Wastewater Treatment Plant (WWTP) of Union Village, in Palmas-TO, to obtain lipids and propose the use for biodiesel production.

2 Methodology

2.1 Characteristics of the WWTP Union Village, Palmas-TO

The WWTP Union Village is located in the northern sector of the city of Palmas, state of Tocantins and belongs to the Sanitation Company of the state of Tocantins, consisting of pre-treatment (grating, box of sand and grease trap), an UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reactor followed by an aerobic and anaerobic pond (Length: 256m, Width: 110m, Area: 28.160 m²; Volume: 42.240 m³; Height: 1.5m) for a post-treatment of that effluent. The aquatic environment receiving the effluent from the WWTP is the Stream Agua Fria whose mouth is the reservoir of Luis Eduardo Magalhães Hydroelectric Plant, where the release point of the effluent is located near the mouth of the stream. The population makes use of it for various purposes (recreation, fishing and doing their laundry) [11].

2.2 Collection of microalgae

For the qualitative and quantitative analysis of microalgae, the aerobic and anaerobic lagoon sample was collected of the effluent (100 mL) in an amber bottle with the aid of a collecting vessel and a funnel, both made of plastic. The sample was stored and transferred for analysis. Then, a volume of 10L was collected to obtain biomass. The collection was gathered at the outlet of the pond. After collecting the effluent, it was transported to a laboratory to be made into the concentration of microalgal biomass.

2.3 Qualitative characterization of the microalgae from the aerobic and anaerobic pond

The methodology used for the qualitative analysis of the microalgae from the aerobic and anaerobic pond was described by Marques [12], which consists of



the taxonomic approach and the population structure, using optical microscopy (using a 40x objective, corresponding to the range 10µm to 25.30cm) binocular Olympus MX41, equipped with digital color camera and ocular micrometer, the organisms were observed in frontal, apical and lateral view, aiming to identify, measure and capture images. The characteristics (morphological and morphometric of the vegetative and reproductive life) of taxonomic value of the species were analyzed according to specialized bibliographies.

2.4 Quantitative analysis of the microalgae from the aerobic and anaerobic lagoon

Quantitative analysis was performed according to the method described by Uthermöhl [13], which is based on the random distribution of individuals in the bottom of the sedimentation chamber. The supernatant volume was 10 ml, in function of the sample concentration. The count was performed on an inverted microscope whose counted fields were distributed in parallel vertical transects, covering almost the entire area of the chamber, drawn randomly. The sedimentation time was at least 3 hours for each inch of height of the camera [14]. In calculation of the phytoplankton, it was considered as an individual unicellular organism, filaments, trichomes, colonies and cenobio. The number of fields counted was the necessary amount to reach 100 individuals of the more frequent species, or stabilizing the number of species added per field (minimum area of compensation). Lund *et al.* [15] considered the counting error less than 20% at a significance level of 95%. The count results were expressed as individuals per ml, calculated according to Nogueira and Rodrigues [16]. Both the quantitative and taxonomic analysis was performed in duplicate.

2.5 Harvest of microalgal biomass

The concentration of microalgal biomass was carried out using a vacuum filtration system which consisted of a Kitassato, Büchner funnel and vacuum pump (Primatec model 131B) using, for the retention of microalgae, a quantitative paper filter (CAAL N°1540). After the filtration, the concentrated biomass was dried in direct sunlight, open air (outdoors), and temperature and humidity were measured using a thermo-hygrometer TFA. The concentration of microalgal biomass was performed in triplicate.

2.6 Lipids extraction

The extraction of lipids from the biomass was performed according to Folch *et al.* in Lourenço [4], with adaptations. Initially, the dried samples (343.07 ± 5.44 mg) were put into a beaker and to this was added 60mL of a chloroform mixture: methanol (2:1 v/v). The mixture was stirred (with the aid of mechanical stirrer Fisatom model 713D) in the chapel, and macerated for 5 minutes. Then, a vacuum filtration was made, where the cell debris remained in the filter paper and the medium liquid was collected, its volume was measured, and transferred

to a separated funnel. To this was added a solution of KCl 0.88% (corresponding to $\frac{1}{4}$ of the volume of the mixture contained in the funnel). The mixture was stirred manually three times and after this, the medium was put to sit for 10 minutes. The separation was made of the phases (top and bottom), and the upper phase was discarded. The lower phase, dense and with dissolved lipids, was separated and added to a mixture of methanol: distilled water (1:1 v/v) corresponding to $\frac{1}{4}$ of the solution volume. Again the system was agitated three times and left to stand for 10 minutes. The lower phase was separated and dried with anhydrous Na_2SO_4 . Then the mixture was filtered in a vacuum. The solvent present in the mixture was removed by rota-evaporation using a rota-evaporation apparatus Fisatom model 802. The concentrate was measured and its mass was stored in an amber bottle and refrigerated.

2.7 Analysis of the extract by Fourier transform infrared (FTIR) and gas chromatography with mass spectroscopy (GC/MS)

The infrared spectra covering the region of $4000 - 400\text{cm}^{-1}$ were obtained in FTIR Spectrophotometer, Thermo Nicolet model Nexus 470, from the analysis of 1mL of sample extract obtained in the previous step. The spectra were obtained at room temperature in solid pellets, and were acquired with a resolution of 4cm^{-1} and 32 scans min^{-1} .

2.8 Obtaining and analysis of biodiesel

To obtain the biodiesel 180.4mg of lipid extracted from the microalgae collected in the WWTP pond were used. The methodology used was described by Xu *et al.* [17]. The biodiesel was analyzed by FTIR, as it was done for the lipid extract. The chromatographic analysis was performed according to Xu *et al.* [17], using equipment of GC/MS Varian Saturn 2200.

3 Results and discussions

3.1 Qualitative characterization of the microalgae from the aerobic and anaerobic lagoon

Descriptive species of the phytoplankton of the aerobic and anaerobic lagoon belong to the groups Bacillariophyceae, Cyanobacteria, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Euglenophyceae, Dinophyceae and Zygnemaphyceae. Two taxa were identified belonging to Bacillariophyceae division, 9 taxa of Cyanobacteria division, 9 taxa of Chlorophyceae division, one of the Cryptophyceae, 9 of Euglenophyceae, 7 Zygnemaphyceae and 1 taxon of Dinophyceae division.

3.2 Quantitative analysis of the microalgae from the aerobic and anaerobic lagoon

The largest number of individuals per milliliter was microalgae belonging to Cyanobacteria and Euglenophyceae groups in the two collections. This may be



related, according to Soldatelli [18], the characteristics of the culture medium (secondarily treated effluent by anaerobic UASB), rich in nitrogen compounds, enabling the environment for the proliferation of these groups of microalgae.

Fifteen taxa were identified at generic, specific and intraspecific levels. The genera numbers for different groups of algae were: 3 Cyanobacteria, 5 Chlorophyceae, 1 of Cryptophyceae, 5 Dinophyceae and 1 Euglenophyceae. In relation to the species found, the *Lepocinclis salina* Frits. the *Plankthotrix isothrix* Bory, *Euglena* sp. and *Phacus longicauda* (Ehr.) Duj. were the species with the highest number of individuals per milliliter.

3.3 Harvest of microalgal biomass

The amount of microalgal biomass obtained by filtration of the effluent from the aerobic and anaerobic pond was 821.77 ± 266.40 mg. The effluent, after filtrated, had its apparent color changed (from green to transparent), as shown in fig. 1, confirming the recovery of microalgal biomass and improving the effluent to be released in the receiving body, since, according to Petry [19], when the receiving body has a combination of algae and halogenated compounds, trihalomethanes can be produced. Borges in Petry [19] analyzed samples of water containing chlorophyceae algae and cyanobacteria and noted that trihalomethanes were formed in these waters, even in small quantities compared with waters rich in humic acids. He noted also, by filtration or not of water containing algae, that the algae as well as its extracellular products act as precursors of trihalomethanes, where the water with algae in suspension has a higher risk for formation of these byproducts. According to Naval *et al.* [11], the WWTP Union Village generates a lot of negative impacts in various environments (water, soil and air) and the population that uses the stream water that receives the effluent from the WWTP. In respect the elevated presence of microalgae in the effluent of the WWTP, these authors show that, when thrown into the stream, algal biomass might generate impacts arising from the presence of toxin producing microalgae, might lead to a reduction of the photic zone of the stream and might alter the aquatic flora.

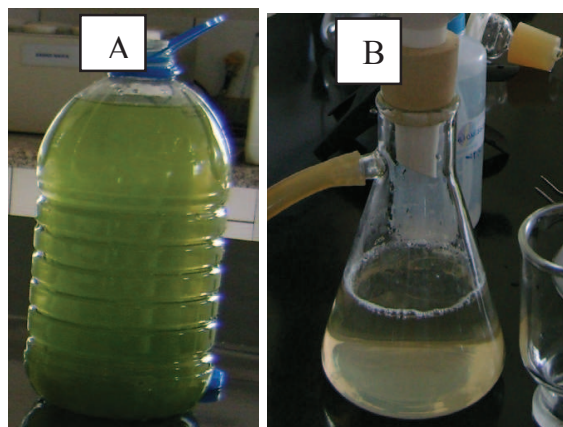


Figure 1: Effluent from the aerobic and anaerobic pond of the WWTP Union Village. Before (A) and after (B) filtration.

3.4 Lipid extraction

In percentage terms, an extract with values of 16wt% was obtained, with an average of 55.6 ± 1.044 mg. Thus, considering only 0.50 m deep of the aerobic and anaerobic lagoon (area of greater light intensity, according to Von Sperling [9]), the volume of 14,080m³ would be obtained and, using the least amount of biomass obtained (594.2mg), recovered algal biomass would be approximately 858.086Kg and an amount, considering a 16% content, of approximately 127.39Kg in lipid.

The concentrate obtained had a greenish color and a waxy appearance, as seen in fig. 2. According to Thompson [20], some microalgae have an alternative form of lipids storage. The specie *Euglena gracilis* (Euglenophyceae), depending on the environmental condition of light in which is found, can store wax composed of fatty acids from 12 to 13 carbon atoms, with a greater quantity of wax when the cells are grown in an anaerobic environment. Besides wax, many species identified in the effluent of the aerobic and anaerobic pond in Union Village are producing saturated fatty acids, providing a solid consistency to the extract obtained, when present in the triglyceride structure.

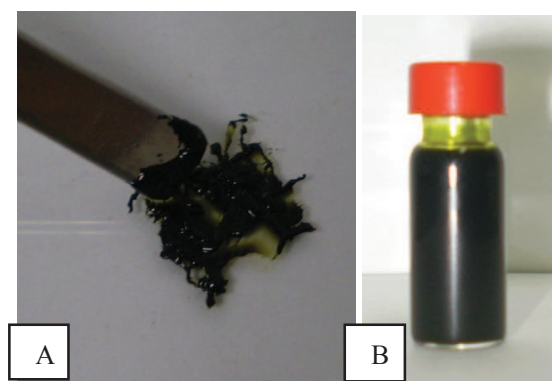


Figure 2: Lipid extract obtained of microalgae from the WWTP Union Village pond. Concentrate (A) and diluted in hexane (B).

3.5 Analysis of the extract by Fourier transform infrared (FTIR)

According to Yang *et al.* [21], most of the absorption bands representing the functional groups of triglycerides can be observed around 2937cm^{-1} (C-H asymmetric axial deformation), 2856cm^{-1} (axial symmetric deformation of C-H), 1749cm^{-1} (axial deformation of C=O group), 1454cm^{-1} (angular deformation such as scissoring of C-H), 1166cm^{-1} (angular deformation of C-O and C-H) and 709cm^{-1} (angular deformation such as rocking of C-H).

Several absorption bands were obtained from the FTIR analysis of the obtained extract, as shown in fig. 3. The numbers 1, 2 and 3 highlight the absorption bands characterizing the presence of esters [22].

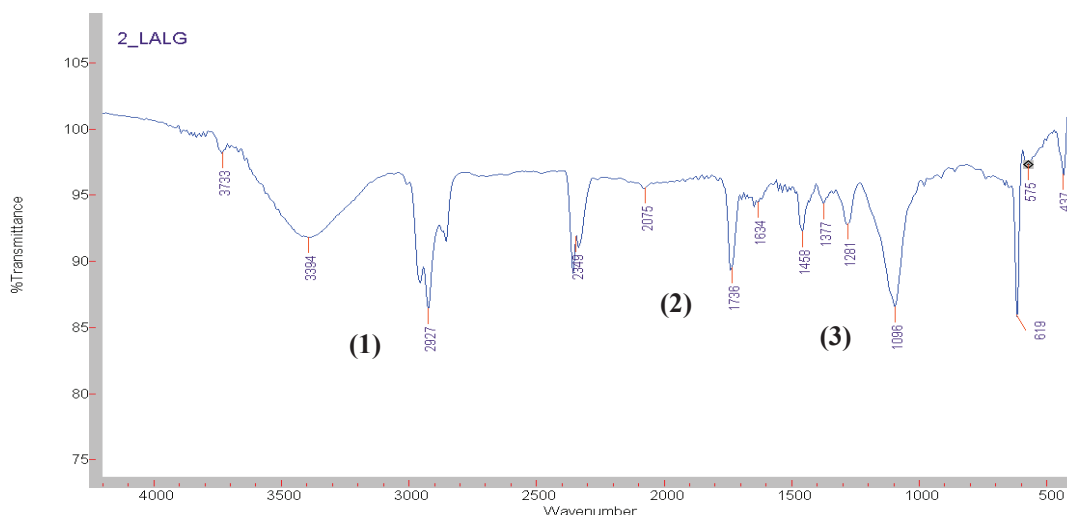


Figure 3: Infrared spectrum of the extract obtained from the microalgae of the WWTP Union Village and diluted in hexane. Axial deformation of C-H of alkanes (1) (2927cm^{-1}), axial deformation of C=O of saturated aliphatic esters (2) (1736 cm^{-1}), axial deformation of O-C-C of esters (3) (1096 cm^{-1}).

3.6 Analysis of the biodiesel by Fourier transform infrared (FTIR) and gas chromatography with mass spectroscopy (GC/MS)

Fig. 4 shows the FTIR spectrum of the lipid sample obtained from the microalgae collected in the pond and transesterified.

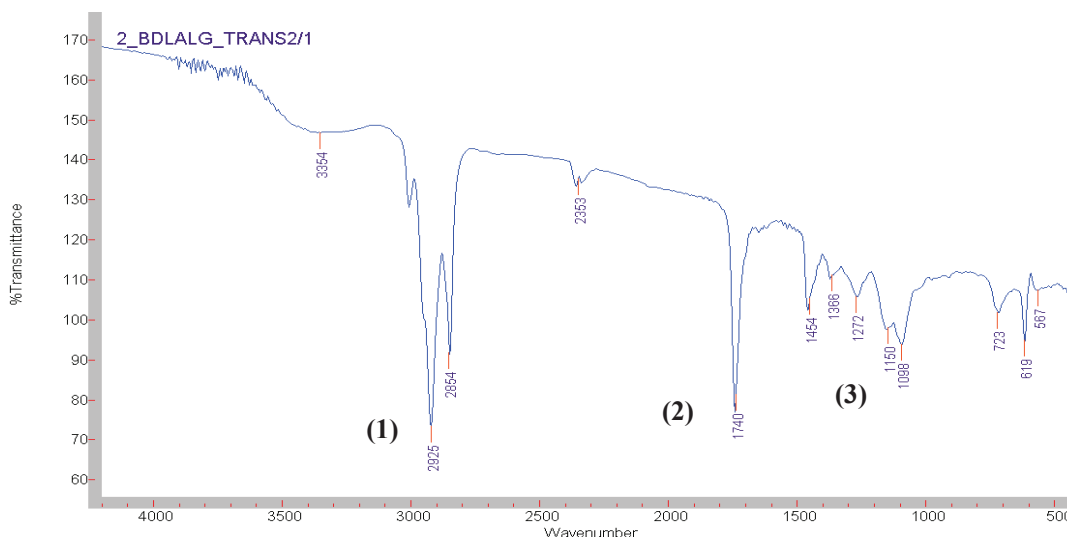


Figure 4: Infrared spectrum of the biodiesel from extract. Axial deformation of C-H of alkanes (1) (2925 cm^{-1}), axial deformation of C=O of saturated aliphatic esters (2) (1740 cm^{-1}), axial deformation of O-C-C of esters (3) (1150 cm^{-1}).

Several absorption bands were obtained from the FTIR analysis of the obtained biodiesel, as shown in fig. 4. The numbers 1, 2 and 3 highlight the absorption bands characterizing the presence of esters [22]. The spectrum of the biodiesel sample from the microalgae obtained lipid showed some similarities with the spectrum of this lipid, but with differences such as the reduction of the O-H group band at 3354cm^{-1} .

The compounds observed by the analysis of GC/MS were Eicosane ($\text{C}_{20}\text{H}_{42}$) (42,801%) (1), Hexadecanoic acid methyl ester ($\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$) (8,831%) (2), 12,15-Octadecadienoic acid, methyl ester ($\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$) (8,803%) (3), 6-Octadecenoic acid, methyl ester ($\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$) (15,679%) (4), Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester ($\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{O}_4$) (10,004%) (5) and 1,2-Benzenedicarboxylic, diisooctyl ester ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$) (13,852%) (6), as shown in the fig. 5.

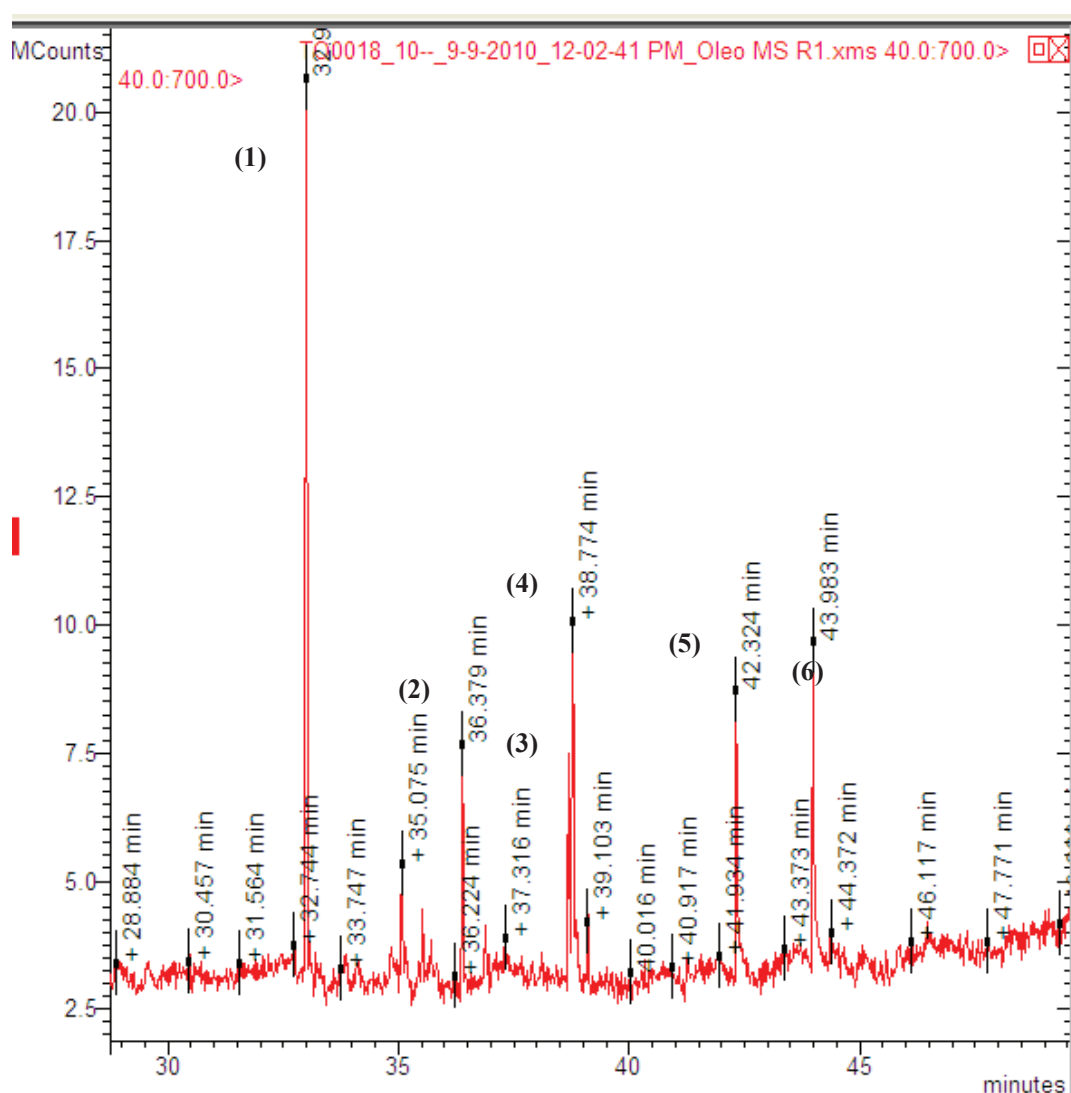


Figure 5: Spectrum of GC/MS of the extract from the microalgae after being derivatized.

4 Conclusion

The effluent of the aerobic and anaerobic lagoon of the WWTP Union Village is composed of different species. The taxa Cyanobacteria, Chlorophyceae, Euglenophyceae and Zygnemaphyceae present the highest number of species. However, with regard to the number of individuals per milliliter, species belonging to taxa Cyanobacteria and Euglenophyceae are predominant. The identified microalgae are producing lipids and fatty acids, which can be used to obtain biodiesel.

In the recovery of microalgal biomass, the filtration process can be used for the microalgal biomass concentration considering a bench scale. Biomass recovered from the effluent of the WWTP Union Village through this process has a lipid content of 16%, resembling the lipid obtained from microalgae grown by conventional processes, and has potential for use in obtaining lipid to biodiesel production.

From the standpoint of economic and environmental, the obtaining of microalgal biomass directly from the aerobic and anaerobic lagoon shows an alternative to the traditionally used procedures (photobioreactors and aerated tanks) to obtain algal biomass, to use the biomass for biofuel production and, simultaneously, to minimize environmental impacts of the elevated presence of this material in the environment.

References

- [1] Chist, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**, pp.294-306, 2007.
- [2] BIODIESELBR, www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/bndes-enxerga-algas-alternativa-materia-prima--grande-potencial-.htm
- [3] BIODIESELBR, www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/gargalos-biodiesel-preocupam-bndes.htm
- [4] Lourenço, Sergio O. *Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações*. Rima: São Carlos-SP, chapter 6, 2006.
- [5] Morais, M. G. and Costa, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*, **31(5)**, pp.1038-1042, 2008.
- [6] Borowitzka, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, **70**, pp.313-321, 1999.
- [7] Sawayama, S.; Inoue, S.; Dote, Y. and Yokoyama, S. CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Conversion and Management*, **36(6-9)**, pp.729-731, 1995.
- [8] Craggs, R. J.; McAuley, P. J.; Smith, V. J. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway. *Water Resource*, **31(7)**, pp.1701-1707, 1997.



- [9] Von Sperling, M. *Lagoas de Estabilização*. UFMG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Belo Horizonte - MG, v.3, 2.ed. 1986.
- [10] Von Sperling, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. UFMG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Belo Horizonte - MG, v.1, 3.ed. 2005.
- [11] Naval, L. P.; BARros, D. S. B.; and Silva, C. D. F. Aplicação de métodos de avaliação de impactos ambientais a uma ETE operando em escala real com a respectiva proposição de medidas mitigadoras. www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/danger.pdf
- [12] Marques, A. K. Análise da diversidade fitoplanctônica no reservatório da Usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães, no médio Tocantins – TO: estrutura da comunidade, flutuações temporais e espaciais. www.site.uft.edu.br/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=974&Itemid=69
- [13] Uthermöhl, H. Zur Vervollkomnigung der quantitativen Phytoplankton. *Methodik Mitteilungen Internationalen Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie*, **9**, pp.1-38, 1958.
- [14] Margalef, R. *Limnologia*. Omega S/A: Barcelona, 1010 p., 1983.
- [15] Lund, J. W. G.; Kipling, C.; Lecren, E. D. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia*, **11**, pp.143-170, 1958.
- [16] Nogueira, I. S. and Rodrigues, L. N. C. Planctonic algae of an artificial lake of Chico Mendes botanical gardens, municipality of Goiania, state of Goias: floristic and some ecological considerations. *Revista Brasileira de Biologia*, **16**, pp.155-174, 1999.
- [17] Xu, H.; Miao, X.; and Wu, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, **126**, pp.499-507, 2006.
- [18] Soldatelli, V. F. Avaliação da comunidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização utilizada em tratamento de efluentes domésticos. Estudo de caso – ETE – UCS. www.lume.ufrgs.br/handle/10183/10953
- [19] Petry, A. T. Efeito potencial de gradiente trófico em rio urbano na formação de trihalometanos. www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=117560
- [20] Thompson JR., G. A. Lipids and membrane function in green algae. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1302**, pp.17-45, 1996.
- [21] Yang, H.; Irudayaraj, J.; and Paradkar, M. M. Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, **93**, pp.25-32, 2005.
- [22] Silverstein, R. M. and Webster, F. X. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A: Rio de Janeiro - RJ, cap.3, 2000.



REVISÃO

O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis

Aderlânio da Silva Cardoso^{1*}, Gláucia Eliza Gama Vieira² e Anelise Kappes Marques³

Recebido: 03 de dezembro de 2010 Recebido após revisão: 05 de agosto de 2011 Aceito: 29 de agosto de 2011
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1797>

RESUMO: (O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis). Microalgas são organismos procariotos ou eucariotos de crescimento acelerado e composição química bastante diversificada. A biomassa de microalgas está sendo utilizada para a obtenção de diferentes biocombustíveis (biodiesel, etanol, metano, hidrogênio e bio-óleo) por possuir uma maior concentração e produtividade de bioprodutos (*lipídios*, carboidratos, proteínas, entre outros), quando comparado às biomassas tradicionalmente utilizadas. Essa biomassa pode ser obtida via cultivo autotrófico e/ou heterotrófico com o uso de fotobiorreatores abertos ou fechados, sem a necessidade do uso de terras agricultáveis. Após o cultivo, a biomassa é separada do meio de cultura por processos físicos e químicos, e seca com o uso de diferentes tecnologias para preservá-la e auxiliar na etapa seguinte, a extração dos compostos celulares. Em virtude disso, a biomassa de microalgas apresenta-se atualmente como uma alternativa às biomassas tradicionalmente utilizadas para a obtenção de diferentes biocombustíveis.

Palavras-chave: cultivo e processamento de algas, bioprodutos de algas, combustível renovável.

ABSTRACT: (The use of microalgae for the production of biofuels). Microalgae are rapidly growing prokaryotic or eukaryotic organisms of diversified chemical composition. The microalgal biomass has been used by researchers to obtain different biofuels (biodiesel, ethanol, methane, hydrogen and bio-oil) due to high concentration and productivity of bioproducts (lipids, carbohydrates, protein and others), stored on its cells, when compared to traditionally used biomass. Microalgal biomass can be obtained via autotrophic and/or heterotrophic cultivation using raceway pond or closed photobioreactor systems, without requiring the use of agricultural land. After cultivation, the biomass is separated from the culture medium by physical and chemical processes and dries using different technologies to preserve it and assist in next stage, the extraction of cellular components. Therefore, microalgal biomass has been presented as an alternative to traditional biomass used to obtain different biofuels.

Key words: cultivation and processing algae, bioproducts from algae, renewable fuel.

INTRODUÇÃO

As microalgas consistem em uma variedade de organismos autotróficos, procarióticos ou eucarióticos. A estrutura unicelular das microalgas permite que elas convertam facilmente a energia solar em energia química. Essa conversão bioquímica está sendo aproveitada comercialmente para a obtenção de biomassa de microalgas e, conseqüentemente, de produtos de aplicação comercial. As técnicas de cultivo de microalgas mais utilizadas atualmente são as lagoas aeradas abertas e os fotobiorreatores fechados (Brennan & Owende 2010, Harun *et al.* 2010, Chen *et al.* 2011, Singh *et al.* 2011), sendo que o uso de uma ou outra técnica de cultivo é influenciado pelas características do local de cultivo, pela espécie utilizada, a quantidade de luz necessária e o processo de recuperação da biomassa do meio de cultura (centrifugação, floculação e filtração) que pretende-se utilizar.

A biotecnologia das microalgas tem sido desenvolvida para diferentes aplicações comerciais. No que diz respeito aos biocombustíveis, algumas microalgas con-

têm altos níveis de *lipídios*, os quais podem ser transesterificados em biodiesel. Além disso, a biomassa residual obtida após a extração dos *lipídios* pode ser utilizada para produzir diferentes tipos de biocombustíveis como metano, bio-óleo e etanol. Além disso, o hidrogênio pode ser obtido através do condicionamento do cultivo para direcionar a produção dele pelas células e o metano, bio-óleo e etanol podem ser obtidos com o uso das células intactas (Brennan & Owende 2010, Dasgupta *et al.* 2010, Harun *et al.* 2010, Chen *et al.* 2011, Singh *et al.* 2011). Logo, objetiva-se realizar uma breve discussão sobre como está sendo feita a produção de biomassa de microalgas, como é a sua composição bioquímica e o uso dessa biomassa para a obtenção de diferentes biocombustíveis.

BIOLOGIA DAS MICROALGAS

Microalgas são algas microscópicas (5-50 μm), assim como as cianobactérias, cujas células possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, pro-

1. Bolsista CNPq pelo Mestrado em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins (UFT), Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento em Biomassa e Biocombustível (LEDBIO), Palmas, TO, Brasil.

2. Professora Pesquisadora do Programa de Pós-graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, (LEDBIO), Palmas, TO, Brasil.

3. Pesquisadora Bolsista de Pós-doutorado Júnior/Lambio da Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

*Autor para contato. E-mail: asc_uft@yahoo.com.br

Tabela 1. Conteúdo dos principais componentes químicos de células autotróficas e heterotróficas de *Chlorella protothecoides*. Fonte: Xu *et al.* (2006).

Componente (%)	Autotrófico	Heterotrófico
Proteína	52,64 ± 0,26	10,28 ± 0,10
Lípido	14,57 ± 0,16	55,20 ± 0,28
Carboidrato	10,62 ± 0,14	15,43 ± 0,17
Cinzas	6,36 ± 0,05	5,93 ± 0,04
Umidade	5,39 ± 0,04	1,93 ± 0,02
Outros	10,42 ± 0,65	11,20 ± 0,61

teína, lipídios, ácidos graxos, etc.) e essa composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e ao meio de cultura utilizado (Miao & Wu 2006, Zamalloa *et al.* 2011). Como exemplo, tem-se um trabalho realizado por Xu *et al.* (2006), o qual mostra que células da microalga *Chlorella protothecoides* têm a sua composição bioquímica diferenciada quando cultivada de forma autotrófica e heterotrófica (Tab. 1).

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Em microalga verde, por exemplo, o complexo sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenóide captura energia solar na forma de fótons. Esta energia é utilizada pelo fotossistema II na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e molécula de O₂. Os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do tilacóide, o qual é utilizado para conduzir a produção de ATP via ATP sintase. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO₂ é fixado em moléculas de três átomos de carbono que são assimilados em açúcares, amido, lipídios, ou outras moléculas exigidas para o crescimento celular. Já o substrato para a hidrogenase, H⁺ e e⁻, são supridos tanto via cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos como via fermentação do carboidrato (amido) armazenado (Beer *et al.* 2009).

Logo, devido a essa diversidade de produtos existentes em biomassa de microalga, esta é utilizada pelo homem para o fornecimento de suplementos alimentares, obtenção de fármacos, produção de biocombustíveis (Borowitzka 1999, Venkatesan *et al.* 2006), uso da biomassa de microalga, juntamente com o efluente de lagoas de estabilização, na agricultura e piscicultura (Sousa 2007, Mata *et al.* 2010), entre outros usos.

CULTIVO, COLETA E PROCESSAMENTO DE BIOMASSA DE MICROALGAS PARA A OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

O cultivo de microalgas pode ser realizado por processo autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotohete-

rotrofico. Em cultura autotrófica, as microalgas utilizam luz como fonte de energia e carbono inorgânico (CO₂, por exemplo) como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese. Diferente deste, o cultivo heterotrófico é realizado quando a espécie de microalga utiliza carbono orgânico como fonte de energia e de carbono. O mixotrófico ocorre quando a microalga, sob fotossíntese, utiliza como fonte de carbono para o seu crescimento compostos orgânicos e CO₂. Já o cultivo fotoheterotrófico ocorre quando a microalga requer luz quando utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono, sendo este cultivo diferente do mixotrófico pelo fato de naquele a luz é requerida como fonte de energia e neste é utilizado compostos orgânicos para este propósito (Brennan & Owende 2010, Chen *et al.* 2011).

No que diz respeito às tecnologias utilizadas para o cultivo de microalgas, atualmente são utilizados os fotobiorreatores, os quais podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados de alta taxa e com extremidades elípticas (*raceway ponds*, lagos, etc), e sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal, fermentador, etc) (Dasgupta *et al.* 2010).

A geometria dos fotobiorreatores fechados apresenta-se nas seguintes formas: *reator tubular*, o qual possui diferentes configurações como reator tubular vertical (tubo transparente vertical de polietileno ou vidro, no qual a agitação é atingida pelo borbulhamento feito a partir do fundo); reator tubular horizontal (o gás é introduzido pela conexão do tubo ou através de unidade de troca gasosa); reator tubular helicoidal (construídos com tubos de plástico flexível em estruturas helicoidais tridimensionais; é ligado externamente por um trocador de gás e um trocador de calor, e uma bomba centrífuga é utilizada para acionar a alimentação através dos tubos de forma ascendente). Além do reator tubular, existe o *reator em placas*, sendo estas postas de forma vertical (lados transparentes frente para o leste-oeste), inclinada (norte-sul) ou horizontal. Na produção em larga escala, várias chapas estão dispostas paralelamente sobre uma área. Os reatores de placa plana são caracterizados por uma área aberta de transferência de gás, reduzindo assim a necessidade de um desgaseificador exclusivo para isso. Por fim, tem-se o *reator tipo fermentador*. Neste, a iluminação é fornecida internamente, quando utilizado grandes volumes, e a agitação é realizada com a ajuda de um rotor (*impeller*) tipo marinho (fluxo axial) ou helicoidal (*ribbon type*) ou agitação magnética (em unidades menores) (Dasgupta *et al.* 2010).

Os sistemas de fotobiorreatores fechados apresentam-se como os mais adequados para microalgas que podem ser rapidamente contaminadas por outros microrganismos, exceto para microalgas que conseguem sobreviver em condições ambientais extremas como alto pH (*Spirulina*, por exemplo) e alta salinidade (*Dunaliella*, por exemplo) ou podem crescer muito rapidamente (*Chlorella*, por exemplo) em tanques abertos (Brennan & Owende 2010).

Já os sistemas de tanques abertos são talvez os mais adequados para o cultivo de microalgas em sistema autotrófico para a produção de biodiesel devido ao seu baixo custo de operação. O sistema mais utilizado são os tanques aerados de alta taxa. Estes são feitos tipicamente de canais com circulação em formato elíptico, geralmente com 20-50 cm de profundidade e com agitação e circulação do meio de cultivo para estabilizar o crescimento e a produtividade das microalgas. São freqüentemente construídos em concreto, mas tanques com revestimento de plástico também tem sido utilizados. Em um sistema de cultivo contínuo, as microalgas e os nutrientes são introduzidos na frente da pá de agitação e movidos por todo o tanque até o ponto de coleta. A agitação é contínua para evitar a sedimentação das células. A fonte de carbono pode ser obtida diretamente da atmosfera, na superfície, mas aeradores submersos podem ser instalados para aumentar a absorção do CO₂ (Brennan & Owende, 2010, Dasgupta *et al.*, 2010). Adicionalmente, águas residuárias podem ser utilizadas para o cultivo de microalgas em sistemas abertos ou fechados por conter nutrientes abundantes (fontes de nitrogênio, fósforo, carbono, entre outros), os quais são necessários para o crescimento das microalgas. A água residuária, após prévio tratamento (físico e/ou químico) pode ser utilizada unicamente ou como aditivo no cultivo de microalgas (Chinnasamy *et al.* 2010, Cho *et al.* 2011, Christenson & Sims 2011, Jiang *et al.* 2011, Li *et al.* 2011).

No entanto, no que diz respeito às vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo de microalgas, pode-se observar que, embora as microalgas possam utilizar eficientemente a luz solar, o cultivo autotrófico é lento por causa da limitação luminosa imposta pela elevada densidade celular em cultivos em larga escala ou devido a uma fotoinibição ocasionada pelo excesso de luz, especialmente em dias ensolarados, principalmente em sistemas abertos. Em virtude disso, o crescimento heterotrófico de microalgas em fotobiorreatores fechados poderia ser considerado favorável. Estes oferecem várias vantagens sobre os sistemas abertos, como a eliminação da variabilidade existente na fonte natural de luz, um bom controle do processo e um baixo custo para colher a biomassa devido à obtenção de uma elevada densidade celular (Miao & Wu 2006, Xu *et al.* 2006, Huang *et al.* 2010).

Porém, assim como os fotobiorreatores abertos, os fechados também padecem de várias desvantagens que necessitam ser consideradas e resolvidas. Suas principais limitações incluem: sobreaquecimento, bio-incrustantes, acúmulo de oxigênio, dificuldade de ampliação, o alto custo de construção, operação e do cultivo das microalgas, danos às células pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*) e deterioração do material utilizado para a fase luminosa. O custo da produção de biomassa de microalgas em fotobiorreatores fechados pode ser maior que em tanques. Isto dependerá do destino que será dado às células das microalgas (obtenção de

químicos de alto ou baixo valor no mercado) (Brennan & Owende 2010, Mata *et al.* 2010). Devido ao exposto acima, os fotobiorreatores fechados podem não ter um impacto significativo em um futuro próximo sobre qualquer produto ou processo que possa ser obtido com os tanques aerados abertos.

Para a produção de um biocombustível a baixo custo para que todos os consumidores venham ter acesso, a escolha de um ou outro sistema de obtenção de microalgas para este fim é de fundamental importância, para que maiores investimentos sejam feitos nessa área. Para isso, seria necessário o aperfeiçoamento do sistema de cultivo mais economicamente viável, com consequente redução de custos em todas as áreas (uso de água, nutrientes, energia, infra-estrutura, entre outros). Uma alternativa que vem sendo pensada, atualmente, é o aproveitamento de efluentes industriais ou domésticos (como fonte de nutrientes) e a própria infra-estrutura (ou com adições) de uma Estação de Tratamento de Efluente (ETE), com sistema de lagoa de estabilização, para a obtenção de biomassa de microalgas (Mulbry *et al.* 2008). Além disso, os sistemas utilizados para a obtenção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás, hidrogênio) devem ser integrados para um maior aproveitamento da biomassa e diminuição dos custos (Powell & Hill 2009, Harun *et al.* 2011).

Após o cultivo, seja em fotobiorreatores abertos ou fechados, a biomassa de microalgas deve ser separada do meio de cultura para que seja aproveitada. O método adequado para a remoção de elevadas quantidades de água e o processamento de grandes volumes de biomassa de microalgas pode envolver uma ou mais etapas, e podem ser realizados diferentes métodos físicos, químicos e biológicos para executar a separação sólido-líquida desejada (Grima *et al.* 2003, Brennan & Owende 2010, Mata *et al.* 2010). Os métodos de coleta comumente utilizados incluem a sedimentação, centrifugação, filtração, ultra-filtração, às vezes com uma etapa adicional de floculação ou uma combinação de flotação com floculação (Wang *et al.* 2008). Meios de cultura são geralmente diluídos (<0,5Kg.m⁻³ de biomassa seca em alguns sistemas de produção comercial). Com isso, a recuperação da biomassa do meio de cultura tem sido responsável por contribuir com 20-30% do total de gastos para a produção de biomassa (Grima *et al.* 2003).

A etapa final do processo de obtenção de biomassa de microalgas, o processamento (secagem, extração dos bioprodutos, entre outros) da biomassa recuperada, representa a maior limitação econômica à obtenção de produtos de microalgas de baixo custo, possuindo uma elevada especificidade e é fortemente dependente dos produtos desejados. Vários métodos têm sido aplicados para a secagem de microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*, sendo que dentre os mais comuns têm-se a secagem com spray (*spry-drying*) (pulverização da amostra em uma câmara submetida a uma corrente de ar quente), tambor de secagem (*drum-drying*) (transferência de calor para a amostra através

das paredes internas do cilindro do tambor), liofilização (congelamento da amostra e remoção da umidade por sublimação) e secagem ao sol. A secagem ao sol é mais utilizada para biomassas com um baixo teor de umidade e a secagem com spray não é economicamente viável para produtos de baixo valor, como biocombustíveis e proteínas. A liofilização tem sido utilizada para secagem de microalgas em pesquisas laboratoriais. No entanto, este método é muito caro para ser utilizado em uma escala comercial para a recuperação de produtos das microalgas (Grima *et al.* 2003, Brennan & Owende 2010, Mata *et al.* 2010).

Além de conservar a biomassa, a secagem auxilia na ruptura celular das microalgas para a liberação dos metabólitos de interesse. Em alguns casos, a extração com solvente de biomassa seca tem demonstrado uma maior recuperação de metabólitos intracelulares do que a biomassa úmida. Produtos intracelulares como óleos podem ser de difícil extração a partir de biomassas úmidas de células não rompidas. Mas são extraídas facilmente se a biomassa for seca anteriormente. Vários métodos para romper a parede celular podem ser utilizados (dependendo da parede das microalgas e da natureza dos produtos a serem obtidos), os quais utilizam ou não a ação mecânica (prensas, por exemplo) (congelamento, solvente orgânico, choque osmótico e reações ácidas, básicas e enzimáticas são exemplos de ação não mecânica). O ultra-som pode ser utilizado para romper células de microalgas suspensas em pequenas quantidades de biomassa, mas este não é aplicável em grandes escalas. O tratamento com álcalis é outro método efetivo de ruptura da parede celular, mas geralmente não é adequado para produtos sensíveis como proteínas. No entanto, a ruptura alcalina pode ser utilizada para isolar ácidos graxos livres. Entretanto, prensas mecânicas e solventes apolares são os métodos mais utilizados para a extração de *lipídios* das microalgas, assim como é realizado com oleaginosas tradicionais (Grima *et al.* 2003, Mata *et al.* 2010).

BICOMBUSTÍVEIS OBTIDOS A PARTIR DAS MICROALGAS

Biodiesel

O biodiesel é um biocombustível formado a partir da reação de esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de glicerídeos, ambos presentes em óleos vegetais, gorduras animais e óleos e gorduras residuais. Atualmente, a principal biomassa utilizada para a obtenção de biodiesel é a soja (*Glycine* sp.), atendendo mais de 80% da produção de biodiesel no Brasil. Entretanto, a soja não será capaz de auxiliar a produção desse biocombustível sem a destinação de áreas agrícolas exclusivamente para esse fim, devido à baixa produtividade dessa biomassa (0,2-0,4 tonelada por hectare). Logo, é preferível que as biomassas utilizadas proporcionem uma ótima produtividade em *lipídios* e

com um menor uso do solo (Chist 2007, BiodieselBR 2010, Neto 2011).

As microalgas surgem como uma biomassa com teor lipídico que pode variar entre 1 e 70%, mas sob certas condições, algumas espécies podem atingir 90% do peso seco (Chist 2007, Huang *et al.* 2010, Mata *et al.* 2010). O conteúdo de óleo em microalgas pode atingir 75% em peso em relação à biomassa seca, mas associado com baixa produtividade, como em *Botryococcus braunii*, por exemplo. Algas mais comuns (*Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis*) têm níveis de óleo entre 20 e 50%, mas produtividades maiores podem ser atingidas (Mata *et al.* 2010). A fonte de carbono utilizado pelas microalgas pode ser tanto carbono inorgânico (CO₂) quanto orgânico (glucose, acetato, etc) para a formação de ácidos graxos e, conseqüentemente, *lipídios*, sendo a quantidade destes em cada célula diferente entre espécies. As rotas de formação de ácidos graxos e triglicerídeos em microalgas podem ser divididas nas seguintes etapas: formação da acetil coenzima A (acetil-coA) no citoplasma; o alongamento e insaturação da cadeia de carbono de ácidos graxos, dependente principalmente dos sistemas enzimáticos acetil-coA carboxilase (ACCE) e ácido graxo sintase (FAS); e a biossíntese de triglicerídeos, tendo L- α -fosfoglicerol e acetil-coA como os dois maiores iniciadores (*primers*) (Hu *et al.* 2008, Huang *et al.* 2010).

Os *lipídios* das microalgas são constituídos por diferentes ácidos graxos saturados e insaturados, alguns deles da família do ω -3 e ω -6 (Hu *et al.* 2008, Huang *et al.* 2010). Geralmente, os ácidos graxos saturados e mono-insaturados predominantes são C16:0 e C16:1 em Bacillariophyceae; C16:0 e C18:1 em Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenophyceae e Eustigmatophyceae; C16:0, C16:1 e C18:1 em Cryptophyceae, Prymnesiophyceae, e Cianobactéria; C16:0 em Dinophyceae e Rhodophyceae; e C14:0, C16:0 e C16:1 em Xanthophyceae. Já os poliinsaturados são C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3 em Bacillariophyceae; C18:2 e C18:3 ω 3 em algas verdes e Euglenophyceae; C20:5, C22:5 e C22:6 em Cryptophyceae; C18:3 ω 3, C18:4 e C20:5 em Cryptophyceae; C20:3 e C20:4 ω 3 em Eustigmatophyceae; C18:3 ω 3 e C20:5 em Prasinophyceae; C18:5 ω 3 e C22:6 ω 3 em Dinophyceae; C18:2, C18:3 ω 3 e C22:6 ω 3 em Prymnesiophyceae; C18:2 e C20:5 em Rhodophyceae; C16:3 e C20:5 em Xanthophyceae; e C16:2, C18:2 e C18:3 ω 3 em Cianobactéria (Rezanka *et al.* 2003, Zhukova & Aizdaicher 1995, Hu *et al.* 2008). As microalgas são freqüentemente compostas por triglicerídeos e ácidos graxos poliinsaturados que não são tradicionalmente utilizados para a obtenção de biodiesel, sendo propensos a reações de oxidação indesejáveis. Além disso, o óleo de microalga pode apresentar uma elevada acidez (Miao & Wu 2006). Para isso, podem ser feitas modificações no metabolismo e no meio de cultura (modifi-

cações na quantidade de nitrogênio, fósforo e enxofre, por exemplo) para que os *lipídios* de interesse sejam produzidos (Beer *et al.* 2009), assim como catalisadores ácidos podem ser utilizados no processo reacional de obtenção do biodiesel (Miao & Wu 2006, Xu *et al.* 2006).

As características dos ácidos graxos que compõem os *lipídios* devem ser levadas em consideração porque as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção, dependem fortemente deles. As propriedades mais influenciadas incluem a qualidade da ignição (número de cetano, por exemplo), as propriedades de fluxo a frio e estabilidade oxidativa. Apesar da saturação e do perfil dos ácidos graxos das microalgas não terem muito impacto sobre a obtenção de biodiesel a partir da reação de transesterificação (por ser o mesmo processo utilizado nas outras oleaginosas, via catálise básica ou ácida), eles podem afetar as propriedades do biocombustível. Por exemplo, óleos saturados produzem um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetano, mas propriedades indesejáveis a baixas temperaturas, sendo susceptível ao estado sólido. Biodiesel produzido a partir de biomassa que possui um elevado teor de ácidos poliinsaturados possui boas propriedades à baixa temperatura. Entretanto, esses ácidos graxos são muito susceptíveis à oxidação, possuindo problemas de instabilidade quando armazenado por muito tempo (Hu *et al.* 2008). No entanto, esses problemas podem ser resolvidos com o uso de aditivos para tornar o combustível mais estável, como já é feito atualmente. Em relação às microalgas, o biodiesel obtido a partir delas possui características físicas e químicas semelhantes aos de biomassas tradicionais (soja, pinhão-mansão, babaçu, óleo residual, etc, por possuir *lipídio* com características similares a estas) e do diesel (Miao & Wu 2006, Xu *et al.* 2006, Chist 2007, Vijayaraghavan & Hemanathan 2009).

Etanol

O etanol é um biocombustível obtido via processo bioquímico, através da fermentação de biomassas sacaríneas e, após hidrólise, de amiláceas e celulósicas, e por processo termoquímico (gaseificação da biomassa). As biomassas frequentemente empregadas na obtenção de etanol, como o milho e a cana-de-açúcar, têm problemas em comum: são muito utilizadas na alimentação e é necessária a disponibilização de terras agricultáveis para serem produzidas. Em virtude disso, tem existido um interesse atualmente na produção de etanol a partir dos carboidratos (celulose, xilose, galactose, arabinose, glicose e manose) presentes em microalgas (Harun *et al.* 2009).

As microalgas fornecem carboidratos que podem ser fonte de carbono para a fermentação (Brennan & Owende 2010, Harun *et al.* 2010, Singh & Gu 2010). Entretanto, a produção de etanol de microalgas ainda está sob investigação e esta tecnologia ainda não tem sido comercializada, visto que o processo de obtenção

de etanol a partir de microalgas é o mesmo utilizado quando da obtenção de etanol a partir de biomassas amiláceas e celulósicas e a obtenção da biomassa de microalgas ainda é um processo caro. Além disso, antes da fermentação, os *lipídios* devem ser removidos (rompimento da célula via extração por solvente e/ou mecânica), pois assim tanto os carboidratos presentes na membrana celular e no meio intracelular (armazenados no cloroplasto, por exemplo) estarão disponíveis para a fermentação, aumentando o rendimento (Harun *et al.* 2009).

Outra forma de obtenção de elevados teores de carboidrato é o condicionamento do meio de cultura para que a microalga venha a produzir mais esse composto em detrimento de outros. Dragone *et al.* (2011) testaram a influência da concentração de nitrogênio e ferro sobre o acúmulo de amido em *C. vulgaris* P12. Os autores observaram que o maior teor de amido (acima de 41%, em relação à massa seca da biomassa) foi obtido quando a quantidade de nitrogênio e ferro foi menor. Entretanto, a quantidade de biomassa foi menor que quando maiores concentrações desses nutrientes foram utilizadas. Logo, eles sugerem que o cultivo seja feito em duas etapas: a primeira para obtenção de biomassa (maiores concentrações de nitrogênio e ferro) e a segunda para o aumento do teor de amido (meio livre de nitrogênio e ferro por poucos dias de cultivo).

Hirano *et al.* (1997) obtiveram etanol a partir de células de *C. vulgaris*. Após a ruptura celular (por radiação ultrassônica, por exemplo), o extrato obtido foi centrifugado e lavado com uma solução 95% (v/v) de água deionizada e metanol. O extrato foi incubado em α -amilase a 100 °C e pH 6,0 e glucoamilase a 60 °C e pH 4,5. O açúcar resultante foi fermentado por *Saccharomyces cerevisiae*. Harun *et al.* (2009) obtiveram etanol, por fermentação com *Saccharomyces bayanus*, a partir de células intactas e rompidas da espécie *Chlorella sp.* e concluíram que o maior rendimento foi o obtido a partir das células previamente rompidas.

Metano

A tecnologia de fermentação para a obtenção de metano para algas tem recebido considerável atenção porque ela produz compostos de valor agregado no mercado, como biogás, por exemplo. O biogás consiste principalmente de uma mistura de metano (55-75%) e CO₂ (25-45%) produzidos por microrganismos durante a digestão anaeróbica. O metano da digestão anaeróbica pode ser utilizado como gás combustível e também ser convertido para a geração de eletricidade. Já o CO₂ da digestão anaeróbica e da queima do metano, assim como o proveniente de indústrias, poderia ser utilizado para o cultivo das microalgas, injetando-o no sistema de cultivo (Morais & Costa 2008, Wang *et al.* 2008). A biomassa residual da digestão anaeróbica pode também ser reprocessada para fazer fertilizante. Além de ser renovável e sustentável, haveria o estímulo às práticas agrícolas sustentáveis (diminuindo o uso de pro-

Tabela 2. Comparação das propriedades típicas do óleo de petróleo e dos bio-óleos da pirólise rápida de madeira e microalgas. Fonte: Brennan & Owende (2010).

	Bio-óleo		Óleo de petróleo
	Madeira	Microalgas	
C (%)	56,4	62,07	83,0-87,0
H (%)	6,2	8,76	10,0-14,0
O (%)	37,3	11,24	0,05-1,5
N (%)	0,1	9,74	0,01-0,7
Densidade (kg.L ⁻¹)	1,2	1,06	0,75-1,0
Viscosidade (Pas)	0,04-0,20 (a 40 °C)	0,10 (a 40 °C)	2-1000
PCS (MJ.kg ⁻¹)	21	29-45,9	42

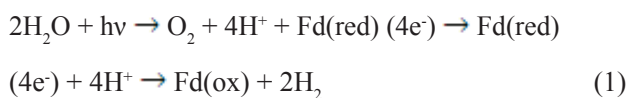
dutos químicos) e reduziria os custos da produção das microalgas.

As microalgas não contêm elevados teores de lignina e possuem uma menor quantidade de celulose. Isso faz com que o processo apresente uma boa estabilidade e uma alta eficiência na conversão à biogás. O biogás produzido deste processo de digestão anaeróbia é principalmente afetado pela sua carga orgânica, temperatura, pH e tempo de detenção no reator. Basicamente, um longo tempo de detenção do sólido e uma alta carga orgânica proporcionam um maior rendimento de metano. Além disso, a digestão anaeróbia pode ser operada em condições mesofílicas (35 °C) e termofílicas (55 °C) (Brennan & Owende 2010, Harun *et al.* 2010, Singh & Gu 2010).

Hidrogênio

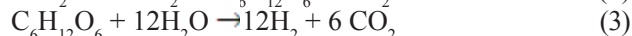
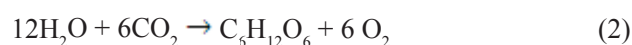
A produção de hidrogênio a partir de microalgas é realizada pelo uso de sistemas fotobiológicos em fotobiorreatores (os mesmos utilizados para a obtenção de biomassa) com condições de cultivo (concentração de CO₂ e O₂ dissolvido, pH, nitrogênio, temperatura, luz e agitação) controladas para favorecer a produção de hidrogênio pelas células. No que diz respeito às microalgas verdes e cianobactérias, o hidrogênio pode ser formado por biofotólise direta e biofotólise indireta (Benemann 2000, Dasgupta *et al.* 2010).

A biofotólise direta é um processo biológico que quebra a molécula de água para a produção de hidrogênio e oxigênio pela utilização da luz solar. As algas verdes possuem um fotossistema II (PSII) e o fotossistema I (PSI) para a captura de luz solar e realizam a fotossíntese oxigênica como as plantas superiores. Na ausência de oxigênio, os elétrons (e⁻) da ferredoxina reduzida (Fd) podem ser utilizados também pela hidrogenase para reduzir prótons (H⁺) formando hidrogênio (H₂) (Eq. 1) (Benemann 2000, Dasgupta *et al.* 2010).



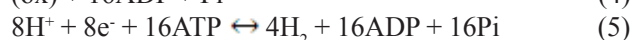
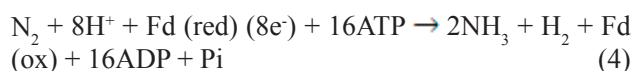
Uma inibição parcial do PSII pode gerar uma condição anaeróbica para a célula dentro do fotobiorreator. Com isso, há uma menor atividade de oxidação da água para produzir O₂ e o O₂ residual é utilizado pela respiração.

Já a biofotólise indireta é um processo muito eficiente para separar as fases de formação do H₂ e O₂ (As equações 2 e 3 são muito observadas em cianobactérias). O carboidrato armazenado é oxidado para a produção de H₂ (Benemann 2000). As reações gerais são as seguintes:



Em condição anaeróbia e na ausência de luz, a oxido-reductase ferredoxina piruvato (PFOR), responsável pela descarboxilação do piruvato (formação de CO₂) para acetyl-CoA, está ligada à produção de H₂ via produção da ferredoxina. Na presença de luz, a ferredoxina é reduzida pelo NADH produzido durante o catabolismo do piruvato pela desidrogenase piruvato (PDH). A cianobactéria fixadora de nitrogênio produz H₂ principalmente pela nitrogenase (fixando N₂ a NH₃) em vez de produzir via hidrogenase bidirecional. Entretanto, em várias cianobactérias não fixadoras de N₂, a obtenção de H₂ é também observada pela hidrogenase bidirecional (Dasgupta *et al.* 2010).

Em bactérias filamentosas, a nitrogenase é localizada nos heterocistos com um PSI funcional (sem atividade do PSII). Os elétrons são doados para o PSI no heterocisto vindo da reserva de carbono transportado da célula vegetativa vizinha. Entretanto, a produção de hidrogênio é energeticamente sobrecarregada devido à biossíntese e à manutenção dos heterocistos e da quantidade significativa de ATP requerida pela nitrogenase (Eqs. 4 e 5) (Dasgupta *et al.* 2010).



Bio-óleo

Comparado a outras tecnologias de conversão térmica (gaseificação, liquefação), a pirólise (conversão da biomassa em média a alta temperatura (350-700 °C), na ausência de ar) de biomassa de microalgas é bastante aplicada e tem alcançado resultados promissores e confiáveis que poderiam levá-la a uma exploração comercial. Dentre os produtos que podem ser obtidos da pirólise (gases, líquidos e sólidos), tem-se o bio-óleo (líquido de cor negra composto por diferentes produ-

tos químicos que podem ser aproveitados como combustível ou utilizados para outras finalidades), cujas características estão relacionadas ao tipo de microalga utilizada, ao tipo de cultivo em que estas foram submetidas (autotrófico ou heterotrófico) e condições de pirólise (taxa de aquecimento, tempo de residência dos gases no reator, temperatura, fluxo do gás de arraste, entre outros). Logo, dependendo das condições anteriormente citadas, o bio-óleo de microalgas pode possuir uma qualidade superior ao bio-óleo obtido de biomassas lignocelulósicas (Miao & Wu 2004, Miao et al. 2004, Wang et al. 2008, Grierson et al. 2009, Brennan & Owende 2010) (Tab. 2). Entretanto, existem desafios técnicos que precisam ser resolvidos para a utilização de bio-óleos como combustível, pois eles são altamente ácidos, instáveis, viscosos e contêm sólidos e água quimicamente dissolvida (Brennan & Owende 2010).

CONCLUSÃO

A biomassa de microalgas apresenta-se como uma alternativa às biomassas tradicionalmente utilizadas para a obtenção de biocombustíveis devido às suas características de crescimento rápido, por possuir uma composição bioquímica diversificada e com características semelhantes às das biomassas tradicionais e ao fato da forma de obtenção dos biocombustíveis a partir das microalgas ser semelhante aos processos utilizados tradicionalmente. A composição bioquímica das microalgas, dependendo da espécie, das condições ambientais e do sistema de cultivo utilizados pode chegar a um teor maior do que o encontrado nas biomassas tradicionais (maior teor de óleo do que a soja, por exemplo). No entanto, para que as microalgas possam ser efetivamente utilizadas para a produção de diversos combustíveis, o processo de obtenção das células das microalgas deve ser o mais produtivo e de baixo custo para que ocorra uma viabilidade, além de ambiental, também econômica. Isso pode ser feito através da integração do sistema de cultivo das microalgas e saneamento ambiental (tratamento de efluentes líquidos e gasosos), além da integração dos processos de obtenção de biocombustíveis para que toda a biomassa seja aproveitada. Logo, é necessária a realização de mais pesquisa para a modificação e aprimoramento de cada etapa do processo de cultivo de microalgas para, principalmente, diminuir os custos envolvidos e difundir o uso dessa biomassa.

REFERÊNCIAS

- BEER, L. L., BOYD, E. S., PETERS, J. W. & POSEWITZ, M. C. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 264-271.
- BENEMANN, J. R. 2000. Hydrogen production by microalgae. *Journal of applied Phycology*, 12: 291-300.
- BIODIESELBR. 2010. Gargalos do biodiesel preocupam BNDES. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/gargalos-biodiesel-preocupam-bndes.htm>>. Acesso em: 22/06/2010.
- BOROWITZKA, M. A. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 70: 313-321.
- BRENNAN, L. & OWENDE, P. 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 557-577.
- CHEN, C.Y., YEH, K.L., AISYAH, R., LEE, D.J. & CHANG, J.S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102: 71-81.
- CHINNASAMY, S., BHATNAGAR, A., HUNT, R.W. & DAS, K.C. 2010. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biodiesel applications. *Bioresource Technology*, 101: 3097-3105.
- CHIST, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.
- CHO, S., LUONG, T.T., LEE, D., OH, Y. & LEE, T. 2011. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biodiesel production. *Bioresource Technology*. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.037>>.
- CHRISTENSON, L. & SIMS, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29(6): 686-702. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>>.
- DASGUPTA, C.N., GILBERT, J.J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S.A., SKJANES, K. & DAS, D. 2010. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35: 10218-10238.
- DRAGONE, G., FERNANDES, B.D., ABREU, A.P., VICENTE, A.A. & TEIXEIRA, J.A. 2011. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, 88: 3331-3335.
- GRIERSON, S., STREZOV, V., ELLEM, G., MCGREGOR, R. & HERBERTSON, J. 2009. Thermal characterization of microalgae under slow pyrolysis conditions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 85: 118-123.
- GRIMA, E.M., BELARBI, E.-H., FERNÁNDEZ, F.G.A., MEDINA, A. R. & CHIST, Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20: 491-515.
- HARUN, R., DAVIDSON, M., DOYLE, M., GOPIRAJ, R., DANQUAH, M. & FORDE, G. 2011. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass & Bioenergy*, 35: 741-747.
- HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M. & DANQUAH, M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 1037-1047.
- HARUN, R., DANQUAH, M.K. & FORDE, G.M. 2009. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 85(2): 199-203. <<http://dx.doi.org/10.1002/jctb.2287>>.
- HIRANO, A., UEDA, R., HIRAYAMA, S. & OGUSHI, Y. 1997. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22: 137-142.
- HU, Q., SOMMERFELD, M., JARVIS, E., GUIRARDI, M., POSEWITZ, M., SEIBERT, M. & DARZINS, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54: 621-639.
- HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X. & CHEN, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 87: 38-46.
- JIANG, L., LUO, S., FAN, X., YANG, Z. & GUO, R. 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Applied Energy*, 88: 3336-3341.
- LI, Y., CHEN, Y., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J. & RUAN, R. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient re-

- moval and biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(8): 5138-5144 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>>.
- MATA, T.M., MARTINS, A.A. & CAETANO, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 217-232.
- MIAO, X. & WU, Q. 2004. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology*, 110: 85-93.
- MIAO, X. & WU, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*, 97: 841-846.
- MIAO, X., WU, Q. & YANG, C. 2004. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71: 855-863.
- MORAIS, M.G. & COSTA, J.A.V. 2008. Bioprocessos para a remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova*, 31(5): 1038-1042.
- MULBRY, W., KONDRAD, S., PIZARRO, C. & KEBEDE-WESTHEAD, E. 2008. Treatment of dairy manure effluente using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, 99: 8137-8142.
- NETO, S.A.R. 2011. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conjuntura mensal. Biodiesel. Período maio de 2011. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_06_07_08_34_00_conjuntura_biodiesel_mai_2011.pdf>. Acesso em: 18/07/2011.
- POWELL, E.E. & HILL, G.A. 2009. Economic assessment of an integrated bioethanol-biodiesel-microalgal fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. *Chemical Engineering Research and Design*, 87: 1340-1348.
- ŘEZANKA, T., DOR, I., PRELL, A. & DEMBITSKY, V.M. 2003. Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. *Folia microbiologica*, 48: 71-75.
- SINGH, A., NIGAM, P.S. & MURPHY, J.D. 2011. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology*, 102: 26-34.
- SINGH, J. & GU, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 2596-2610.
- SOUSA, M.P. 2007. *Organismos planctônicos de sistemas de lagoas de tratamento de esgotos sanitários como alimento natural na criação de Tilápia do Nilo*. 60 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- VENKATESAN, R., VASAGAM, K.P.K. & BALASUBRAMANIAN, T. 2006. Culture of marine microalgae in shrimp farm discharge water: a sustainable approach to reduce the cost production and recovery of nutrients. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 1(3): 262-269.
- VIJAYARAGHAVAN, K. & HEMANATHAN, K. 2009. Biodiesel production from freshwater algae. *Energy Fuels*, 23: 5448-5453.
- WANG, B., LI, Y., WU, N. & LAN, C.Q. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79: 707-718.
- XU, H., MIAO, X. & WU, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126: 499-507.
- ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J. & VERSTRAETE, W. 2011. *Bioresource Technology*, 102: 1149-1158.
- ZHUKOVA, N. & AIZDAICHER, N.A. 1995. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39(2): 351-356.