

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
UNIOESTE
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOENERGIA

SIDNEY DE OLIVEIRA NOVAES JUNIOR

**POTENCIAL DE APROVEITAMENTO DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris*
e *Scenedesmus subspicatus* COMO MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO
DE BIODIESEL**

CASCADEL – PR
AGOSTO/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
UNIOESTE
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOENERGIA

**POTENCIAL DE APROVEITAMENTO DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris*
e *Scenedesmus subspicatus* COMO MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO
DE BIODIESEL**

**Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do grau de
Mestre em Bioenergia, no
Programa de Pós
Graduação *strictu sensu*
da Universidade Estadual
do Oeste do Paraná –
UNIOESTE**

**Autor: Sidney de Oliveira Novaes Junior
Orientador: Samuel Nelson Melegari de
Souza
Coorientador: Nyamien Yahaut Sebastien**

Cascavel – PR

2013

Catálogo na Publicação elaborada pela Biblioteca Universitária
UNIOESTE/Campus de Toledo.

Bibliotecária: Marilene de Fátima Donadel - CRB – 9/924

N935p Novaes Junior, Sidney de Oliveira
Potencial de aproveitamento de microalgas *Chlorella vulgaris* e
Scenedesmus subspicatus como matéria-prima para obtenção de
biodiesel / Sidney de Oliveira Novaes Junior. -- Toledo, PR : [s. n.],
2013.
xiv ; 53 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Samuel Nelson Melegari de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien
Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual
do Oeste do Paraná. Campus de Toledo. Centro de Engenharias e
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação “Stricto sensu” em
Bioenergia, 2012.
Inclui Bibliografia

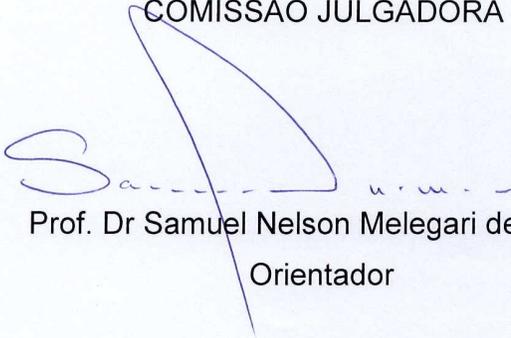
1. Bioenergia – Dissertações 2. Biodiesel de microalgas 3.
Biocombustível 4. Biotecnologia 5. Energia de biomassa 6.
Microalga - Cultura e meios de cultura 7. *Chlorella vulgaris* 8.
Scenedesmus subspicatus 9. Lipídios I. Souza, Samuel Nelson
Melegari de, Orient. II. Sebastien, Nyamien Yahaut, Orient. III. T

CDD 20. ed. 662.88

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Sidney de Oliveira Novaes Junior a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 09 de agosto de 2013

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr Samuel Nelson Melegari de Souza
Orientador



Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti
Membro



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Membro

DEDICATÓRIA

Ofereço este trabalho, primeiramente:

A Deus, por ter-me dado forças, saúde e sabedoria
para completar esse trabalho.

A meus pais, Sidney e Conceição (*in memoriam*),
pelos esforços empregados na minha educação
e por terem me dado as condições necessárias para chegar aqui.

À Silvia, Gustavo e Guilherme, por entenderem minha ausência
durante as aulas e os períodos de pesquisa.

Aos meus orientadores Samuel e Sebastien,
pelas valiosas instruções para a construção desta obra.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho dessa magnitude e dessa complexidade exige o auxílio de vários profissionais de diversas áreas. Talvez não inclua algum, por puro descuido, mas preciso mencionar a maioria dos amigos e das amigas que fizeram parte dessa jornada.

Preciso começar com aquele que foi o primeiro a me incentivar a fazer um curso de Mestrado, Professor Joaquim Jorge Silveira Buchaim. Além de um grande biólogo, é um grande incentivador das pesquisas em todos os seguimentos científicos. Sempre tive em mente seus conselhos: “Você precisa fazer um Mestrado”. Graças ao seu oportuno entusiasmo e incentivo, fui atrás desse sonho.

Aos meus orientadores Samuel Nelson Melegari de Souza e Nyamien Yahaut Sebastien pelas valiosas e precisas informações na construção desse trabalho.

À Professora Flavia do Nascimento Figueiredo, igualmente bióloga, que me apresentou às questões ambientais. Meu foco era outro e sua intervenção me fez mudar de rumo, e abracei a causa ambiental com muita satisfação e orgulho. Precisei conhecer novos conceitos, mas foi extremamente gratificante ver como o ambiente precisa de nosso empenho para reparar os danos que causamos.

Não há como deixar de mencionar a fantástica ajuda dos funcionários da SANEPAR de Foz do Iguaçu/PR Victor Carlos Martinez, Luiz Carlos Medeiros, e Marcos Antônio Valero e Rodrigo Becker. Franquearam-me a entrada na Estação de Tratamento de Efluentes do bairro Ouro Verde, em Foz do Iguaçu, com muito boa vontade. Sem eles, este trabalho se tornaria inviável, pois não teria acesso aos efluentes humanos para embasar parte dos experimentos.

Outra importantíssima ajuda veio dos proprietários da Granja São Pedro (Colombari), localizada no município de São Miguel do Iguaçu/PR. José Carlos e seu filho Pedro foram de uma grandíssima benevolência ao me fornecerem o material fundamental para a outra parte dos experimentos: os efluentes dos suínos criados em sua propriedade. Sempre se mostraram extremamente simpáticos e generosos em todas as minhas solicitações.

Impossível deixar de mencionar os funcionários dos laboratórios da Faculdade UDC-Anglo, de Foz do Iguaçu. Daniela Gomes de Carvalho, Michelle Geanne de Moraes, Vera Gayer Rosseti, Marlei Hoff, Maria Teresa Silva Albeton, Nelciro Kleinschmitt, Juliana Santana da Silva e Manuela Schuchowsky merecem um destaque carinhoso pela paciência com que suportaram os odores dos efluentes na hora da autoclavagem, além da montagem das estruturas e limpeza dos materiais utilizados. Meu muitíssimo obrigado a todos.

Providencial foi a ajuda de duas professoras da UDC-Anglo, Priscila Ferri Coldebella e Karina Novak Leite. A primeira, engenheira química, me forneceu os conhecimentos necessários para o entendimento da parte química dos procedimentos laboratoriais, pois, reconhecidamente, não é o meu forte. Especialmente a parte de extração por meio de ultrassom, componente indispensável do processo de obtenção de matéria prima para o biodiesel. Já a segunda, orientou-me nos cálculos dos microrganismos utilizados nos experimentos. Como já mencionei, minha área preferencial era outra e mudei radicalmente meu foco. Indispensável o auxílio dessas duas profissionais incrivelmente competentes.

Inestimável também foi a participação de três alunos durante as fases deste trabalho. Andréia Souza de Oliveira, Tatiane Nascimento Alves de Oliveira e Gustavo Gil Novaes, meu filho, o que muito me orgulhou. A participação de todos foi de muita relevância, especialmente durante as coletas, cultivo e filtração das amostras.

Meu muito obrigado aos colegas Alexandre Moreira Zsigmond, Francisco Antenor Júnior da Rocha e Júlio César Vieira Pereira que, ao me substituírem nos plantões, possibilitaram meu comparecimento às aulas das disciplinas obrigatórias.

Por fim, Douglas Rafael Aguiar, o “Buzz Lightyear” e Elias Trevisan. Companheiros de Mestrado, realizaram uma das mais importantes partes dos experimentos laboratoriais, a cromatografia dos óleos extraídos das microalgas. Com base nesse trabalho, pude conhecer e descrever a composição dos óleos e a importância para a composição do biodiesel, objeto deste trabalho. Providencial e fundamental as suas participações.

A todos esses, meu muitíssimo obrigado e que Deus continue abençoando-os, lhes dando muita saúde e prosperidade.

SENHOR!

Fazei de mim um instrumento de Vossa Paz!
Onde houver ódio, fazei que eu leve o amor,
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,
Onde houver discórdia, que eu leve a união,
Onde houver dúvida, que eu leve a fé,
Onde houver erros, que eu leve a verdade,
Onde houver desespero, que eu leve a esperança,
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,
Onde houver trevas, que eu leve a luz!
Ó MESTRE! Fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado,
Compreender, que ser compreendido.
Amar, que ser amado...

Pois:

É dando que se recebe,
É perdoando que se é perdoado
E é morrendo que se vive para VIDA ETERNA.

(prece de São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	5
2.1 – OBJETIVO GERAL	5
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
3 – REVISÃO DA LITERATURA	6
3.1 – ENERGIA DA BIOMASSA	6
3.2 – BIOCOMBUSTÍVEIS	6
3.2.1 Matéria-prima dos biocombustíveis	7
3.2.1.1 Etanol	7
3.2.1.2 Biodiesel	7
3.2.1.3 Composição química do biodiesel	7
3.2.1.4 Padrões de qualidade do biodiesel	9
3.3 – BIOMASSA COMO FONTE DE COMBUSTÍVEL	11
3.4 – ECOCOMPATIBILIDADE DO BODIESEL À BASE DE MICROALGAS	11
3.5 – IMPORTÂNCIA DAS MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	12
3.5.1 Potencialidade das microalgas para a produção de biodiesel	13
3.5.2 Métodos de extração de lipídios das microalgas	13
3.6 – MÉTODOS (ROTAS) DE OBTENÇÃO DO BODIESEL	14
3.6.1 Transesterificação	14
3.6.2 Esterificação	15
3.6.3 Esterificação	16
3.7 – NUTRIENTES DAS MICROALGAS	17
3.7.1 Concentrações ideais de nitrogênio e fósforo para o cultivo de microalgas	18
3.7.2 Fatores que interferem no crescimento das microalgas	18
3.7.3 Substratos utilizados para a cultivo das microalgas	19
3.7.4 Aplicação do agrostemin®	19
3.8 – MICROALGAS UTILIZADAS COMO MATÉRIAS-PRIMAS	20

3.8.1 <i>Scenedesmus subspicatus</i> – Características	21
3.8.2 – <i>Chlorella vulgaris</i> – Características	21
3.9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 – SISTEMAS DE CULTIVO	23
4.1.1 – Cultivo com agrostemin®	24
4.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES PARA O CULTIVO DAS MICROALGAS	25
4.3 – POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA	25
4.3.1 – Local do ensaio de avaliação do potencial	25
4.3.2 – Cultivo das microalgas	26
4.3.2.1 – Determinação da curva de crescimento e melhor diluição	26
4.3.2.2 – Cultivo para extração dos óleos	27
4.4 – QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS DA BIOMASSA DAS MICROALGAS	28
4.4.1 – Extração de óleos	28
4.5 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS	29
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 – CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES DE HUMANOS E DE SUÍNOS	30
5.2 – CURVA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS E ESTUDO DAS DILUIÇÕES	31
5.3 – ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ÓLEOS	34
5.3.1 – Análise qualitativa da produção de óleos	35
5.3.2 – Análise quantitativa da produção de óleos	40
6 – CONCLUSÕES	44
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de transesterificação	15
Figura 2 – Processo de esterificação	16
Figura 3 – Processo de hidroesterificação	16
Figura 4 – Células de microalgas <i>Scenedesmus subspicatus</i> observadas ao microscópio ótico com aumento de 400 x	23
Figura 5 – Células de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> observadas ao microscópio ótico com aumento de 400 x	23
Figura 6 – Coleta de efluentes humanos na ETE III da SANEPAR	24
Figura 7 – Coleta de efluentes de suínos na Granja Colombari	24
Figura 8 – Estante com cultivos. Os erlenmeyers com soluções mais claras são efluentes de humanos; os mais escuros, efluentes de suínos	26
Figura 9 – Amostras após 60 dias de cultivo	28
Figura 10 – Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> em efluentes humanos	32
Figura 11 – Cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> em efluentes suínos	32
Figura 12 – Cultura de <i>Scenedesmus subspicatus</i> em efluentes humanos ...	33
Figura 13 – Cultura de <i>Scenedesmus subspicatus</i> em efluentes suínos	33
Figura 14 – Perfil cromatográfico do padrão analítico de ácidos graxos	36
Figura 15 – Perfil cromatográfico de <i>Chlorella</i> em efluentes humanos	37
Figura 16 – Perfil cromatográfico de <i>Chlorella</i> em efluentes suínos	38
Figura 17 – Perfil cromatográfico de <i>Scenedesmus</i> em efluentes humanos ...	39
Figura 18 – Perfil cromatográfico de <i>Scenedesmus</i> em efluentes suínos	40

1. INTRODUÇÃO

Durante o século passado, os combustíveis fósseis estiveram em evidência no cenário energético mundial, respondendo, naquela época e ainda hoje, por cerca de 60% do consumo de energia do planeta (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Os combustíveis fósseis são os maiores responsáveis por emissões de gases de efeito estufa (GEE), que aumentam consideravelmente as temperaturas globais, ocasionando reações violentas por parte do planeta Terra. Por conta disso, alternativas ditas ecológicas estão sendo estudadas e viabilizadas com vários intuitos, mas especificamente, o de mitigar os efeitos relacionados às emissões de GEE (DEDÊ, 2010, BORGES, 2005 e ALEJANDRA, Palomino M.; CESAR Estrada F.; JORGE, Lopez G., 2010).

Em função disto e também tentando equacionar as questões sociais, além de melhorar o desempenho da balança comercial brasileira, o governo federal fomenta oficialmente a pesquisa de formas alternativas de obtenção de energia para substituir os combustíveis fósseis (NASCIMENTO Iracema Andrada *et al.*, 2009 e PAULILLO, Luis Cesar Maffei Sartini; JATOBÁ, Fabiano Henrique Peixinho; CECHINEL, Cleber André, 2009). Uma delas é o estudo dos biocombustíveis. Sua obtenção atende a inúmeras exigências atuais do estilo “ecologicamente correto”. Isso significa que

“todo o processo produtivo deverá ser limpo e apropriado, com uso de matéria-prima natural renovável ou não (mas reaproveitável), sintética reaproveitada e/ou reciclada, com insumos ecológicos, com baixo consumo energético para sua fabricação, com menor carga residual sobre o meio ambiente, com possibilidade máxima de recuperação ou reciclagem” (Verde Vida).

As fontes para esse tipo de combustível são inúmeras, dentre elas os óleos vegetais, a gordura animal e o reuso do óleo usado em frituras (PEREIRA *et al.*, 2012). Dentre as oleaginosas mais utilizadas para obtenção desses óleos estão a soja, o dendê, o algodão, o amendoim e o milho, que apresentam potencial para fornecer a quantidade necessária para suplementar em 5% a mistura de biodiesel. En-

tretanto, essas oleaginosas sofrem restrições de natureza econômica por se tratarem de *commodities* (TEIXEIRA, Claudia Maria; MORALES Maria Elizabeth, 2006).

Como alternativas a essas oleaginosas encontram-se as microalgas, seres unicelulares, com estrutura e organização simples e primitiva, que podem ser encontrados solitários ou em colônias, autotróficos e fotossintetizantes. Seus maiores representantes são as diatomáceas e os dinoflagelados (RICHMOND, Amos; CHENG-WU, Zhang; ZARMI, Yair, 2003 e PÉREZ, 2007).

As algas apresentam um potencial adequado para esse tipo de exploração, pois contam com características interessantes: custos baixos para a colheita e transporte; menor gasto de água, se comparado ao cultivo de plantas; as condições para seu cultivo não precisam ser necessariamente iguais às de culturas convencionais; podem ser cultivadas em meio salino, doce ou salobro; são excelentes fixadores de CO₂. Além disso, as terras utilizadas podem ser desérticas e com alto índice de irradiação solar, podendo ser utilizados resíduos de outras produções, como o CO₂ de processos industriais e resíduos orgânicos (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O rendimento em óleo é cerca de quinze vezes maior que o de palma, que é a oleaginosa de maior produtividade. A extração pode ser feita por esmagamento ou ultrassom (NASCIMENTO *et al.*, 2009), usando solvente, de forma fluida supercrítica, enzimática, por choque osmótico e extração ultrassônica assistida (AFIFY, Abd El-Moneim M. R.; SHALABY, Emad A.; SHANAB, Sanaa M. M., 2010 e NASCIMENTO *et al.*, 2009). São usados ainda o benzeno, éter ou hexano, além de enzimas, tornando o fracionamento de óleo mais fácil (PEREIRA *et al.*, 2012).

Sua ecocompatibilidade é altamente eficiente, pois atende ao interesse principal que é a substituição gradual do diesel usado na maioria dos transportes de carga. Podem gerar etanol e biodiesel na mesma produção, e ainda gerar biomassa a ser utilizada em rações para animais, além de adubo fertilizante para a agricultura. Os dois biocombustíveis gerados são menos agressivos ao ambiente que os de combustíveis fósseis (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Estudos promovidos pelo National Renewable Energy Laboratory – NREL (Laboratório Nacional de Energia Renovável), órgão estadunidense que gerencia um projeto de produção de biodiesel a partir de microalgas, contêm espécies de microalgas que produzem lipídios em grandes quantidades, com rápido crescimento, mas não necessariamente na mesma fase de crescimento ou de uma forma controlável.

(BROWN, 1993). A Itaipu Binacional, conforme Simone Frederigi Benassi, da Divisão de Reservatórios (MARR.CD), informou que em recente levantamento foram catalogadas mais de cento e cinquenta espécies de microalgas no Lago de Itaipu (MACIEL, 2010). Estudos posteriores podem avaliar o potencial de produção de lipídios por parte desses microrganismos para fins de produção de biodiesel.

Diversos trabalhos apontam várias algas com potencial lipídico satisfatório para obtenção de biodiesel. São citadas várias espécies, tais como: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Spirulina platensis*, além de *Botryococcus braunii*, *Nitzschia* sp., dentre outras. (ARAÚJO *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2009; BECKER, 2006; WALKER *et al.*, 2005). Os percentuais encontrados nessas microalgas podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentual de lipídios em microalgas

Microalga	Percentual de lipídios
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 – 75,0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 – 71,0
<i>Nitzschia sp</i>	16,0 – 47,0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0 – 55,0
<i>Spirulina platensis</i>	4,0 – 16,0

FORTE: PEREIRA *et al.* (2012).

Em síntese, o estudo de organismos como microalgas deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, na saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse da indústria alimentar, química e farmacêutica, dentre outras (PÉREZ, 2007).

Este trabalho foi distribuído em seis capítulos, estruturados e sumarizados da seguinte forma:

- O Capítulo 1 apresenta a motivação para a elaboração deste trabalho, explanando a importância do uso de microalgas como matéria-prima para obtenção de biodiesel;
- O Capítulo 2 traz os objetivos do presente trabalho, o Geral e os Específicos;
- O Capítulo 3 tem como conteúdo uma revisão da literatura a respeito dos biocombustíveis, especialmente o biodiesel, sua composição química, importância da biomassa como fonte de combustível, a ecocompatibilidade das microalgas, as espécies utilizadas nos experimentos, suas formas de cultivo e os nutrientes usados, bem como a forma de extração dos lipídios produzidos pelas microalgas;
- O Capítulo 4 descreve a metodologia utilizada neste trabalho para o cultivo das microalgas objetivando seu crescimento para posterior extração dos óleos, com a consequente análise do perfil dos ácidos graxos neles presentes por meio da cromatografia gasosa;
- O Capítulo 5 apresenta a discussão dos resultados obtidos através de análises qualitativa e quantitativa dos óleos; e
- O Capítulo 6 aborda as conclusões obtidas, com base nos resultados anteriormente descritos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a produção de biomassa de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* para extração de óleo vegetal em sistema fechado utilizando efluentes de humanos e de suínos.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1 – Realizar a caracterização físico-química dos efluentes de humanos e de suínos para que sirvam de substratos para o cultivo de microalgas;
- 2 – Determinar o potencial de produção de biomassa de algas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus*;
- 3 – Quantificar o teor de lipídios na biomassa das microalgas;
- 4 – Estabelecer o melhor meio para o cultivo de ambas as algas, tendo como parâmetros as concentrações de Nitrogênio e Fósforo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENERGIA DA BIOMASSA

Estudos recentes de avaliação de consumo energético relatam que os combustíveis fósseis representam 88% do consumo de energia primária, enquanto que a energia nuclear e a hidroeletricidade representam 5% e 6% do consumo total de energia primária, respectivamente. Infelizmente, a ameaça potencial das mudanças climáticas tem aumentado, e por uma maior parte, são atribuídas às emissões de gases de efeito estufa pelo uso dos combustíveis fósseis (ALEJANDRA, Palomino M.; CESAR Estrada F.; JORGE, Lopez G., 2010).

A conceituação de biomassa pode ser aplicada sob dois enfoques. Sob o ponto de vista da geração de energia, entende-se como sendo tudo o que é derivado recente de organismos vivos e que pode ser utilizado como combustível ou sua produção. Já o enfoque biológico, é toda a quantidade de matéria viva de um ecossistema ou em populações animais e vegetais (USINA ECOELÉTRICA).

O uso da biomassa residual apresenta-se como alternativa viável, renovável e muito pouco impactante do ponto de vista ambiental. Trata-se de “matéria orgânica não fóssil, de origem animal ou vegetal, utilizada na produção de calor, para uso térmico industrial, geração de eletricidade e/ou transformada em outras formas de energias sólidas, líquidas e gasosas” (BRASIL.COM.BR). Seu aproveitamento pode gerar uma receita anual de mais de 670 milhões de euros (BLEY JR. *et al.*, 2009).

3.2 BIOCOMBUSTÍVEIS

Biocombustíveis podem ser definidos como “combustíveis produzidos a partir da biomassa (matéria orgânica), isto é, de fontes renováveis – produtos vegetais ou compostos de origem animal” (BIODIESELBR.COM). Os tipos de biocombustíveis produzidos no Brasil são o etanol extraído da cana de açúcar e o biodiesel produzido a partir de óleos vegetais ou gordura animal (ANP, 2005).

Os ésteres de derivados de óleos e gorduras a partir de fontes biológicas renováveis são definidos como biodiesel (CLEMENTES, 1992). Normalmente, os óleos de microalgas, gorduras animais e de oleaginosas são quimicamente muito semelhantes, se não idênticas.

3.2.1 Matéria-prima dos biocombustíveis

3.2.1.1 – Etanol

O etanol de primeira geração pode ser obtido a partir de várias fontes – conforme a região produtora – tais como: milho (EUA), cana de açúcar (Brasil), beterraba (Alemanha), sorgo (África) e trigo (Europa). Conforme MACEDO (2007), O Brasil é o maior produtor de etanol, sendo responsável por 36,4% da produção mundial, sendo este combustível responsável por cerca de 40% dos combustíveis para motores leves (LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis L. V., 2007). Atualmente, investe-se no etanol de segunda geração, feito a partir da celulose originária dos vegetais.

3.2.1.2 - Biodiesel

O biodiesel é resultado de uma mistura de alquilésteres de cadeia linear, obtida através da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com alcoóis de cadeia curta, tendo como coproduto o glicerol (LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sergio Luis Costa, 2009). A matéria-prima deriva de óleos vegetais “puros” ou já utilizados, gorduras animais e microalgas (PAULILLO, Luis Cesar Maffei Sartini; JATOBÁ, Fabiano Henrique Peixinho; CECHINEL, Cleber André, 2010). Para a transesterificação desses óleos os alcoóis mais utilizados como solventes são o etanol e o metanol.

O metanol é o mais utilizado por ser mais reativo, implicando em menor temperatura e tempo de reação. Já o etanol é menos tóxico, renovável e produz biodiesel com mais cetonas e lubricidade. Entretanto, promove maior dispersão da glicerina, tornando difícil sua separação (LÔBO *et al.*, 2009).

VIÊGAS (2010), utilizando o método de Bligh & Dyer (1959), conseguiu extrair em média 17% de lipídios de *Chlorella pyrenoidosa* usando metanol e 7,8% tendo o etanol como solvente. DANTAS *et al.* (2010) encontraram quantidades menores em experimentos com a mesma microalga: 5,79% com metanol e 4,64% com etanol, em média.

3.2.1.3 Composição química do biodiesel

De acordo com OLIVEIRA, Flavia C. da C.; SUAREZ, Paulo A. Z.; SANTOS, Wildson Luiz Pereira (2007), o biodiesel possui composição química é bem diferente da do diesel mineral. Enquanto este é constituído por hidrocarbonetos com baixas concentrações de átomos de enxofre, oxigênio e nitrogênio, aquele é uma mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados. Além disso, outra diferença está na forma de obtenção de ambos. O diesel é resultado do refino do petróleo por destilação fracionada, com temperaturas entre 105°C 400°C, com até 28 átomos de carbono; já o biodiesel é proveniente da transesterificação ou esterificação de óleos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em relação aos óleos vegetais, estes possuem constituição a base de triglicérides (ou triacilgliceróis ou triacilglicerídios), que são ésteres provenientes de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos) e glicerol (RINALDI *et al.*, 2007). Os ácidos graxos apresentam número de carbonos que constituem sua cadeia, além da presença de insaturações (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Os mais comuns apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono, mas outros com maior ou menor número de carbonos podem ser encontrados em vários óleos e gorduras (RINALDI *et al.*, 2007).

A Tabela 2 apresenta a distribuição dos ácidos graxos em alguns óleos e gorduras de origem vegetal.

Tabela 2 – Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos e gorduras

Óleo ou Gordura	Composição em ácidos graxos (% em massa)						
	Láurico C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Mirístico C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Palmítico C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Estearico C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Oleico C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Linoleico C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Linolênico C ₁₈ H ₂₈ O ₂
Algodão	–	1,5	22	5	19	50	–
Amendoim	–	0,5	6,0 – 11,4	3,0 – 6,0	42,3 – 61	13 – 33,5	–
Babaçu	44 – 45	15 – 16,5	5,8 – 8,5	2,5 – 5,5	12 – 16	1,4 – 2,8	–
Coco	44 – 5	13 – 18,5	7,5 – 11	1 – 3	5 – 8,2	1,0 – 2,6	–
Dendê	–	0,6 – 2,4	32 – 45	4,0 – 6,3	38 – 53	6 – 12	–
Girassol	–	–	3,6 – 6,5	1,3 -	14 – 43	44 – 68	–
Linhaça	–	–	6	4	13 – 37	5 – 23	26 – 58
Milho	–	–	7	3	43	39	–
Oliva	–	1,3	7 – 16	1,4 – 3,3	64 – 84	4 – 15	–
Soja	–	–	2,3 – 11	2,4 – 6	23,5 – 31	49 – 51,5	2 – 10,5
Sebo	–	3 – 6	25 – 37	14 – 29	26 – 50	1 – 2,5	–

FONTE: RINALDI *et al.*(2007)

3.2.1.4 – Padrões de qualidade do biodiesel

Em se tratando de normas de padrão de qualidade para biodiesel, as aplicadas pela americana ASTM (American Society of Testing and Materials) de número D6751e pela europeia CEN (Comité Européen de Normalisation) a EN 14214, são as mais usadas como referências para outras padronizações, inclusive a brasileira (LÔBO *et al.*, 2009).

No Brasil, a obrigatoriedade da adição do biodiesel no diesel mineral foi determinada pela Lei 11.097, de 13 de janeiro de 2005, que ampliou a competência da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), que assumiu a atribuição de especificar e fiscalizar a qualidade dos biocombustíveis (ANP, 2005). Tal legislação estabeleceu que o percentual da mistura fosse de 2% (B2) de biodiesel a partir de janeiro de 2008 e que, a partir de 1º de janeiro de 2010, passou a ser de 5% (B5), obrigatoriamente (ANP, 2005).

A Resolução 07/2008 estabeleceu os critérios de avaliação do biodiesel mineral brasileiro, tendo como parâmetro as especificações da ASTM e da CEN. Convém ressaltar que em 31 de dezembro de 2007, os EUA, a União Europeia e o Brasil se reuniram em uma força-tarefa a fim de estabelecer padrões de qualidade em nível internacional para biocombustíveis. LÔBO *et al.* (2009) apresentaram uma tabela com as especificações do biodiesel, com as comparações entre os 3 principais centros de produção – Brasil, União Europeia e EUA (Tabela 3).

Padrões de qualidade do biodiesel:

Tabela 3 - Padrões de qualidade do biodiesel

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	Brasil ANP 07/2008	UE EN 4214	EUA ASTM D6751
Aspecto	---	---	---	---
Massa específica *	Kg.m ⁻³	850-900 a 20 °C	860-900 a 15 °C	---
Viscosidade cinemática a 40 °C *	mm ² /s	3,0-6,0	3,5-5,0	1,9-6,0
Água e sedimentos, máx. *	% volume	---	---	0,05
Ponto de fulgor, mín. *	°C	100	120	130
Destilação; 90% vol. recuperados, máx. *	°C	---	---	360
Resíduo de carbono dos, máx. *	% (m/m)	Em 100% da amostra 0,050	10% resi- dual da destilação 0,3	Em 100% da amostra 0,05
Cinzas sulfatadas, máx. *	% (m/m)	0,020	0,02	---
Enxofre total, máx. *	mg/kg	50	10	15
Corrosividade ao cobre, 3 h a 50 °C, máx. *	-	1	1	3
Número de cetanos *	-	Anotar	51 (mín.)	47 (mín.)
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx. *	°C	19	Por região	---
Ponto de fluidez (<i>pour point</i> - PP) *	°C	---	Por região	---
Ponto de nuvem (<i>cloud point</i> - CP) *	°C	---	----	Registrar
Sódio + Potássio, máx.	mg/kg	5	5	---
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/kg	5	5	---
Fósforo, máx.	mg/kg	10	10	10
Contaminação total, máx.	mg/kg	24	24	---
Teor de éster, min.	% (m/m)	96,5	96,5	---
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	0,5	0,5
Glicerina livre, máx.	% (m/m)	0,02	0,02	0,02
Glicerina total, máx.	% (m/m)	0,25	0,25	0,24
Monoglicerídeos	% (m/m)	Anotar	0,8 (máx)	---
Diglicerídeos	% (m/m)	Anotar	0,2 (máx)	---
Triglicerídeos	% (m/m)	Anotar	0,2 (máx)	---
Metanol ou Etanol, máx.	% (m/m)	0,20	0,20	---
Índice de iodo	g I ₂ /100 g	Anotar	120 (máx)	---
Estabilidade à oxidação a 110 °C, mín.	h	6	6	---
Água, máx.	mg.kg ⁻¹	500	500	500
Ácido linolênico	% (m/m)	---	12 max	---
Metil ésteres com mais que 4 insatura- ções	% (m/m)	---	1 max	---

* Parâmetros típicos da normatização do diesel mineral

FONTE: LÔBO *et al.* (2009)

Ainda de acordo com LÔBO *et al.* (2009), as variações das estruturas moleculares dos ésteres que compõem o biodiesel podem fazer com que sua qualidade seja afetada, em razão da presença de contaminantes oriundos da matéria prima, do processo de produção ou da estocagem do produto. O que pode motivar essas alterações é o fato de que as estruturas moleculares possam sofrer variações em sua quantidade, o tamanho de sua cadeia carbônica, a presença de agrupamentos na cadeia ou a posição das insaturações (LÔBO *et al.*, 2009).

3.3 BIOMASSA COMO FONTE DE COMBUSTÍVEL

Nos últimos anos, o uso de biocombustíveis líquidos no setor dos transportes tem mostrado rápido crescimento global, impulsionado principalmente por políticas que visam alcançar a segurança energética e mitigação das emissões de gases de efeito estufa (ALEJANDRA, Palomino M.; CESAR Estrada F.; JORGE, Lopez G., 2010). O biodiesel aparece como excelente alternativa para suprir essa demanda.

O biodiesel produz menos poluentes que o diesel de petróleo e é virtualmente livre de enxofre (BROWN, 1993). Este combustível é ordinariamente derivado a partir de sementes oleaginosas, mas há um produto idêntico de biodiesel que pode ser conseguido a partir de microalgas (BROWN, 1993). Esta tecnologia é complementar para os esforços em curso a fim de aumentar a biomassa lignocelulósica em áreas com solos férteis e recursos hídricos, por que as microalgas são projetados para serem cultivadas em áreas onde oleaginosas ou lignocelulósicos não têm bom crescimento (BROWN, 1993). No entanto, o biodiesel pode ser feito de oleaginosas disponíveis rapidamente, ajudando a resolver problemas locais de poluição do ar sobre o curto prazo e estabelecer um nicho de mercado no início de biodiesel. O biodiesel de microalgas viria mais tarde, após uma linha de maior desenvolvimento tecnológico para atender a uma demanda multiquadro para diesel (BROWN, 1993).

3.4 ECOCOMPATIBILIDADE DO BODIESEL À BASE DE MICROALGAS

A importância dessa alternativa está sintetizada no fato de que as oleaginosas necessitam de imensas áreas de cultivo, não lhes garantindo uma ecocompatibilidade adequada. Para grandes extensões de terra agricultáveis, é necessária a der-

rubada de muitas árvores, diminuindo a cobertura vegetal e trazendo prejuízos ao solo (pelo uso de herbicidas) e no sequestro de CO₂. Isso, sem mencionar o prejuízo à biodiversidade, com a quebra dos ecossistemas presentes na área afetada.

A opção pelo cultivo de microalgas está fundamentada em inúmeros fatores (NASCIMENTO *et al.*, 2009): 1) seu cultivo não depende de extensas áreas, podendo ser realizado em tanques abertos (no solo, também chamados *raceways*) ou fechados (em vidro ou fibra); 2) a produção de biodiesel está atrelada à necessidade de importação do diesel. Embora o custo do biodiesel ainda seja alto, sua ecoeficiência, através da mistura com o diesel fóssil, é bastante aceitável, visto que polui muito menos; 3) trata-se de uma fonte inesgotável, pois a nutrição das microalgas é à base de CO₂, sequestrando-o do meio e servindo de elemento para a fotossíntese, transformando-o em biomassa (SCRAGG *et al.*, 2002). Além disso, podem ajudar na degradação de dejetos residenciais e/ou industriais; 4) a imensa quantidade de incidência solar na Região Oeste do Paraná faz com que haja fonte inesgotável de energia luminosa para a fotossíntese desses microrganismos; 5) quanto maior a fonte de CO₂, maior é a produção de biomassa. O teor de triglicerídeos, fonte do biodiesel, depende da quantidade de CO₂ (MORITA, M; WATANABE, Y. SAIKI, H., 2001); 6) da parede celular das microalgas, pode-se extrair o etanol, em processo diferenciado; 7) em todas as regiões brasileiras, pode servir para contratação de qualquer tipo de mão de obra, sem necessidade de especialização, atendendo à demanda social por oportunidades de emprego (na fase de colheita, pois na produção torna-se necessária, obviamente, a contratação de pessoal qualificado).

3.5 IMPORTÂNCIA DAS MICROALGAS PARA A PRODUÇÃO DE BODIESEL

PÉREZ (2007), BECKER (2006), TEIXEIRA, Claudia Maria; MORALES, Maria Elizabeth (2006) e ESTRADA, Cesar A.; NOGUERA, Yanaika C.; LOPEZ, Jorge E. (2010), dentre outros, apresentam os resultados obtidos em relação aos componentes de algumas microalgas, tais como a composição proteica, lipídica e de carboidratos. A utilização de microalgas atende a inúmeros interesses, de ordem ecológica, farmacêutica, alimentícia e da indústria de cosméticos. A produção de biodiesel tem seu significado representado na fixação de CO₂, na redução das áreas de cultivo, na produção de biomassa que sirva de fertilizantes ou de alimento para criadouros de peixes, bovinos, suínos e aves. O processo de fotossíntese tem sua importância

aumentada, na medida em que se torna responsável pelo sequestro de dióxido de carbono da atmosfera. Quanto maior a quantidade de CO₂ fixada, maior a produção de triglicerídeos, base do óleo que gerará o biodiesel. Pelo simples fato de não fazerem parte do grupo das *commodities*, já traz às microalgas uma vantagem nada desprezível para a produção de biodiesel (BIODIESELBR, 2008).

3.5.1 Potencialidade das microalgas para a produção de biodiesel

Dentre os critérios para seleção de matérias-primas que possam ser utilizadas para a produção de biodiesel estão: grande teor de óleo por área e por período de cultivo, balanço energético favorável, preços da matéria-prima compatível com a produção de biodiesel, reaproveitamento do subproduto da extração do óleo como suplemento nutricional para humanos e animais, o biodiesel produzido deve atender às especificações dos motores (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O conteúdo lipídico da biomassa algal pode variar entre 1% e 40% do peso seco e, dependendo das condições de cultivo, alcançar até 85% (BECKER, 2004 *apud* DERNER *et al.* 2006). Embora não exista uma espécie que atenda a todas as condições exigidas, DANTAS *et al.* (2010) apontam *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella* como espécies com grande potencial para produção em larga escala, visando a extração de óleo para produção de biodiesel.

3.5.2 Métodos de extração de lipídios das microalgas

A eficiência do método de extração constitui fator importante no processo econômico para a produção de óleos a partir de microalgas (DANTAS *et al.*, 2010). Vários são os métodos de extração de lipídios, que pode ser feita de duas formas: a) química, com a utilização de solventes orgânicos – água, etanol, éter e metanol (DANTAS, 2010); b) mecânica, por meio de prensagem, ultrassom, floculação, centrifugação e filtração (DERNER *et al.*, 2006 e ARAUJO *et al.*, 2012).

A extração por prensagem alcança até 75% do óleo das algas (ARAUJO *et al.* 2012). Esse método juntamente com solventes pode chegar a 95% do óleo das algas (Kowalski, 2010, *apud* ARAUJO *et al.*, 2012). Silva *et al.*, 2007 *apud* ARAUJO *et al.* (2012) mencionam que a utilização de fluidos supercríticos remove mais de 90% do óleo das algas. Mata *et al.*, 2009 *apud* ARAUJO *et al.* (2012) informam que a aplicação de ultrassom, juntamente com fluidos supercríticos, reduzem o volume de

solvente e o tempo de extração, tornando-se o método com maior eficiência e menor impacto ambiental.

3.6 MÉTODOS (ROTAS) DE OBTENÇÃO DO BIODIESEL

Os óleos vegetais apresentam alta viscosidade em sua forma *in natura*, ocasionando problemas operacionais para ser usado como biodiesel, como:

“(a) ocorrência de gomas durante a estocagem dos óleos e diminuição da eficiência de lubrificação, devido às reações de oxidação e polimerização dos mesmos (principalmente no caso de óleos insaturados); (b) obstrução dos filtros de óleo e bicos injetores; (c) diluição parcial do combustível no lubrificante; (d) comprometimento da durabilidade do motor e aumento em seus custos de manutenção; e (e) produção de acroleína durante a combustão, uma substância altamente tóxica e cancerígena, formada pela decomposição térmica do glicerol” (RAMOS *et al.*, 2003 e FELIZARDO, P. M. G., 2003 *apud* RAMOS *et al.*, 2011).

Dessa forma, torna-se necessária a realização de um procedimento para eliminar esses resíduos para que se torne possível a produção de biodiesel. Três são os processos mais utilizados com esse fim: transesterificação, esterificação e hidroesterificação.

3.6.1 Transesterificação

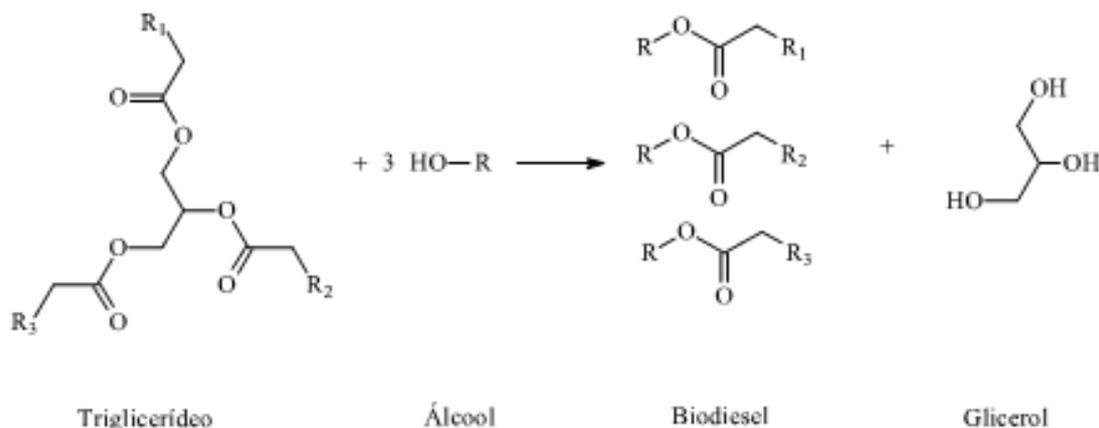
Trata-se do método mais utilizado atualmente para a redução da viscosidade dos triglicerídeos (GARCIA, 2006), pois produz monoésteres alquílicos com viscosidades cinemáticas bem próximas das do diesel mineral, já que a dos óleos vegetais é bem mais elevada, evitando adaptações nos motores (Schuchardt e Ribeiro, 2001; Knothe *et al.*, 2006; Silva, 2009 *apud* RAMOS *et al.*, 2011).

O processo mais comum de produção do biodiesel é a utilização de meio alcalino homogêneo para a transesterificação metílica de óleos vegetais com a adição de alcóxidos metálicos, “mediante a dissolução de hidróxido de sódio ou de potássio no álcool utilizado como agente da transesterificação” (RAMOS *et al.*, 2011).

A transesterificação de óleos vegetais tem relevância estratégica, já que os “ésteres produzidos a partir de óleos vegetais e alcoóis de cadeia curta (biodiesel)

estão se tornando um substituto renovável do óleo diesel mineral” (GARCIA, 2006). Sua fórmula química está representada na Figura 1.

Figura 1: Processo de transesterificação



FONTE: Kusdiana (2004) *apud* PUPO *et al.* (201-).

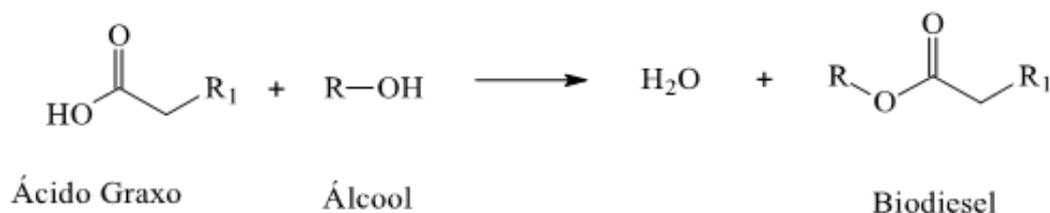
3.6.2 Esterificação

Conforme BARCZA (2000?), esterificação é o “processo de obtenção de ésteres, formado a partir da substituição de uma hidroxila (-OH) de um ácido por um radical alcoxila (-OR)” (Figura 2). Nesse método, o mais comum é a eliminação de água após a reversão de um ácido carboxílico com um álcool (BARCZA, 2000?).

A importância da esterificação para a produção de biodiesel está atrelada às matérias-primas de alta acidez, como os ácidos graxos que possuem alto valor agregado, pouco compatível com o setor de biocombustíveis (RAMOS *et al.*, 2011). Além disso, tem importante desempenho na produção de ésteres de interesse comercial, como: solventes, polímeros, essências, fragrâncias sintéticas, etc (BARCZA, 2000?).

O aumento da temperatura do meio reacional e a presença de catalisador facilitam a esterificação. Além disso, o ácido orgânico e o álcool usados no processo interferem na velocidade da reação (BARCZA, 2000?). Como demonstram Pisarello *et al.* (2007) *apud* RAMOS *et al.* (2011), a utilização de ácido sulfúrico como catalisador de reação de esterificação metílica de ácidos graxos resultaram em equilíbrio do sistema em menos de 1h de reação, com variação das condições experimentais.

Figura 2: Processo de esterificação



FONTE: Kusdiana (2004) *apud* PUPO (201-).

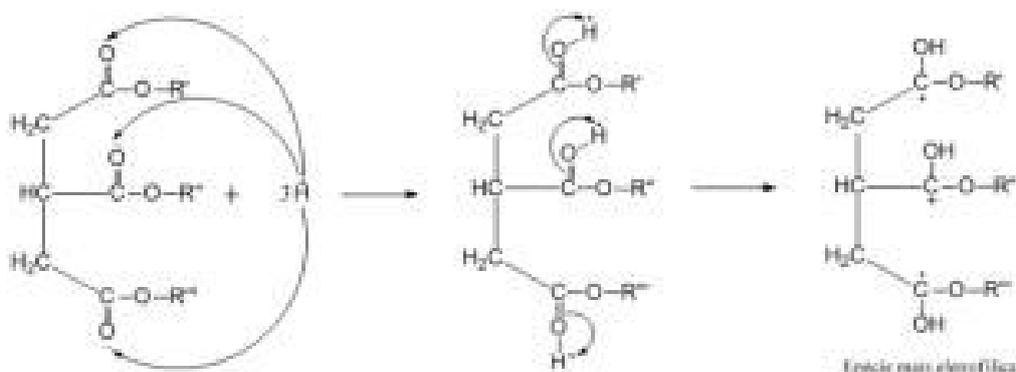
3.6.3 Hidroesterificação

A hidroesterificação consiste, basicamente, num processo de hidrólise seguido de uma esterificação (PUPO *et al.*, 201-) (Figura 3). “A hidrólise aumenta a acidez da matéria-prima descartando a necessidade da remoção de ácidos graxos realizada no refino” (ARCEO, 2012).

Trata-se de um método que pode diminuir o alto custo de produção de biomassa seca e da extração do óleo, tornando-se uma alternativa ao processo convencional de produção de biodiesel (ARCEO, 2012).

A maior vantagem em relação à transesterificação se deve ao fato de que o ácido graxo livre reagir com a hidroesterificação, não limitando a especificação da matéria-prima, tornando possível sua utilização com altos níveis de acidez (PUPO *et al.*, 201-). Além disso, a hidroesterificação permite a transformação completa dos triacilglicerídeos, existentes em óleos de baixa acidez, “que podem ser esterificados para formar ésteres de ácidos graxos livres e da umidade encontrados” (ARCEO, 2012).

Figura 3: Processo de hidroesterificação



FONTE: Kusdiana (2004) *apud* PUPO (201-).

3.7 NUTRIENTES DAS MICROALGAS

Grande parte dos estudos com microalgas tem como objetivo o resgate do CO₂ da atmosfera, objetivando a diminuição do efeito estufa como forma de amenizar o aquecimento global. Entretanto, outros elementos fazem parte da nutrição daqueles microrganismos, como nitrogênio e fósforo. As concentrações desses nutrientes alteram substancialmente o desenvolvimento das microalgas, interferindo na produção de lipídios.

As microalgas podem ser utilizadas para remover Nitrogênio e Fósforo de efluentes (BERTOLIN *et al.*, 2003). Para BERTOLDI *et al.* (2008) *apud* DE LA NOÛE e DE PAUW (1998), a eutrofização resultante do descarte indevido em rios pode ser feita biorremediando metais pesados, nitrogênio e fósforo através da biotecnologia de microalgas.

CLEY JR. *et al.* (2009) demonstram em seu trabalho que é possível recuperar 85% de nitrogênio, 15% de fósforo e 43% do potássio da biomassa residual de animais em criatórios ou semiestabulados, elementos importantes para a agricultura brasileira, o que diminuiria a dependência de importações de fertilizantes.

WIJFFELS e BARBOSA (2010) relatam que são fatores indispensáveis para o desenvolvimento de conhecimentos acerca das rotas metabólicas de acúmulo de lipídios baseados na biologia molecular a implementação de reatores, a utilização de fontes de nitrogênio e fósforo de baixo custo.

NASCIMENTO *et al.* (2010) demonstram que o nitrogênio em diversas formas pode ser usado como fonte de nutrientes para o desenvolvimento de *S. subspicatus*, na forma de amônia, ureia, nitrito e nitrato. Concluem em seu trabalho que o cultivo com NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) resultou em melhor crescimento das microalgas.

Conforme BERTOLDI *et al.* (2008), o nitrogênio constitui importante elemento para o metabolismo das microalgas, contribuindo significativamente para a formação de proteínas. Entretanto, para a formação de lipídios e carboidratos, a redução da quantidade de nitrogênio no meio de cultura é o que torna possível a sintetização daqueles elementos (*apud* RIGANO *et al.*, 1998).

3.7.1 Concentrações ideais de nitrogênio e fósforo para cultivo de microalgas

Já ILLMAN *et al.* (2000) apontam que a taxa de crescimento da *C. vulgaris* em presença de baixos níveis de nitrogênio foi menor, mas seu número de células final foi um pouco mais alto, com aumento no teor de lipídios produzidos por essas células. BERTOLDI *et al.* (2007) avaliaram a remoção de nitrogênio e fósforo de solução hidropônica residual usando *C. vulgaris* e os resultados demonstraram que a remoção foi bastante efetiva.

BERTOLDI *et al.* (2008) *apud* SIPAÚBA-TAVARES (1995) reportam que o aumento do teor de lipídios na composição da biomassa seca de *Chlorella sp.* se deve à carência de fosfato no meio. Citando ROCHE *et al.* (1993), informam que o fósforo atua como transportador de substratos ou energia química, integrando os ácidos nucleicos e as membranas celulares.

A maior parte dos trabalhos que estudam microalgas foi feita para avaliar a fixação de CO₂ (OHSE *et al.*, 2007). Entretanto, neste trabalho deu-se maior importância à absorção de outros nutrientes pelas microalgas tais como: compostos nitrogenados, fosfatados e carbonados. Conforme BECKER (1994), tais compostos fazem parte das receitas de nutrientes para o cultivo de algas, que podem ser compostas de concentração total de sais, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração de potássio, magnésio, sódio, sulfato e fosfato, valor de pH do meio, oligoelementos (como o ferro) e componentes orgânicos que ajudam no crescimento das algas (vitaminas, por exemplo).

Para BECKER (1995), várias espécies de algas podem alterar sua condição de autotrofia para a heterotrofia, de acordo com a fonte de carbono disponível. *Scenedesmus sp* e *Chlorella sp* estão entre elas, possuindo ambas alta flexibilidade na absorção de carbono.

3.7.2 Fatores que interferem no crescimento das microalgas

Fatores químicos, físicos e biológicos são responsáveis pelos índices de crescimento das microalgas (Falkowski e Raven, 1997 *apud* OHSE *et al.*, 2008). Às taxas biológicas das espécies cultivadas estão relacionados os fatores biológicos, assim como os organismos que possam causar contaminação. Já os fatores físico-químicos que interferem no crescimento desses microrganismos os estudos apontam para luz, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Guillard, 1975; Richmond, 2004 *apud* OHSE *et al.*, 2008).

Conforme BECKER (1995), o pH influencia direta ou indiretamente o metabolismo das algas, pois determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio de cultivo. Rocha *et al.* (2003) *apud* OHSE *et al.* (2008) encontraram resultados que comprovam o maior crescimento celular decorrente do aumento do período de iluminação. MEINERZ (2007) constatou que as variações de temperatura, assim como a quantidade de nutrientes – Nitrogênio e Fósforo, principalmente –, influenciaram positiva ou negativamente no crescimento de determinadas microalgas.

3.7.3 Substratos utilizados para o cultivo das microalgas

Uma dessas finalidades proposta neste trabalho é o tratamento de efluentes suínos. A suinocultura causa impactos ambientais de grande magnitude, pois é adotado o sistema de forma intensiva, acarretando em poluição de solos e mananciais de água (SILVA *et al.*, 2012). Conforme PERDOMO *et al.* (2001), o volume de dejetos suínos na Região Sul do Brasil ultrapassava 37 milhões de m³, mas hoje responde por quase 70% da criação desses animais em nosso País conforme a CIAS¹ (EMBRAPA, 2011), com expectativa de crescimento da ordem de 22% nos próximos dez anos (UOL, 2013). Trata-se, portanto, de um gigantesco campo para cultivo de microalgas e, conseqüentemente, a geração de biodiesel.

A título de comparação foram realizados testes com efluentes humanos, para que se entendessem as diferenças de concentrações com os efluentes suínos. Conforme exemplifica ARAÚJO *et al.* (2005), a complexidade no tratamento de esgotos domésticos no Brasil fez com que fossem tomadas iniciativas com o fim de minimizar ou sanar as fontes de poluição. Sendo assim, a utilização de algas torna-se uma alternativa economicamente viável, por se tratar de mecanismo biológico com resultados altamente positivos (ARAÚJO *et al.*, 2005).

3.7.4 Aplicação do Agrostemin®

Em condições experimentais, foi adicionado um produto denominado Agrostemin®, que se caracteriza por ser um fertilizante mineral misto com propriedades bioestimulantes. Sua produção se dá através de um processo biotecnológico criado

¹ Central de Inteligência de Aves e Suínos.

a partir de interações alopáticas positivas entre várias culturas (www.agrostemin.com).

Segundo Molisch *apud* INNECCO, Renato; VASCONCELOS, Aurilene Araújo; MATTOS, Sérgio Horta (201-), alelopatia é definida como “a capacidade de as plantas, superiores ou inferiores, produzirem substâncias químicas que, liberadas no ambiente de outras, influenciam de forma favorável ou desfavorável o seu desenvolvimento”. Substâncias de categoria secundária ocasionam os efeitos alelopáticos (INNECCO *et al.*, 201-).

É um produto baseado exclusivamente em matérias-primas naturais, usando como princípio ativo o extrato vegetal de *Agrostema githago*. Em sua composição química estão presentes 39 espécies diferentes de plantas, com dois tipos principais de componentes alelopáticos: substâncias ativas, representando 4% do total, composto pelo seu extrato vegetal e 96% de Silicato de Magnésio, caracterizado por substâncias inibidoras (www.agrostemin.com).

3.8 MICROALGAS UTILIZADAS COMO MATÉRIAS-PRIMAS

As espécies de microalgas utilizadas como matérias-primas nos experimentos foram *Scenedesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*. Tal escolha repousou em dois fatores de importância relevante: a) fácil acesso às cepas; e b) são citadas por vários autores como tendo grande potencial para obtenção de lipídios que compõem o biodiesel.

PEREIRA *et al.* (2012), FRANCO *et al.* (2013), RADMANN e COSTA (2008), PEREIRA FILHO *et al.* (2010) e ARAUJO *et al.* 2012) citam ambas as microalgas com potencial para produção em larga escala visando a extração de óleos para a produção de biodiesel.

3.8.1 *Scenedesmus subspicatus* – Características

De acordo com Chodat (1926) *apud* GUIRY (2013), *Scenedesmus subspicatus* pertence à Classe *Chlorophyceae*, da Ordem *Sphaeropleales* e da Família *Scenedesmaceae*. A microalga *S. subspicatus* é considerado atualmente como sinônimo taxonômico *Desmodesmus subspicatus*.

Após análises moleculares, restou demonstrado que havia dois gêneros distintos. Os que possuem espinhos passaram a ser chamados de *Desmodesmus* e os

que não apresentam espinhos continuaram com a nomenclatura antiga. Apresentam como características colônias planas que podem ser lineares ou ligeiramente curvadas, podendo ter uma, duas, quatro ou oito células, unidas lateralmente e em paralelo. Suas células podem ser ovóides ou elipsóides, com ápices arredondados, possuindo espinhos longos ou não. Sua reprodução é assexuada (EOL²).

3.8.2 *Chlorella vulgaris* – Características

Conforme MARINHO *et al.* (2009) *apud* HOEK *et al.* (1995), *Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular, de coloração verde, pertencente à Classe *Chlorophyceae*, da Ordem *Chlorococcales* e da Família *Oocystaceae*. Apresenta forma de vida unicelular ou colonial, e pode acumular pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. Sua principal forma de reserva é o amido. Entretanto, em certas condições armazenam óleo. Tem reprodução por divisão binária, com esporos assexuais e reprodução sexual (MARINHO *et al.* 2009).

3.9 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários minerais compõem a nutrição das algas. Conforme Malisch (1896) *apud* BECKER (1995), a nutrição desses organismos não difere da dos vegetais superiores. Os elementos principais são carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio e magnésio, mas outros elementos também fazem parte dessa nutrição, tais como: ferro e manganês (em pequenas quantidades), cobalto, zinco, boro, cobre e molibdênio, estes como elementos essenciais (BECKER, 1995).

A concentração ótima de fósforo no meio, assim como a tolerância a esse elemento, varia conforme as espécies cultivadas. A média tolerada para a maioria das algas é de $50 \mu\text{gL}^{-1}$ – 20mgL^{-1} (BECKER, 1995). Em relação ao nitrogênio, baixas concentrações desse elemento para *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* produziram em torno de 45% de lipídios totais, sendo 70% de lipídios neutros contendo ácidos graxos, principalmente 16:0 e 18:1 (BECKER, 1995).

² Encyclopedia of Life

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As cepas das microalgas *Scenedesmus subspicatus* (Figura 4) e *Chlorella vulgaris* (Figura 5) foram obtidas junto ao Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental (CPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Toledo. As células dos microrganismos estudados estão demonstradas nas figuras 4 e 5 respectivamente.

A produção das microalgas foi realizada no Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU), localizado na mesma instituição e que possui uma estrutura para produção de microalgas em sistema semicontínuo desde volumes iniciais condicionados em erlenmeyers até atingirem volumes maiores em estruturas de tanque de fibra de vidro com volume de 500L.

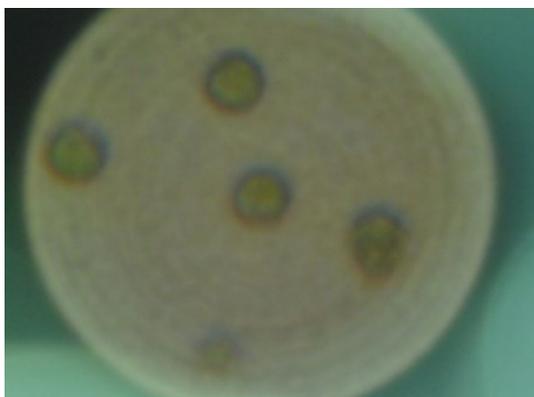
Os cultivos das cepas obedeceram ao que prescreve BECKER (1994). Para o cultivo de ambas as microalgas o meio de cultura continha:

- KNO_3 (810 mgL^{-1})
- NaNO_3 (680 mgL^{-1})
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (415 mgL^{-1})
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (250 mgL^{-1})
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (180 mgL^{-1})
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (25 mgL^{-1})
- FeEDTA (4 mgL^{-1})
- H_3BO_3 ($2,5 \text{ mgL}^{-1}$)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mgL^{-1})
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ mgL}^{-1}$)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ mgL}^{-1}$)
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,03 \text{ mgL}^{-1}$)

Figura 4 – Células de microalgas *Scenedesmus subspicatus* observadas ao microscópio ótico com aumento de 400x.



Figura 5: Células de *Chlorella vulgaris*, observadas ao microscópio ótico, com aumento de 400x.



4.1. SISTEMAS DE CULTIVO

BECKER (1994) recomenda que os meios de cultura para microalgas possam ser agrupados em três tipos, dependendo das matérias-primas utilizadas e o fim dado à biomassa das microalgas: a) meio sintético completo; b) aqueles que são baseados em água natural enriquecida com suplementação mineral; e c) águas residuais como efluentes de estações de tratamento, industriais, etc.

Nesse contexto, o nitrogênio e o fósforo desempenham papel importante na nutrição das algas. BECKER (1994) mostra que a forma como ambos são fornecidos interfere em seu crescimento. As algas utilizam nitrogênio na forma de nitrato, nitrito, amônia ou ureia. Já o fósforo pode ser limitante do crescimento, mas em condições normais é absorvido na forma de ortofosfato, com dependência de energia fornecida por fotossíntese ou respiração celular (BECKER, 1994).

Os meios de cultura selecionados foram efluentes humanos e de suínos. O primeiro foi colhido na Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) III da SANEPAR,

localizada no Bairro Ouro Verde, em Foz do Iguaçu/PR (Figura 6). O segundo foi coletado na Granja Colombari, situada na cidade de São Miguel do Iguaçu/PR, onde há a criação de cinco mil suínos (Figura 7).

4.1.1 Cultivo com Agrostemin®

A aplicação de Agrostemin® foi feita em apenas um cultivo de cada experimento, sendo um de *C. vulgaris* em efluente humano, um de *C. vulgaris* em efluente suíno, um de *S. subspicatus* em efluente humano e um de *S. subspicatus* em efluente suíno, para que se observasse se haveria uma maior produtividade de cada uma das culturas.

Figura 6 – Coleta de efluentes humanos na ETE III da SANEPAR – Foz do Iguaçu/PR.

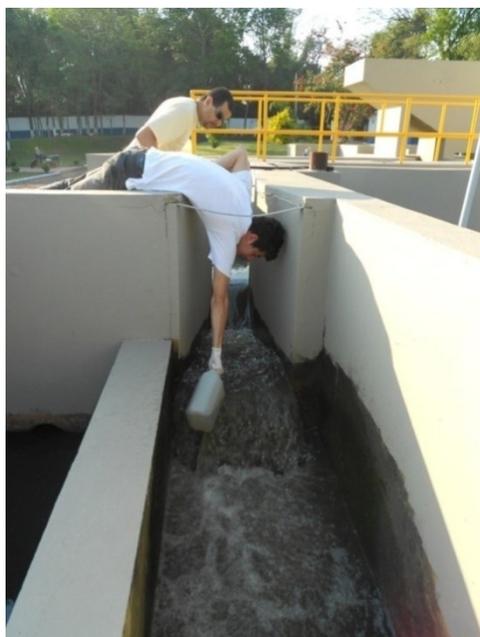


Figura 7 – Coleta de efluentes de suínos na Granja Colombari.



4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES PARA O CULTIVO DAS MICROALGAS

As avaliações foram realizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná (IAP) com amostras de efluentes humanos e de suínos, e demonstraram que a quantidade de nitrogênio e fósforo em diversas formas – Fósforo Total, Ortofosfato Solúvel, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Kjeldahl e Nitrogênio Orgânico (ver anexos) – atingiram concentrações diferenciadas, mas que seriam suficientes para nutrir as microalgas dos experimentos.

Foram realizadas análises de óleos e graxas totais, vegetais e animais, e minerais em ambos os efluentes no Laboratório Núcleo de Análises Físico-Químicas Ltda. (NUCLEOTEC), localizado na cidade de Foz do Iguaçu/PR. Os resultados estão demonstrados nas tabelas 4 e 5, nos Resultados e Discussões.

4.3. POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA

4.3.1 Local do ensaio de avaliação do potencial

Foi montada uma estrutura semelhante à dos laboratórios da UNIOESTE na Faculdade UDC – Anglo Americano de Foz do Iguaçu, especificamente nos Laboratórios de Ciências Biológicas (CCBS), de Integração do Meio Ambiente (LIMA) e de Ciências Farmacêuticas (CCF).

No CCBS, foram montadas duas estantes com fotoperíodo de 24 horas consecutivas e temperatura entre 25°C e 31°C, com média de 28°C (Figura 8). No LIMA, estão localizados alguns equipamentos e materiais utilizados, que precederam e finalizaram o cultivo – microscópios, autoclave, capela, dessecadores, câmara de Neubauer, banho-maria e estufa. No CCF, está localizado o ultrassom, utilizado para o rompimento da parede celulósica e extração de lipídios das microalgas.

Figura 8 – Estantes com os cultivos. Os erlenmeyers com soluções mais claras, são efluentes de humanos; os mais escuros, efluentes de suínos.



4.3.2 Cultivo das microalgas

4.3.2.1 Determinação da curva de crescimento e melhor diluição

Inicialmente, os efluentes foram autoclavados a 120°C por 30 minutos, a fim de eliminar os microrganismos existentes em cada efluente. Após a autoclavagem, tais culturas foram diluídas nas seguintes proporções (v/v), para ambos os efluentes a fim de avaliar a curva de crescimento dos microrganismos:

- *Chlorella*/humanos: 10%, 1%, 0,5% e 0,33%
- *Chlorella*/suínos: 10%, 1%, 0,5% e 0,33%
- *Scenedesmus*/humanos: 10%, 1%, 0,5% e 0,33%
- *Scenedesmus*/suínos: 10%, 1%, 0,5% e 0,33%

Conforme relatado no item 3.7.1 “Concentrações ideais de nitrogênio e fósforo para cultivo de microalgas”, a presença de baixos níveis desses compostos favorece a produção de altas taxas de lipídios. Dessa forma, tais diluições foram necessárias em razão das altas concentrações de compostos nitrogenados e fosfatados, conforme descrito no item 5.1 ‘Caracterização dos efluentes de humanos e de suínos’.

Foram inoculados 5µL de cada cultura de microalgas a fim de se obter uma curva de crescimento para avaliar o potencial de crescimento das algas naqueles meios de cultura. Ambos os cultivos foram mantidos em temperatura média de 23°C, com fotoperíodo de 24 horas constantes.

Para avaliar o crescimento foi realizada a quantificação da densidade celular. A densidade celular (n° cél. 10^{-4} .mL) foi determinada nas amostras das culturas de microalgas a partir da contagem de células usando uma câmara de Neubauer Improved – hemocímetro, juntamente com o auxílio de um microscópio ótico de luz transmitida, binocular de marca Quimis, modelo Q 7085-4, com magnificação total de 400x para ambas as microalgas.

4.3.2.2 Cultivo para extração dos óleos

Numa segunda etapa, foram coletados 16 litros de cada efluente. Ambos foram autoclavados a 120°C por 30 minutos, a fim de eliminar os microrganismos existentes em cada efluente. Após a autoclavagem, foram diluídos da seguinte forma:

- Efluente humano: 50% de efluentes humanos com 50% de água destilada, distribuídos em 14 (quatorze) frascos de Erlenmeyers de 1000 mL
- Efluente suíno: 20% de efluentes suínos com 80% de água destilada, igualmente distribuídos em outros 14 (quatorze) frascos também de 1000 mL.
- Em quatro frascos foram adicionados 5 mg do produto Agrostemim®, sendo um com cultivo de *C. vulgaris* em efluente humano, um com cultivo de *C. vulgaris* em efluente suíno, um com cultivo de *S. subspicatus* em efluente humano e um com cultivo de *S. subspicatus* em efluente suíno.

Nos frascos com efluentes humanos, em 9 (nove) deles foram inoculadas culturas de *Scenedesmus* e nos outros 9 (nove) foram inoculadas culturas de *Chlorella*. O procedimento foi repetido nos frascos com efluentes de suínos, totalizando 36 frascos.

Após 60 dias, período estabelecido para uma boa consistência visual e obtenção de massa suficiente para extração de óleo para a análise cromatográfica, observou-se um ótimo crescimento de todas as culturas (Figura 9) e iniciou-se a etapa seguinte. Esta consistiu na filtração a vácuo, em filtrador da marca Quimis, modelo Q 355B, com filtros de 14 μ m. Todos os filtros foram colocados em placas de Petri e

depois em estufa a 40°C por 2 horas. Posteriormente, foram acondicionados em dessecadores para eliminar qualquer resquício de umidade.

Figura 9 – Amostras após 60 dias de cultivo.



4.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS DA BIOMASSA DAS MICROALGAS

4.4.1 Extração de óleos

Na extração do óleos das microalgas foi utilizada a metodologia de DANTAS *et al.* (2010). Após a dessecação, foram retiradas duas amostras de cada filtro e pesadas separadamente. Cada amostra foi introduzida em um tubo de ensaio previamente pesado e feita uma nova pesagem, agora com as amostras. Foram adicionados 5 mL de metanol como solvente e embalados em papel alumínio para evitar a ação da luz.

O metanol é o solvente mais eficiente para a extração de componentes de microalgas quando se usa o ultrassom. Os tubos contendo as amostras foram colocados em ultrassom a 40 kHz durante 60 minutos, para efetuar a ruptura da parede celular e a completa extração do óleo das microalgas. Em seguida, aguardou-se a completa evaporação do metanol em banho-maria a 60°C e o óleo extraído restou acumulado nos tubos (DANTAS *et al.*, 2010).

Após esse procedimento, as amostras foram retiradas e os tubos pesados somente com o óleo extraído.

4.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

Para a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo extraído foi utilizada cromatografia gasosa. Primeiramente foi necessário realizar a derivatização, já que os óleos a serem analisados precisam ser convertidos em componentes de maior volatilidade, tais como os ésteres etílicos (VISENTAINER *et al.*, 2006).

Os tubos de ensaio com os óleos extraídos foram enviados à Universidade Estadual de Maringá (UEM) e os ésteres metílicos obtidos foram analisados em cromatografia gasosa, aplicando-se a preparação para aqueles ésteres de ácidos graxos com 8 (oito) ou mais átomos de Carbono.

A metodologia de transesterificação de lipídios com baixo teor de acidez que foi utilizada consistiu em pesar 100 mg do óleo em um tubo de ensaio, adicionar 2,0 mL de n-heptano e agitar até a solubilização total da matéria graxa. Em seguida adicionou-se 2,0 mL de solução 2 mol/L de KOH em metanol e agitou-se novamente por cerca de cinco minutos. Após a completa separação das fases, o sobrenadante foi utilizado para injeção no cromatógrafo (AGUIAR, 2013).

A análise cromatográfica das amostras seguiu os parâmetros adotados por METCALFE *et al.* (1966). Tais parâmetros seguem os padrões do método gravimétrico segundo a Norma Internacional ISO 6142:2001³. Foi utilizado um cromatógrafo da marca Varian, modelo CP – 3800, com detector de ionização de chama (DIC), contendo uma coluna capilar específica para separação de ácidos graxos BP – X70 – SGE de 30m x 0,25mm. O gás utilizado para arraste foi o hélio, em razão split de 1:10. A análise foi realizada com programação de temperatura da coluna, iniciada a 140°C, sendo aquecida até 250°C a 5°C.min⁻¹. A temperatura do detector foi mantida em 220°C e a do injetor em 260°C.

³ Norma ISO 6142, *Gas Analysis – Preparation of calibration gas mixtures – Gravimetric method*, 2001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES DE HUMANOS E DE SUÍNOS

Foi realizada a caracterização dos efluentes humanos e suínos por meio de avaliação da quantidade de óleos e graxas totais, com os resultados demonstrados nas Tabelas 4 e 5:

Tabela 4 - Análise de efluentes suínos.

PARÂMETROS	RESULTADOS (m.v ⁻¹)	MÉTODOS
Óleos e Graxas Totais	2296,0000 mgL ⁻¹	Gravimétrico
Óleos e Graxas Vegetais e Gorduras Animais	2272,0000 mgL ⁻¹	Gravimétrico
Óleos e Graxas Minerais	24,0000 mgL ⁻¹	Gravimétrico

Tabela 5 - Análise de efluentes humanos.

PARÂMETROS	RESULTADOS	MÉTODOS
Óleos e Graxas Totais	21,8000 mgL ⁻¹	Gravimétrico
Óleos e Graxas Vegetais e Gorduras Animais	18,4000 mgL ⁻¹	Gravimétrico
Óleos e Graxas Minerais	3,4000 mgL ⁻¹	Gravimétrico

Analisando os resultados, conclui-se que os óleos e graxas totais dos efluentes suínos constituem 0,023% de sua composição e dos efluentes humanos, 0,00022%; óleos e graxas vegetais e gorduras animais de efluentes suínos, 0,023% e de efluentes humanos, 0,00018%; e, por último, óleos e graxas minerais de efluentes suínos, somam 0,00024% e de efluentes humanos, 0,000034%. Tais informações foram importantes para se conhecer os percentuais de óleos e graxas encontrados em ambos os efluentes e, conseqüentemente, o potencial de produção de óleos por parte das microalgas usadas neste trabalho.

No caso dos efluentes humanos, as concentrações médias de Nitrogênio e Fósforo, nutrientes das microalgas, apresentaram os valores médios conforme a Tabela 6:

Tabela 6 – Concentrações de Nitrogênio e Fósforo em efluentes humanos.

Nutriente	Concentração (mgL⁻¹)
Fosfato Total	3,2
Nitrogênio Amoniacal	28,3
Nitrogênio Kjeldahl	38
Nitrogênio Orgânico	9,6
Fósforo Total	3,2
Ortofosfato Solúvel	1,6

Já os efluentes de suínos, os valores médios das concentrações de Nitrogênio e Fósforo estão demonstrados na Tabela 7:

Tabela 7 – Concentrações de Nitrogênio e Fósforo em efluentes suínos.

Nutriente	Concentração (mgL⁻¹)
Fosfato Total	2.596
Nitrogênio Amoniacal	2.596
Nitrogênio Kjeldahl	4.603,3
Nitrogênio Orgânico	2007,3
Fósforo Total	6.239,3
Ortofosfato Solúvel	347,3

Os resultados completos estão no anexo C.

5.2 CURVA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS E ESTUDO DAS DILUIÇÕES

Os cultivos foram realizados conforme descrito no item 4.3.2.1, com duração de dez dias, para que houvesse uma curva de crescimento das espécies testadas, com as fases LAG, fase LOG ou exponencial, fase de estabilização e fase de declínio ou senescência. Tais cultivos apresentaram os seguintes resultados:

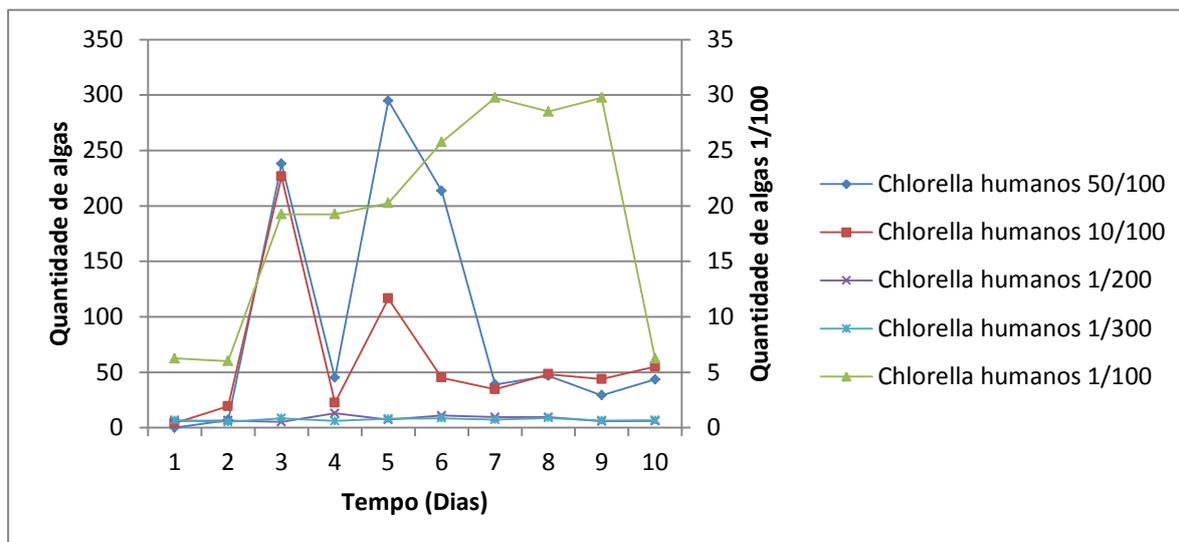
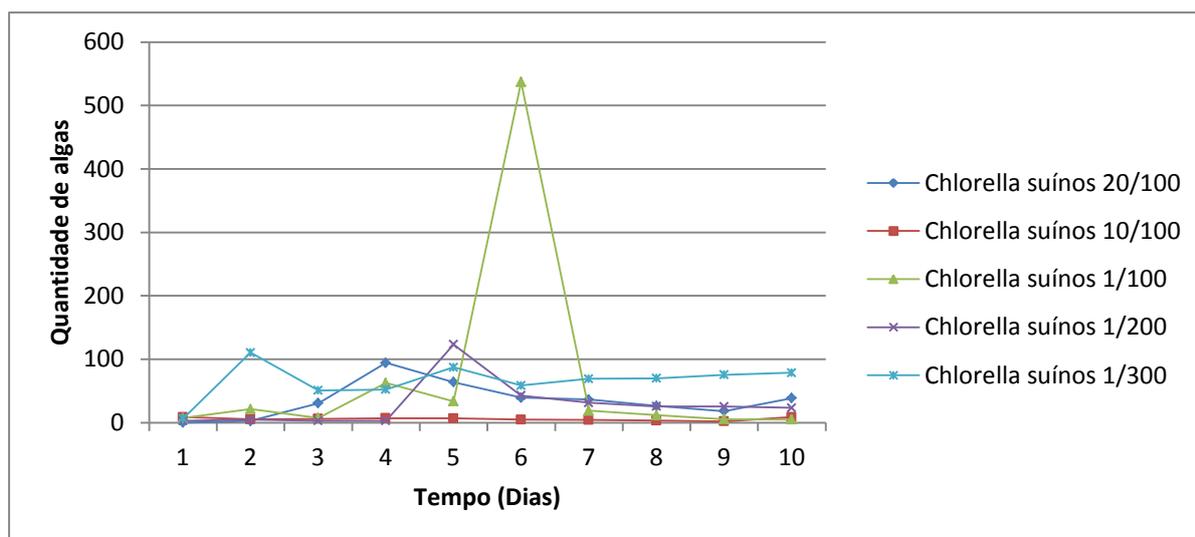
Figura 10 – Cultura de *Chlorella* em efluentes humanosFigura 11 – Cultura de *Chlorella* em efluentes suínos

Figura 12 – Cultura de *Scenedesmus* em efluentes humanos

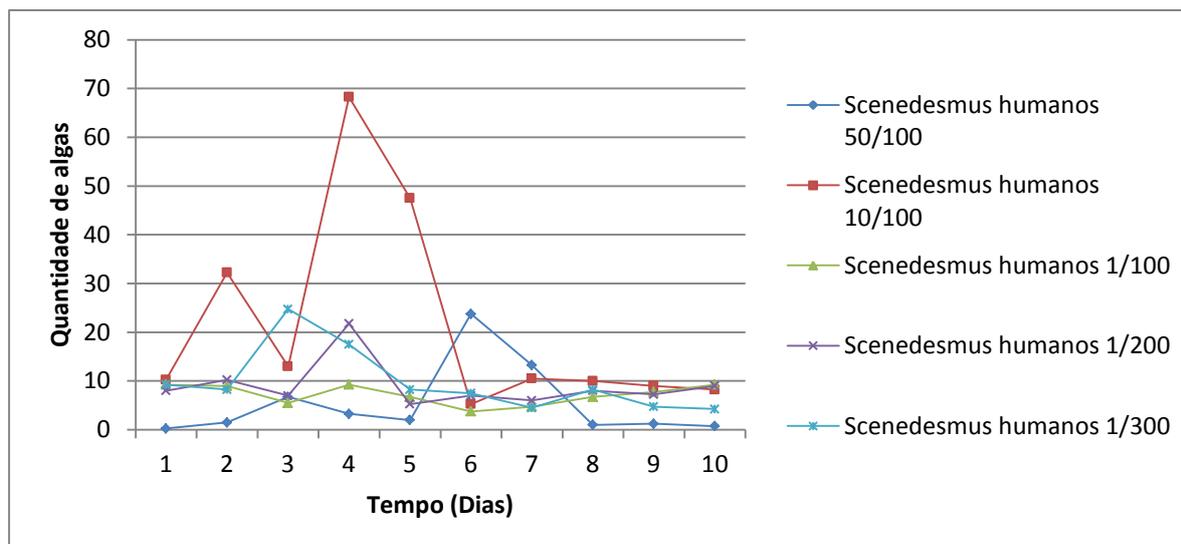
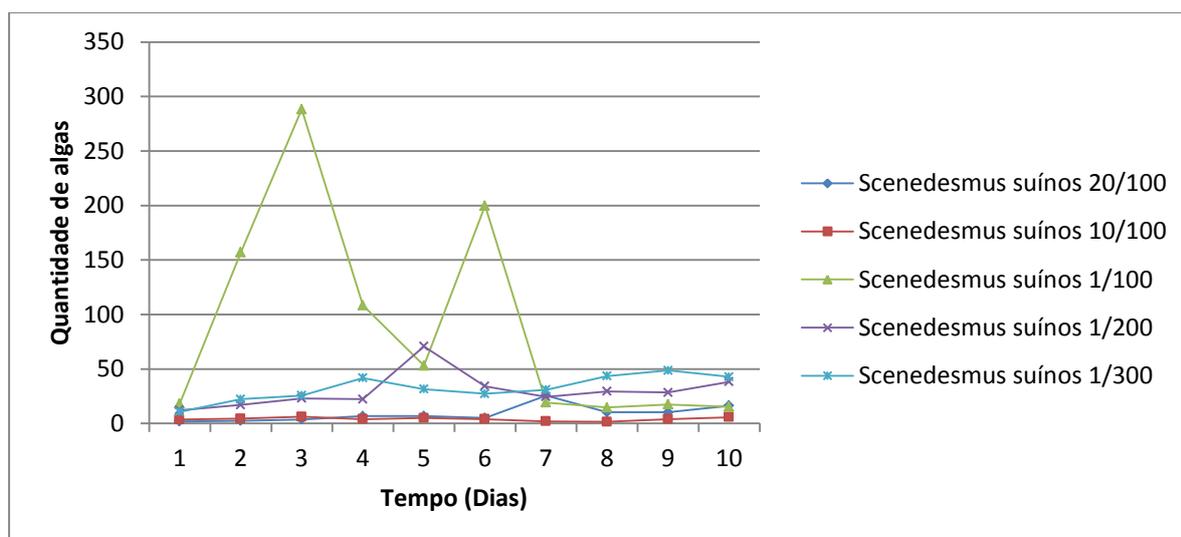


Figura 13 – Cultura de *Scenedesmus* em efluentes suínos



Verificou-se que não houve especificamente o desenvolvimento de todas as fases, mas sim um crescimento exponencial em determinadas situações. Na [Figura 10](#), a concentração em 10% de efluentes humanos (10/100) fez com que a *Chlorella* alcançasse o número de $226,5 \cdot 10^{-4}$ cél.mL, no terceiro dia. Entretanto, a concentração 1/100 apresentou um crescimento ideal, mas com pico de $29,75 \cdot 10^{-4}$ cél.mL apenas no 7º dia; na [Figura 11](#), a concentração em 1% (1/100) de efluentes suínos permitiu que o cultivo de *Chlorella* chegasse a $537 \cdot 10^{-4}$ cél.mL, no sexto dia; na [Figura](#)

ra 12, o melhor resultado foi no cultivo em 10% (10/100) de efluentes humanos, que demonstrou uma concentração de *Scenedesmus* de $68,25 \cdot 10^{-4}$ cél.mL, no quarto dia; e na Figura 13, o que apresentou melhor resposta foi o cultivo realizado em diluição a 1% (1/100) de efluentes suínos, com uma concentração de $288,25 \cdot 10^{-4}$ cél.mL de *Scenedesmus*, no terceiro dia.

O crescimento de *C. vulgaris* em ambos os cultivos (humano e suíno) atingiu a densidade de celular máxima entre o 5º e o 6º dias. Tal índice é semelhante ao encontrado por OHSE *et al.* (2008). Já o crescimento de *S. subspicatus* nos dois cultivos (humano e suíno) foi semelhante ao descrito por RIBEIRO (1997), com a maior densidade celular entre os 3º e 4º dias.

Para fins de produção de biomassa e obtenção dos lipídios que foram analisados por cromatografia gasosa, foram selecionadas as diluições de 20% (20/100) dos efluentes suínos e de 50% (50/100) de efluentes humanos, apenas para realizar as análises quantitativa e qualitativa dos óleos produzidos pelas microalgas.

5.3 ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE ÓLEOS

As análises qualitativa e quantitativa das microalgas *C. vulgaris* e *S. subspicatus* tiveram como objetivo a obtenção de percentuais de lipídios em quantidade suficiente para a produção de biodiesel. Objetivou-se também uma análise comparativa entre a gordura existente nos efluentes e a massa produzida pelas microalgas.

A Tabela 8 demonstra o teor de gorduras totais encontrado nas culturas realizadas.

Tabela 8 – Teor de gorduras totais das culturas de microalgas.

Tratamento	Teor de Gordura Totais (%) ⁴
<i>Chlorella</i> - suínos	37,70 ± 9,55
<i>Scenedesmus</i> - suínos	25,96 ± 6,4
<i>Chlorella</i> - humanos	50,12 ± 9,19
<i>Scenedesmus</i> - humanos	33,46 ± 5,71

⁴ Resultados expressos pela média ± desvio padrão.

Nos resultados obtidos, observa-se que a cultura de *C. vulgaris* em efluentes humanos foi a que apresentou a melhor produção de gorduras totais, num total de 50,12%, com variação de $\pm 9,19\%$. O cultivo de *C. vulgaris* em efluentes suínos produziu um total de 37,70% de gorduras totais, com variação de $\pm 9,55\%$. As culturas de *S. subspicatus* em efluentes suínos e humanos apresentaram rendimento inferior, com 25,96% (variação de $\pm 6,4\%$) e 33,46% (variação de $\pm 5,71\%$), respectivamente.

Nos cultivos com o produto Agrostemin®, os resultados obtidos foram os discriminados na Tabela 9:

Tabela 9 – Cultivos com Agrostemin® e os percentuais de gordura obtidos

Cultivo com Agrostemin®	% de gordura
<i>Chlorella</i> - suíno	46,66
<i>Scenedesmus</i> - suíno	46,86
<i>Chlorella</i> - humano	70,35
<i>Scenedesmus</i> - humano	37,94

Houve relevante aumento na produção de gordura nos cultivos com Agrostemin®. Na cultura de *C. vulgaris* em efluente suíno com o produto, a produção foi de aproximadamente 23%; na cultura de *S. subspicatus* no mesmo efluente, juntamente com o produto, o aumento foi próximo de 80%; no cultivo de *C. vulgaris* em efluente humano, com o produto adicionado, o acréscimo foi de aproximadamente 41%; e no cultivo de *S. subspicatus* em efluente humano, houve aumento de 13%. Tais valores encontram respaldo nas informações prestadas pela empresa que comercializa o produto (AGROSTEMIN®⁵).

5.3.1 Análise qualitativa da produção de óleos

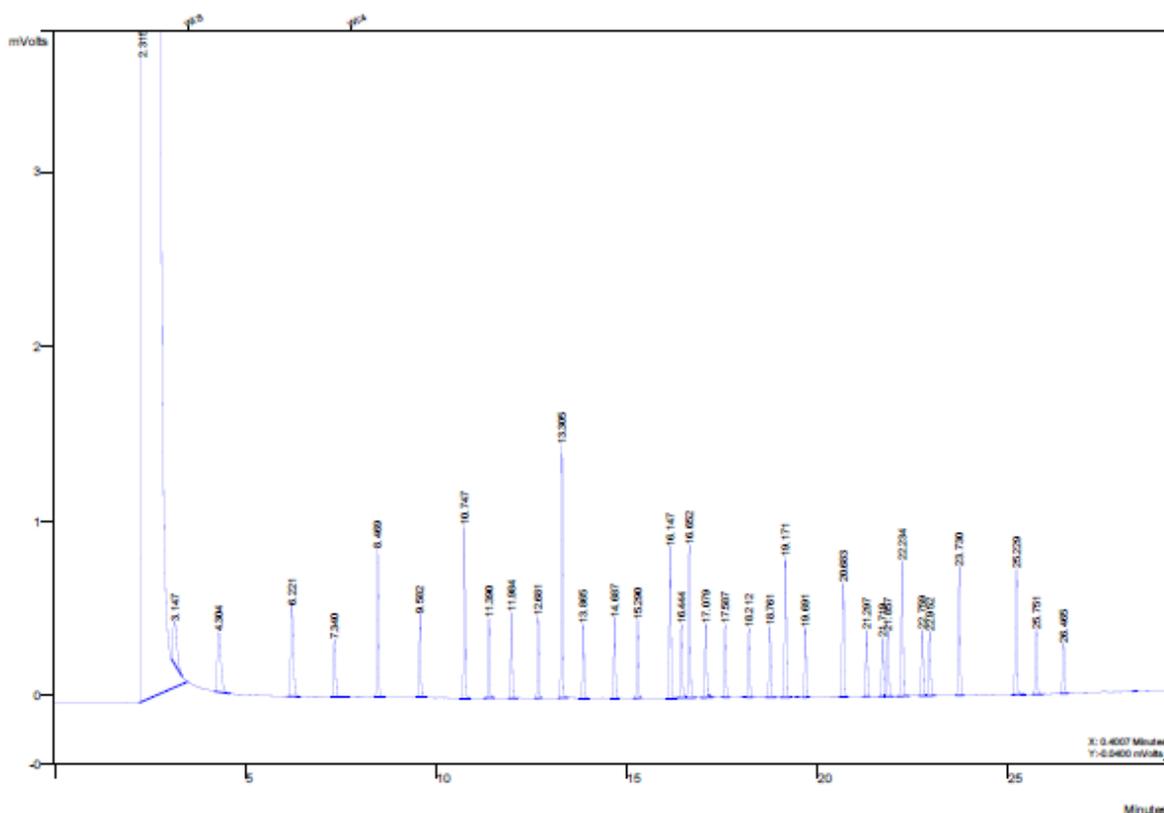
A análise qualitativa foi feita por meio de cromatografia gasosa e determinou quais os tipos de ácidos graxos encontrados nos óleos extraídos que pudessem constituir biodiesel.

⁵ <http://www.agrostemin.com.br/>

A cromatografia gasosa utilizou os seguintes padrões de ácidos graxos: ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido láurico (C12:0) ácido mirístico (C14:0); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoleico (C16:1); ácido hexadecanoico (C16:2), ácido esteárico (C18:0); ácido oleico (C18:1); ácido linoleico (C18:2); ácido linolênico (C18:3); ácido araquídico (C20), ácido behênico (C22), e ácido lignocérico (C24). Tais ésteres metílicos foram identificados por comparação com os padrões cromatográficos (Figura 14).

O padrão interno (PI) utilizado foi o éster metílico tricosanóico 99%, C₂₃, adquirido da Sigma-Aldrich. Este éster foi escolhido como PI por não ter sido identificado como componente da amostra de ésteres produzidos. Além disso, é um composto estável e permite a adição de uma quantidade precisa na amostra e, principalmente, apresenta a resposta próxima aos componentes encontrados no biodiesel produzido (VISENTAINER e FRANCO, 2006).

Figura 14 – Perfil cromatográfico do padrão analítico de ácidos graxos.

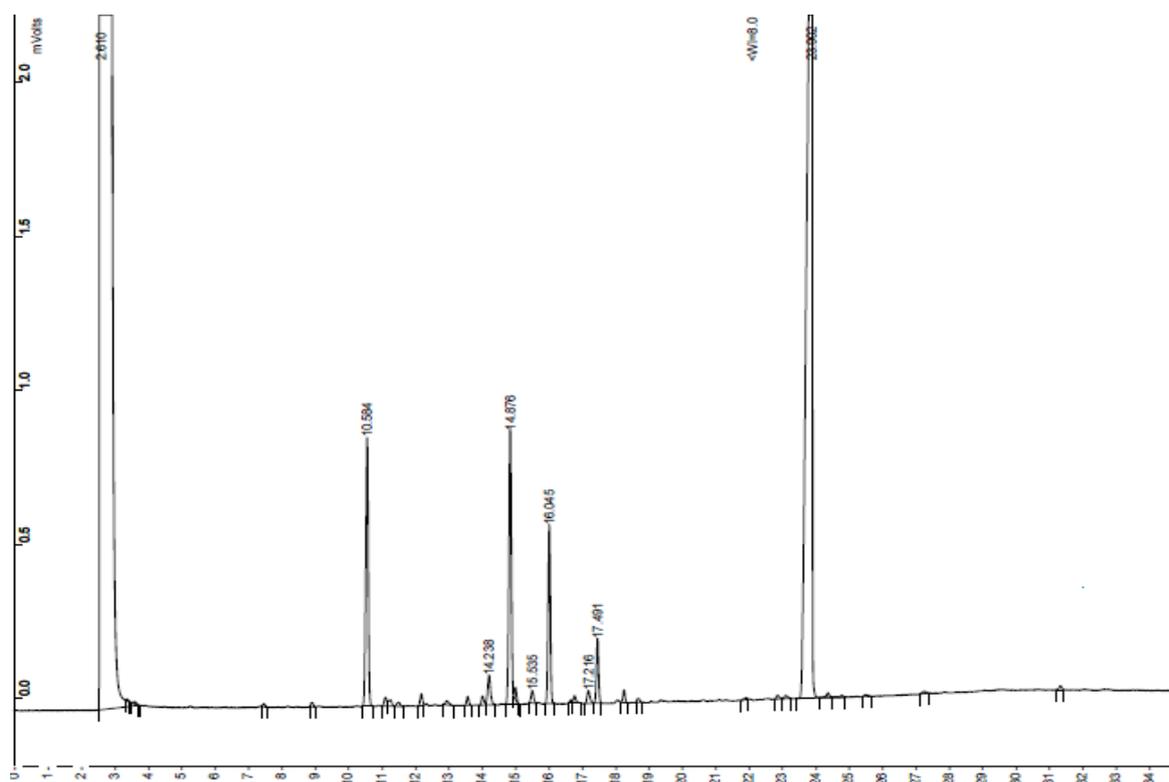


A Figura 14 mostra o gráfico com a cromatografia padrão utilizada para se tempo de retenção (minutos), constata-se a presença dos ácidos C8:0 (caprílico),

C10:0 (cáprico) = (7.340), C12:0 (láurico) = (9.582), C14:0 (mirístico) = (11.984), C16:0 (palmítico) = (14.687), C16:1 (palmitoleico) = (15.290), C16:2 (Hexadecanoico), C18:0 (esteárico) = (17.587), C18:1 (oleico) = (18.212), C18:2 (linoleico) = (18.761), C18:3 (linolênico) = (19.171) e C20:0 (araquídico) = (20.683), C22:0 (behênico) = (21.297) e C24:0 (lignocérico) = (22.234), sendo 23.730 o tempo de retenção do padrão interno.

O gráfico da Figura 15, com o cultivo de *C. vulgaris* em efluentes humanos, registrou a presença dos ésteres C14:0 (palmítico) = (14.238), C16:1 (palmitoleico) = (14.876), C18:0 (esteárico) = (17.491), com o palmitoleico em maiores quantidades.

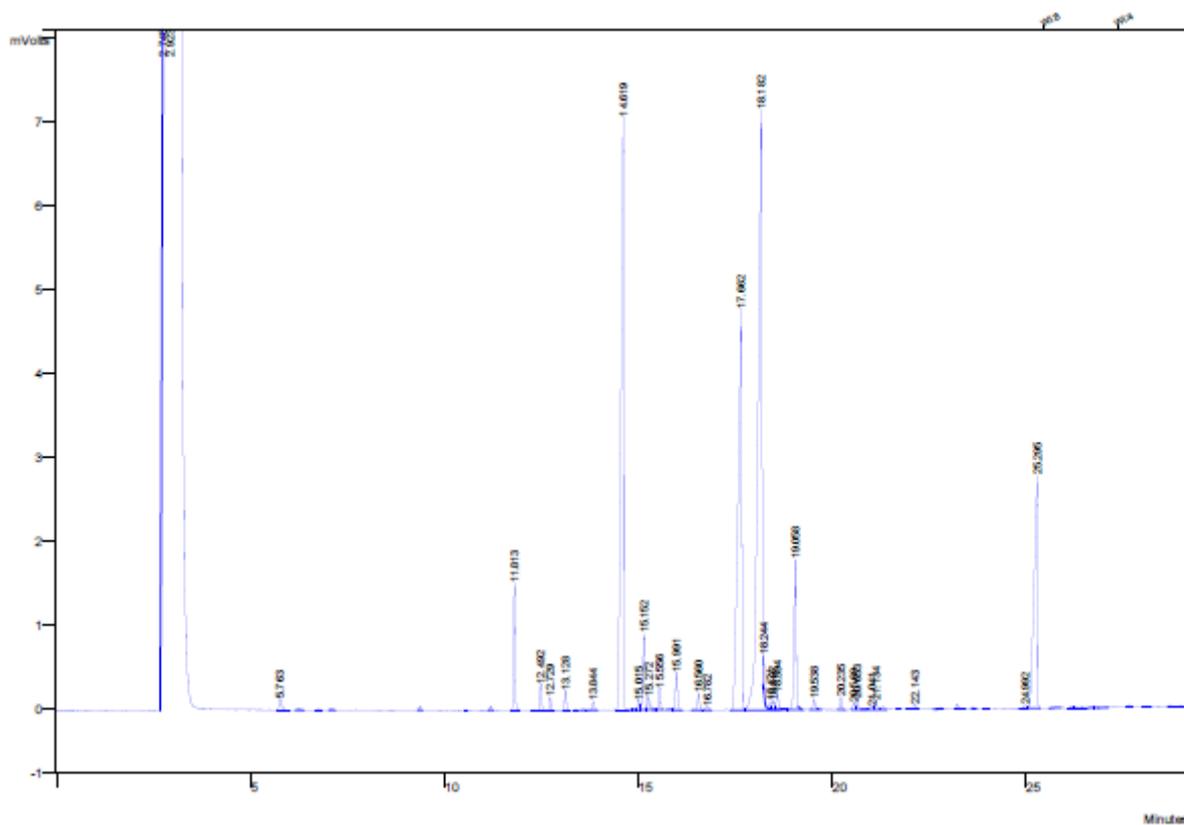
Figura 15 – Perfil cromatográfico de *Chlorella* em efluentes humanos



Na Figura 16, temos os resultados do cultivo de *Chlorella vulgaris* em efluentes suínos, onde se constata a presença dos ácidos C8:0 (cáprico) = (5.763), C14:0 (mirístico) = (11.813), C16:0 (palmítico) = (14.619), C16:1 (palmitoleico) = 15.015, C18:0 (esteárico) = (17.662), C18:1 (oleico) = (18.182), C18:2 (linoleico) = (18.594),

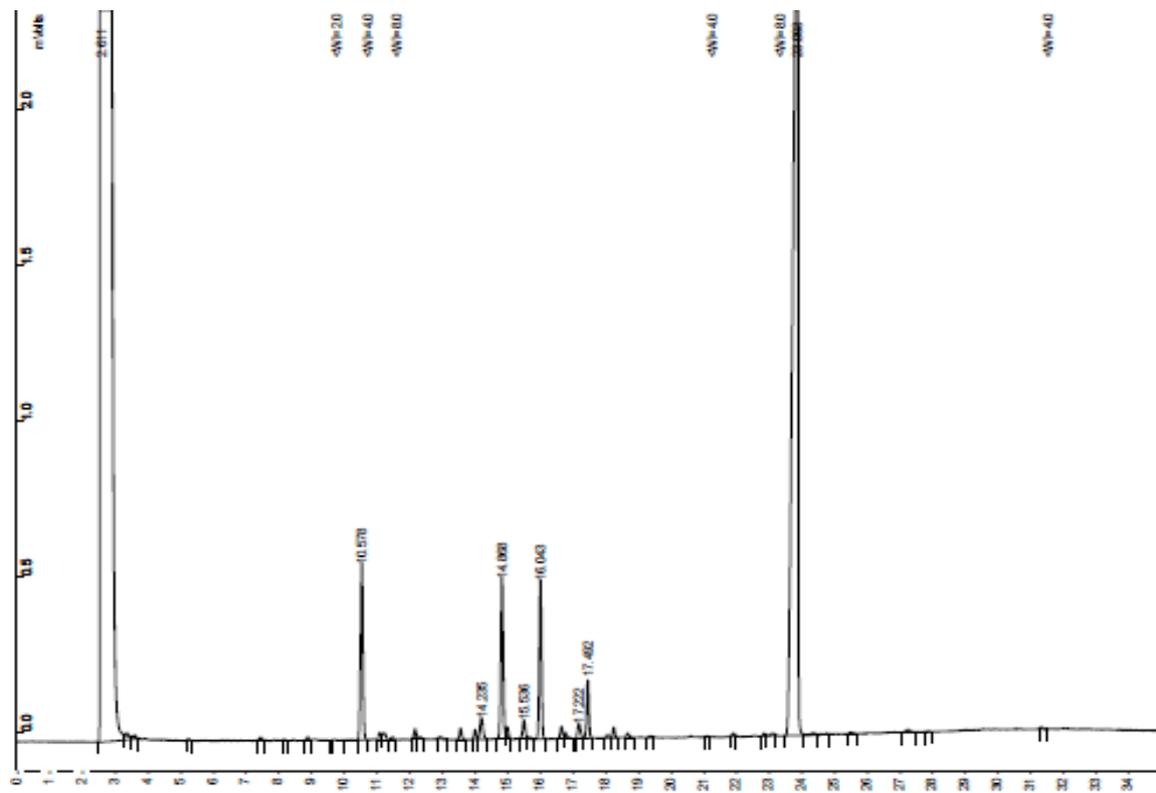
C18:3 (linolênico) = (19.058), com maiores volumes para o palmítico, o esteárico e o oleico.

Figura 16 – Perfil cromatográfico de *Chlorella* em efluentes suínos



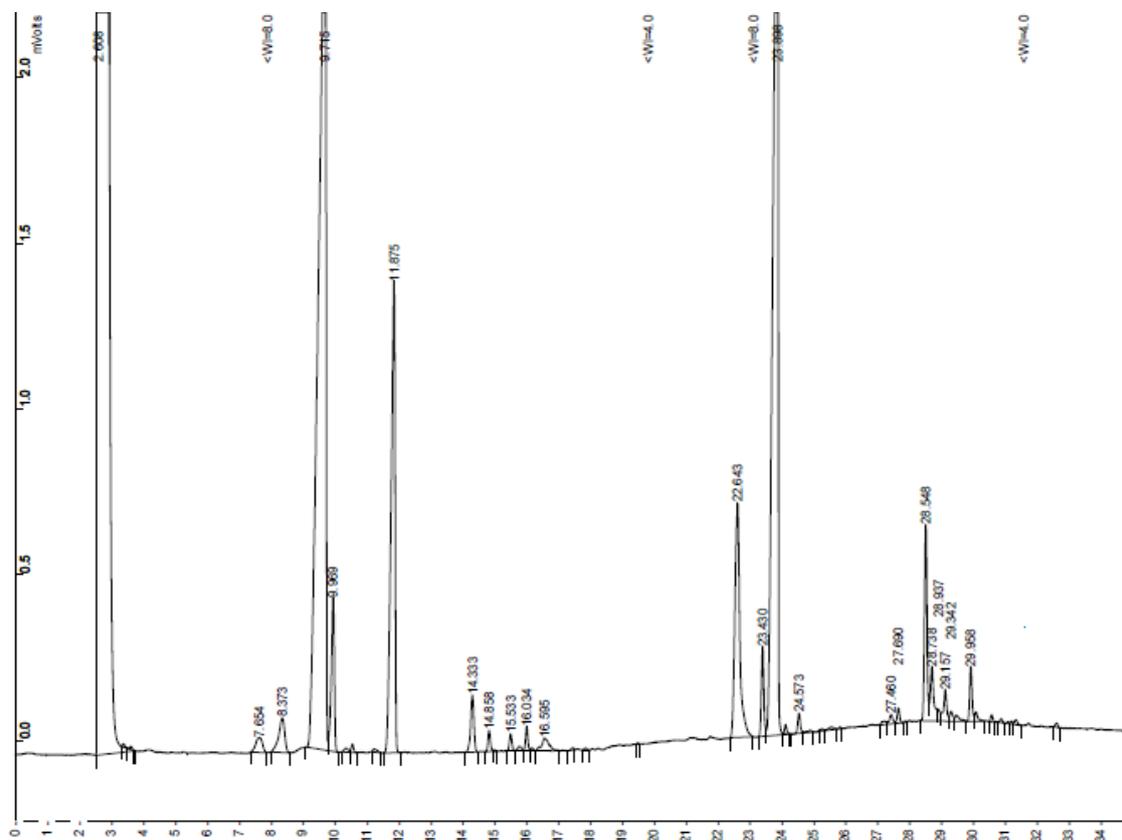
A Figura 17 apresenta o gráfico do cultivo de *S. subspicatus* em efluentes humanos, com a presença em destaque dos ácidos C16:0 (palmítico) = (14.868), C16:1 (palmitoleico) = (15.536), C18:0 (esteárico) = (17.492), com o maior volume para o ácido palmítico.

Figura 17 – Perfil cromatográfico de *Scenedesmus* em efluentes humanos



Por fim, a Figura 18 aponta o perfil cromatográfico obtido na cultura de *Scenedesmus subspicatus* em efluentes suínos. Consta a presença dos ácidos C10:0 (cáprico) = (7.654), C12:0 (láurico) = (9.715), C14:0 (mirístico) = (11.875), C16:0 (palmítico) = (14.333), C16:1 (palmitoleico) = (15.533), sendo que o láurico e o mirístico estão em maiores teores.

Figura 18 – Perfil cromatográfico de *Scenedesmus* em efluentes suínos



5.3.2 Análise quantitativa da produção de óleos

A análise quantitativa objetivou verificar o percentual de ácidos graxos em cada amostra de óleo extraído das microalgas. Tendo como referência a quantidade de 100 mg de cada óleo analisado, os resultados obtidos podem ser analisados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

A Tabela 10 representa o cultivo de *C. vulgaris* em efluentes humanos e demonstra que os ácidos graxos com maiores concentrações e que fazem parte da composição do biodiesel é o C16:1 (palmitoleico), com 33,38% e o C18:2T (linoleico), com 35,17% da massa seca total.

Tabela 10 – Percentual de ácidos graxos de *C. vulgaris* em efluentes humanos

<i>Chlorella</i> - humanos			
Compostos	Tempo de Retenção (min)	Área	Teor óleo (%)
C16:1	10,584	4574	33,38
C18:1	14,238	589	4,30
C18:2T	14,876	4819	35,17
C18:2N	16,045	2761	20,15
C20:1	17,491	958	6,99

Os ácidos graxos com maiores percentuais no cultivo de *C. vulgaris* em efluentes suínos são C18:1 (oleico), com 25,63%, C18:3 (linolênico), com 23,38% e C20:0 (araquídico), com 37,29% do total de massa seca utilizada e estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Percentual de ácidos graxos de *C. vulgaris* em efluentes suínos

<i>Chlorella</i> - suínos			
Compostos	Tempo de Retenção (min)	Área	Teor óleo (%)
C13:0	5,763	690	0,50
C17:0	11,813	4452	3,24
C17:1	12,492	1031	0,75
C18:0	13,844	373	0,27
C18:1	14,619	35189	25,63
C18:2	15,152	4667	3,40
C18:3	17,662	32098	23,38
C20:0	18,182	51196	37,29
C21:0	19,058	7162	5,22
C20:3	21,041	442	0,32

Na tabela 12, que representa o cultivo de *S. subspicatus* em efluentes humanos, os maiores percentuais estão representados nos ácidos C16:1 (palmitoleico), com 28,85%, C18:1CIS (oleico), com 27,69% e C18:2N (linoleico), com 24,07% do total da massa utilizada.

Tabela 12 – Percentual de ácidos graxos de *S. subspicatus* em efluentes humanos

Scenedesmus - humanos			
Compostos	Tempo de Retenção (min)	Área	Teor óleo (%)
C16:1	10,578	2949	28,85
C18:1	14,235	448	4,38
C18:1CIS	14,868	2830	27,69
C18:2N	15,536	345	3,38
C18:2N	16,043	2460	24,07
C20:1	17,222	318	3,11
C20:1	17,492	872	8,53

Os ácidos graxos que compõem o biodiesel com percentuais mais elevados do óleo produzido pelo cultivo de *S. subspicatus* em efluentes humanos estão representados na Tabela 13 e são os seguintes: ácido C15:1 (pentadecanoico), com 55,22%, ácido C17:0 (heptadecanoico), com 15,65%, ácido C16:0 (palmitico), com 13,14% e C20:4 (araquidônico), com 10,11% do total.

Tabela 13 – Teor de óleos obtidos em culturas de *S. subspicatus* em efluentes suínos

Scenedesmus - suínos			
Compostos	Tempo de Retenção (min)	Área	Teor óleo (%)
C14:1	7,65	640	0,84
C15:0	8,37	1373	1,81
C15:1	9,715	41890	55,22
C16:0	9,96	9969	13,14
C17:0	11,87	11875	15,65
C18:1	14,33	1194	1,57
C18:1	14,85	342	0,45
C18:2	15,553	278	0,37
C18:3	16,59	622	0,82
C20:4	22,64	7672	10,11

TEIXEIRA *et al.* (2006) citam que o percentual de lipídios produzido por dois tipos de *Scenedesmus* (*obliquus* e *dimorphus*) pode alcançar entre 12% e 14%, e

16% e 40%, respectivamente. Já para *C. vulgaris*, o percentual obtido foi entre 14% e 22%. BECKER (2006) menciona valores idênticos para *S. obliquus* e para *C. vulgaris*. Comparativamente, vê-se que os cultivos de *C. vulgaris* em ambos os efluentes ultrapassaram os números encontrados pelos referidos autores, que mencionam apenas o CO₂ como fonte de nutrientes para as algas citadas. Já os índices de *S. subspicatus* apresentaram semelhanças com os descritos pelos mesmos.

A variação dos resultados se deve ao fato de se tratar de microrganismos, nos quais a diferença no número de células pode ter sido grande na hora da inoculação. Não havendo meios de se controlar o número de células, pois a inoculação foi feita somente através de volumes, entende-se que possa ter havido uma introdução maior ou menor de células em cada recipiente por esse fator.

6. CONCLUSÕES

Embora não se tenha precisado a quantificação de biomassas de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* cultivadas em efluentes de humanos e de suínos, foi possível verificar que a mesmas alcançaram quantidades suficientes para a obtenção de óleos destinados à obtenção de biodiesel. As concentrações dos efluentes foram determinantes para o bom crescimento das microalgas. O melhor desenvolvimento foi o de *C. vulgaris* em efluentes suínos a 10%, com pico de 537.10^{-4} cél.mL, seguido pelo cultivo de *S. subspicatus* em efluentes humanos a 1%, com o máximo de $288,25.10^{-4}$ cél.mL.

A caracterização físico-química dos efluentes constatou a presença de pequena quantidade de gorduras e graxas totais em ambos os efluentes. Com a comprovação da presença de nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) em quantidade suficiente para o desenvolvimento das microalgas pode-se verificar um crescimento acentuado destas, o suficiente para produzir óleos que possibilitam a fabricação do biodiesel. Entretanto, alguns nutrientes, em quantidade elevada, são fatores limitantes do crescimento das microalgas. Nos efluentes humanos apresentaram concentração de Nitrogênio Kjedal de 38 mgL^{-1} e o de Fósforo de $3,2 \text{ mgL}^{-1}$; nos efluentes suínos, as concentrações foram muito superiores, com o Nitrogênio Kjedal apresentando $4.603,3 \text{ mgL}^{-1}$ e o Fósforo com $6.239,3 \text{ mgL}^{-1}$. Dessa forma, justificou-se a diluição dos efluentes, especialmente os de origem suína, para que os microrganismos pudessem se desenvolver.

Após o tempo de cultivo, verificou-se que a produção de óleos pelas microalgas foi bastante satisfatória, possibilitando a extração para a produção de biodiesel. Tais óleos foram caracterizados e neles foram encontrados vários ácidos graxos que podem compor o biodiesel. Os ácidos graxos produzidos com maiores níveis encontrados foram C16:2 (linoleico), com 35,17% no cultivo de *C. vulgaris* em efluente humano, C20:0 (araquídico), com 37,29% no cultivo de *C. vulgaris* em efluente suíno, C16:1 (palmitoleico), com 28,85% no cultivo de *S. subspicatus* em efluente humano e C15:1 (pentadecanoico), com 55,22% no cultivo de *S. subspicatus* em efluente suíno.

Sendo assim, o efluente e a microalga que mais se mostraram propícios para a produção de biodiesel foram o de humanos e *S. subspicatus*, respectivamente.

Entretanto, os outros cultivos se mostraram bastante promissores, não podendo ser desprezados, merecendo igualmente especial atenção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFY, Abd El-Moneim M. R.; SHALABY, Emad A.; SHANAB, Sanaa M. M. **Enhancement, of biodiesel production from different species of algae**. Gizá, Egito. Out/dez 2010. Disponível em <<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php> > acesso em 18.out 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Estudo sobre as especificações internacionais para os biocombustíveis**. Disponível em <<http://www.anp.gov.br>> acesso em 14.mai 2013.

AGROSTEMIN®. Disponível em <<http://www.agrostemin.com/indexbra.php>> acesso em 25.mai.2013.

ALEJANDRA, Palomino M.; CESAR Estrada F.; JORGE, Lopez G. **Microalgas: Potencial para la produccion de biodiesel**. João Pessoa, PB. 2010. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/item/18289/1/BID-07.pdf>> acesso em 01.out 2010.

ARAÚJO, Francisca Pereira de; PAZ, Gilvan Moreira da; OLIVEIRA, Yáscara Lopes de; LEITE, Cris Hellany da Paixão. **Estudo da Viabilidade de Microalgas para Produção de Biodiesel**. VII CONNEPI. 2012. Tocantins, BR. Disponível em <propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/3289/1216> acesso em 23.jan.2013.

ARAÚJO, Welliton Eduardo Lima de; PASQUALETTO, Antônio. **Utilização de Algas no Tratamento de Efluente Doméstico**. Goiânia, GO. 2005. Disponível em <<http://www.pucgoias.edu.br/ucg/prope/cpgss/ArquivosUpload/36/file/UTILIZA%C3%87%C3%83O%20DE%20ALGAS%20NO%20TRATAMENTO%20DE%20EFLUENTE%20DOM%C3%89STICO.pdf>> acesso em 24.mar 2011.

ARCEO, Ángel Almarales. **Produção de biodiesel mediante o processo de hidro-esterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. Rio de Janeiro, BR. 2012. Disponível em <tpqb.eq.ufrj.br/download/prodcao-de-biodiesel-da-biomassa-das-microalgas.pdf> acesso em 05.set.2013.

BARCZA, Marcos Villela. **Esterificação**. São Paulo, BR. Disponível em <www.dequi.eel.usp.br/~barcza/Esterificação.pdf> acesso em 03.set.2013.

BECKER, E. W. **Micro-algae as a source of protein**. Tübingen, Germany. 23.nov 2006. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>> acesso em 07.nov 2010.

BECKER, E. W. **Microalgae – Biotechnology and Microbiology**. Cambridge, UK. 1995.

BERTOLDI, Fabiano Cleber; SANT'ANNA, Ernani; OLIVEIRA, Jorge Luiz Barcelos; REBELO, Andrey Martinez. **Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris***. Editora UNOESC, Joaçaba, SC. 2007. Disponível em <<https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:lpdDrfPoVcwJ:editora.unoesc.edu.br/index.php/evidencia/article/download/1862/934+&hl=pt-BR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEESiVcuM0guBiRgHrNdShmU04TEWeYPLSWEJyfE1kowDW84xlGhO26WPbAVk5FOZqAAo1pAYuibF2Zkqcy2sXTx2NmggcSQ2S5tjtn7fG0HyPeFTsd4HpfuZJyoFysWTUck7WdgKt&sig=AHIEtbSbO3k4rQtgPt6aEXwfZnN0wJ2JA>> acesso em 06.abr 2013.

BERTOLDI, Fabiano Cleber; SANT'ANNA, Ernani ; OLIVEIRA, Jorge Luiz Barcelos. **Revisão: Biotecnologia de Microalgas**. Curitiba, PR. 2008. Disponível em <ojs.c3sl.ufpr.br/ojs-2.2.4/index.php/alimentos/article/viewFile/11804/8320> acesso em 05. Jun 2013.

BERTOLIN, Tanise Boeira Pelegrini; COSTA, Jorge Alberto Vieira; COLLA, Luciane Maria; BERTOLIN, Telma Elita; HEMKEMEIER, Marcelo. **Produção de Microalga *Spirulina platensis* a Partir de Efluente Suíno Sintético**. Rio Grande/RS. 2003. Disponível em <http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t269.doc> acesso em 27.abr 2013.

Biodiesel Standard; *ASTM D6751*, USA, 2002.

Biodiesel Standard; *ASTM PS 121-99*, USA, 1999.

BIODIESELBR.COM. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel>> acesso em 25.ago.2013.

BLEY JR., Cícero; LIBÂNIO, José Carlos; GALINKIN, Maurício; OLIVEIRA, Mauro Márcio. **Agroenergia da Biomassa Residual: perspectivas energéticas, socioeconômicas e ambientais**. 2ª Ed. Rev. Itaipu Binacional. Foz do Iguaçu/PR e Brasília/DF. 2009.

BORGES, Lucélia; FARIA, Bias Marçal de; ODEBRECHT, Clarisse; ABREU, Paulo C. **Potencial de absorção do dióxido de carbono atmosférico por microalgas utilizadas na aquicultura para a geração de um mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL)**. Rio Grande, RS. Mar 2005. Disponível em <http://bdt.d.furg.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=88> acesso em 21.nov.2010. Brasil.gov.br. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/bioenergia-biomassa>> acesso em 11.mai 2013.

BROWN, Lewis M. **Biodiesel from microalgae: complementarity in a fuel development strategy**. Golden, Colorado, USA. 1993. Disponível em <<http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/5715.pdf>> acesso em 22.fev 2012.

CLEMENTS, D. **Biodiesel Working Group**" in *Proceeding of "Technology for Expanding the Biofuels Industry, April 21-22, 1992, Chicago III"*. U. S. Department of Energy, US Department of Agriculture, Renewable Fuels Association. pp. V-1-V-3.

DANTAS, Danielli Matias M.; DRUMMOND, Ana Rita F.; SANTOS, Leilane B. G. dos; SANTOS, Felipe K. dos; BEZERRA, Ranilson de S.; GÁLVEZ, Alfredo O. **Extração de óleo de microalga utilizando ultrassom com diferentes solventes visando a produção de biodiesel**. João Pessoa, PB. 2010. Disponível em <<http://www.cbmamona.com.br> > acesso em 07.ago 2012.

DEDÊ, M. A. B. **Mecanismo de desenvolvimento limpo de etanol e biodiesel utilizando algas verdes a partir de uma metodologia para macrorredução, educação ambiental e o desenvolvimento sustentável**. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer, vol. 6, n. 9, pág. 9. Goiânia, GO. Disponível em <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2010/mecanismo.pdf>> acesso em 05.nov 2010.

DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício; CARVALHO, Sabrina Matos de; FETT, Roseane. **Microalgas, produtos e aplicações**. Ciência Rural. Santa Maria/RS. 2006. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0103-84782006000600050&script=sci_arttext> acesso em 12.mai.2011.

EMBRAPA Suínos e Aves. 2001. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=59> acesso em 28.abr 2013.

ENCARNAÇÃO, Ana Paula Gama. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação, uma avaliação econômica**. Rio de Janeiro, BR. 2008. Disponível em <<http://www.eq.ufrj.br/sipeq/download/biodiesel-via-trans-e-hidroesterificacao.pdf>> acesso em 03.set.2013.

ENCYCLOPEDIA OF LIFE (EOL). Disponível em <<http://eol.org/pages/908262/overview>> acesso em 15. Jun 2013.

ESTRADA, Cesar A.; NOGUERA, Yanaika C.; LOPEZ, Jorge E. **Desarrollo tecnológico prototipo para la producción de biodiesel a partir de microalgas en sistemas cerrados, como biocombustible de segunda generación**. Arequipa, Peru. 01 a 04.jun 2010. Disponível em <<http://www.laccei.org/>> acesso em 05.nov 2010.

FRANCO, André Luis Custódio; LÔBO, Ivon Pinheiro; CRUZ, Rosenira Serpa. TEIXEIRA, Cláudia Maria Luz Lapa; NETO, José Adolfo de Almeida; MENEZES, Rafael Silva. **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios**. Quím. Nova, vol. 36, nº 3, 437-448, 2013. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000300015&script=sci_arttext> acesso em 25.mai.2013.

GARCIA, Camila Martins. **Transesterificação de óleos vegetais**. Campinas, SP. 2006. Disponível em <biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000386845.pdf> acesso em 03.set.2013.

GUIRY, Michael D. World-wide electronic publication, National University of Ireland. 2013. Galway, IR. Disponível em <www.marinespecies.org/org/aphia.php?p=taxdetails&id=248163> acesso em 06.set.2013.

<<http://verdevida.wordpress.com/2007/08/20/o-que-e-ser-ecologicamente-correto/>> acesso em 29.nov 2010.

HUBER, George W.; IBORRA, Sara; CORMA, Avelino. **Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering**. Valencia, Espanha, 03.fev 2006. Disponível em <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr068360d>> acesso em 07.nov 2010.

ILLMAN, A.M.; SCRAGG, A.H.; SHALES, S.W. **Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium**. Bristol, UK. 03.Jul.2000. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022900002660>> acesso em 05.11 2010.

INNECCO, Renato; VASCONCELOS, Aurilene Araújo; MATTOS, Sérgio Horta. **Efeito Alelopático do extrato de *Agrostemma githago* no cultivo de gergelim BRS Seda no Ceará**. 201-. Disponível em <www.ufc.br> acesso em 06.set.2013.

LEITE, Rogério Cezar de Cerqueira; LEAL, Manoel Régis L. V. **O biocombustível no Brasil**. São Paulo, SP. Jul.2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-33002007000200003&script=sci_arttext&tlng=es> acesso em 25.ago.2013.

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sergio Luis Costa. **Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos**. Quim. Nova, vol. 32, nº 6, Jul.2009. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n6/44.pdf>> acesso em 19.mai 2013.

MACIEL, Jocylaine Nunes. **Assembleias fitoplanctônicas como ferramenta de avaliação da qualidade da água em um braço do reservatório da UHE Itaipu Binacional**. Santo André, SP. Disponível em <<http://pgene.ufabc.edu.br/conteudo/bloco2/publicacoes/Dissertacoes2010/DissertacaoJocylaineMaciel.pdf>> acesso em 10.mai 2013.

MARINHO, Yllana Ferreira; SANTOS Ana Paula Felipe dos; SANTOS, Leilane Bruna Gomes dos; VASCONCELOS, Rebeca Ferreira Lemos; KALAZANS, Nathalia Karolinne Ferreira; NASCIMENTO, Renata Daniela Moura do; DANTAS, Daniela Matias de Macedo; GÁLVEZ, Alfredo Oliveira. **Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel**. 2009. Disponível em

<<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0160-2.pdf>> acesso em 31. Mai 2013.

MARQUES, Marcelo Volpato; NACIUK, Fabrício Fredo; MELLO, Ana Maria de Souza; SEIBEL, Nair Maria; FONTOURA, Luiz Antonio Mazzini. **Determinação do teor de ésteres graxos em biodiesel metílico de soja por cromatografia gasosa utilizando oleato de etila como padrão interno.** *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 4, 978-980, 2010.

MEINERZ, Lisandra Isabel. **Influência da temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos (N e P) no cultivo de microalgas de água estuarina e costeira.** Rio Grande, RS. Fev 2007. Disponível em http://bdtd.furg.br/tdc_arquivos > acesso em 18.out 2010.

METCALFE, L. D., SCHMITZ, A. A., PELKA, J. R. **Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis.** Washington, DC, EUA. Disponível em <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60235a044>> acesso em 29.abr 2013.

MORITA, M.; WATANABE Y.; SAIKI, H. **Instruction of microalgal biomass production for practically higher photosynthetic performance using a photobioreactor.** Chiba, Japão. Set 2001. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science>> acesso em 18.nov 2010.

NASCIMENTO, Iracema Andrade; PEREIRA, Solange Andrade; LEITE, Maria Bernadete Neiva Lemos; SANTOS, Jacson Nunes dos; NASCIMENTO, Tiago Pereira do; NASCIMENTO, Maurício Andrade; NETO, José Baía Coelho; SOUSA, Clarivaldo Santos de. **Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: importância no cenário atual, principais entraves e resultados promissores na Bahia.** Dez 2009. DIÁLOGOS & CIÊNCIA – Revista da Rede de Ensino FTC. Disponível em <<http://dialogos.ftc.br>> acesso em 01.out 2010.

NASCIMENTO, Renata Daniela Moura do; SANTOS, Ana Paula Felipe dos; MARI-NHO, Yllana Ferreira; DANTAS, Danielli Matias de Macedo; GÁLVEZ, Alfredo Oliveira. **Avaliação de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* através de diferentes formulações no seu cultivo,** acesso em 21.set 2010.

OHSE, Silvana; DERNER Roberto Bianchini; OZÓRIO, Renata Ávila; BRAGA, Maurício Vilela da Costa; CUNHA, Paulo; LAMARCA, Claudia Pavan; SANTOS, Márcia Estevão **Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário.** *Revista Biotemas*, 21 (2). 2008. Disponível em <<http://journal.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/2175-7925.2008v21n2p7/18899>> acesso em 16. Jun 2013.

OHSE, Silvana; DERNER, Roberto Bianchini; OZÓRIO, Renata Ávila; CUNHA, Paulo César Roberto; LAMARCA, Claudia Pavan; SANTOS, Márcia Estevão; MENDES, Leonardo Brantes Bacellar. **Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas.** Flo-

rianópolis, SC. *INSULA*, nº 36, 39-74. 2007. Disponível em <<http://www.journal.ufsc.br/index.php/insula/article/viewArticle/15121>> acesso em 16.mai 2011.

OLIVEIRA, Flavia C. da C.; SUAREZ, Paulo A. Z.; SANTOS, Wildson Luiz Pereira. **Biodiesel: Possibilidades e Desafios**. 2007. *Química Nova na Escola*. Nº 8. Disponível em <qnesc.sbq.org.br/online/qnesc28/02-QS-1707.pdf> acesso em 08.set.2013.

PAULILLO, Luis Cesar Maffei Sartini; JATOBÁ, Fabiano Henrique Peixinho; CECHINEL, Cleber André. **Biodiesel: Eficiência energética e impacto ambiental**. 23.jun 2010. Disponível em <<http://www.gestaouniversitaria.com.br/edicoes/217-229/23052-biodiesel-eficiencia-energetica-e-impacto-ambiental.html>>, acesso em 10.out 2010.

PERDOMO, Carlos Cláudio; LIMA, Gustavo J. M. M.; NONES, Kátia. **Produção de suínos e meio ambiente**, Abr.2001. Gramado, RS. 9º Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura. Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0104_perdomo.pdf>, acesso em 27.abr 2013.

PEREIRA, Claudio M. P.; HOBUSS, Cristiane B.; MACIEL, Juliana Villela; FERREIRA, Lizângela R.; DEL PINO, Francisco B.; MESKO, Márcia F. **Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas**, *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 10, 2013-2018, 2012.

PEREIRA FILHO, Silvio Mario; CUNHA, Maristela C. C.; DRUMMOND, Ana Rita F.; DANTAS, Danielli M. M.; GÁLVEZ, Alfredo O. **Matéria-prima do Biodiesel com Curto Tempo de Coleta: Microalga (*Scenedesmus subspicatus*)**. Pernambuco, BR. 2010. Disponível em <<http://www.apcagronomica.org.br/seminario2010/POSTERES/II%20BIODIESEL%20-%20Trabalho%2011.pdf>> acesso em 14.jun.2013.

PÉREZ, Homero E. Bañados. **Biodiesel de Microalgas**. São Paulo, SP. 06.mai 2007. Disponível em <<http://www.ipen.br>> acesso em 06.nov 2010.

PUPO, Marília M. de S.; ALMEIDA, André R.; MAIA, Wendel A.; RAMOS, André L. D. **Produção de biodiesel via hidroesterificação utilizando catalisadores ácidos**. Sergipe, BR. Disponível em <<https://www.sigaa.ufs.br/sigaa/verProducao?idProducao=52504&key>> acesso em 03.set.2013.

RADMANN, Elisangela Martha; COSTA, Jorge Alberto Vieira. **Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO**. *Quím. Nova*, vol. 31, nº 7, 1609-1612, 2008. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n7/v31n7a02.pdf>> acesso em 06.abr.2013.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRISCH, A. S.; CORDEIRO, C. S. **Tecnologias de produção de biodiesel**. Virtual Química, nº 3, 385-405. 2011. Disponível em <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/190/191>> acesso em 03.set.2013.

REVISTA BIODIESELBR, Ano I, nº 6 – Ago/Set, p. 36 a 41.

RIBEIRO, José Tarcísio. **Subprodutos da desinfecção de efluentes de Estações de Tratamento de Esgotos Sanitários**. 1997. São Paulo, SP. Disponível em <<http://bt.fatecsp.br/system/articles/73/original/04josetarcisio.pdf>> acesso em 16. Jun 2013.

RICHMOND, Amos; CHENG-WU, Zhang; ZARMI, Yair. **Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition**. Israel, 2003. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science>> acesso em 05.nov 2010.

RINALDI, Roberto; GARCIA, Camila; MARCINIUK, Letícia Ledo; ROSSI, Adriana Vitorino; SCHUCHARDT, Ulf. **Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experiment para laboratório de química geral**. Quím. Nova, vol. 30, nº 5, 1374-1380. 2007. Disponível em <www.scielo.br/pdf/qn/v30n5/a54v30n5.pdf> acesso em 08.set.2013.

SANTOS, Mateus Sales dos; RIBEIRO, Flávio de Miranda. **Tratamento de Efluentes em indústrias de cervejas e refrigerantes**. CETESB. Biblioteca, SP, Brasil, 2005, disponível em <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFCQAF/tratamento-efluentes-industrias-cervejas-refrigerantes>, acesso em 07.nov 2012.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. **Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor**. Frenchay, UK. 29.jan 2002. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science>> acesso em 05.nov 2010.

SILVA, Christian Luiz da; BASSI, Nádia Solange Schmidt. **Análise dos impactos ambientais no Oeste Catarinense e das tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves**. Set.2012. Belém, PA. Disponível em <<http://www.anppas.org.br/encontro6/anais/ARQUIVOS/GT7-946-803-20120621110037.pdf>> acesso em 27.abr 2013.

TEIXEIRA, Cláudia Maria; MORALES, Maria Elizabeth. **Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2006. Disponível em <www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf> acesso em 01.out 2010.

UOL – Seção Rural Centro. Ed. de 27/04/2013. Disponível em <<http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/producao-de-suinos-no-brasil-vai-crescer-22-56426>> acesso em 28.abr 2013.

USINA ECOELÉTRICA. Disponível em <<http://www.dee.feis.unesp.br/usinaecoeletrica/index.php/biomassa>> acesso em 11.mai 2013.

VIÊGAS, Carolina Vieira, **Extração e caracterização de lipídios da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. em <www.argo.furg.br//tde_arquivos/17/TDE-2011-08.10T161759Z-303/Publico/DissertacaoFINALpdf> acesso em 05.jun.2013.

VISENTAINER, Jesuí; FRANCO, Maria Regina. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: Identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006.

WALKER, Tara L., PURTON, Saul, BECKER, Douglas K., COLLET, C. **Microalgae as bioreactors**, 2005. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136314> acesso em 05.nov.2010.

WIJFFELS René H.; BARBOSA Maria J. **An Outlook on Microalgal Biofuels**. Disponível em <algalbiofuels.pbworks.com/f/science-2010-wijffels-796-9.pdf> acesso em 05.jun 2013.

.WISEGEEK. Disponível em <<http://www.wisegeek.com/what-is-chlorella-vulgaris.htm>> acesso em 15.jun 2013.