



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS

QUÍMICA E BIOLÓGICA

**LODO DE ESGOTO DA ETE SAMAMBAIA E *Chlorella*
sp. COMO MATÉRIAS PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

David Mark Mendes Pinho

Orientador: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

Brasília-DF

2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E BIOLÓGICA

**LODO DE ESGOTO DA ETE SAMAMBAIA E *Chlorella*
sp. COMO MATÉRIAS PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE
BIODIESEL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de doutor.

David Mark Mendes Pinho

Orientador: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez

Brasília-DF

2017

Folha de Aprovação

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese do (a) aluno (a) **David Mark Mendes Pinho**, matrícula nº **14/0106588**, intitulada **“LODO DE ESGOTO DA ETE SAMAMBAIA E *Chlorella sp.* COMO MATÉRIA PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL”**, apresentada no (a) Auditório CDT da Universidade de Brasília (UnB) em 5 de julho de 2017.

Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof. Dr. Fábio Moreira da Silva
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Melquizedeque Bento Alves
Membro Titular (ANA)

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues dos Santos
Membro Titular (UNIP)

Prof^a. Dra. Maria Beatriz Pereira Mangas
Membro Suplente (UCB)

Em 5 de julho de 2017.

“O que é você no universo”

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que fizeram parte diretamente e indiretamente do meu trabalho. Além disso, gostaria de agradecer individualmente a minha família: Mãe e irmãos; minha namorada; galera do Riacho; Aos amigos do LMC; Meus alunos de iniciação científica; Amigos da Química Geral; Amigos da Geologia; Amigos da UnB; Ao meu orientador; A banca examinadora.

Gostaria de agradecer a Caesb, aos servidores envolvidos na nossa visita a estação, e pela doação da matéria prima utilizada no nosso trabalho.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha vida de todas as formas, seja colaborando com meu trabalho ou com uma breve conversa. Pois somos aquilo que vivemos, não chegaria até onde cheguei sem a presença de todos.

Resumo

Na última década, tem crescido as pesquisas que estudam as microalgas como fonte potencial de lipídios para a produção de biodiesel. Neste trabalho, estudou-se o potencial de lodo da lagoa de alta taxa do tratamento de esgoto urbano, composto principalmente por *Chlorella* sp., como fonte de óleo para produção de biodiesel. O potencial de crescimento da *Chlorella* sp. em fotobiorreactor em condições controladas também foi investigado. Foi observado em ambos os casos baixo teor lipídico (Max. 3%). A composição de ambos os óleos mostrou alta quantidade de ácidos graxos e também outros lipídios diferentes de ácido graxo. Foram determinadas a densidade e viscosidade do biodiesel produzido do óleo de biossólido, e os resultados mostraram que essas propriedades físico-químicas não correspondem às especificações exigidas para o biodiesel. Os resultados mostraram que o lodo de esgoto da estação de tratamento de Samambaia (DF, Brasil) e *Chlorella* sp. cultivados nas condições descritas neste trabalho, não são fontes potenciais de material graxo para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Biodiesel / Lodo de Esgoto / *Chlorella* sp.

Abstract

In the last decade, the research works on microbial as a potential source of lipid for biodiesel production have been growing. In this work, the potential of a sludge from high-rate lagoons in urban sewage treatment, composed mainly by *Chlorella* sp., as oil source for biodiesel production, was studied. The potential of *Chlorella* sp. growth in photobioreactor under controlled conditions was also investigated. Low lipid content (up to 3%) was observed in both cases. A composition of both glasses showed high amounts of fatty acids and also other lipids other than fatty acid. Density and viscosity of biodiesel from biosolid oil were determined and the results showed that these physico-chemical properties do not match the specification required for biodiesel. The results showed that sewage sludge from Samambaia treatment station (DF, Brazil) and *Chlorella* sp. cultivated under the conditions described in this work are not potential sources of fatty material for biodiesel production.

Keywords: Biodiesel / Sludge Sewage / *Chlorella* sp.

Produção técnica e científica ao longo do doutorado (2014-2017)

Trabalhos gerados a partir desta tese:

Pinho D. M. M.; Oliveira R. S.; Santos V. M. L. dos; Marques W. F.; Pinto A. C.; Rezende M. J. C.; Suarez P. A. Z. Evaluating the potential of biodiesel production through microalgae farming in photobioreactor and high rate ponds from wastewater treatment. **J. Braz. Chem. Soc.**, *aceito para publicação*. dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170097.

Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z. Do óleo de amendoim ao biodiesel- Histórico e política Brasileira para o uso energético de óleos e gorduras. **Rev. Virtual Quim.**, Vol. 9, n. 1, p. 39-51, 2017.

Trabalhos paralelos publicados ao longo do doutorado:

Organização de Livro:

Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z. (Orgs.) Armazenagem e uso de biodiesel: problemas associados e formas de controle. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico- CDT, UnB, 2016. ISBN 978-85-93309-02-1

Capítulo de livro:

Pinho D. M. M.; Suarez P. A. Z.; Meneghetti S. M. P.; Rangel E. T. Capítulo 1: Problemas de formação de borras durante a estocagem verificados após a obrigatoriedade do biodiesel e as possíveis causas. Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z. (Orgs.). Armazenagem e uso de biodiesel: problemas associados e formas de controle. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico- CDT, UnB, 2016. p. 12-26.

Pinho D. M. M.; Suarez P. A. Z.; Rangel E. T. Capítulo 6: Modificação química de biodiesel para aumentar a sua estabilidade química. Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z. (Orgs.). Armazenagem e uso de biodiesel: problemas associados e formas de controle. Brasília: Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico- CDT, UnB, 2016. p. 176-188.

Andrade, D. F.; Davila, L. A.; Suarez, P. A. Z.; Pinho, D. M. M.; Miranda, J. L. Capítulo 5: Análise da Qualidade do Biodiesel. Miranda, J. L. de; Moura, L. C. de (Orgs.). BOA-Biodiesel: Obtenção e Análise de Qualidade. Rio de Janeiro: Publit Soluções Editoriais, 2016. p. 144-178.

Artigos:

da Silva, F. M.; Pinho, D. M. M.; Houg, G. P.; Reis, I. B. A.; Kawamura, M.; Quemel, M. S. R.; Montes, P. R.; Suarez, P. A. Z. Continuous biodiesel production using a fixed-bed Lewis-based catalytic system. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 92, p. 1463-1469, 2014.

Pinho, D. M. M.; Santos Jr, V. O.; Santos V. M. L. dos; Oliveira M. C. S.; Silva M. T. da; Piza P. G. T.; Pinto A. C.; Rezende M. J. C.; Suarez P. A. Z. Evaluating the use of EN 14078 for determination of biodiesel in diesel blends sold in the Brazilian market. **Fuel**, Vol. 136, p. 136-142, 2014.

Consultoria:

Pinho D. M. M.; Suarez P. A. Z. Caracterização físico-química de óleo diesel visando investigar adulteração. 2016.

Pinho D. M. M.; Suarez P. A. Z. Desenvolvimento de aditivo para trabalhar o asfalto a frio. 2015.

Pinho D. M. M.; Suarez P. A. Z. Laudo sobre derramamento de óleo no Lago Paranoá. 2014.

Entrevistas/programas:

PINHO, D. M. M.; SANTANA, R. O. Meio ambiente por inteiro- Algas: Programa de TV [10 dez 2016]. Disponível em: < https://www.youtube.com/watch?v=GI-ur_T9kW4>.

PINHO, D. M. M. Derramamento de óleo no lago Paranoá: Entrevista [20 fev 2014]. Disponível em: < https://www.youtube.com/watch?v=7oP_vUI3I5A>.

Sumário

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	14
1.1- Introdução.....	15
1.2- Objetivo.....	16
1.2.1- Objetivos específicos.....	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2- Revisão Bibliográfica.....	18
2.1- Biocombustíveis e a questão do biodiesel.....	18
2.2- Microalgas.....	21
2.2.1- <i>Chlorella</i> sp.	23
2.3- Necessidade do tratamento de efluentes.....	24
2.4- Uso de microalgas no processo de tratamento de esgoto.....	26
2.4.1- Produção de biomassa do processo de tratamento de esgoto e destinação final.....	27
2.5- Biodiesel.....	29
2.6- Uso de microalgas para a produção de biodiesel.....	31
2.7- Estabilidade x Fluidez.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3- Material e Métodos.....	37
3.1- Geral.....	37
3.1.1- Reagentes.....	37
3.1.2- Amostra de lodo de esgoto.....	37
3.2- Procedimentos experimentais.....	38
3.2.1- Secagem do lodo de esgoto.....	38
3.2.2- Estudo da fração orgânica do bio sólido.....	38
3.2.3- Extração dos lipídios presentes na biomassa de <i>Chlorella</i> sp. e bio sólido.....	38

3.2.4- Produção do biodiesel de biossólido	39
3.2.5- Cultivo da microalga <i>Chlorella</i> sp.	39
3.2.6- Contagem celular da <i>Chlorella</i> sp.	42
3.2.7- Capacidade calorífica	43
3.3- Técnicas de análise	43
3.3.2- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	43
3.3.3- Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)	43
3.3.4- Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)	43
3.3.5- Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas no modo de aquisição monitoramento seletivo de íons (CG-EM- MSI)	44
3.3.6- Densidade e viscosidade	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4- Resultados e Discussão	47
4.1- Produção de biodiesel de lodo de esgoto	47
4.1.1- Caracterização do Lodo de Esgoto	47
4.1.2- Produção de Biodiesel	51
4.2- Produção de biodiesel de óleo de <i>Chlorella</i> sp.	55
4.2.1- Cultivo das microalgas	55
4.2.2- Caracterização do material obtido de <i>Chlorella</i> sp.	56
4.3- Composição química do biodiesel de biossólido e <i>Chlorella</i> sp.	57
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	63
5- Conclusões e Perspectivas	64
REFERÊNCIAS	66
6- Referências	67

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

ANP- Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS- American Oil Chemists' Society
ATR- attenuated total reflectance
ASTM- American Society for Testing and Materials
CAESB- Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal
CG-EM-MSI- Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de Massas no modo de aquisição monitoramento seletivo de íons
CDCl₃- Clorofórmio deuterado
CO₂- Dióxido de carbono
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
EPE- Empresa de Pesquisa Energética
ETE- Estação de Tratamento de Esgoto
EUA- Estados Unidos da América
FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP-OES- Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente
IV- Espectro de Infravermelho
KOH- Hidróxido de potássio
MME- Ministério de Minas e Energia
P.E.- Ponto de ebulição
PNPB- Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
PNSB- Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
ppm- partes por milhão
RMN- Ressonância Magnética Nuclear

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtividade de algumas matérias-primas que podem ser empregadas na produção de biodiesel. ^{10,11,}	22
Tabela 2: Conteúdo em óleo de algumas espécies de microalgas. ^{10,11}	23
Tabela 3: Meio de cultivo BG-11 (adaptado de 34).	41
Tabela 4: Quantidade de solução estoque adicionada ao fotobiorreator por volume final (L) de meio de cultivo.	41
Tabela 5: Resultados da análise de ICP-OES.	49
Tabela 6: Porcentagem de material lipídico extraído ao longo das lavagens com diclorometano em ultrassom.....	50
Tabela 7: Densidade e viscosidade do óleo de biossólido ao longo das etapas de produção de biodiesel.	55
Tabela 8: Picos identificados da análise de CG/MS do biodiesel do óleo de biossólido e <i>Chlorella</i> sp.....	58
Tabela 9: Ésteres metílicos presentes no biodiesel de lodo de esgoto e <i>Chlorella</i> sp.	60
Tabela 10: Porcentagem de área dos principais ésteres do biodiesel de soja e sua comparação com o biodiesel de óleo de biossólido.	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Projeção da demanda mundial de biodiesel e etanol em 2024 segundo a EPE-2015. ⁵	19
Figura 2: Consumo final de energia no Brasil por fonte em 2015 segundo o MME. ⁷	20
Figura 3: Foto panorâmica da empresa Cyanotech. ⁹	21
Figura 4: Etapas do processo de tratamento da ETE.....	26
Figura 5: Ciclo biológico que ocorre na lagoa de alta taxa.	27
Figura 6: Reação de transesterificação.	30
Figura 7: Reação de esterificação.	30
Figura 8: Fluxograma da produção de biodiesel a partir de algas.....	32
Figura 9: Estrutura básica do triacilglicerídeo e alguns ácidos graxos.	33
Figura 10: Relação das insaturações com a estabilidade e fluidez, onde quanto mais insaturado menor a estabilidade e maior a fluidez para os óleos e o contrário para as gorduras. ³⁴	35
Figura 11: Fotobiorreator utilizado no cultivo da microalga <i>Chlorella</i> sp.	40
Figura 12: Laminas contendo as algas <i>Chlorella</i> sp. (a) e lodo de esgoto (b). 47	
Figura 13: Fotografia do lodo de esgoto coletado na ETE Samambaia.	48
Figura 14: Espectro de IV-ATR do óleo de biossólido.....	50
Figura 15: Espectro de RMN-600 ¹ H (CDCl ₃) do óleo de lodo de esgoto.....	51
Figura 16: Espectro de IV-ATR do óleo de lodo de esgoto (vermelho) e do óleo acidificado (preto).....	52
Figura 17: Espectro de IV-ATR do ácido graxo (espectro azul) e do produto da esterificação (espectro preto).....	53
Figura 18: Espectro de RMN-600 ¹ H (CDCl ₃) do biodiesel produzido a partir do óleo de lodo de esgoto.	54
Figura 19: Curvas de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. nas três condições de cultivo testadas: BG-11 Padrão, BG-11 modificado (BG-11 CN) e BG-11 modificado sem nitrogênio (BG-11 SN).....	56

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1- Introdução

Ao longo da existência humana alguns marcos históricos na ciência e tecnologia merecem especial destaque, dentre eles temos a primeira revolução industrial, que criou novas formas de produção. Outro exemplo importante é a segunda revolução industrial, que é conhecida como revolução das máquinas, que permitiu a mecanização rural. Atualmente pode se considerar que está acontecendo a terceira grande revolução industrial, que é a revolução da sustentabilidade, que consiste na produção e uso de insumos, como os combustíveis, utilizando fontes renováveis.

Esta necessidade surgiu ao relacionar as alterações climáticas com a queima descontrolada e inconsequente dos combustíveis fósseis, e também por um possível risco de desabastecimento de petróleo. Para contornar esta situação, o Brasil tem investido em tecnologias renováveis, podendo ser produzidas inclusive de fontes residuais.

No caso do tratamento de esgotos, um dos sistemas utilizados atualmente emprega o uso de lagoas de alta taxa. As lagoas de alta taxa fazem uso de micro-organismos como algas e bactérias para retirar da água nutrientes e matéria orgânica, sendo depois separados por processos que podem ser químicos ou físicos. O resultado disso são milhares de toneladas anuais de biomassa gerada nessas lagoas e que não possuem destino certo, sendo atualmente incineradas ou levadas a aterros sanitários. Usualmente, essa biomassa é conhecida como lodo de esgoto, uma terminologia genérica para este resíduo do tratamento de efluentes.

Algumas soluções políticas para a destinação adequada dos resíduos sólidos é apresentada pela Política Nacional de Resíduos Sólidos, que descreve a necessidade da adequada disposição de tais resíduos, fazendo uso de medidas como reutilização, reciclagem, tratamento e adequada destinação final. A partir desta linha, algumas soluções aplicáveis para o lodo de esgoto podem ser encontradas, uma delas é apresentada pela resolução CONAMA nº 375 de 2006, que apresenta os parâmetros químicos e biológicos necessários que autoriza o uso do lodo de esgoto para o uso agrícola. Porém, como o lodo de esgoto é um resíduo com composição variável em função de vários fatores como clima e região, deve-se sempre caracterizá-lo antes de usá-lo para este

fim, principalmente para determinar a presença de contaminantes químicos e biológicos. De fato, é comum a presença de metais pesados, compostos químicos tóxicos resistentes e micro-organismos patogênicos.

As microalgas são sem dúvida uma atrativa opção biológica quando se fala na captura e conversão de CO₂ em energia, além do seu uso industrial na captura de nutrientes de águas residuais. Uma das poucas microalgas com licença para cultivo para fins alimentícios são as da família *Chlorella*, que podem alcançar até aproximadamente 50 % do seu peso seco em lipídios, sendo um belo atrativo para seu uso na produção de biodiesel.¹

Tendo em vista que, segundo relatos da literatura, algumas microalgas podem conter até 77 % de lipídios, e que o lodo de esgoto obtido das lagoas de alta taxa é um resíduo a ser descartado, e sua composição é principalmente composto de microalgas, uma alternativa é sua utilização como insumo para a produção de biodiesel. Para se ter uma idéia, em 2014 foram produzidos 3,42 bilhões de litros de biodiesel.² Além disso, vale lembrar que a maior vantagem do uso do lodo de esgoto na produção de biodiesel é a eliminação de uma das etapas da cadeia de produção deste combustível, que é a produção da matéria prima, pois o lodo de esgoto é um resíduo produzido diariamente, sendo esta forma, uma alternativa para agregar valor a este resíduo.

1.2- Objetivo

O presente trabalho tem como objetivos principais o desenvolvimento de uma tecnologia que permita o uso do lodo de esgoto, produzido nas ETE's, como insumo na produção de biodiesel, e comparar seu potencial frente a alga *Chlorella* sp.

1.2.1- Objetivos específicos

- Avaliar o lodo de esgoto como matéria prima na produção de biodiesel;
- Produzir e caracterizar o biodiesel de lodo de esgoto;
- Avaliar o potencial da alga *Chlorella* sp. como matéria prima na produção de biodiesel.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Biocombustíveis e a questão do biodiesel

A utilização de biocombustíveis vem desde os primórdios da existência humana, desde que o homem passou a dominar o fogo utilizando a madeira como combustível. Mas devido a grande abundância de petróleo e baixo preço, é recente a necessidade do uso de biocombustíveis. A necessidade surgiu em meados da década de 1970, quando turbulências políticas e civis no oriente médio, provocaram o primeiro choque do petróleo.³ Nesse momento, fica evidenciado no Brasil a fragilidade energética e dependência do petróleo do oriente médio. Na mesma época, o país criou o Pró-Alcool, passando a produzir etanol a partir da cana de açúcar em substituição aos combustíveis derivados de petróleo, reduzindo sua dependência do petróleo e fazendo uso de combustíveis renováveis.⁴

Além de problemas relacionados com a crise do petróleo, existe também a crescente preocupação relacionada às questões ambientais, especialmente no que diz respeito ao aquecimento global e mudanças climáticas. Tendo isso em mente, as energias renováveis estão cada vez mais presentes na matriz energética do país. O Plano Decenal de Expansão de Energia lançado em 2015 pela Empresa de Pesquisa Energética- EPE mostra a projeção da demanda nacional, internacional e total de biocombustíveis como etanol e biodiesel para 2024 seguindo a tendência atual, conforme gráfico da Figura 1.⁵

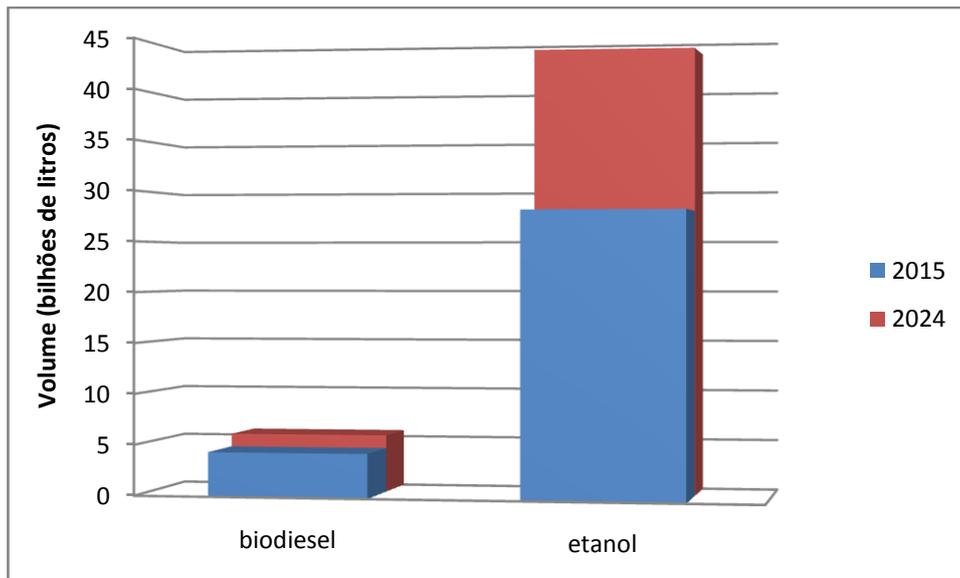


Figura 1: Projeção da demanda mundial de biodiesel e etanol em 2024 segundo a EPE-2015. ⁵

Observando os valores apresentados na Figura 1, e com base nos dados disponíveis no relatório, calcula-se que a projeção da demanda desses dois biocombustíveis em 2024, considerando o cenário atual, aumente em 21,5% para o biodiesel e 36,4% para o etanol. Vale ressaltar que o relatório estima o aumento considerando que o percentual mandatório em 2024 da adição de biodiesel ao diesel permaneça em 7 %vol, mas sabe-se que segundo a lei nº 13.263 de 23 de março de 2016 esse aumento estará em no mínimo em 10%vol já em 2019!

Para que essa demanda seja suprida, é necessária, além de aumento na produção por hectare das matérias primas, a necessidade de expansão da fronteira agrícola, pois esses dois biocombustíveis são produzidos principalmente de cana de açúcar e soja.

Outra questão abordada quando se fala em biocombustíveis é a questão alimentícia, isso sempre gera polêmica, pois é defendido por muitos que existe a possibilidade de uma possível competição por matéria-prima entre os alimentos e biocombustíveis. Provavelmente, isso não ocorra de forma direta em uma disputa por terras, pois ainda existem milhões de terras agricultáveis no país, mas talvez tal competição venha a ser por água e insumos agrícolas como fertilizantes. ⁶ O cenário atual dos biocombustíveis no país segundo dados do último relatório do Ministério de Minas e Energia (MME) lançado em 2016, mostra que 41,2% de toda energia consumida no país advém de fontes

renováveis, enquanto a média mundial em 2013 é de apenas 13,5%.⁷ Além disso, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 2, 19% de toda energia consumida no país é a partir do óleo diesel, mostrando a importância do biodiesel no mercado nacional.

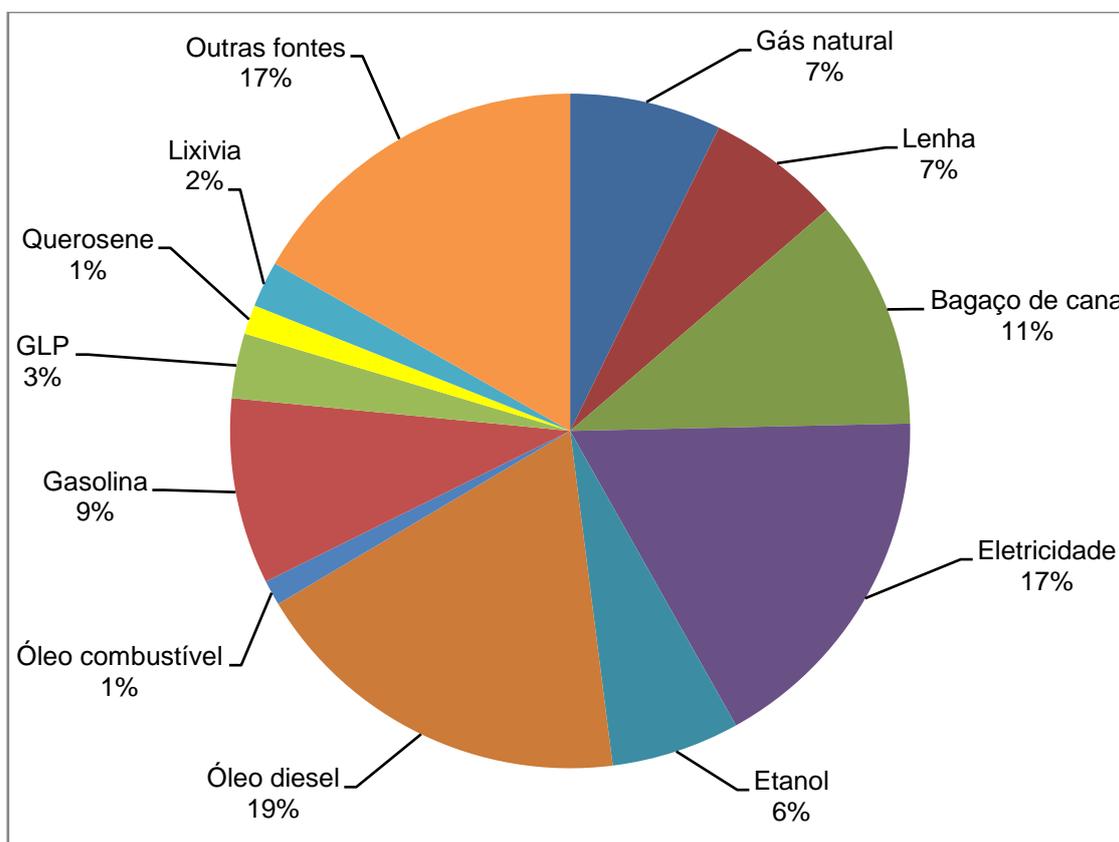


Figura 2: Consumo final de energia no Brasil por fonte em 2015 segundo o MME.⁷

Um fato a ser analisado quando se fala em biodiesel, está relacionado às matérias-primas utilizadas em sua produção. Mensalmente é lançado no portal da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o Boletim Mensal do Biodiesel, onde é possível verificar as matérias primas utilizadas na produção de biodiesel naquele respectivo mês. Com base nesses dados, é possível verificar que cerca de 75% de todo biodiesel produzido no país advém do óleo de soja, sendo outros 15% produzido a partir do sebo bovino e outros 10% divididos em uma gama de matérias-primas, passando por óleo de fritura usado, gordura de porco e frango, algodão, palma, nabo forrageiro, girassol, amendoim, sésamo e canola. Fora dessa gama de matérias-primas, cada vez mais tem se intensificado as pesquisas com

matérias primas alternativas, tais como microalgas, lodo de esgoto e outros resíduos industriais e urbanos.

2.2- Microalgas

Tendo em vista a problemática das matérias primas para a produção dos biocombustíveis, uma fonte em especial vem ganhando atenção: as microalgas. Isso tem ocorrido devido suas vantagens frente aos atuais problemas enfrentados pela agroenergia. Dentre suas vantagens genéticas, podemos citar o ciclo rápido de cultivo; pode dobrar sua biomassa em questão de dias; não trabalha em regime de safra; e possuem espécies que podem produzir grandes quantidades de óleo.⁸

O cultivo das microalgas pode ser realizado em sistemas abertos, pelo uso de lagoas ou fechado utilizando fotobiorreatores, e requer para seu cultivo apenas CO₂, água, luz e nutrientes como fósforo e nitrogênio. O recolhimento da biomassa pode ser realizado diariamente, dependendo do processo de produção utilizado.

Existem plantas industriais que comercializam biomassa de microalgas. Um exemplo é a Cyanotech localizada no Havaí-EUA que vende a biomassa na forma de suplemento alimentar. A foto apresentada na Figura 3 mostra uma visão panorâmica da Cyanotech, sendo possível observar seus imensos tanques tubulares pelo Google Maps, bastando verificar as coordenadas: 19.730819, -156.054000.



Figura 3: Foto panorâmica da empresa Cyanotech.⁹

Isso mostra que as microalgas já são bem conhecidas pela indústria, e além da sua utilização na forma de alimento, as microalgas também são bastante exploradas nas indústrias cosméticas e farmacêuticas. Pensando nessa linha, a produção de biodiesel a partir das microalgas pode trazer algumas vantagens frente à cultura tradicional, dentre elas podem ser citadas:⁸

- Não requer terras férteis, deixando praticamente ilimitado o local de cultivo;
- Não compete com os alimentos, uma vez que não requer desmatamento e permite a verticalização do cultivo;
- Não necessita de pesticidas, que é um dos grandes vilões do agronegócio;
- Consome menos água, podendo ser utilizadas águas residuais;
- Possui maior rendimento em óleo por hectare que cultivos agrícolas por possuir um período curto de coleta.

O rendimento em óleo conforme dados na literatura que apresentam estimativas de produção até milhares de vezes maior que a produção da soja como pode ser observado na Tabela 1, que apresenta a produtividade de óleo em L/há de algumas matérias primas utilizáveis na produção de biodiesel.

Tabela 1: Produtividade de algumas matérias-primas que podem ser empregadas na produção de biodiesel.^{10,11}

Fonte de biodiesel	Produtividade óleo (L/há)
Mamona	806
Pinhão manso	1892
Milho	172
Soja	446
Canola	1190
Côco	2689
Palma	5950
Microalga	58700

Fato interessante de ser observado é que não se encontra óleo de microalgas no mercado, isso propõe uma inconsistência, porque com a alta produtividade em óleo apresentada na Tabela 1, o alto valor nutricional deste

óleo, apenas é possível encontrar no mercado a biomassa seca. Conseqüentemente, apesar das vantagens o biodiesel de microalgas ainda não é produzido em escala industrial. Isso acontece porque as microalgas necessitam de uma cadeia de produção voltada para o biodiesel. Outro fator está relacionado às espécies, pois não são todas que produzem óleo. Além disso, problemas com o controle de invasões podem acontecer, onde a contaminação e proliferação de cepas de espécies menos sensíveis ao meio pode eliminar a de interesse. Na Tabela 2 podem ser observadas algumas das espécies produtoras de óleo bem como seu conteúdo em óleo.

Tabela 2: Conteúdo em óleo de algumas espécies de microalgas.^{10,11}

Microalga	Conteúdo de óleo (% do peso seco)	Microalga	Conteúdo de óleo (% do peso seco)
<i>Botrycoccus braunii</i>	25-75	<i>Neochlorisole oabundans</i>	35-54
<i>Chlorella sp.</i>	28-32	<i>Nitzschia sp.</i>	16-47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-58	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Crypthecondinium cohnii</i>	20	<i>Porphiridium cruentum</i>	9-19
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Dunaliella primolecta</i>	23	<i>Scenedesmus sp.</i>	20-21
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	17-71	<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Euglena gracilis</i>	14-20	<i>Spirulina máxima</i>	4-9
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33	<i>Spirulina platensis</i>	4-16
<i>Monallanthus salina</i>	>20	<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
<i>Nannochloris sp.</i>	20-35	<i>Tetraselmis sp.</i>	13-15
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68		

2.2.1- *Chlorella sp.*

Dentre as microalgas mais cultivadas pelo mundo, está a *Chlorella sp.*, que é unicelular, tem seu valor nutricional conhecido, é aceito no mercado consumidor e de fácil escalonamento de produção. Além disso, o seu cultivo é bastante simples e praticamente não se observa invasões de outras cepas,

uma vez que possui diversas vantagens competitivas frente à microorganismos e possuindo, assim, uma tendência natural a dominar o ambiente em que se encontra. Além disso, *Chlorella* sp. é uma das poucas microalgas que tem registro de comercialização no Brasil.¹²

A *Chlorella* é estudada há muito tempo, sendo produzida por mais de 70 indústrias espalhadas pelo mundo. Sua produção é dedicada ao consumo humano, além disso, sua produção mundial chega a mais de 2.000 t por ano.¹³

2.3- Necessidade do tratamento de efluentes

Com o crescimento exponencial da população do país, em certas situações como no caso dos grandes centros urbanos, os dejetos lançados diretamente nos leitos dos rios causam sérios danos ao meio ambiente. Em países como o Brasil, onde existem deficiências crônicas de gestão, até hoje é possível encontrar esgoto sendo lançado diretamente nos afluentes. Em longo prazo, devido à concentração e quantidade de material lançado, situações catastróficas são geradas. Existem vários exemplos de rios onde a concentração de dejetos eliminou a vida ali existente, e também tornou inviável o uso do próprio afluente pelas próprias pessoas que o contaminaram. Um exemplo disso é o Rio Tiete localizado em São Paulo, onde a poluição é tamanha, que nos pontos mais poluídos o mau cheiro pode ser sentido a quilômetros de distância.

Isso ocorre porque neste caso, a própria natureza não consegue recuperar o rio na mesma velocidade em que os dejetos são lançados. Para que isso seja evitado, a coleta e o tratamento de esgoto deve abranger uma porcentagem maior da população. O tratamento de esgoto é uma forma de devolver a água de uso doméstico e industrial para natureza causando o mínimo de impacto possível.

A natureza tem capacidade de decompor naturalmente a matéria orgânica oriunda dos esgotos, mas devido principalmente à alta concentração e ao perigo de contaminação, a resolução CONAMA nº 357 de 2005 complementada pela CONAMA nº 430 de 2011, dispõe sobre as condições de padrões de lançamentos de efluentes. Desta forma, os esgotos devem ser

tratados, atingindo os limites determinados pela legislação, sendo devolvido para a natureza sem causar danos ambientais. O tratamento do esgoto tem o objetivo de acelerar o processo natural de decomposição da matéria orgânica em grandes tanques, até que o esgoto atinja os limites especificados, antes de ser lançado no afluente.

Para isto, o governo incentivou a instalação de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's), para que as águas residuais sejam devidamente tratadas, a níveis em que não contaminem os mananciais. Para que se tenha uma idéia da atual situação, na última Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) realizada em 2008 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), apenas 27,2 % dos municípios do país contam com tratamento do esgoto sanitário realizada por ETE's.¹⁴

Mas como todo processo, existe sempre um resíduo a ser descartado. Antigamente não se dava a devida atenção à destinação dos resíduos oriundos do tratamento de esgoto, que até hoje é realizada em aterros sanitários ou lixões. Mas atualmente, devido à crescente preocupação com o meio ambiente, a realidade é outra. É crescente as políticas públicas voltadas ao incentivo de práticas ambientalmente corretas com enfoque em sustentabilidade para todos os resíduos em geral, sem deixar de fora o lodo de esgoto.

O lodo de esgoto é o resíduo gerado em maiores quantidades durante o tratamento de efluentes domésticos, sendo seu destino final ainda um desafio para tornar o processo ambientalmente correto, pois quando descartado de forma inadequada acaba comprometendo o seu benefício ambiental.

Muitos estudos estão sendo realizados visando agregar valor a este rejeito, focando principalmente na química verde, através da sua transformação em produtos que venham a complementar ou até mesmo substituir os derivados de petróleo. Outros estudos mostram sua agregação em substituição a outros materiais de maior custo visando uma forma de economia financeira e redução no impacto ambiental gerado pelo resíduo, alguns desses exemplos serão citados no tópico a seguir.

2.4- Uso de microalgas no processo de tratamento de esgoto

A instalação e operação das ETE's resultam na geração de grandes volumes de resíduos, os quais não podem ser descartados no meio ambiente. Estes resíduos são gerados ao longo de todo o processo de tratamento, que se inicia com a chegada do esgoto a estação e a filtração de sólidos grosseiros em uma grade. Na grade são retirados do processo materiais grosseiros como pedaços de plástico, panos, preservativos e etc.

A segunda etapa do processo de tratamento é a desarenação, que é a separação por sedimentação. Nesta etapa são retirados materiais sólidos e pesados, como areia, além de retirada da espuma, que é uma emulsão de materiais graxos e água. Após a sedimentação, o fluido segue para o primeiro tanque chamado de decantador primário. Neste tanque são removidos os sólidos sedimentáveis gerando o resíduo conhecido como lodo primário. O processo de tratamento de esgoto está esquematizado na Figura 4, que apresenta as etapas do processo, de sua chegada a estação até seu despejo no corpo d'água.¹⁵

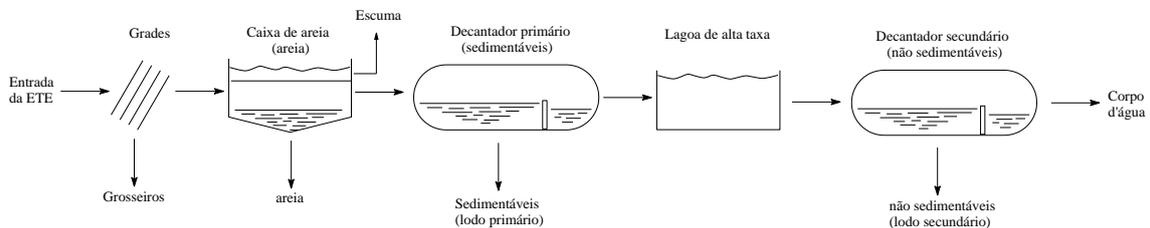


Figura 4: Etapas do processo de tratamento da ETE.

Saindo do decantador primário, o fluido segue para a lagoa de alta taxa, onde ocorre a decomposição bacteriana, que converte a matéria orgânica em NH_3 , PO_4^{3-} e CO_2 . Paralelamente, na presença de luz, as algas consomem os micronutrientes e convertem o CO_2 em O_2 , o qual é utilizado pelas bactérias fechando o ciclo. Este ciclo pode ser observado na Figura 5.

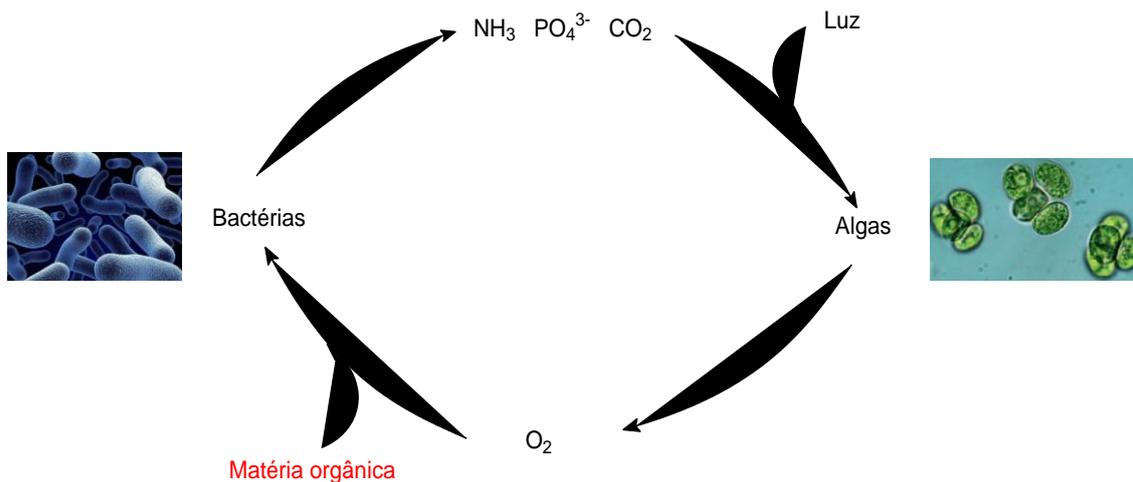


Figura 5: Ciclo biológico que ocorre na lagoa de alta taxa.

Este ciclo eleva a concentração de algas, que são retiradas no próximo processo que é o decantador secundário. O resíduo obtido é chamado de lodo secundário, que parte pode ser devolvida para a lagoa de alta taxa, mantendo a concentração de micro-organismos, e a outra parte é descartada. Então, o papel das microalgas nesta etapa do tratamento, é o fornecimento de oxigênio, redução do pH pela remoção de CO_2 , que é um dos fatores que elimina parte dos micro-organismos patogênicos, além de promover a precipitação de fosfatos na forma de hidroxiapatita ou estruvita.¹⁶

2.4.1- Produção de biomassa do processo de tratamento de esgoto e destinação final

Durante o processo de tratamento de esgoto, vários são os resíduos gerados, entre eles: material gradeado, areia, lodo primário, lodo secundário e espuma. Mas este trabalho se concentrará apenas no lodo secundário, pois este é o produto produzido em maior quantidade em comparação com os outros resíduos oriundos do tratamento de esgotos.

Além do processo descrito no tópico anterior, o lodo de esgoto também pode ser obtido pela aglomeração física dos resíduos utilizando métodos como centrifugação e micropeneiras, mas estes métodos exigem maior grau de mecanização das estações, logo, os métodos preferenciais são métodos de coagulação, que podem ser realizados utilizando, por exemplo, sulfato de

alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$).¹⁷ O sulfato de alumínio age estabilizando as cargas moleculares, reduzindo sua repulsão, dessa forma eleva-se as interações de van der Waals, que aglomeram e sedimentam, formando o lodo de esgoto. O lodo de esgoto é um líquido não-newtoniano, rico em matéria orgânica, sendo composto principalmente de biomassa de micro-organismos, metais (Cd, Cu, Mo, Ni, Zn, Pb, Mn, Fe, Al, Cr, Hg), micro-organismos patogênicos e poluentes orgânicos que do ponto de vista ambiental, são considerados poluentes.¹⁸

Depois de retirado do processo, o lodo de esgoto é tratado para a retirada de água, assim seu volume é reduzido obtendo características químicas e físicas para ser descartado. Nesta etapa é obtido um material sólido, conhecido como biossólido. Atualmente no país, o destino do biossólido pode ser sua aplicação no solo, incineração ou o mais tradicional é ser levado ao aterro sanitário. Em outros países a realidade não é diferente. Por exemplo, atualmente a produção anual de lodo na União Européia e na China é próxima de 11.000.000 e 6.000.000 toneladas, respectivamente. Considerando que 50 % do custo do tratamento do esgoto representa o tratamento deste resíduo, é necessário o desenvolvimento de melhores práticas com vistas a otimizar sua gestão, de forma que se gaste menos recursos.¹⁹ Para isto, é necessário sua utilização de forma sustentável, visando redução de custos e impacto ambiental, completando assim, a relação entre as tecnologias de tratamento de água e o meio ambiente.

Na Agenda 21 é descrito no capítulo Agricultura Sustentável item 6.1, que fala sobre sustentabilidade da agricultura, sobre a possibilidade de utilização do lodo de esgoto na compostagem para uso em agricultura, pois contém a presença de componentes orgânicos e minerais contendo nitrogênio e fósforo. Mas devido aos compostos indesejáveis (os poluentes descritos anteriormente), é necessária regulamentação adequada, e para que isto se torne realidade, são necessários estudos detalhados que verifiquem o risco ambiental e a saúde. Além disso, as características do esgoto mudam de acordo com sua origem, que pode ser principalmente doméstica e industrial. Além desta diferença principal, outros fatores como classe social da população e clima também interferem nas características do esgoto.²⁰

Além disso, outras saídas permitem a valorização desse produto, agregando valor pela produção de insumos. Observando a problemática do

lodo de esgoto, a literatura científica apresenta uma vasta gama de possibilidade de uso, dentre eles pode-se citar seu uso como adsorvente de sulfeto de hidrogênio, em substituição do carvão ativado, pois quando não tratado e utilizado como combustível, o biogás pode danificar os equipamentos devido à acidez do H₂S.²¹ Alguns autores descrevem a possibilidade do biossólido ser adicionado ao forno de produção de cimento reduzindo o uso de matéria prima, sendo um método de eliminação segura do lodo de esgoto, além de uma forma interessante de encapsular os metais pesados.²² Além do uso na produção de cimento, o biossólido também pode ser acrescentado à produção de tijolos e cerâmicas.

Além das citadas acima, algumas alternativas atrativas para o uso do biossólido permitem sua conversão em conteúdo energético através de várias reações, como a pirólise e a gaseificação, além da extração de açúcar e óleos que podem ser usados para a obtenção de bioetanol e biodiesel.^{23,24}

2.5- Biodiesel

Segundo a resolução ANP n° 45 de 2014, o biodiesel é definido como sendo:²⁵

“...combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal...”

No caso da transesterificação, esta reação é realizada a partir da reação do triglicerídeo com um álcool na presença de catalisador como apresenta a Figura 6.

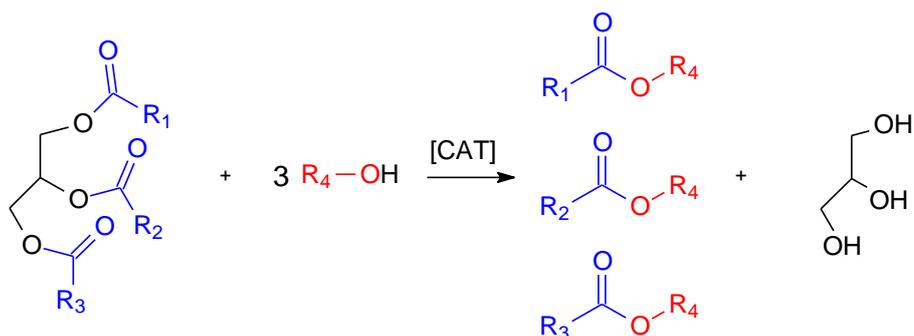


Figura 6: Reação de transesterificação.

Já no caso da esterificação, esta tem como reagente de partida o ácido graxo que tem origem da hidrólise do triglicerídeo, esta reação pode ser visualizada na Figura 7.

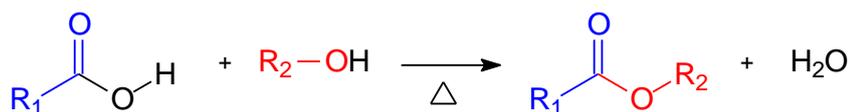


Figura 7: Reação de esterificação.

A rota escolhida para a produção do biocombustível geralmente está relacionada ao número de ácidos graxos livres presente na matéria prima. Estima-se que óleos com índice de acidez acima de 5 mg de KOH por g de amostra já requer o tratamento via esterificação, pois dessa forma, a acidez da matéria-prima é reduzida evitando a perda dos catalisadores básicos homogêneos geralmente empregados nas reações de transesterificação.²⁶

No Brasil, o governo federal criou em 2004 o PNPB (Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel), que objetiva de forma técnica e econômica a produção e uso do biodiesel com enfoque na inclusão social, geração de emprego e distribuição de renda.³ A produção e uso comercial de biodiesel se tornou realidade em 2005, quando a lei federal N° 11.097 de 13 de janeiro de 2005 tornou obrigatória a sua mistura com o diesel comercializado no varejo. Esta lei previu o uso facultativo de uma mistura com 2 %vol de biodiesel, chamada de B2, entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008, quando passou a ser obrigatório e aumentou o teor obrigatório gradativamente até chegar a uma mistura B5 em janeiro de 2010. Com a Lei Federal nº 13.033, de 24 de

setembro de 2014, a mistura obrigatório passou a ser B7 a partir de novembro de 2014. Recentemente, a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, altera a lei anterior e prevê-se a obrigatoriedade do uso de B8 em Março de 2017, o B9 em Março de 2018 e o B10 em Março de 2019. Além disso, esta lei prevê que o Conselho Nacional de Política Energética - CNPE poderá aumentar a mistura de biodiesel para até 15% em 36 meses, após testes e ensaios, realizados em motores que validem a mistura. Desde 2005, o crescimento da produção e uso do biodiesel no Brasil foi enorme, seja para atender o aumento do seu teor na mistura ou o incremento significativo na demanda por combustível. Tendo isso em vista, toda nova matéria prima que venha a complementar a produção de biodiesel no país requer a devida atenção. Tudo isso, aponta para a real necessidade da viabilização do processo de produção de biodiesel, a partir de matérias primas, como as microalgas.

2.6- Uso de microalgas para a produção de biodiesel

A cadeia de produção de biodiesel de microalgas está apresentada de forma simplificada no fluxograma da Figura 8. A produção do biodiesel de algas inicia-se pelo cultivo, realizado em reatores que podem ser abertos, pelo uso de lagoas, ou fechado, que engloba os chamados fotobiorreatores. Para o adequado desenvolvimento da cultura, o meio de cultivo requer adequado controle dos nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio e dióxido de carbono. Além disso, a presença de luz é essencial para a realização da fotossíntese, podendo ser a luz natural, através do sol, ou artificial no caso dos fotobiorreatores.²⁷

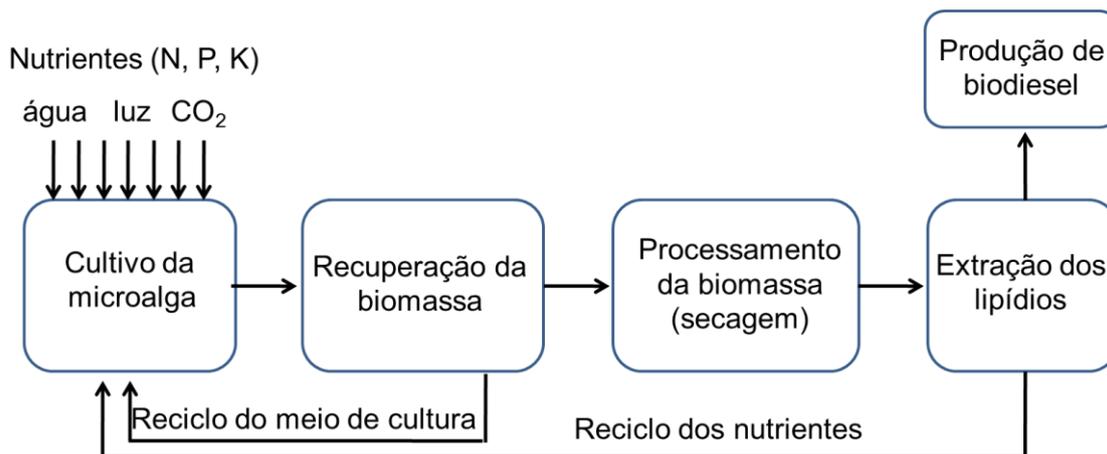


Figura 8: Fluxograma da produção de biodiesel a partir de algas.

A recuperação da biomassa pode ser realizada por centrifugação, decantação, floculação e filtração. Sendo esta etapa, um dos maiores desafios no processo de produção das microalgas devido a baixa concentração das algas no meio (entre 0,3 e 0,5 g/L) e seu tamanho pequeno (comprimento médio entre 3-30 μm). Por isso, são necessárias várias etapas de extração sólido-líquido, mas geralmente são utilizadas duas, uma de concentração do meio, realizada por decantação ou floculação e outra de filtração ou centrifugação seguida de secagem obtendo apenas a biomassa seca. Mas a escolha da tecnologia mais adequada para obtenção da biomassa é escolhida visando o melhor custo benefício tanto econômico quanto técnico-operacional.²⁸

Cada insumo desejado das microalgas requer um processo específico, logo, para a produção de biodiesel não é diferente. Para produzir biodiesel a partir de microalgas os lipídeos desejados são os triglicerídeos, tri-ésteres compostos da esterificação do glicerol com três ácidos graxos. A estrutura geral do triacilglicerídeo está apresentada na Figura 9, onde os grupos R são cadeias carbônicas contendo geralmente 18 carbonos que podem ser saturadas ou insaturadas, e em casos mais específicos podendo ser funcionalizada como é o caso do ácido ricinoleico que está presente em torno de 84-91% dos ácidos graxos presentes no óleo de mamona.²⁹ Alguns dos principais ácidos graxos estão apresentados na figura.

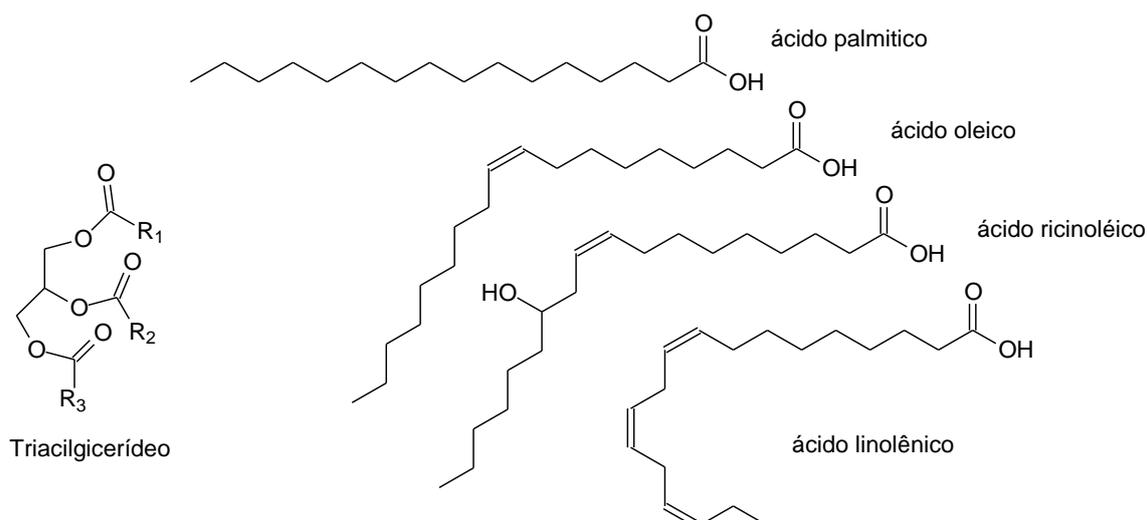


Figura 9: Estrutura básica do triacilglicerídeo e alguns ácidos graxos.

Após a obtenção da biomassa, o óleo é extraído, e para maximizar a extração, a parede celular deve ser rompida para liberar o óleo intracelular.³⁰ Diversas formas são adotadas para o rompimento da parede celular, dentre elas podem ser utilizados métodos de congelamento, uso de solvente orgânico, choque osmótico, reações ácidas, básicas e enzimáticas. Além desses, pode também ser utilizado ultrassom para rompimento das células, mas este método é aplicável somente a pequenas quantidades, sendo inviável em grandes escalas.³¹

Por fim, os lipídios podem ser retirados com a utilização de solventes orgânicos. No laboratório, essa extração pode ser realizada pela lavagem da biomassa seca em sistemas Soxhlet.

Os lipídeos obtidos podem ser processados por reações de esterificação e transesterificação para produção de biodiesel. Parece bem simples na teoria, mas industrialmente, as microalgas ainda não entraram na cadeia de produção de biodiesel. Isso acontece porque ainda não foi possível superar as dificuldades do processo que torne viável a produção de biodiesel de microalgas.

2.7- Estabilidade x Fluides

A estabilidade do biodiesel está diretamente ligada as insaturações presentes na cadeia graxa, quanto maior o número de insaturações, mais suscetível é o biodiesel a oxidação. Em contrapartida, quanto menor o número de insaturações, maior será o ponto de fusão do ácido graxo. No caso do biodiesel, a relação da presença de insaturações determinará algumas propriedades físico-químicas do biodiesel, e se estas não estão nos limites determinados pela ANP, este combustível é considerado fora de especificação e não poderá ser comercializado.³² O que determina o número de insaturações é principalmente a matéria prima utilizada, além disso, variantes como as condições climáticas de cultivo também podem interferir.

O biodiesel produzido a partir do óleo de soja é um combustível consideravelmente rico em insaturações, por outro lado, o biodiesel de sebo é um combustível com elevado ponto de fusão devido a sua baixa concentração de insaturações. Essas considerações podem ser mais um motivo pelo qual o biodiesel comercializado no Brasil é composto principalmente de soja e sebo, pois com a mistura destes combustíveis é possível ajustar suas propriedades físico-químicas. Vale definir que a diferença entre óleos e gorduras é a temperatura de fusão, quando igual ou superior a 25 °C é considerado gordura e quando é inferior a 25 °C é considerado óleo.³³ A partir disso, a Figura 10 ilustra a relação entre óleos, gorduras e insaturações.

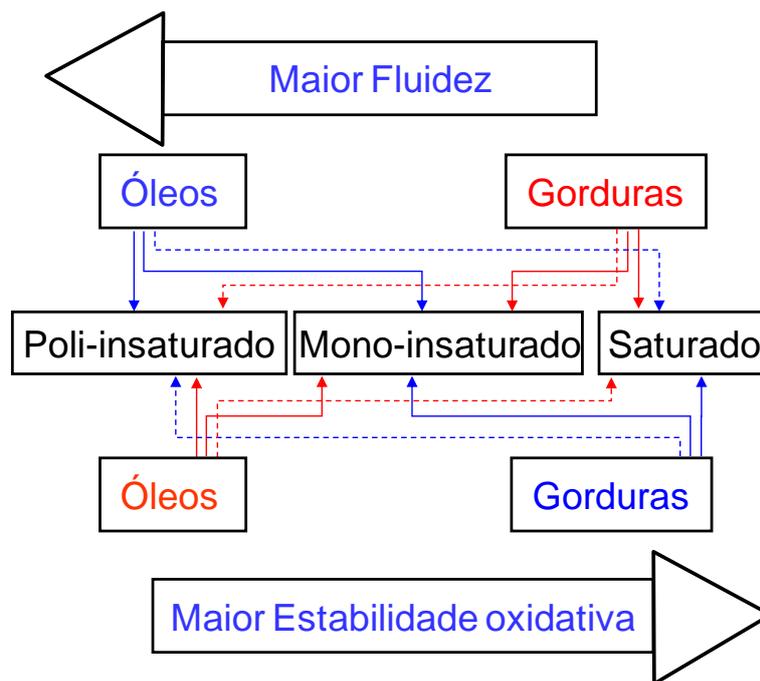


Figura 10: Relação das insaturações com a estabilidade e fluidez, onde quanto mais insaturado menor a estabilidade e maior a fluidez para os óleos e o contrário para as gorduras.³⁴

MATERIAL E MÉTODOS

3- Material e Métodos

3.1- Geral

3.1.1- Reagentes

Neste trabalho foram utilizados, Hexano P.A, Diclorometano P.A., Ácido Clorídrico P.A. (37 %), Ácido Sulfúrico P.A. e Metanol P.A., foram adquiridos da marca VETEC Química Fina LTDA e utilizados como recebidos.

3.1.2- Amostra de lodo de esgoto

A coleta do material foi realizada em uma única vez, sendo este material utilizado até o final do projeto. A coleta foi realizada na ETE Samambaia localizada as margens da DF 180, km 42, e atende a cidade de Samambaia. Esta ETE tem como corpo receptor o Córrego Gatume/ Rio Melchior.

A coleta foi realizada dia 04 de agosto de 2014, sob supervisão do Sr. Estevão Oracio Lira e acesso a estação autorizado pela Sr^a Maria Cristina Rodrigues, ambos funcionários da CAESB (Companhia de Saneamento Ambiental do Distrito Federal).

O tratamento do lodo de esgoto nesta estação faz o uso das lagoas de alta taxa, e o material recolhido foi na etapa de polimento, etapa esta onde o lodo de esgoto é gerado. Não foi coletado o material seco porque a etapa de secagem, realizada por centrifugação, é realizada na estação de tratamento Melchior e são misturados os lodos das estações. Na estação Melchior o processo de tratamento não faz uso das lagoas de alta taxa, e sim do processo conhecido como lodos ativados, que não fazem uso de microalgas para o tratamento do esgoto.

3.2- Procedimentos experimentais

3.2.1- Secagem do lodo de esgoto

A secagem do lodo de esgoto foi realizada expondo a amostra à temperatura ambiente, até a amostra demonstrar aspecto sólido, inclusive quando triturada. Após a secagem, o material é chamado de biossólido, sendo posteriormente triturado em moinho de martelos semi-industrial até passar em peneira de 2,5 mm.

3.2.2- Estudo da fração orgânica do biossólido

O biossólido foi avaliado por procedimentos termogravimétricos. Para avaliar o teor de voláteis presentes no biossólido mesmo após sua secagem a temperatura ambiente. Para tal, foi seguido o método AOCS Ca 2c-25 com algumas modificações. Foi pesada em cadinho de porcelana uma amostra de 10 g de biossólido e deixada em estufa a 100 °C por 24 h. Após esse período a amostra foi resfriada em dessecador e pesada. Esse processo foi repetido até não haver perda de massa entre dois períodos.

Já a fração inorgânica foi quantificada seguindo o método AOCS Ca 11-55 com algumas modificações. Foi pesando 1 g de biossólido em um cadinho de porcelana e deixado em mufla a 700 °C por 30 min. Terminado o tempo, o cadinho era resfriado em dessecador e pesado novamente. O ensaio foi repetido até a massa resultante não variar entre duas pesagens. O teor de matéria orgânica foi, então, determinado pela diferença entre a massa inicial de biossólido e o teor de matéria inorgânica.

3.2.3- Extração dos lipídios presentes na biomassa de *Chlorella* sp. e biossólido

Foi adotada na extração dos lipídios como metodologia padrão o método AOCS Ae 3-52, pois este permite a quantificação do material lipídico pela diferença de massa do material antes e após a extração. Neste método, a extração é realizada por solvente utilizando vidraria Soxhlet. A confecção do

cartucho utilizado para acomodação da amostra no Soxhlet foi preparado seguindo método AOCS Aa 4-38.

3.2.4- Produção do biodiesel de biossólido

O material lipídico extraído do biossólido foi acidificado pela adição de ácido clorídrico e água, sob refluxo a 80 °C durante 8 h. Então, o material foi lavado várias vezes com água destilada até a água de lavagem chegar ao pH 5, sendo posteriormente seco sobre pressão reduzida. Esta etapa foi realizada repetidas vezes até a estabilização do índice de acidez do produto final, sendo o índice de acidez realizado seguindo o método AOCS Cd 3d-63.

A esterificação foi realizada misturando o óleo biossólido acidificado na proporção 1:1 com uma mistura de 1:0,2 de metanol e ácido sulfúrico, mantendo a mistura sob refluxo a 80 °C durante 4 h. Esta reação é repetida várias vezes até o rendimento, medido pela redução do índice de acidez do produto em comparação com o óleo de partida, for superior a 96,5%.

3.2.5- Cultivo da microalga *Chlorella* sp.

Esta parte foi realizada em colaboração com o biólogo Welington Fábio Marques. Nesta parte o inóculo da cepa foi preparado em incubadora com refrigeração e agitação (Shaker). A cepa foi inoculada em Erlenmeyer, e após 4 semanas, as microalgas foram transferidas para o fotobiorreator, modelo HT-Labfors Lux com cuba de vidro de 2,5 L, uma imagem do fotobiorreator pode ser visualizada na Figura 11.



Figura 11: Fotobiorreator utilizado no cultivo da microalga *Chlorella* sp.

Foram realizadas 3 bateladas fazendo uso do meio BG-11 em três condições diferentes de cultivo: (i) BG-11 Padrão; (ii) BG-11 modificado e (iii) BG-11 sem Nitrogênio, como descrito na literatura.³⁵ Todos os parâmetros de cultivo foram monitorados diariamente por um período de 7 dias, sendo o pH controlado por soluções ácido/base, injetadas no reator por mangueira de acesso. No meio de cultivo BG-11 modificado foi dobrada a quantidade de nitrogênio, enquanto que no meio BG-11 sem Nitrogênio foi retirado todo o nitrogênio. A adição de nitrogênio é realizada utilizando NaNO_3 , e todos os constituintes do meio BG-11 podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3: Meio de cultivo BG-11 (adaptado de 35).

Nutrientes	Reagentes	Concentração (g/L)
Solução Estoque 1	Na ₂ Mg EDTA	0,1
	Citrato de Amonio Férrico	0,6
	C ₆ H ₈ O ₇ .1H ₂ O	0,6
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,6
Solução Estoque 2	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
Solução Estoque 3	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	4,0
	ou K ₂ HPO ₄	3,05
Solução Estoque 4	H ₃ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079
	COCl ₂ .6H ₂ O	0,050
	NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,391
	ou MoO ₄ (85%)	0,018
Sólido 1	Na ₂ CO ₃	-
Sólido 2	NaNO ₃	-

Observa-se a partir da Tabela 3 que o meio de cultivo BG-11 é preparado pela mistura de 4 soluções estoque além da adição de carbonato e nitrato de sódio (Na₂CO₃ e NaNO₃) e adicionadas ao reator contendo água destilada. A quantidade dos nutrientes adicionada ao reator pode ser vista na Tabela 4.

Tabela 4: Quantidade de solução estoque adicionada ao fotobiorreator por volume final (L) de meio de cultivo.

Nutriente	Quantidade adicionada por volume final (L) de meio de cultivo
Solução Estoque 1	10 mL
Solução Estoque 2	10 mL
Solução Estoque 3	10 mL
Solução Estoque 4	1,0 mL
Na ₂ CO ₃	0,02 g
NaNO ₃	1,5g

Os parâmetros controlados durante o cultivo foram: Luminosidade; Aeração; Temperatura e pH. A luz foi obtida pela própria câmara de luz do fotobiorreator, pelo uso de lâmpadas fluorescentes, totalizando 48 W em fotoperíodo de 24h/24h. A aeração foi obtida pelo compressor Praic Air-CSI 7,4- SCHULZ- 125 ibf/pulg²- 50 L- 13 gal- 1,5 hp, com pressão de ar regulado para 1,3 NI/min, sendo ligado ao reator por mangueiras e funcionando de modo contínuo. A temperatura foi medida pelo próprio reator através de um termômetro acoplado, sendo a temperatura fixada em 27 °C. O pH foi estabilizado em 7,0 e medido com o uso de um pHmetro.

Ao final da batelada, o material foi decantado. O sobrenadante foi descartado e a biomassa seca em estufa a 60 °C, sendo que após a secagem a biomassa foi pesada em balança analítica para obtenção do peso final.

Observa-se que vários são os parâmetros que podem ser variados ao longo do cultivo, mas neste trabalho optou-se por variar o nitrogênio devido a vasta divulgação na literatura científica de que ao privar as algas de nitrogênio, o stress gerado eleva o conteúdo lipídico das microalgas. O motivo ainda não é certo, mas acredita-se que o stress promove uma reorganização dos sistemas metabólicos da alga, mas o motivo disso permanece desconhecido.³⁶

3.2.6- Contagem celular da *Chlorella* sp.

Esta parte do trabalho também foi realizada com contribuições do biólogo Wellington Fábio Marques. Para a contagem celular foi utilizada uma Câmara de Neubauer Dupla Melhorada Espelhada da New Optics, com profundidade da câmara de 0,1 mm, sendo dividida em 25 grupos quadrados de 0,2 mm de cada lado. Cada grupo consiste em 16 miniáreas com 0,05 mm de cada lado, onde cada um possui uma área de 0,0025 mm².³⁷

A contagem foi realizada em Microscópio Óptico da marca Bioval modelo L2000C, sendo realizada para se obter a concentração celular por mL. Para a contagem foram retiradas alíquotas diárias em cada batelada, cerca de 0,1 mL, sendo diluída em 0,9 mL de água destilada e adicionada na Câmara de Neubauer.

3.2.7- Capacidade calorífica

A capacidade calorífica foi realizada seguindo o método ASTM D240, utilizando como referência uma pastilha de 1 g de ácido benzóico. Neste método a amostra e pressão de oxigênio (10 bar) é adicionada em uma autoclave e submersa em água, quando estabilizada a temperatura é acionada a ignição e o cálculo realizado pela variação da temperatura da água.

3.3- Técnicas de análise

3.3.2- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise pode prover informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica, estado de reação e ambiente químico das moléculas.³⁸ Para esta análise foi utilizado um equipamento de RMN de 600 MHz da Varian. Todas as análises foram realizadas utilizando clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e os espectros foram trabalhados utilizando o programa Mestre-C.

3.3.3- Espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR)

Esta análise é utilizada para a identificação dos grupos funcionais, e para esta análise foi utilizado um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu modelo IR-Prestige- 21, com resolução de 4 cm^{-1} e absorvância de 0,1 a 308 unidades de absorvância. Cada espectro é a média de 32 varreduras, sendo as amostras colocadas em célula de ATR.

3.3.4- Espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES)

Esta análise é utilizada para a identificação e quantificação da presença de metais, semimetais e terras raras. Esta análise baseia-se na detecção da radiação eletromagnética emitida pelos átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta. E foi conduzida em equipamento ICP-OES (iCAP 6000 Series)- Thermo Fischer Scientific,

Cambridge, United Kingdom. A fonte utilizada foi de argônio, com fluxo de 0,5 L/min para o método aquoso e 1,5 L/min para o método orgânico. A curva de calibração foi feita com padrão contendo 24 elementos, onde tanto no método orgânico quanto no aquoso, todas as curvas possuíam R^2 superior a 0,9990, com exceção do Silício no método aquoso obteve R^2 igual a 0,9360. O preparo da amostra orgânica (óleo de biossólido) foi realizada diluindo 0,01 g de amostra em 3,8 g de querosene, enquanto para amostra sólida (biossólido) o preparo é realizado pela digestão em água régia.

3.3.5- Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas no modo de aquisição monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI)

Esta análise foi realizada para a identificação da composição do material produzido a partir do óleo de lodo de esgoto e *Chlorella* sp., e foi realizada pelo grupo da professora Dr. Michelle J. C. Rezende do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A análise foi conduzida em cromatógrafo gasoso Agilent, modelo 6890, acoplado a espectrômetro de massas Agilent, modelo 5973, com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e analisador do tipo quadrupolo, equipado com coluna Rxi (100% metilpolisiloxano) de 30 m e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio 4.5 (99,995%) como gás carreador a 1,8 mL/min.

O forno foi programado com 2 rampas de aquecimento, iniciando a corrida a 120 °C, em 2 min inicia o aquecimento de 12 °C/min até 210 °C (mantido por 2 min) seguida de aquecimento a 15 °C/min até 290 °C permanecendo por 1 min. A temperatura do injetor foi de 290 °C e o tempo total de corrida de 17,8 min no modo de análise por monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI).

3.3.6- Densidade e viscosidade

A densidade e a viscosidade foram determinadas em equipamento da Anton Paar, Viscosímetro/densímetro modelo Stabinger™: SVM™ 3000, sendo a densidade medida a 20 °C e a viscosidade a 40 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4- Resultados e Discussão

4.1- Produção de biodiesel de lodo de esgoto

4.1.1- Caracterização do Lodo de Esgoto

Inicialmente, foi preparada uma lâmina com o lodo de esgoto e outra com a cepa *Chlorella* sp. e analisadas em microscópio óptico. Fotografias dessas lâminas estão apresentadas na Figura 12.

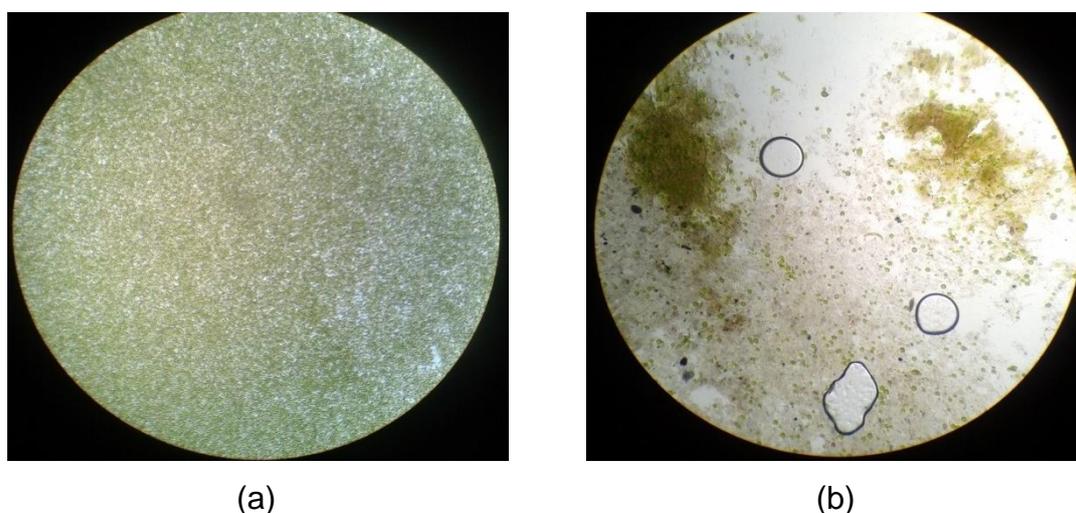


Figura 12: Laminas contendo as algas *Chlorella* sp. (a) e lodo de esgoto (b).

Ao observar a lamina contendo somente a alga *Chlorella* sp. (Figura 12a) observa-se uma homogeneidade das algas ali presentes, enquanto na lamina contendo lodo de esgoto (Figura 12b) se observa uma heterogeneidade do material. No entanto, a presença de nódulos verdes semelhantes aos observados na lamina contendo a alga *Chlorella* sp. indicam a possível presença de colônias de algas no lodo de esgoto.

Foi realizado em outra linha de pesquisa do projeto, pelo Msc. Renato Santana Oliveira, a identificação de espécies, sendo confirmado por ele, que a composição das algas presentes no lodo de esgoto da ETE Samambaia, são principalmente as algas *Chlorella* sp., *Euglena* e *Phacus*.³⁹ Devido a elevada importância da *Chlorella* sp. descrita anteriormente, a mesma foi reproduzida em fotobiorreator, para também ser avaliada como potencial na produção de biodiesel.

Para chegar ao biodiesel, primeiro o óleo precisou ser extraído do lodo de esgoto. E ao longo das etapas de produção, alguns parâmetros foram verificados, a começar pelo teor de lipídeos presente no material. O processo começa com a secagem do lodo de esgoto a temperatura ambiente, o que perdurou durante 3 dias. Logo nessa parte foi verificado que o peso da amostra caiu para 6 % do peso inicial do lodo de esgoto coletado na ETE Samambaia. Na Figura 13, pode ser visualizada a imagem fotográfica do lodo de esgoto obtido na ETE e o mesmo após a secagem.



Antes da secagem



Após a secagem

Figura 13: Fotografia do lodo de esgoto coletado na ETE Samambaia.

Outro teste realizado visa verificar a fração orgânica do biossólido. Nos dois testes realizados para avaliar a fração orgânica, foi verificado que 18 % da massa do material são voláteis a 100 °C, 40 % é material orgânico e 34 % são minerais. Considerando o biossólido já sem os voláteis, a fração mineral salta para 41 %.

Considerando o elevado teor de material orgânico no biossólido, seguiu-se para a extração do material lipídico. Para isso, seguindo o método AOCS, foi utilizado hexano como solvente, sendo verificado ao final da extração que menos que 0,5 % do material lipídico foi extraído. Como teste, a extração foi repetida e o método alterado, substituindo hexano por diclorometano, a partir daí foi verificado que a extração chegou a 3 %. Os valores obtidos da extração são relativamente baixos se comparar esse material com matérias primas como a soja, que possui em média 16% de extração do seu peso em óleo.⁴⁰

Uma vez que o volume de material extraído é muito baixo, a extração foi realizada sucessivas vezes a fim de se obter volume de material suficiente para dar continuidade na próxima etapa que é a produção de biodiesel. As extrações

seguintes foram realizadas com uma mistura de hexano e diclorometano 1:1 a fim de ter maior controle da extração e menos perdas de solvente, pois a pressão de vapor do diclorometano (P.E. 39 °C) é extremamente baixa em comparação ao hexano (P.E. 68 °C).

Outro teste realizado, tanto com o biossólido quanto com o óleo foi o ICP-OES. Nesse ensaio foi possível para avaliar os metais presentes no material, incluindo metais pesados. O resultado da análise está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados da análise de ICP-OES.

Metal	Biossólido (ppm)	Óleo (ppm)
Al	3444	
Fe	36	260
K	14194	
Mg	4367	
P	3707	48
S	32539	
Si	10582	1440
Sn	216	

Na análise de ICP-OES não foram encontradas concentrações consideráveis de metais pesados, com exceção do estanho, que mesmo nessa concentração, de acordo com a resolução CONAMA n° 375 de 2006 que descreve o uso agrícola do lodo, o limite superior para o estanho é de 2800 ppm. O resultado de ICP não apresenta a detecção de outros metais pesados, o que já era esperado, pois o esgoto tratado na ETE Samambaia é esgoto de origem doméstica oriunda da cidade satélite de Samambaia-DF.

Com o biossólido foi realizado também a análise de capacidade calorífica, visando verificar o potencial energético do biossólido. A capacidade calorífica foi testada com o biossólido antes e depois da extração do óleo, e foi obtido como resultado de 1,699 MJ/Kg para o biossólido e 2,375 MJ/Kg para o biossólido após a extração. O resultado mostra que após a extração do óleo o poder calorífico do biossólido aumenta, o que pode ser justificado pela

elevação da concentração de outros materiais orgânicos como celulose e outros após a retirada do óleo. Além disso, para se ter uma ideia da dimensão do poder calorífico do bio sólido, o da madeira é próximo de 20 MJ/Kg.⁴¹

Em paralelo, foi testada a extração utilizando ultrassom, para isso o bio sólido foi adicionado ao Becker junto com o solvente e submetido ao ultrassom por 10 min. Finalizado o tempo, foi avaliado o teor da extração, sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Porcentagem de material lipídico extraído ao longo das lavagens com diclorometano em ultrassom.

Lavagens	% de extração
1	1,5
2	2,4

Foi verificado no ultrassom que duas lavagens não são suficientes para chegar a 3 % de extração obtida no Soxhlet, e acrescentando questões logísticas, a extração do material lipídico utilizado no trabalho se deu apenas na extração em vidraria tipo Soxhlet.

Obtido o óleo, foi realizada análise de IV. O IV está apresentado na Figura 14, onde se associa a absorção em 1709 cm^{-1} a C=O de ácido carboxílico, 1673 e 1621 cm^{-1} a carboxilatos.

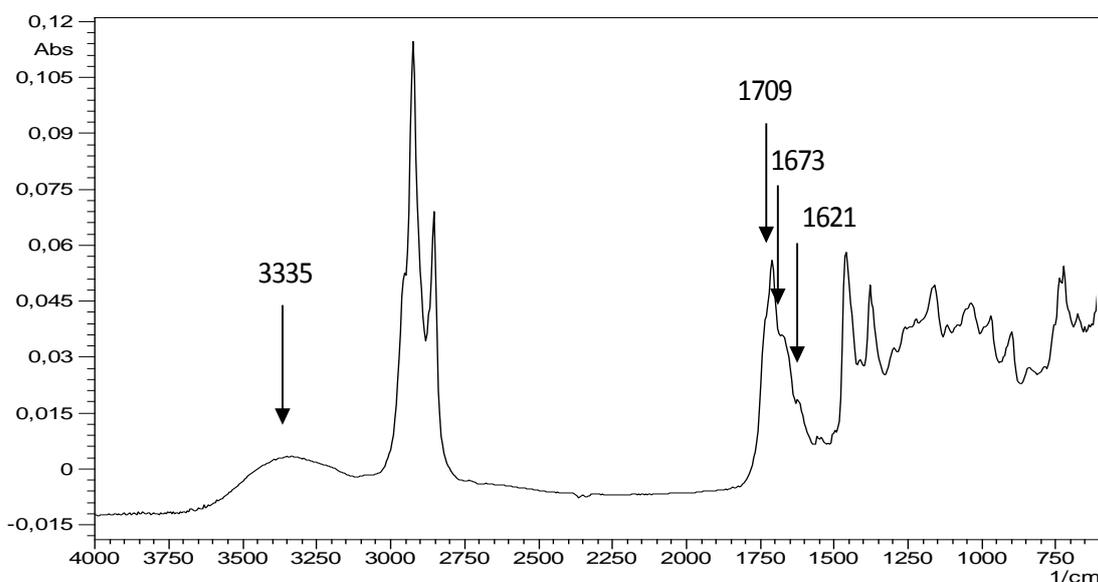


Figura 14: Espectro de IV-ATR do óleo de bio sólido.

Pela interpretação do espectro de infravermelho mostrado Na Figura 14, fica evidenciado que a composição do material lipídico obtido se refere principalmente a uma mistura de sabões e ácidos graxos livres. A ausência de triacilglicérideos pode ser vista por RMN-600 ^1H mostrado na Figura 15, onde se verifica a ausência de hidrogênios na região compreendida entre 4-4,5 ppm referentes aos hidrogênios do glicerol.

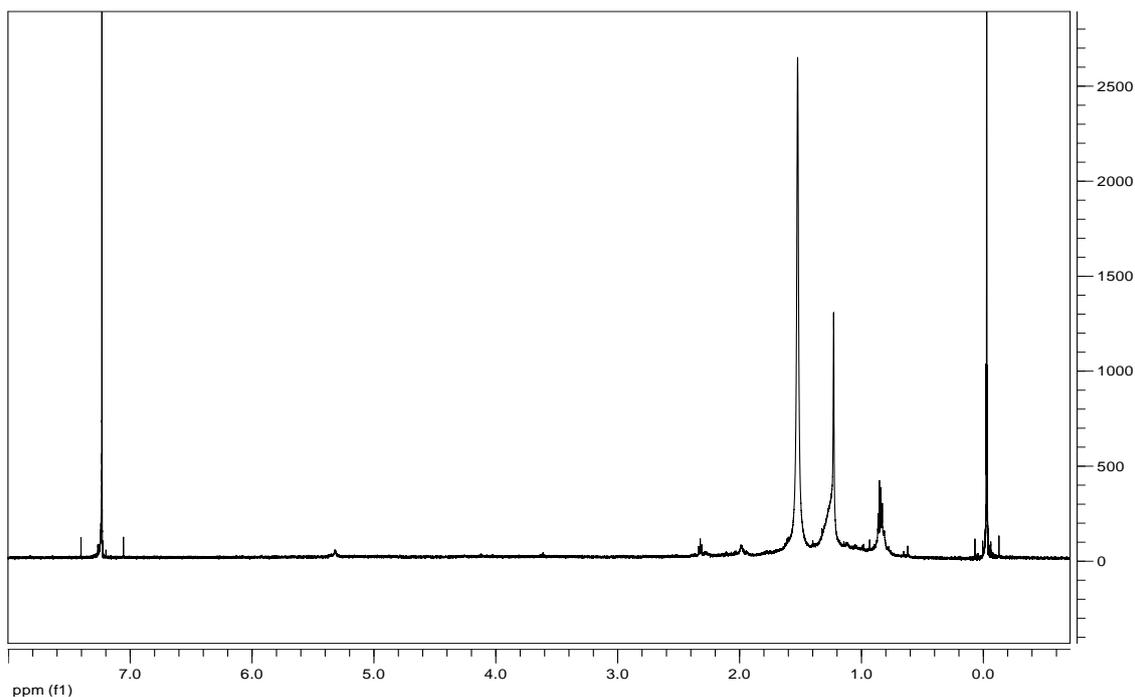


Figura 15: Espectro de RMN-600 ^1H (CDCl_3) do óleo de lodo de esgoto.

4.1.2- Produção de Biodiesel

Devido à grande quantidade de sabões, não foi realizado diretamente a produção de biodiesel via reação de esterificação. Primeiro o óleo foi tratado com ácido clorídrico para a conversão dos carboxilatos em ácido carboxílico, que posteriormente foi trabalhado na reação de esterificação. Após a acidificação o resultado obtido pode ser observado no espectro de infravermelho mostrado na Figura 16, onde é possível comparar o espectro antes e depois da acidificação.

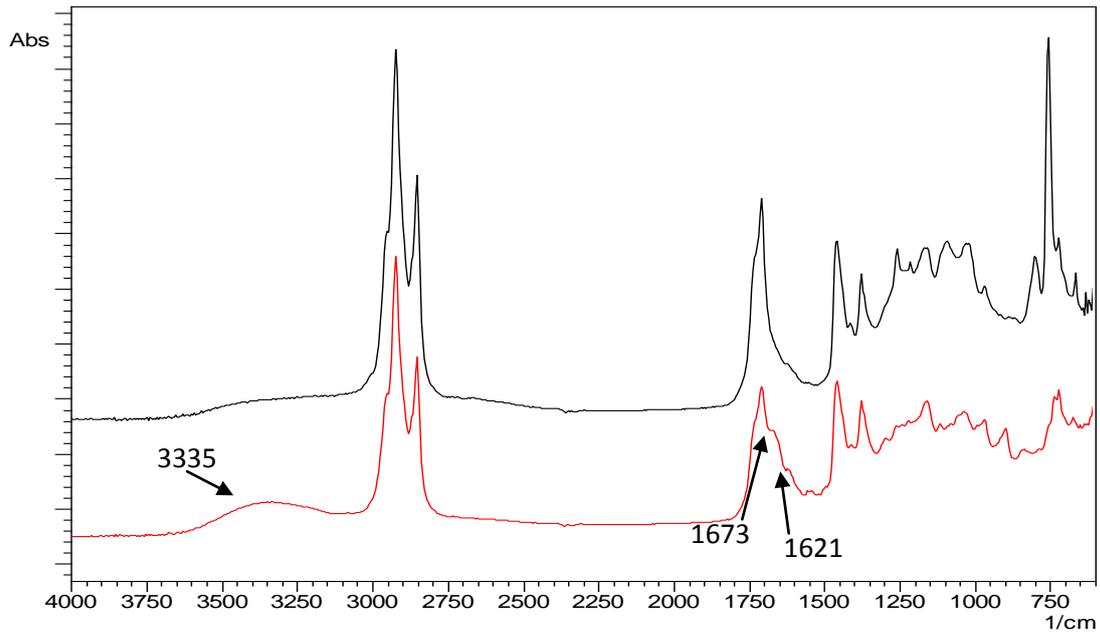


Figura 16: Espectro de IV-ATR do óleo de lodo de esgoto (vermelho) e do óleo acidificado (preto).

Observa-se na Figura 15 após a acidificação (espectro preto), a redução das bandas em 1673 e 1621 cm^{-1} referentes aos caboxilatos, e a suavização da absorção em 3335 cm^{-1} referente à ligação O-H. Essas alterações indicam a conversão dos sabões em ácidos carboxílicos.

Após a acidificação, foi realizada a reação de esterificação, sendo o espectro de infravermelho do produto obtido mostrado na Figura 17.

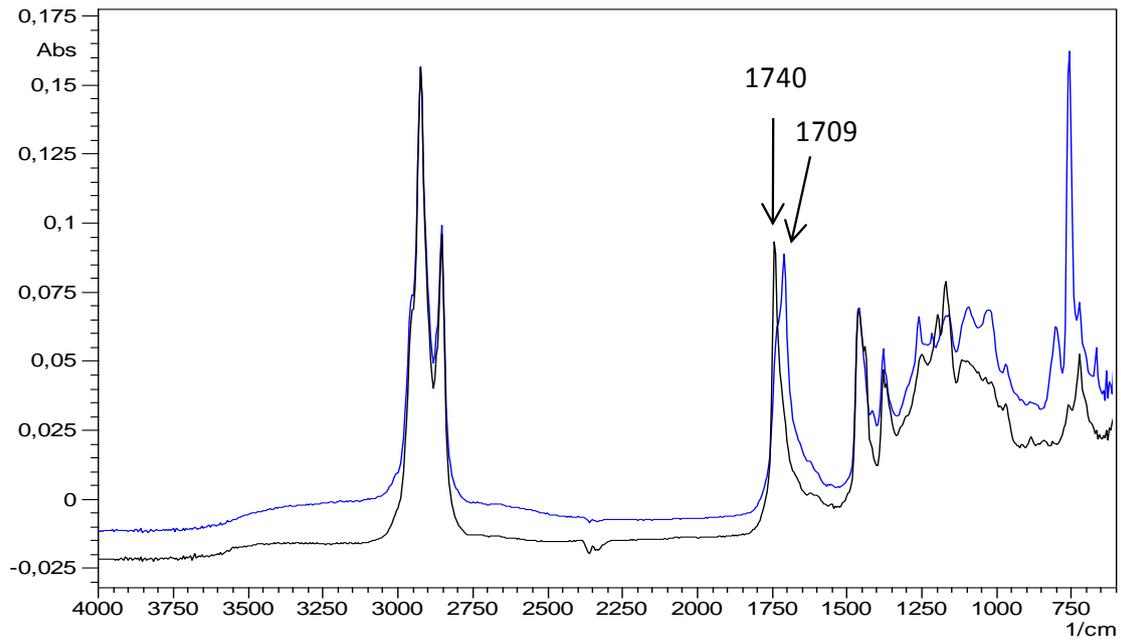


Figura 17: Espectro de IV-ATR do ácido graxo (espectro azul) e do produto da esterificação (espectro preto).

Na Figura 17, fica evidenciado deslocamento da carboxila de 1709 para 1740 cm^{-1} , evidenciando a conversão do ácido carboxílico em éster metílico. Por RMN de ^1H também é possível verificar em 3,6 ppm o pico referente aos hidrogênios do éster formado. O espectro de RMN-600 de ^1H pode ser observado na Figura 18.

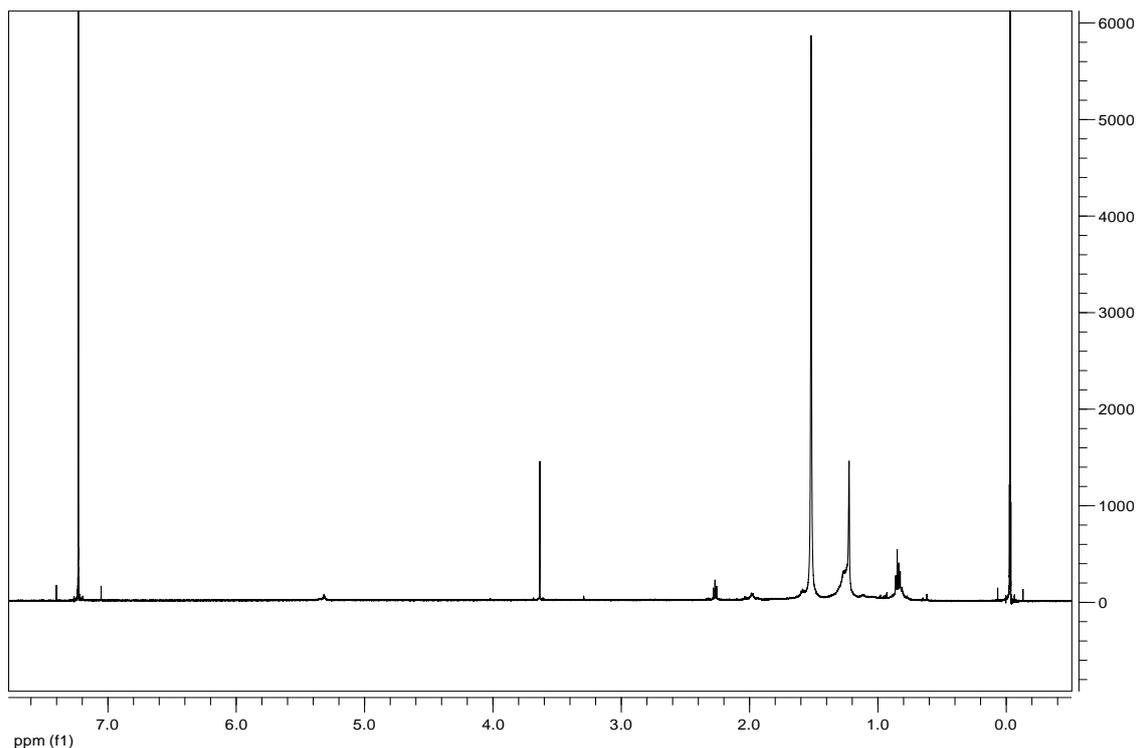


Figura 18: Espectro de RMN-600 ^1H (CDCl_3) do biodiesel produzido a partir do óleo de lodo de esgoto.

A conversão dos ácidos graxos em ésteres, a cada esterificação, foi determinada por titulação, comparando com a acidez do óleo de partida. A conversão alcançou 96,5 % na quarta vez em que o material foi esterificado, sendo que na primeira esterificação a conversão alcançou 75 %.

A Tabela 7 apresenta a densidade e viscosidade dos produtos nas etapas de produção de biodiesel. Também estão apresentados na Tabela 7 a densidade e viscosidade do biodiesel de soja para fins de comparação, bem como os limites permitidos pela ANP para o biodiesel segundo a RANP N° 45 de 2014. Na tabela é possível observar que tanto a densidade quanto a viscosidade do produto esterificado de biossólido (entrada 4 da Tabela 7), estão fora dos limites permitidos para este combustível. Além disso, é possível observar que o óleo acidificado (entrada 2 da Tabela 7) possui densidade e viscosidade superior ao óleo bruto. Isso pode ocorrer devido a ligação de hidrogênio realizada entre diferentes moléculas de ácido carboxílico.

Tabela 7: Densidade e viscosidade do óleo de bio-sólido ao longo das etapas de produção de biodiesel.

Entrada	Produto	Densidade (g/cm³)	Viscosidade (mm²/s)
1	Óleo bruto	999,5	97,7
2	Produto acidificado	1009,5	566,5
3	Esterificado 75 %	990,0	244,3
4	Esterificado 95 %	989,2	120,5
5	Biodiesel de soja	883,3	2,8
6	Limite ANP	850-900	3,0-6,0

4.2- Produção de biodiesel de óleo de *Chlorella* sp.

4.2.1- Cultivo das microalgas

Das condições testadas, na condição BG-11 Padrão, foi observada a maior concentração celular. Enquanto na condição BG-11 na ausência de nitrogênio, foi observado um declínio da população celular logo após o primeiro dia de cultivo, sendo o declínio quase que total após o quinto dia de cultivo. As curvas de crescimento podem ser observadas na Figura 19.

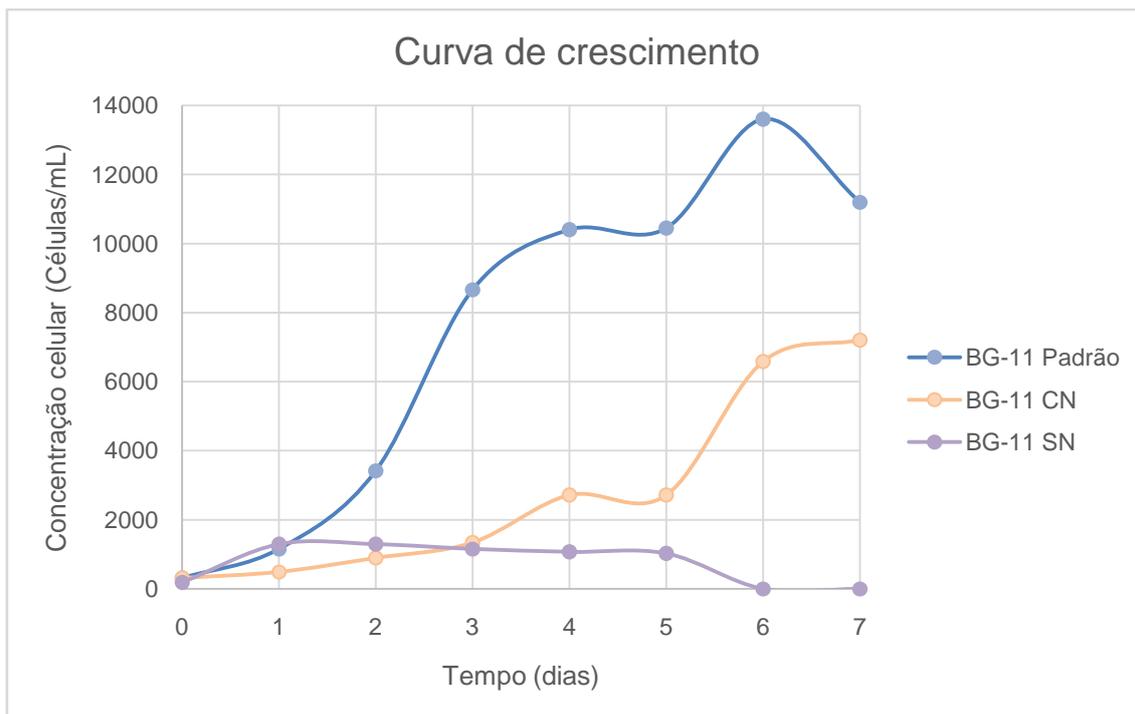


Figura 19: Curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp. nas três condições de cultivo testadas: BG-11 Padrão, BG-11 modificado (BG-11 CN) e BG-11 modificado sem nitrogênio (BG-11 SN).

O declínio na população no meio de cultivo BG-11 sem nitrogênio ocorreu pela indisponibilidade de nitrogênio, nutriente essencial na constituição das proteínas e ácidos nucleicos, além de ser componente de uma molécula imprescindível para a manutenção da vida de todos os organismos da biosfera, que é o ATP.⁴²

4.2.2- Caracterização do material obtido de *Chlorella* sp.

Ao final de cada batelada, após a decantação e secagem, foi obtido de biomassa seca aproximadamente 2,7 g para o BG-11 Padrão, 2,4 g para o BG-11 Modificado e 0,7 g para o BG-11 sem Nitrogênio. Considerando que o fotobiorreator possui volume de 2 L, isso significa uma produção de 1,35, 1,2 e 0,35 g/L de biomassa seca respectivamente. Este é um resultado muito bom, pois se observa na literatura que a produção de biomassa não ultrapassa 1 g/L.^{43,44}

Para avaliar a *Chlorella* sp. obtida como potencial na produção de biodiesel, foi verificado o teor lipídico do material. Da biomassa seca obtida, e seguindo o método AOCS Ae 3-52, foi verificado que a massa de lipídios presente no meio de cultivo BG-11 Padrão corresponde a 0,041 g, no meio BG-11 Modificado é de 0,030 g e no meio BG-11 sem Nitrogênio é de 0,024 g. Ao calcular a relação da quantidade de óleo por grama de biomassa seca, obtém-se 1,5% para o meio BG-11 Padrão, 1,25% para o meio BG-11 Modificado e 3,43% para o meio BG-11 sem Nitrogênio. Isso significa que apesar da baixa produção de biomassa, fica claro que em condições livre de nitrogênio, o teor de óleo na biomassa é o dobro da quantidade observada para algas que crescem na presença de nitrogênio. Também fica evidenciado nos resultados que a população algal é inferior no meio BG-11 sem Nitrogênio, isso porque a privação de nitrogênio inibe a multiplicação celular, mas em contrapartida, o stress gerado no meio eleva a produção de lipídios, o que pode ser observado nestes resultados.⁴⁵

Como visto na revisão bibliográfica deste trabalho, o teor de lipídios da alga *Chlorella* sp. varia de 28-32% do peso da biomassa seca.¹⁰ Duas possíveis explicações para a baixa concentração de óleos são as seguintes: (i) foram avaliadas apenas 3 condições de crescimento das microalgas, as quais provavelmente não são as ótimas; (ii) como mencionado na revisão bibliográfica, a ruptura da parede celular das microalgas é bastante difícil, sendo um dos principais desafios para a extração industrial e laboratorial do óleo. Provavelmente, a ruptura da parede celular pode não ter ocorrido de forma eficiente e deve ser otimizada para atingir teores lipídicos maiores.

4.3- Composição química do biodiesel de biossólido e *Chlorella* sp.

Tendo em vista a elevada viscosidade e densidade do biodiesel de biossólido e *Chlorella* sp., o passo seguinte foi verificar a composição química. Para isso, foi realizada análise de cromatografia gasosa, e os compostos identificados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Picos identificados da análise de CG/MS do biodiesel do óleo de biossólido e *Chlorella* sp.

Entrada	Constituinte	<i>Chlorella</i> sp.		biossólido	
		t _R * (min)	% Área	t _R * (min)	% Área
1	Derivado do norborneno	2,77	0,1	-	-
2	9-oxo-nonanoato de metila	6,40	0,1	-	-
3	Dodecanoato de metila	-	-	7,66	0,4
4	Nonanoicdimetilester	7,70	0,1	-	-
5	Tridecanoato de metila	-	-	8,37	0,2
6	Hexadecano	-	-	8,67	0,6
7	Octadecenal	-	-	9,48	0,1
8	Tetradecenoato de metila	-	-	9,53	0,5
9	Heptadecano	-	-	9,70	0,9
10	Tetradecanoato de metila	9,76	0,3	9,77	3,2
11	Pentadecanoato de metila	10,48	0,1	10,49	3,2
12	12-metil-tridecanoato de metila	10,57	0,1	10,58	1,6
13	Octadecano	-	-	10,83	0,9
14	Hexadecatetraenoato de metila	11,57	6,0	-	-
15	Hexadecatrienoato de metila	11,77	2,0	-	-
16	Hexadecenoato de metila	12,08	1,8	11,92	21,9
17	Hexadecanoato de metila	12,20	39,2	12,20	20,7
18	Heptadecanoato de metila	-	-	12,95	1,6
19	14-metil-hexadecanoato de metila	13,32	0,2	13,34	2,0
20	Fitol acetate	13,57	0,5	13,58	1,6
21	Octadecadienoato de metila	13,99	1,9	13,99	3,2
22	Octadecatrienoato de metila	14,04	22,7	14,04	1,7
23	Octadecenoato de metila	14,14	18,2	14,13	16,9
24	Octadecanoato de metila	14,33	1,7	14,35	2,1

* t_R- tempo de retenção

É possível verificar a partir dos dados apresentados na Tabela 8 que a composição de ambos biodieseis são uma mistura de vários compostos, não necessariamente de derivados de ácidos carboxílicos, como é o caso do

octadecano (entrada 13 da Tabela 8) presente no bio-sólido e o derivado de norborneno (entrada 1 da Tabela 8) no biodiesel de *Chlorella* sp. Outro fator importante, é que a presença destes outros compostos diferentes de ésteres, podem também interferir nas propriedades físico-químicas como viscosidade e densidade, podendo ser um dos motivos pelo qual a densidade e viscosidade ficaram consideravelmente elevada em comparação com o biodiesel de soja e os limites permitidos pela ANP.

Produtos como a cadeia lateral da clorofila, o fitol (entrada 20 da Tabela 8) também foi encontrado em ambos biodieseis. Sua presença se justifica pela origem dos óleos, que advém das microalgas *Chlorella* sp. e as presentes no bio-sólido, que por sua vez, são organismos fotossintéticos, que usam a clorofila para a produção de energia. Vale lembrar que o bio-sólido é oriundo do tratamento de esgotos a partir do processo de lagoas de alta taxa, que faz uso de microalgas para remoção da matéria orgânica da água.

Além dos picos identificados, outros 18 picos variando de 0,1 a 2,2 % de área, não puderam ser identificados com similaridade superior a 80 % no biodiesel produzido a partir do bio-sólido e no caso da *Chlorella* sp. são 14 picos. Esses picos somam 16,4 e 5,2 % do total da área do cromatograma do biodiesel de bio-sólido e *Chlorella* sp., respectivamente. Considerando apenas os ésteres, que são a composição básica do biodiesel foi montada a Tabela 9, em que os ésteres majoritários estão destacados em vermelho.

Tabela 9: Ésteres metílicos presentes no biodiesel de lodo de esgoto e *Chlorella* sp.

Constituinte		<i>Chlorella</i> sp.	bio sólido
		% Área	% Área
Dodecanoato de metila	C12:0	-	0,4
Tridecanoato de metila	C13:0	-	0,2
Tetradecanoato de metila	C14:1	-	0,5
Tetradecanoato de metila	C14:0	0,3	3,2
Pentadecanoato de metila	C15:0	0,1	3,2
Hexadecatetraenoato de metila	C16:4	6,0	-
Hexadecatrienoato de metila	C16:3	2,0	-
Hexadecenoato de metila	C16:1	1,8	21,9
Hexadecanoato de metila	C16:0	39,2	20,7
Heptadecanoato de metila	C17:0	-	1,6
Octadecadienoato de metila	C18:2	1,9	3,2
Octadecatrienoato de metila	C18:3	22,7	1,7
Octadecenoato de metila	C18:1	18,2	16,9
Octadecanoato de metila	C18:0	1,7	2,1
% Área		93,9	75,6
% Ésteres insaturados		52,6	44,2
% Ésteres saturados		41,3	31,4

Pela análise da Tabela 9, verifica-se que 93,9 % do biodiesel de *Chlorella* sp. é composto por ésteres metílicos, enquanto no biodiesel de bio sólido, esse valor é de 75,6 %. É interessante observar que no biodiesel de bio sólido outros 24,4 % são outros compostos que estão fora da definição de biodiesel, enquanto no caso da *Chlorella* sp. esse valor é 6,1 %. Isso se dá pela origem dos materiais, aonde o biodiesel de bio sólido vem de um resíduo, que possui em sua composição uma grande mistura de materiais, enquanto na *Chlorella*, a biomassa seca é composta exclusivamente da alga *Chlorella* sp.

Outra comparação interessante de se fazer é comparar os biodieseis obtidos com o de soja, pois esse é o principal comercializado no país (em média de 75 % do total). Essa comparação pode ser visualizada na Tabela 10.

Tabela 10: Porcentagem de área dos principais ésteres do biodiesel de soja e sua comparação com o biodiesel de óleo de bio sólido.

Éster metílico	Área % <i>Chlorella</i> sp.	Área % bio sólido	Área % soja
Ácido Palmítico (C16:0)	39,2	20,7	12,2
Ácido Palmitoleico (C16:1)	1,8	21,9	-
Ácido Esteárico (C18:0)	1,7	2,1	5,2
Ácido Oléico (C18:1)	18,2	16,9	29,9
Ácido Linoléico (C18:2)	1,9	3,2	50,2
Ácido Linolênico (C18:3)	22,7	1,7	0,4
% Ésteres insaturados	44,6	43,7	80,5
% Ésteres saturados	40,9	22,8	17,4

Pelos resultados apresentados na Tabela 10, é possível verificar que os produtos de *Chlorella* sp. e bio sólido são ricos em ácido palmítico e ácido linolênico em comparação com a soja. Isso aponta que os produtos de *Chlorella* sp. e bio sólido são ricos em cadeias saturadas e poliinsaturadas. As cadeias saturadas interferem diretamente no ponto de fusão, e para uso como combustível, essas cadeias podem comprometer as propriedades a frio. Além disso, a presença em quantidade alta dessas cadeias saturadas pode justificar a elevada viscosidade e densidade do produto obtido a partir do bio sólido. Enquanto a elevada concentração de cadeias poliinsaturadas, sugere que ambas amostras são altamente suscetíveis a oxidação, o que não foi avaliado devido ao baixo volume obtido do óleo. No caso dos óleos, vale ressaltar que o ponto de fusão não tem a ver com os pontos de fusão individuais, e sim com o da mistura, então para se ter certeza do ponto de fusão seria necessário realizar tal análise.⁴⁶

Mas, para ser considerado biodiesel, a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos precisa atender a resolução ANP N° 45 de 2014. Isso significa que, dentre outros parâmetros, o teor de ésteres deve ser superior ou igual a 96,5 %. Como se pode observar na Tabela 8, a quantidade de compostos lipídicos diferentes de ésteres metílicos de ácidos graxos é muito superior a 3,5 % tanto para o biodiesel de lodo de esgoto quanto de *Chlorella* sp. Como a separação destes compostos é difícil, estes óleos provavelmente não podem

ser considerados como alternativas viáveis para a produção de biodiesel. Além disso, pelos resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9, percebe-se um alto teor de ésteres derivados do ácido graxo linolênico (até 20 %). Este ácido graxo é extremamente suscetível à oxidação, levando a formação de polímeros e compostos oxigenados em contato com o ar. Assim, a composição química em ácidos graxos também sugere que estes óleos não são ideais para a produção de biodiesel.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5- Conclusões e Perspectivas

Este trabalho mostrou que são baixos os teores lipídicos no bio-sólido gerado nas lagoas de alta taxa da ETE Samambaia em comparação com matérias primas como a soja, que representa 75% de todo biodiesel produzido no Brasil. Os resultados da extração tanto para o bio-sólido quanto para a microalga *Chlorella* sp apresentaram resultados de extração bem próximos, mesmo na melhor condição de cultivo testada. Os resultados baixos na extração podem estar relacionados ao inadequado rompimento da parede celular das algas ou às condições de cultivo testadas.

Além disso, este trabalho mostrou a influência da variação da concentração de nitrogênio no meio de cultivo onde pode ser observado que no meio de cultivo sem nitrogênio (BG-11 sem Nitrogênio) a quantidade de óleo produzida em relação ao peso seco chega a 3,43%. Isso significa mais que o dobro da concentração de óleo em comparação ao meio de cultivo BG-11 Padrão.

Devido a elevada quantidade de ácido linolênico no biodiesel de *Chlorella* sp. (próximo de 23 %), sugere que o biodiesel produzido possui sérios problemas frente à estabilidade oxidativa. Também foi observado que a elevada viscosidade e densidade do biodiesel de bio-sólido produzido podem estar associados à composição do biodiesel, onde pode ser observado elevadas concentrações de compostos saturados, o que afetam diretamente em suas propriedades a frio. Logo, estima-se que os biodieseis produzidos a partir destas matérias-primas não atenderiam a legislação brasileira atual. Além disso, o teor de ésteres nos biodieseis não atende a legislação brasileira no quesito teor de ésteres, uma vez que estão presentes outros compostos lipídicos não graxos em quantidades elevadas, sendo necessária uma etapa de separação. Logo, o biodiesel de microalgas obtido neste estudo, tanto das algas das lagoas de alta taxa quanto do cultivo em fotobiorreator de *Chlorella* sp., quando comparados com a produção do biodiesel de soja no país, ainda requer bastante pesquisa de forma a viabilizar a sua produção em massa e adequação deste combustível ao mercado brasileiro.

Algumas saídas são possíveis para contornar os problemas enfrentados neste trabalho, dentre eles pode ser citado o uso do processo de cristalização

fracionada como meio de purificação do biodiesel, ajustando suas propriedades a fim de torná-lo adequado para uso como biodiesel. Mas vale ressaltar, que visando à redução de custos de produção, o processo de cristalização fracionada acrescentaria mais uma etapa no processo de produção. Mas em contrapartida, o lodo de esgoto é um resíduo da indústria, diferente da soja, que requer insumos como água e fertilizantes. Então a questão da produção do biodiesel de microalgas, requer um estudo mais aprofundado de sua viabilidade econômica com vistas a inserir este material na cadeia de produção de biodiesel.

Como continuação deste trabalho, objetiva-se além da avaliação anterior, utilizar o óleo de microalgas para outra finalidade na qual a presença das cadeias poli-insaturadas seja desejável, como por exemplo, a polimerização. E também, outras condições de cultivo devem ser testadas, como por exemplo, o controle da injeção de CO₂, composto essencial da fotossíntese, e conseqüentemente influenciará tanto a concentração algal quanto a produção de lipídios pelas microalgas.

REFERÊNCIAS

6- Referências

1. Ikarán Z., Suárez-Alvarez S., Urreta I., Castañón S. The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. **Algal Research**. Vol. 10, p. 134-144, 2015.
2. Costa F. Produção de biodiesel deve crescer 25% no Brasil em 2015. **Jornal Zero Hora**. Disponível em: <<http://zh.clicrbs.com.br/rs/notificas/campo-e-lavoura/noticia/2015/04/producao-de-biodiesel-deve-crescer-25-no-brasil-em-2015-4731798.html>>. Acesso em: 18 jan. 2016.
3. Pousa G. P. A. G., Santos A. L. F., Suarez P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, Vol. 35, p. 5393–5398, 2007.
4. Junior A. G. PróÁlcool. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/combustiveis/proalcool/>>. Acesso em: 22 mar 2017.
5. Brasil, Ministério de Minas e Energia, Empresa de Pesquisa Energética. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2024**/ Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME/EPE, 2015.
6. Kinpara, D. L., Rocha, M. G. Biodiesel e Segurança Alimentar. **Comissão Pastoral da Terra Nordeste II**. Disponível em: <<http://www.cptne2.org.br/index.php/publicacoes/noticias/1-etanol/143-Biodiesel%20e%20seguran%C3%A7a%20alimentar.html?fontstyle=f-larger>>. Acesso em: 19 jan. 2016.
7. Empresa de Pesquisa Energética (Brasil). **Balço Energético Nacional 2015**- Ano base 2012: Relatório Síntese; Rio de Janeiro: EPE, 2015.
8. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Vol. 35, p. 265-278, 2014.
9. Cyanotech improving Astaxanthin production. **Algae Industry Magazine.com**. Disponível em: <http://www.algaeindustrymagazine.com/cyanotech-improving-astaxanthin-production/?utm_source=feedburner&utm_medium=email&utm_campaign=Feed%3A+AlgaeIndustryMagazine+%28Algae+Industry+Magazine%29>. Acesso em: 20 set. 2015.
10. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotech. Adv.**, Vol. 25, p. 294-306, 2007.

11. Pereira C. M. P., Hobuss C. B., Maciel J. V., Ferreira L. R., Pino F. B. D., Mesko M. F., Jacob-Lopes E., Neto P. C., Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Quím. Nova**, Vol.35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.
12. Primo, T. A. R. da C., Canto F. Q., Monteiro I. B., Abreu T. A. M. de, Henrique A. da S., Willemann D. P., Neves F. de F., **Cultivo de *Chlorella sp.*- Utilização de Fertilizantes Agrícolas Comerciais para Elaboração de Meios de Cultura**. 25º Seminário de Iniciação Científica. Universidade do Estado de Santa Catarina.
13. Henrard A. S. A. **Cultivo Semicontínuo das Microalgas *Cyanobium sp.* e *Chlorella sp.***. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal Do Rio Grande, Rio Grande do Sul 2009.
14. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**. Tabela 58. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/defaulttabpdf_esgot_san.shtm>. Acesso em: 24 set. 2014.
15. **Processo de tratamento**. Disponível em: <<http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infol=29&sid=34&tpl=printerview>>. Acesso em: 12 set 2014.
16. Bento, A. P.; **Tratamento de esgoto doméstico em lagoas de estabilização com suportes para o desenvolvimento de perifiton - biofilme**. 2005. 197 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental)- Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2005.
17. Santos, A. D.; **Estudo das possibilidades de reciclagem dos resíduos de tratamento de esgoto da região metropolitana de São Paulo**. 2003. 265 f. Dissertação (Mestrado em engenharia)- Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo 2003.
18. Queiroz, T. R.; **Remoção de Sólidos suspensos de Efluentes de Lagoas de Estabilização por Meio de Processos Naturais**. 2001. 229 f. Dissertação (Mestrado em engenharia)- Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2001.
19. He C., Chen C. L., Giannis A., Yang Y., Wang J. Y. Hydrothermal gasification of sewage sludge and model compounds for renewable hydrogen production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Vol. 39, p. 1127–1142, 2014.

20. Pedroza M. M., Vieira G. E. G., Sousa J. F. Características Químicas de Lodos de Esgotos Produzidos no Brasil. **revista AIDS de ingeniería y ciencias ambientales: investigación, desarrollo y práctica**, Vol. 4, N. 2, p. 35-47, 2011.
21. Ortiz F.J.G., Aguilera P.G., Ollero P. Biogas desulfurization by adsorption on thermally treated sewage-sludge. **Separation and Purification Technology**, Vol. 123, n. 26, p. 200-213, 2014.
22. Rodríguez N. H., Martínez-Ramírez S., Blanco-Varela M. T., Donatello S., Guillem M., Puig J., Fos C., Larrotcha E., Flores J. The effect of using thermally dried sewage sludge as an alternative fuel on Portland cement clinker production. **Journal of Cleaner Production**, Vol. 52, p. 94-102, 2013.
23. Jina H., Arazob R. O., Gao J., Capareda S., Chang Z. Leaching of heavy metals from fast pyrolysis residues produced from different particle sizes of sewage sludge. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, Vol. 109, p. 168-175, 2014.
24. Gil-Lalaguna N., Sánchez J.L., Murillo M.B., Ruiz V., Gea G. Air-steam gasification of char derived from sewage sludge pyrolysis. Comparison with the gasification of sewage sludge. **Fuel**, Vol. 129, p. 147-155, 2014.
25. BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). **Resolução nº 45 de 25 de agosto de 2014**. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)>. Acesso em: 24 mai 2016.
26. Ma F., Hanna, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**. Vol. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.
27. Baicha Z., Salar-García M.J., Ortiz-Martínez V.M., Hernández-Fernández F.J., de los Ríos A.P., Labjar N., Lotfi E., Elmahi M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, Vol. 154, p. 104-116, 2016.
28. Lira R. de A. **Estudo do Rendimento de Biomassa da Microalga Nativa *Chlorella* sp. Visando a Obtenção de Biocombustíveis**. Tese (Doctor Scientiae)- Brasil, Viçosa, Minas Gerais, 2011.
29. Reis I. B. de A. **Extração de óleo de mamona utilizando etanol em extrator Semicontínuo**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

30. Oliveira, C. J., Schaffner R. A., Cremonez, P. A., Feroldi M., Teleken J. G., Produção de Biodiesel a Partir das Algas: Uma Revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, vol.3, n. especial, p.202-221, 2014.
31. Cardoso A. S.; Vieira, G. E. G.; Marques A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **R. bras. Bioci.**, vol. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.
32. Pinho, D. M. M.; Santos Jr, V. O.; Santos V. M. L. dos; Oliveira M. C. S.; Silva M. T. da; Piza P. G. T.; Pinto A. C.; Rezende M. J. C.; Suarez P. A. Z. Evaluating the use of EN 14078 for determination of biodiesel in diesel blends sold in the Brazilian market. **Fuel**, Vol. 136, p. 136-142, 2014.
33. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 85 de 13 de dezembro de 2004. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8994-1-0%5D.pdf>>. Acesso em: 22 mai 2017.
34. Pinho, D. M. M.; Suarez, P. A. Z. A Hidrogenação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações Industriais. **Rev. Virtual Quim.** Vol. 5, n. 1, p. 47-62, 2013.
35. UCDAVIS. **Meio de cultivo BG-11 medium**. College of Biological Sciences- Microbiology & Molecular Genetics. Disponível em: <<http://microbiology.ucdavis.edu/meeks/BG11medium.html>>. Acesso em: 23 out 2016.
36. Li Y., Han F., Xu H., Mu J., Chen D., Feng B., Zeng H. Potential lipid accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). **Bioresource Technology**. Vol. 174, p. 24-32, 2014.
37. New Optics. **Câmara de Neubauer Dupla Melhorada Espelhada**. Disponível em: <<http://www.globaltradebr.com.br/camara-de-neubauer-dupla-melhorada-espelhada-new-optics.html>>. Acesso em: 23 mai 2016.
38. Simpósio de Inauguração do RMN do Instituto de Química. Disponível em: <<http://www.unesp.br/portal#!/noticia/14751/simposio-de-inauguracao-do-nmr-do-instituto-de-quimica/>>. Acesso em: 10 jul 2017.
39. Pinho D. M. M., Oliveira R. S., Santos V. M. L. dos, Marques W. F., Pinto A. C., Rezende M. J. C., Suarez P. A. Z. Evaluating the Potential of Biodiesel Production through Microalgae Farming in Photobioreactor and High Rate Ponds from Wastewater Treatment. **J. Braz. Chem. Soc.** No prelo.

40 . Cavalcante A. K., Sousa L. B. de; Hamawaki O. T., Determinação e avaliação do teor de óleo em sementes de soja pelos métodos de ressonância magnética nuclear e soxhlet. **Biosci. J.**, Vol. 27, n. 1, p. 8-15, 2011.

41. Kumar R., Pandey K.K., Chandrashekar N., Mohan S. Study of age and height wise variability on calorific value and other fuel properties of Eucalyptus hybrid, *Acacia auriculaeformis* and *Casuarina equisetifolia*. **Biomass and Bioenergy**. Vol. 35, n. 3, p. 1339-1344, 2011.

42. Equipe Passeiweb. **Ciclos biogeoquímicos: 1. Ciclo do nitrogênio**. Disponível em: <http://www.passeiweb.com/estudos/sala_de_aula/biologia/ciclos_biogeoquimicos_nitrogenio>. Acesso em: 21 mai 2016.

43. Mandik Y. I., Cheirsilp B., Boonsawang P., Prasertsan P. Optimization of flocculation efficiency of lipid-rich marine *Chlorella* sp. biomass and evaluation of its composition in different cultivation modes. **Bioresource Technology**. Vol. 182, p. 89-97, 2015.

44. Singhasuwan S., Choorit W., Sirisansaneeyakul S., Kokkaew N., Chisti Y. Carbon-to-nitrogen ratio affects the biomass composition and the fatty acid profile of heterotrophically grown *Chlorella* sp. TISTR 8990 for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**. Vol. 216, p. 169-177, 2015.

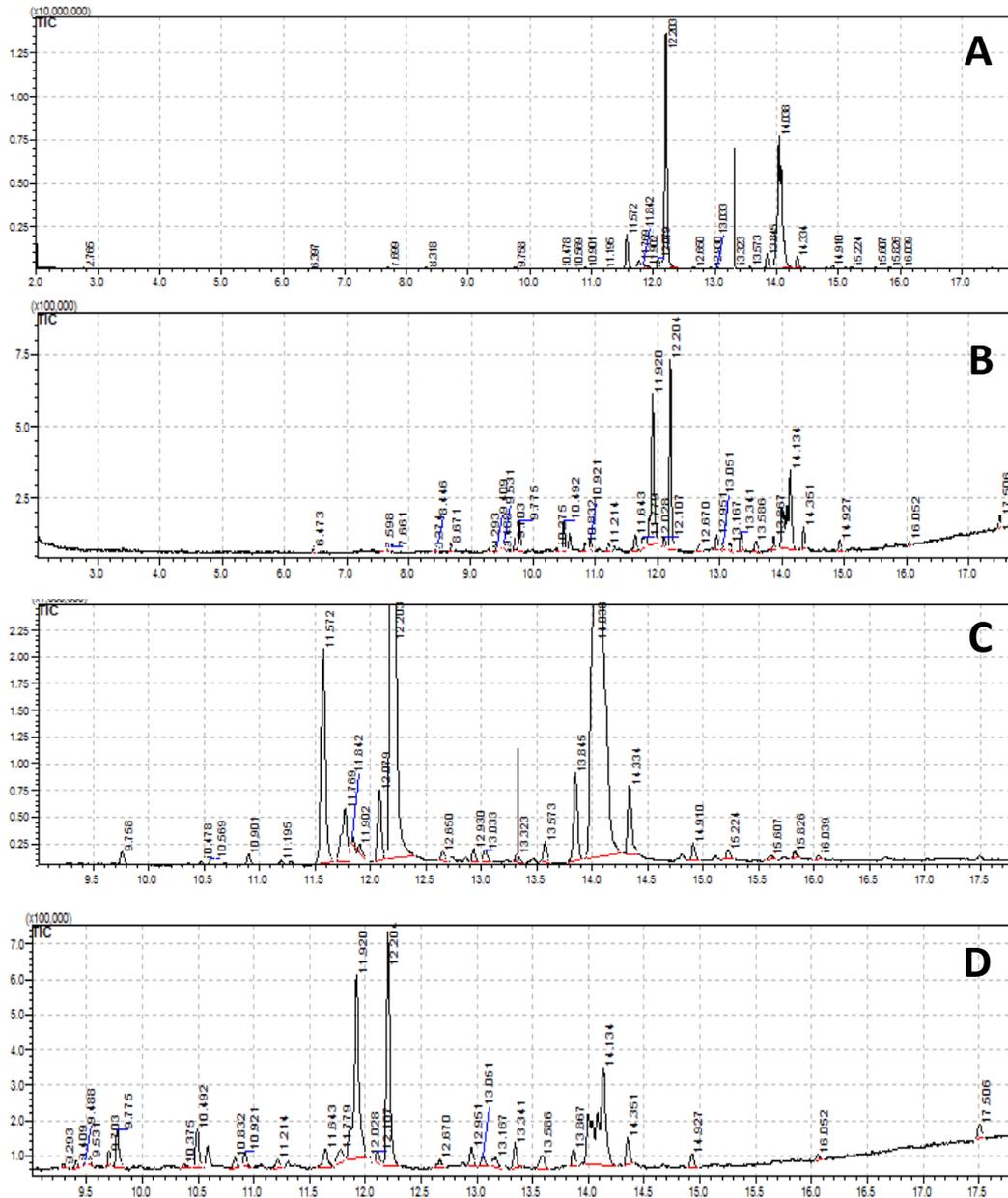
45. Goncalves E. C., Koh J., Zhu N., Yoo M. J., Chen S., Matsuo T., Johnson J. V., Rathinasabapathi B. Nitrogen starvation-induced accumulation of triacylglycerol in the green algae: evidence for a role for ROC40, a transcription factor involved in circadian rhythm. **Plant J**. Vol. 85, p. 743-757, 2016.

46. Souza B. S., Pinho D. M. M., Leopoldino E. C., Suarez P. A. Z., Nome F. Selective partial biodiesel hydrogenation using highly active supported palladium nanoparticles in imidazolium-based ionic liquid. **Applied Catalysis A: General**. Vol. 433, p. 109-114, 2012.

ANEXOS

7- Anexos

Cromatogramas gasosos: A) Cromatograma total biodiesel *Chlorella* sp.; B) Cromatograma total biodiesel de biossólido; C) Ampliação de 9 a 17,8 min biodiesel de *Chlorella* sp.; D) Ampliação de 9 a 17,8 min biodiesel de biossólido.



RMN-¹H completo do óleo de lodo de esgoto:

