

PAULA PEIXOTO ASSEMANY

EFEITO DA RADIAÇÃO SOLAR E PRÉ-DESINFECÇÃO NA  
CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DE BIOMASSA CULTIVADA EM  
LAGOAS DE ALTA TAXA UTILIZANDO ESGOTO DOMÉSTICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Viçosa, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A844e  
2013

Assemany, Paula Peixoto, 1986-

Efeito da radiação solar e pré-desinfecção na caracterização lipídica de biomassa cultivada em lagoas de alta taxa utilizando esgoto doméstico / Paula Peixoto Assemany – Viçosa, MG, 2013.

x, 102f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 91-102

1. Lagoas de estabilização. 2. Biodiesel. 3. Águas residuais.  
4. Lipídios. 5. Biocombustíveis. 6. Óleos e gorduras -  
Saneamento. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento  
de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Civil. II. Título.

CDD 22. ed. 628.351

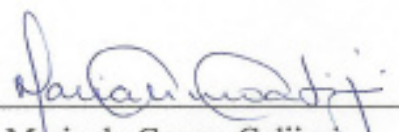
PAULA PEIXOTO ASSEMANY

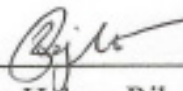
**EFEITO DA RADIAÇÃO SOLAR E PRÉ-DESINFECÇÃO NA  
CARACTERIZAÇÃO LIPÍDICA DE BIOMASSA CULTIVADA EM  
LAGOAS DE ALTA TAXA UTILIZANDO ESGOTO DOMÉSTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2013.

  
\_\_\_\_\_  
Alberto José Delgado dos Reis

  
\_\_\_\_\_  
Maria do Carmo Calijuri

  
\_\_\_\_\_  
Rejane Helena Ribeiro da Costa

  
\_\_\_\_\_  
Maria Lúcia Calijuri  
(Orientadora)

**À minha mãe Cassiana Ribeiro Peixoto.  
Ao meu pai Renato Assemany.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e inspiração.

Aos meus pais, Renato e Cassiana, ao meu irmão Emílio e toda minha família, pela confiança depositada e pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Civil, pela oportunidade concedida.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Lúcia Calijuri, pelo exemplo de motivação, entusiasmo e paixão pela pesquisa, por toda a orientação e ensinamentos.

Aos membros da banca, Dr. Alberto Reis, Professora Rejane Costa e Professora Maria do Carmo Calijuri, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

A todos os meus amigos, especialmente à Ana Paula, Isabella e Gabrielle pela convivência carinhosa do dia-a-dia.

Aos companheiros do nPA e do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA), pela convivência enriquecedora, pelas discussões e tantos momentos de aprendizagem e descontração.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Operação e Processos, em especial à Professora Jane, ao Maurício Leite e ao Jovanny Bermudez Sierra, pela receptiva acolhida. Pela disponibilidade, paciência e pelo imprescindível apoio nas análises de extração e cromatografia gasosa.

Ao Eduardo, pela companhia, por todo o apoio e pelas contribuições de melhoria dadas a esse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
2.1    Objetivos específicos.....	7
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>8</b>
3.1    Produção de microalgas em esgoto sanitário .....	8
3.2    Lagoas de alta taxa .....	10
3.3    Produção de lipídeos em microalgas .....	12
3.3.1    Biossíntese de lipídeos em microalgas .....	13
3.4    Métodos de extração lipídica .....	26
3.4.1    Extração via solvente.....	26
3.5    Rendimento lipídico de microalgas cultivadas em águas residuárias	29
3.6    Produção de biodiesel a partir de microalgas.....	32
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>35</b>
4.1    Descrição da unidade experimental .....	35
4.2    Caracterização das condições ambientais e do meio de cultivo.....	38
4.3    Caracterização da biomassa e da comunidade fitoplanctônica .....	39
4.4    Quantificação do lipídeo acumulado e da produtividade lipídica..	42
4.5    Caracterização do lipídeo acumulado: perfil de ácidos graxos.....	44
4.6    Análises Estatísticas .....	45
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
5.1    Caracterização das condições ambientais e do meio de cultivo.....	47
5.2    Caracterização da biomassa e da comunidade fitoplanctônica .....	56
5.3    Quantificação do lipídeo acumulado e da produtividade lipídica..	67
5.4    Caracterização do lipídeo acumulado: perfil de ácidos graxos.....	82
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>88</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>91</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de síntese biológica de ácidos graxos .....	15
Figura 2. Biossíntese de triglicerídeos em microalgas .....	16
Figura 3. Foto das LATs instaladas .....	36
Figura 4. Diagrama esquemático do experimento .....	38
Figura 5. Biomassa centrifugada .....	42
Figura 6. Biomassa seca.....	42
Figura 7. Separação da fase lipídica (superior) .....	44
Figura 8. Fase lipídica após a evaporação do solvente.....	44
Figura 9. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) dos parâmetros radiação fotossinteticamente ativa do ar (PAR) e subaquática (subPAR) nas lagoas com a pré-desinfecção UV (lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito).....	48
Figura 10. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) do parâmetro temperatura nas lagoas com a pré-desinfecção UV e no esgoto afluente (UASB) (lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito).....	49
Figura 11. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) dos parâmetros pH e oxigênio dissolvido (OD) nas lagoas com a pré-desinfecção UV	

(lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito) e no esgoto afluyente (UASB) .....	<b>51</b>
Figura 12. Concentrações de SSV no esgoto afluyente e nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito)....	<b>56</b>
Figura 13. Concentrações de clorofila <i>a</i> nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito).....	<b>58</b>
Figura 14. Produtividade de biomassa algal nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito).....	<b>58</b>
Figura 15. Concentração média de indivíduos de microalgas para cada lagoa ....	<b>61</b>
Figura 16. Variações na comunidade fitoplanctônica nas lagoas de alta taxa ao longo do período amostral (abundância de indivíduos, %). .....	<b>63</b>
Figura 17. Percentual de lipídeos totais em relação à biomassa seca nas lagoas sem a pré-desinfecção (lado esquerdo) e com a pré-desinfecção (lado direito)...	<b>70</b>
Figura 18. Óleo extraído para análise cromatográfica.....	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das propriedades de óleo de microalgas, diesel convencional e exigências da ASTM .....	34
Tabela 2. Caracterização do meio de cultivo afluente e efluente às lagoas de alta taxa (média ± desvio padrão).....	54
Tabela 3. Concentração média ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) de lipídeos totais na biomassa seca para cada lagoa de alta taxa nas datas de coleta. ....	69
Tabela 4. Resultados da análise de regressão múltipla para as lagoas sem a pré-desinfecção.....	73
Tabela 5. Resultados da análise de regressão múltipla para as lagoas com a pré-desinfecção.....	74
Tabela 6. Conteúdo lipídico mediano e produtividades médias de biomassa total, biomassa algal e de lipídeos para cada lagoa de alta taxa. ....	77
Tabela 7. Composição dos ácidos graxos. ....	84

## RESUMO

ASSEMANY, Paula Peixoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2013. **Efeito da radiação solar e pré-desinfecção na caracterização lipídica de biomassa cultivada em lagoas de alta taxa utilizando esgoto doméstico.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri. Coorientadores: Mônica de Abreu Azevedo e Eduardo Antônio Gomes Marques.

Microalgas são, atualmente, consideradas como uma das mais promissoras fontes alternativas para a produção de biodiesel. Variações nas condições de cultivo, aliadas ao cultivo em águas residuárias, são usualmente empregadas, visando maximizar o acúmulo de lipídeos a um custo relativamente baixo. Esse estudo objetivou investigar a influência de diferentes intensidades luminosas e da pré-desinfecção por radiação ultravioleta na caracterização lipídica de microalgas cultivadas em lagoas de alta taxa, utilizando esgoto doméstico como meio de cultivo. Foram operadas em paralelo doze lagoas de alta taxa. Uma linha era composta de seis lagoas que receberam efluentes domésticos diretamente do reator UASB, e a outra linha de seis lagoas que tiveram como meio de cultivo efluente doméstico do UASB que passou por processo prévio de desinfecção ultravioleta. As unidades foram ainda cobertas com telas de sombreamento para o bloqueio de 9, 18, 30, 60 e 80% da radiação solar. Os resultados mostraram que os gêneros *Chlorella* e *Desmodesmus* foram os dominantes em todas as unidades. O teor de lipídeos totais não variou significativamente entre as unidades, ficando em torno de 9,5%. As unidades com maior bloqueio da radiação solar foram as que menos acumularam lipídeos. Além da radiação solar fotossinteticamente ativa medida no ar (PAR), as variáveis PAR subaquática, concentração de SSV e de clorofila *a* explicaram o acúmulo de lipídeos. Em termos de produtividade lipídica, a unidade com maior sombreamento e sem a pré-desinfecção UV foi a mais produtiva, com valor médio de 1,21 g. m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. O perfil lipídico teve maior predominância dos ácidos graxos C16, C18:1 e C18:3. De forma geral, a condição com 60% de sombra e sem a pré-desinfecção UV, foi a que aliou as melhores características, em termos de quantidade e qualidade, dos lipídeos acumulados para produção de biodiesel.

## ABSTRACT

ASSEMANY, Paula Peixoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2013. **Effect of solar radiation and pre-disinfection in lipid characterization of high rate pond biomass grown in domestic sewage.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri. Co-advisers: Mônica de Abreu Azevedo and Eduardo Antônio Gomes Marques.

Microalgae are currently considered to be one of the most promising alternative sources for biodiesel production. Variations in growing conditions, combined with the cultivation in wastewater are usually employed in order to maximize lipids accumulation at a relatively low cost. The aim of this study was to investigate the influence of different light intensities and ultraviolet pre-disinfection system in the lipid characterization of microalgae cultivated in high rate ponds, using wastewater as growing medium. Twelve high rate algal ponds were operated in parallel. Six of them received UASB effluent, and the others six had as growth medium UASB effluent that had previously passed through an ultraviolet pre-disinfection system. The units were also covered with shade screens for blocking 9, 18, 30 and 60% of solar radiation. The results showed that *Chlorella* and *Desmodesmus* were the dominant genera in all units. The total lipid content did not vary significantly among the units; the medium value was 9.5%. Units with higher solar radiation blocking were the ones that least accumulated lipids. Besides photosynthetically active radiation measured in the air (PAR), the variables subaquatic PAR, VSS concentration and chlorophyll-a concentration were the ones that best explained lipid accumulation. In terms of lipid productivity, the unit with more shadow and without the pre-disinfection system was the most productive, with mean value of 1.21 g. m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>. The lipid profile had a predominance of C16, C18:1 e C18:3 acids. The condition with 60% shade and without the pre-disinfection system was the one that combined the best lipids characteristics, qualitative and quantitative, for biodiesel production.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma crescente necessidade de desenvolvimento de combustíveis alternativos aos combustíveis fósseis. Necessidade essa que cresce não só por questões ambientais, como também por razões econômicas, dados os problemas com o preço do petróleo e seus derivados. Estes aspectos têm forçado a busca por novas fontes de energia, especialmente as renováveis. Neste sentido, destaca-se o biodiesel, que além de ser renovável e emitir menos gases de efeito estufa, reduzindo assim a contribuição para o aquecimento global, produz também menos materiais particulados e óxidos de enxofre (Sharma et al., 2008).

O biodiesel é definido como uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, que pode ser obtida pela transesterificação de triglicerídeos com metanol ou etanol ou pela esterificação de ácidos graxos livres (Suarez e Meneghetti, 2007). As fontes atuais do biodiesel comercial são de plantas oleaginosas como a canola, a soja, a palma, o girassol dentre outros, além de gordura animal e óleo residual de cocção.

O Brasil possui enorme potencial para aumentar a produção, principalmente, de plantas oleaginosas com vistas à geração de matéria prima utilizada na produção de biodiesel. Dessa forma, tem realizado grandes esforços para consolidar o uso de biodiesel como uma opção energética. Em 2004 foi lançado pelo Governo Federal o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que objetiva a implementação de forma sustentável, técnica e econômica da produção e uso do Biodiesel, com enfoque na inclusão social e no

desenvolvimento regional, via geração de emprego e renda. No tocante ao Programa de Biodiesel Brasileiro, Lei N° 11.097, de 13 de Janeiro de 2005, o país deveria ser capaz de produzir aproximadamente 800 milhões de litros de Biodiesel por ano até o dia 31 de dezembro de 2007 para garantir o B2 (mistura de 2% de biodiesel, obrigatória em todo o diesel consumido no território nacional). A Resolução n°. 2/ 2008 do Conselho Nacional de Política Energética – CNPE, de 13 de março de 2008, estabeleceu que todo o óleo diesel comercializado no país passasse a conter o percentual mínimo obrigatório de 3% de biodiesel, o B3, a partir de 1° de julho de 2008. No ano de 2009, programou-se para o uso da mistura B5, o que é atualmente empregado. A expectativa é que a adição do biodiesel ao diesel chegue a 7% em 2013 e a 20% até 2020. Em setembro de 2011, o Brasil conquistou a posição de maior consumidor de biodiesel do mundo e atualmente, o país é o segundo maior produtor mundial, com a produção anual de 2,4 bilhões de metros cúbicos. Os maiores desafios de acordo com Miguel Rossetto, presidente da Petrobras Biocombustíveis são, entretanto, a descentralização da produção e a ampliação da participação da agricultura familiar como a principal fornecedora de matéria-prima para o setor (Rossetto, 2011).

Atualmente, 80% do biodiesel produzido no Brasil utilizam a soja como principal fonte. Outros 13% são extraídos de gordura animal e 4% vêm de outras fontes como girassol e caroço de algodão na região Centro-Oeste, da canola na região Sul, da palma nos estados do Norte e da mamona no Nordeste (ANP, 2012). Uma tendência observada é a regionalização em relação à escolha da

oleaginosa, em detrimento de sua real qualidade como matéria prima. Também observa-se que a matéria-prima normalmente utilizada é aquela que já possui sua logística de produção e distribuição já implementadas, como é o caso da soja e girassol. Outras oleaginosas alternativas que apresentam baixa produtividade necessitam de grandes espaços para cultivo, resultando em desmatamento e conseqüentemente danos ao ambiente. Outro aspecto relevante é que aumentar a produção de oleaginosas pode significar deslocar as atuais fronteiras agrícolas o que, se feito sem o correto planejamento, pode causar impactos ambientais negativos de grandes magnitudes. Há que se considerar também a problemática da utilização de fontes de alimento para produção de combustíveis, o que poderia gerar sérios conflitos e agravos nas desigualdades sociais do país.

Recentes estudos indicam que microalgas possuem características que as tornam potencial matéria prima para a produção de biodiesel (Walter et al., 2005; Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007). As vantagens do uso de microalgas como biocombustíveis são inúmeras, tais como: i) microalgas possuem capacidade de produção ao longo de todo o ano, dessa forma a produtividade lipídica excede o rendimento das culturas oleaginosas mais produtivas, por exemplo, para produção em lagoas de alta taxa, o rendimento das microalgas chega a 12.000 L de biodiesel/ha, enquanto que a cultura de canola possui rendimento de 1.190 L de biodiesel/ha (Schenk et al., 2008); ii) microalgas crescem em meio aquático, porém necessitam de menos quantidade de água do que culturas terrestres (Dismukes et al., 2008); iii) microalgas podem ser cultivadas em terras não aráveis, utilizando água não potável, assim não acarretam em mudança do uso e

ocupação do solo, minimizando possíveis impactos ambientais negativos (Searchinger et al., 2008); iv) ao mesmo tempo não comprometem a produção de alimentos, ou de outros produtos derivados de culturas agrícolas para alimentação animal (Chisti, 2007); v) as microalgas possuem um rápido crescimento, acumulando cerca de 10 a 50% da biomassa seca em forma de óleo (Meeting, 1996; Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007); vi) possuem efeito positivo na qualidade do ar, fixando CO<sub>2</sub> (1 kg de biomassa algal utiliza 1,83 kg de CO<sub>2</sub> para seu crescimento) (Chisti, 2007); vii) as microalgas podem produzir co-produtos, como proteínas e biomassa residual, que pode ser utilizada para fertilizante e ração animal (Spolaore et al., 2006) ou fermentada para produção de metano e etanol (Hirano et al., 1997) e co-produtos de elevado valor agregado como ácido ômega 3 e carotenoides.

Todavia, apesar do inerente potencial, existem ainda muitas dificuldades para o desenvolvimento de tecnologias de microalgas para produção de biocombustível. As atuais tecnologias ainda são incipientes, não garantindo a viabilidade comercial e a sustentabilidade da produção. Os desafios são os seguintes: i) seleção de espécies deve balancear requisitos de produção de biodiesel e extração de co-produtos (Ono e Cuello, 2006); ii) deve-se buscar maior eficiência fotossintética através do contínuo desenvolvimento de sistemas de produção (Pulz e Scheinbenbogan, 1998); iii) necessidade de desenvolver tecnologias de cultivo de uma só espécie, reduzir a evaporação e as perdas na difusão de CO<sub>2</sub> (Ugwu et al., 2008); iv) superar o potencial para balanço energético desfavorável, após contabilização dos requisitos energéticos para

bombeamento de água, transferência de CO<sub>2</sub>, colheita e extração (Hirano et al., 1998); v) há poucas plantas comerciais em operação, o que dificulta a obtenção de dados para produção em maior escala (Pulz, 2001).

Uma opção interessante do ponto de vista econômico e ambiental, para superar alguns desses desafios, é o reuso de esgoto doméstico urbano (Benemann, 1997), ou de outro tipo de efluente, para produção de biomassa algal. Com o uso de águas residuárias, os nutrientes necessários para o crescimento das microalgas são reaproveitados, além do uso de uma fonte alternativa de água. Aliadas ao cultivo em águas residuárias, variações nas condições de cultivo são usualmente empregadas, visando maximizar o acúmulo de lipídeos a um custo relativamente baixo. O mecanismo de síntese e acúmulo de lipídeos em microalgas é bastante amplo e complexo, e depende de diferentes fatores intrínsecos da biologia e bioquímica algal, bem como de fatores externos relacionados com as condições de cultivo. Dessa forma, usualmente, a pesquisa para o desenvolvimento de biocombustíveis de microalgas tem concentrado esforços no entendimento dessas variações nas condições de cultivo, como influência do *stress* nutricional, variação da temperatura, intensidade luminosa, idade do cultivo, dentre outros, para o favorecimento do acúmulo e produção de lipídeos.

No entanto, frente ao cultivo específico e controlado tendo água sintética como meio de cultivo, poucos são os estudos de produção de microalgas para fins energéticos que utilizam esgoto doméstico como meio de cultivo. Trabalhos que abordam conteúdo lipídico de biomassa de lagoas de alta taxa para

tratamento de águas residuárias e a variação da produção lipídica com a abundância de espécies são escassos na literatura (Craggs e Park, 2011). Além dessas lacunas, o efeito da variação da intensidade luminosa no acúmulo de lipídeos em microalgas, ainda não é um consenso entre os pesquisadores da área (Cade-Menun e Paytan, 2010).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar a influência de diferentes intensidades luminosas e da pré-desinfecção por radiação ultravioleta na caracterização lipídica de microalgas cultivadas em lagoas de alta taxa, utilizando esgoto doméstico como meio de cultivo.

### 2.1 Objetivos específicos

- a. Determinar a produtividade de biomassa e caracterizar quanti e qualitativamente a comunidade fitoplanctônica em cada lagoa de alta taxa submetida a diferentes condições de cultivo;
- b. Determinar a quantidade de lipídeos totais (% lipídeos totais na biomassa seca) e a produtividade lipídica de cada lagoa de alta taxa submetida a diferentes condições de cultivo;
- c. Determinar a qualidade do lipídeo (perfil de ácidos graxos) acumulado, para fins de produção de biodiesel, e,
- d. Verificar sob quais condições de cultivo, em relação à pré-desinfecção UV e intensidade luminosa, a produtividade lipídica é mais favorecida.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Produção de microalgas em esgoto sanitário**

Nos últimos anos o volume de esgoto gerado a partir das atividades humanas tem se elevado consideravelmente. Em diversas regiões do planeta, onde os aspectos sanitários ainda representam um dos principais problemas de infraestrutura, esse fator pode ocasionar importantes impactos ambientais negativos, principalmente no que diz respeito à qualidade das águas naturais.

Park et al. (2011a) afirmam que a produção de microalgas tendo o esgoto sanitário como meio de cultivo pode representar uma forma de reduzir os custos de produção de biocombustíveis, uma vez que os nutrientes para o crescimento da biomassa já estão presentes no meio. Além disso, as diferentes formas de se obter energia, como a extração de lipídeos para o biodiesel, a fermentação de carboidratos para o bioetanol e a digestão anaeróbia para o biogás, podem fazer com que o processo seja viável economicamente. Durante o crescimento da biomassa algal, a matéria orgânica e os nutrientes são consumidos, propiciando a depuração do efluente. Porém, Brennan e Owende (2010), apontam como desvantagens do cultivo de microalgas em esgoto sanitário, o elevado requisito de área, caso a produção se dê em lagoas, e o maior custo exigido na produção por fotobioreatores.

Diversos estudos têm avaliado o cultivo de algas em sistemas de tratamento de águas residuárias a partir da ótica de eficiência de remoção de nutrientes. Martínez et al. (2000) obtiveram significativa remoção de fósforo e nitrogênio

utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus*. Para fósforo, atingiram 98% de remoção, enquanto que para nitrogênio amoniacal foi alcançada a remoção completa, isso para tempos de detenção hidráulica de 94 e 183 horas, respectivamente. Gómez-Villa et al. (2005), trabalhando também com *S. obliquus*, obtiveram remoções de 47% e 45% de nitrogênio e fósforo, respectivamente, no inverno, enquanto que no verão essas remoções foram de 79% e 73%. Já Wei et al. (2008), trabalhando em escala de laboratório com produção de microalgas em sistemas de crescimento aderido, obtiveram redução na concentração de fósforo total de 98%, enquanto a redução de nitrogênio total foi de 87%.

Outras pesquisas mostram resultados referentes à produção de biomassa algal mediante o tratamento de esgotos. Para sistemas de lagoas de alta taxa e fotobioreatores tubulares, a produção varia de 10 a 45 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> (Chisti, 2007; González et al., 2008; Shen et al., 2009; Lundquist et al., 2010). Já para sistemas de crescimento aderido, a produção pode variar de 2,2 a 5,5 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> (Wilkie e Mulbry, 2002; Guzzon et al., 2008; Johnson e Wen, 2010).

Para suprir satisfatoriamente à produção de biocombustíveis, Li et al., (2011) afirmam que as cepas de microalgas devem atender a alguns requisitos para que o cultivo seja justificado, sendo eles, a capacidade de sobrevivência em águas residuárias, a capacidade de se desenvolver em um consórcio de microrganismos, além de um alto teor de lipídeos em sua constituição. Dessa forma, pesquisas, tanto em escala piloto quanto principalmente em escala real,

precisam de continuidade, a fim de otimizar o processo de produção e atingir uma qualidade elevada nos efluentes tratados.

### **3.2 Lagoas de alta taxa**

A produção de biomassa algal por meio do reuso de água residuária é, usualmente, realizada em lagoas de alta taxa (LAT) que são, ao mesmo tempo, usadas para o tratamento desse efluente. Tais unidades, assim como as lagoas de estabilização convencionais, são projetadas para promoverem interação ecológica entre algas e bactérias. A fotossíntese promovida pelas algas produz o oxigênio que garante a degradação da matéria orgânica pelas bactérias heterotróficas. O CO<sub>2</sub> proveniente da oxidação e os nutrientes são assimilados pelas algas. Durante seu desenvolvimento nas LATs, as microalgas assimilam os nutrientes existentes no meio, e quando são coletadas, conseqüentemente, ocorre a remoção dos nutrientes do efluente (García et al., 2006; Powell et al., 2009).

As lagoas de alta taxa possuem profundidade de 0,2 a 1,0 m. A mistura do efluente no interior da lagoa é realizada por uma estrutura de pás, que conferem velocidade horizontal que deve estar na faixa de 0,15 a 0,3 m.s<sup>-1</sup> (Craggs, 2005). A pequena circulação da massa líquida objetiva o revolvimento vagaroso, e conseqüentemente, a não ocorrência de estratificação, favorecendo o crescimento de algas maiores e coloniais que apresentam melhor sedimentabilidade. Além disso, promove uma melhor distribuição de nutrientes, melhor utilização da luz e atua na remoção do oxigênio produzido, melhorando a transferência ar-líquido e evitando a inibição da fotossíntese pelo excesso desse elemento (Ketheesan e Nirmalakhand, 2011).

As LATs, como caracterizadas hoje, foram desenvolvidas e apresentadas por Oswald no final da década de 50 (Picot et al., 1991). O sistema foi apresentado como um avanço tecnológico, no sentido de aumento no nível de sofisticação, sobre as lagoas de estabilização convencionais. Se por um lado o sistema proposto permitia menores requisitos de área, por outro, diminuiu em certo nível a melhor vantagem das lagoas convencionais: simplicidade de operação, já que incluía o movimento de pás para circulação suave da massa líquida. O que traz vantagens como menor requisito de área e maior produção de biomassa algal a ser aproveitada.

O custo de operação de um sistema de lagoas de alta taxa para produção de microalgas pode ser ainda menor diante da inclusão da digestão anaeróbia da biomassa, após a extração de lipídeos. Esse processo pode gerar biogás rico em gás metano, que pode ser utilizado na geração da energia necessária à operação do sistema (Sialve et al., 2009). Park et al. (2011a) afirmam que além dos custos de operação da produção e colheita de biomassa algal a partir do tratamento de esgotos por lagoas de alta taxa serem reduzidos, ainda existem significativas vantagens como a não captação de água para a produção de algas, e a produção de energia renovável.

Os sistemas de lagoas são amplamente utilizados em todo mundo, todavia, as lagoas de alta taxa são menos numerosas que as lagoas facultativas e as lagoas de maturação, por exemplo. Entretanto, com a exigência cada vez maior por parte da legislação para a remoção de nutrientes e a busca intensificada por fontes

alternativas de energia, é provável que sua utilização se amplie cada vez mais em um futuro próximo (Park et al., 2011a; Powell et al., 2011).

### **3.3 Produção de lipídeos em microalgas**

De acordo com Huang et al. (2010), estudos com combustíveis líquidos oriundos de microalgas se intensificaram no meio da década de 1980. Durante a segunda guerra mundial, cientistas alemães tentaram extrair lipídeos de diatomáceas, com objetivo de solucionar a crise energética (Cohen et al., 1995). Logo após, as pesquisas foram continuadas nos Estados Unidos no Instituto de Carnegie em Washington. Os resultados foram publicados em um livro intitulado “Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant” (Burlew, 1953). Todavia, as tecnologias de produção de combustíveis advindos de microalgas não foram totalmente exploradas. As razões para isso podem ser as seguintes: i) microalgas como fontes de lipídeos são menos conhecidas que plantas e animais; ii) os preços de óleos de plantas são relativamente baixos e os de gorduras animais são ainda mais baratos; assim, processos de produção de óleos de microrganismos são focados principalmente na obtenção de produtos de alto valor agregado que não são produzidos por plantas, como ácidos graxos insaturados, como ômega 3, EPA e DHA (Wen e Chen, 2000).

Lipídeos podem ser definidos como qualquer molécula biológica que é solúvel em um solvente orgânico. As microalgas sintetizam duas classes principais de lipídeos: (a) lipídeos neutros, que compreendem os acilgliceróis (mono, di e triacilgliceróis) e ácidos graxos livres; e (b) lipídeos polares que incluem os fosfolipídios e galactolipídeos, dentre outros (Halim et al., 2012).

Esses lipídeos são produzidos a partir das fontes de carbono fornecidas à microalga, sejam elas orgânicas, como a glicose, acetato ou glicerol, ou inorgânicas como o dióxido de carbono (Huang et al., 2010). Para fins energéticos de produção de biodiesel, os lipídeos neutros são os mais adequados e dentre esses, os triacilgliceróis são os mais desejados. Os lipídeos nas microalgas, como na maioria dos seres vivos, apresentam as funções principais de reserva energética (lipídeos neutros) e de compor a membrana celular (lipídeos polares). O perfil lipídico, ou seja, as proporções relativas de lipídeos neutros e polares alteram-se com a fase do ciclo de crescimento em que o cultivo se encontra, com o tipo de cultura e com as condições ambientais e de cultivo que a cultura for submetida, dentre outros fatores.

### **3.3.1 Biossíntese de lipídeos em microalgas**

Diferentemente das plantas superiores, nas quais classes individuais de lipídeos são sintetizadas e localizadas em uma específica célula, tecido ou órgão; os lipídeos nas microalgas são de uma enorme variedade e muitos desses tipos ocorrem em uma única célula. Depois de sintetizados, os triacilgliceróis são depositados em densos corpos lipídicos localizados no citoplasma da célula algal. A formação desses corpos lipídicos ocorre no espaço intertilacoidal (Hu et al., 2008).

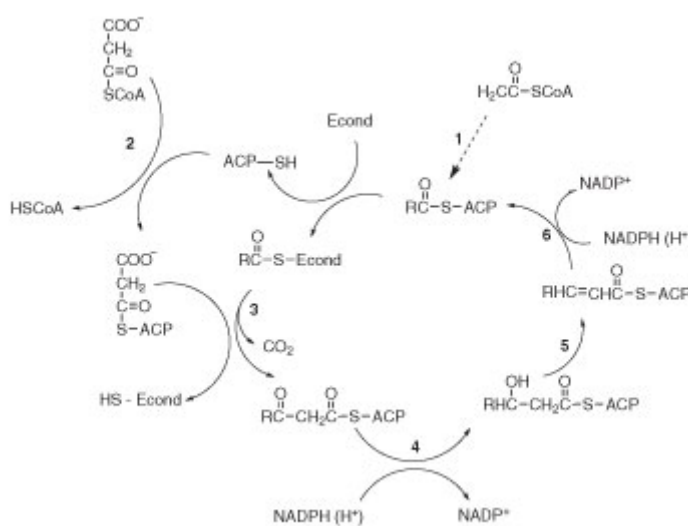
Segundo Huang et al. (2010), a biossíntese de triglicerídeos nas microalgas compreende três etapas principais: i) a formação de acetil coenzima A (acetil-CoA) no citoplasma, ii) a elongação e dessaturação das cadeias carbônicas dos ácidos graxos e iii) a formação dos triacilgliceróis.

Na primeira etapa, as rotas de utilização de fontes de carbono, como a matéria orgânica ou o dióxido de carbono, levam à formação de acetil-CoA nos cloroplastos durante as reações fotossintéticas e as reações do ciclo de Calvin. O piruvato originado na via glicolítica é convertido pelo complexo piruvato desidrogenase em acetil-CoA (Lehninger, 2004). O gliceraldeído-fósforo (GAP), precursor do piruvato é ponto chave nas vias metabólicas. O GAP é formado no ciclo de Calvin em reações de fixação de CO<sub>2</sub> e durante a via glicolítica. Pode também ser formado a partir de outras fontes orgânicas de carbono, como a matéria orgânica presente em águas residuárias. O GAP, depois de formado, é exportado do cloroplasto para o citoplasma, onde é utilizado na síntese de lipídeos para a formação de ácidos graxos, na síntese de açúcares ou na oxidação do piruvato pela via glicolítica (Huang et al., 2010).

A segunda etapa compreende a síntese da cadeia carbônica dos ácidos graxos. Essa etapa depende principalmente da reação de dois sistemas enzimáticos: a ACCE (acetil-CoA carboxilase), responsável pela conversão do acetil-CoA em malonil-CoA e a FAZ (ácido graxo sintase) responsável por ativar os grupos acetil e malonil e iniciar os processos de alongação. Em cada passagem por esse ciclo, a cadeia carbônica é estendida em dois carbonos (Lehninger, 2004).

A formação de ácidos graxos de cadeia média (de 14 a 18 carbonos) é similar em células de plantas superiores, animais, fungos, bactérias e algas. No entanto, em microalgas, a dessaturação da cadeia carbônica do ácido graxo ocorre no carbono 18 e facilita a alongação da cadeia para a produção de ácidos

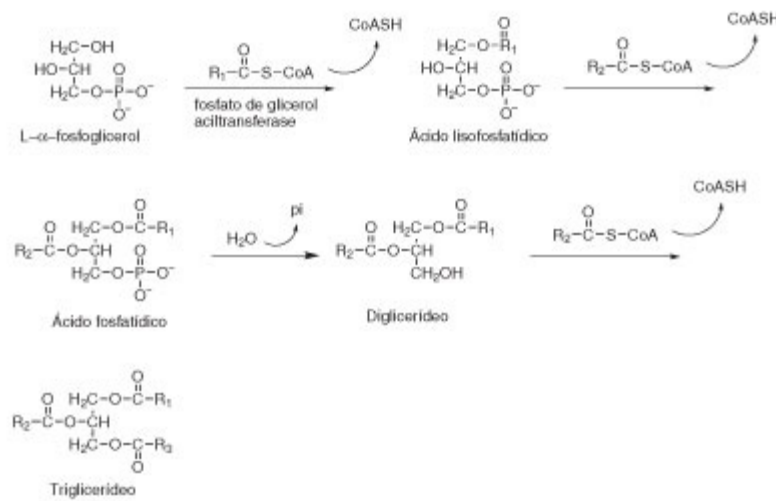
graxos de cadeia longa, fato que é incomum em plantas superiores. Ácidos graxos de cadeia longa (20 a 22 carbonos) são produzidos com frequência pelas microalgas, mas a quantidade varia de acordo com a espécie. Entretanto, um alto conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa não é desejável para o biodiesel e, portanto, algas ricas nesse tipo de composto não devem ser selecionadas para a produção de biodiesel (Huang et al., 2010). A Figura 1 ilustra o processo de formação biológica dos ácidos graxos.



**Figura 1. Processo de síntese biológica de ácidos graxos 1-acetil-CoA-ACP acil transferase. 2- Malonil CoA-ACP acil transferase. 3- $\beta$ -cetoacil-ACP. 4- $\beta$ -cetoacil-ACP redutase. 5- $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase. 6-Enoil-ACP redutase.**

A última etapa da biossíntese consiste na formação dos triacilgliceróis. Os precursores da formação de triacilgliceróis são os compostos acil-CoA graxo, formado a partir de ácidos graxos sob a ação da acil-CoA sintetase e L-glicerol-3-fósforo, formado pela ação da glicerol-3-fosforo-desidrogenase. Segundo Lehninger (2004), a primeira fase de síntese de triacilgliceróis a partir de ácido

fosfatídico é a acilação de 2 grupos hidroxila livres do 1-glicerol-3-fósforo por duas moléculas de acil-CoA graxo, denominado ácido fosfatídico ou fosfotidato. Esse ácido pode ser convertido em triacilglicerol. Na formação de triacilglicerol, o ácido fosfatídico é hidrolisado pelo ácido-fosfatídico fosfatase para formar 1,2-diacilglicerol. Os digliceróis são convertidos em triacilgliceróis pela transesterificação com uma terceira molécula de acil-CoA graxo. A Figura 2 apresenta a biossíntese de triglicerídeos em microalgas.



**Figura 2. Biossíntese de triglicerídeos em microalgas**

O mecanismo de síntese e acúmulo de lipídeos como descrito é bastante amplo e complexo, dependente de diferentes fatores intrínsecos da biologia e bioquímica algal, bem como de fatores externos relacionados com as condições de cultivo. A seguir são descritos e comentados alguns desses fatores externos que influenciam na síntese e acúmulo de triacilgliceróis, bem como na composição de ácidos graxos em microalgas.

### ***Influência do stress nutricional***

Como fatores nutricionais que podem aumentar a quantidade de lipídeos totais, pode-se citar a privação de nitrogênio (Spolaore, 2006; Meng et al., 2009), o aumento da concentração de ferro (Liu et al., 2008), a privação de silício em algas que possuem revestimento externo desse mineral, tais como as diatomáceas (Sirón et al., 1989), a deficiência de fósforo (Lombardi e Wangerski, 1991) e a presença de uma fonte de carbono para microalgas que tenham capacidade heterotrófica (Garcia et al., 2000).

A composição da alga está relacionada com a integração de vários processos envolvidos na captação e assimilação desses compostos. É conhecido que a deficiência de um nutriente leva o microrganismo a aumentar a captação do mesmo, assim como a eficiência metabólica dos processos em que este está envolvido. Na maioria desses casos, a maior absorção do nutriente está relacionada ao aumento de sítios de captação no plasmalema e a indução de isozimas com diferentes propriedades cinéticas que aumentam a afinidade por este nutriente (Beardall et al., 2001). Quando o meio é deficiente em nitrogênio ou fósforo, o que pode ocorrer na fase estacionária do cultivo ou quando o meio de cultura adicionado é pobre nessas substâncias, as células exibem um aumento da velocidade de captação do nutriente limitante. À medida que o nutriente vai se esgotando no meio, fica mais difícil para a célula encontrar esse nutriente. O fato de a célula ter aprimorado seus sistemas de captação para manter sua velocidade de crescimento, e não haver disponibilidade do nutriente para isso ocorrer, gera um *stress* fisiológico que aumenta ao passo que a concentração dos nutrientes

diminui. Esse *stress* altera o metabolismo da microalga, direcionando os processos metabólicos para a produção de lipídeos de reserva para preparar a célula para o período de privação (Greene et al., 1991; Alonso et al., 2000; Beardall et al., 2001; Santos et al., 2003; Lourenço, 2006; Meng et al., 2009).

#### *A influência do nitrogênio*

O nitrogênio é um dos principais elementos para o desenvolvimento microalgal, podendo ser assimilado através de várias fontes, como  $N_2$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ , ureia, aminoácidos, purinas e pirimidinas (Lourenço, 2006). Os sais de nitrato, de amônio e de ureia são as fontes mais empregadas em cultivos artificiais. Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência do aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. Contrariamente, quando as concentrações de nitrogênio são baixas, verifica-se uma diminuição marcante da taxa de divisão celular, além da redução das concentrações de proteínas e clorofila (Lourenço, 2006). Como já visto anteriormente, a depleção de nitrogênio pode aumentar o conteúdo lipídico de uma microalga (Alonso et al., 2000; Grant, 2001; Santos et al., 2003). Isso pode ser explicado pelo fato de que a falta de nitrogênio direciona o metabolismo microalgal, antes voltado para a multiplicação celular, para a produção de componentes de reserva, como os ácidos graxos saturados, para preparar a célula para um período de privação (Alonso et al., 2000).

Youngmanitchai e Ward (1991) relataram que a concentração de nitrogênio no meio interfere no grau de instauração dos lipídeos produzidos. Para algumas microalgas, como a *Dunaliella salina* e *Botryococcus braunii*, a depleção de

nitrogênio aumenta a produção de ácidos graxos polinsaturados. Já para a *Phaeodactylum tricornutum*, a produção desses ácidos graxos diminui sob privação e aumenta em um meio rico em nitrogênio. Santos et al. (2003) privaram a alga *Spirulina maxima* de nitrogênio, e obtiveram um aumento de até 207% de lipídeos totais por grama de biomassa seca. Kaixian e Borowitzka (1993) submeteram a microalga *Phaeodactylum tricornutum* a privação de nitrogênio e obtiveram um aumento de aproximadamente 20% na produção de lipídios por grama de biomassa seca em meio F/2 Guillard.

#### *A influência do fósforo*

O fósforo tem importantes funções na célula, estando envolvido em transferência de energia e constituição de moléculas como o ATP, açúcares fosfatados, ácidos nucleicos e fosfoenzimas (Lourenço, 2006).

No meio de cultivo, o fósforo pode ser adicionado na forma de fósforos e polifósforos, como fósforo de sódio e potássio. Fósforos de cálcio e de ferro se formam no meio, mas são indisponíveis para as algas por formarem complexos insolúveis. Por esse motivo, há necessidade de se garantir um excesso de fósforo no meio. Nesta condição, as microalgas absorvem até 16 vezes mais do que sua necessidade mínima, o que garante o crescimento da célula por um período quando houver privação desse nutriente (Lourenço, 2006; Chisti, 2007).

A deficiência de fósforo no meio afeta o perfil lipídico da célula com mais intensidade do que afeta a quantidade de lipídeos produzidos por biomassa seca. Já que o fósforo faz parte dos fosfolipídios, uma limitação deste nutriente direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos

saturados e lipídeos neutros, e ainda causa uma diminuição de ácidos graxos polinsaturados, o que é favorável para a produção de biodiesel (Sirón et al., 1989).

Alguns estudos relatam um aumento na quantidade de lipídeos totais intracelulares, aliada a diminuição do crescimento celular e mudanças no perfil lipídico da célula com a privação de fósforo no meio. Khozin-Goldberg e Cohen (2006) obtiveram um aumento em 15,5% em ácidos graxos polinsaturados e 39% de triacilgliceróis cultivando *Monodus subterraneus* em meio de cultura deficiente em fósforo. Lombardi e Wangerski (1991) submeteram a microalga *Chaetoceros gracilis* a um meio deficiente em fósforo e obtiveram um aumento da quantidade de lipídeos totais intracelulares atribuído à uma maior produção de triglicerídeos. Obtiveram ainda uma diminuição da produção de fosfolipídios e também um baixo crescimento celular. Esses resultados são consequência da redução da divisão celular e da síntese de clorofila causada pela limitação de fósforo. A baixa captação desse nutriente alterou a velocidade de crescimento da microalga, gerando uma situação de *stress* fisiológico, que direcionou o metabolismo da célula principalmente para produção de triacilgliceróis (Lombardi e Wangerski, 1991).

#### *A influência de uma fonte de carbono*

O carbono é o elemento que é necessário em maiores quantidades para algas, pois constitui em torno de 50% da biomassa seca (Derner, 2006). Pode estar na forma inorgânica, como o CO<sub>2</sub> e compostos derivados (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>), sendo proveniente do ar atmosférico ou de ar injetado na cultura, ou

na forma orgânica, como a glicose, acetato, lactato e aminoácidos. Algumas microalgas autotróficas só assimilam o carbono inorgânico, que se difunde da água para o interior das células e é usado em vários processos metabólicos, como a fixação do próprio carbono. Algumas microalgas também podem assimilar outras fontes de carbono e, quando a microalga consegue assimilar o CO<sub>2</sub> e carbono orgânico simultaneamente, pode-se chamar de cultivo de mixotrófico (Derner, 2006). Sob condições mixotróficas, algumas microalgas aumentam sua taxa de crescimento e sua biomassa, além de produzirem uma maior quantidade de ácidos graxos. Isso pode ser explicado pelo fato de que o uso de fontes suplementares de carbono minimiza as consequências do autossombreamento causado pela elevada concentração de biomassa no meio. Com a baixa disponibilidade de luz em cultivos densos, a assimilação do carbono inorgânico pelas microalgas fica prejudicada. Se a alga consegue assimilar mais carbono, aumenta sua produção de carboidratos, proteínas e lipídeos (Derner, 2006). Alguns autores reportam um aumento da biomassa seca e aumento da produção de lipídeos pela microalga *Phaeodactylum tricoratum* utilizando fontes de carbono como extrato de centeio, trigo ou batata (Fábregas et al., 1997), glicose e glicerol (García et al., 2000). Por exemplo, García e colaboradores (2000) adicionaram glicerol ao meio durante o cultivo dessa microalga e obtiveram uma produção de biomassa seca 74% maior do que um controle sem esse composto e ainda um percentual de lipídeos por biomassa seca 3 vezes maior do que o controle sem o glicerol.

### ***Influência da temperatura***

De acordo com Hu et al. (2008), a temperatura tem efeito principal na composição de ácidos graxos de algas e descrevem uma tendência observada em várias espécies. O aumento da temperatura leva a um aumento da saturação dos ácidos graxos, assim como a diminuição da temperatura acarreta em um aumento de insaturação desses ácidos (Renaud et al., 2002; Cade-Menun e Paytan, 2010; Sakthivel et al., 2011). O aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados a baixas temperaturas pode ser explicado pelo fato de que as algas necessitam produzir mais ácidos graxos polinsaturados para garantir a fluidez da membrana (Sakthivel et al., 2011). Outro motivo apresentado por esses autores é que temperaturas baixas levam a altos teores de oxigênio molecular no interior das células, melhorando a atividade das enzimas de dessaturação e alongação envolvidas na biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados. Por outro lado, sob altas temperaturas, os lipídeos são modificados na sua composição para proteção da membrana tilacóide, para garantir a fotossíntese (Cade-Menun e Paytan, 2010).

Outra tendência geral apresentada por Sakthivel et al. (2011) é o aumento do conteúdo de lipídeos totais em culturas submetidas a temperaturas abaixo da temperatura ótima de cultivo, uma vez que baixas temperaturas (10-15°C) resultam em condições de *stress* para a cultura, levando-a ao acúmulo de lipídeos. Da mesma forma, altas temperaturas (acima de 30°C) significam também mudanças nas condições ótimas de cultivo, porém com uma interrupção brusca do crescimento da cultura, levando à morte das células. No entanto, Cade-

Menun e Paytan (2010), afirmam que essa relação é inversa, ou seja, algumas espécies acumulam maiores quantidades de lipídeos totais geralmente a altas temperaturas e menores a temperaturas mais baixas.

### ***Influência da intensidade luminosa***

Ambas baixas e altas intensidade luminosas possuem a habilidade de limitar o crescimento algal, uma vez que influenciam na fotossíntese. Sob baixas intensidades, algas não terão energia suficiente para suas necessidades fisiológicas. Sob altas intensidades, a luz pode exceder a capacidade celular de utilização da energia, resultando em fotoinibição e até em foto-oxidação. O fenômeno de fotoinibição pode ser ainda mais grave se alta intensidade luminosa for acompanhada de baixa temperatura. Em sistemas naturais, altas intensidades luminosas advindas do sol podem vir acompanhadas de radiação ultravioleta, o que pode prejudicar as células algais (Balseiro et al., 2008; Garbayo et al., 2008).

A redução da fotossíntese e a fotoinibição irão limitar o carbono total que pode ser fixado pelas algas. Fato, que por sua vez, pode alterar a distribuição de carbono em compostos macromoleculares, uma vez que as algas tenderão a se proteger de altas intensidades ou irão maximizar sua capacidade de aprisionamento de energia em caso de baixas intensidades. Fotossistemas e seus subcomplexos estão ancorados na membrana tilacóide através de lipídeos exclusivamente presentes no cloroplasto (Mock e Kroon, 2002). Lipídeos estruturais apresentam além da função de compor a membrana celular, a de modular a eficiência do fotossistema e regular o fluxo de energia. Dessa maneira, o crescimento algal quando submetido a várias intensidades luminosas exhibe

notáveis mudanças na composição química, concentração e composição de pigmentos e atividade fotossintética. Por exemplo, cita-se que sob condições de baixas intensidades luminosas, algas alteram a composição do seu complexo de absorção de luz para maximizar essa absorção, reduzindo a quantidade de carboidratos e aumentando a de lipídeos.

Todavia, os efeitos na composição e concentração dos lipídeos causados pela variação da intensidade luminosa ainda não são consenso entre os pesquisadores. Se por um lado, há constatação de que uma baixa intensidade luminosa leva à um aumento no percentual de lipídeos em relação à biomassa seca; por outro, há pesquisas que comprovam aumento da quantidade de lipídeos quando culturas são submetidas a altas intensidades de luminosidade (maiores que  $1.600 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (Cuhel e Lean, 1987).

Quanto à característica qualitativa dos lipídeos, há certa concordância em literatura. Tipicamente, baixas intensidades luminosas induzem a formação de lipídeos polares de membranas associados ao cloroplasto; enquanto que uma elevada intensidade decresce o conteúdo de lipídeos polares com um concomitante aumento da quantidade de lipídeos neutros de armazenamento, principalmente os triacilgliceróis (Khotimchenko e Yakovleva, 2005). O grau de saturação do ácido graxo também pode ser alterado pela luminosidade. Com pequenas exceções, Hu et al. (2008) afirmam que baixas intensidades luminosas favorecem a formação de ácidos graxos polinsaturados, que são incorporados à estrutura da membrana. Consequentemente, elevadas intensidades alteram a síntese desses ácidos, de forma a produzir mais ácidos saturados e

monoinsaturados, que contribuem para os lipídeos neutros. Esse fato pode ser explicado, pelo fato de que a síntese de triacilgliceróis requer grandes quantidades de ATP e NADPH produzidos fotossinteticamente, ajudando assim, na dissipação do excesso de energia luminosa e prevenindo dano fotoquímico das células algais até que outros mecanismos de proteção sejam implementados (Roessler, 1990).

### ***Influência do ciclo de crescimento da cultura***

A mudança do perfil lipídico com a idade da cultura é explicada por Grima et al. (1994) pela quantidade de nutrientes e luminosidade. Se há disponibilidade de nutrientes, a tendência do cultivo é possuir um maior número de células gerando uma maior competição nutricional e menor disponibilidade de luz. Nessa condição, a alga é obrigada a ativar um aparato fotossintético mais complexo e passa a sintetizar mais lipídeos polares para fazer parte das membranas dos cloroplastos. Isso quer dizer que células jovens, na fase exponencial do cultivo, tendem a captar mais nutrientes pela alta disponibilidade destes no meio, produzindo, assim, mais lipídeos polares. Quando há depleção de nutrientes e uma alta concentração de células, a captação de nitrogênio e fósforo diminui, as células param de se multiplicar e o cultivo entra na fase estacionária. A célula passa então a utilizar fontes de carbono, orgânico ou inorgânico desde que disponíveis, para manutenção do seu metabolismo e para produção de lipídeos de reserva.

Esse mesmo comportamento é descrito por Hu et al. (2008). Os autores afirmam que o conteúdo lipídico e a composição de ácidos graxos são sujeitos à

variação durante o ciclo de crescimento da cultura. Em muitas espécies, um aumento na quantidade de triacilgliceróis, lipídeos mais fáceis de extrair para a produção de biodiesel, é observado na fase estacionária.

### **3.4 Métodos de extração lipídica**

A extração de lipídeos é uma etapa essencial no processo global de produção de biodiesel (Ranjan et al., 2010). Existem vários métodos analíticos ou técnicas de extração reportados em literatura, dentre elas: extração via Soxhlet, utilizando hexano como solvente, método de Bligh and Dyer, que utiliza mistura de clorofórmio, metanol e água como solventes, extração assistida por microondas, extração com fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom e extração com fluido pressurizado. São técnicas diferentes, porém a maioria delas envolve destruição da célula com liberação do óleo no citoplasma (Engler, 1985; Geciova et al., 2002). Para Ranjan et al. (2010) a escolha de uma técnica em particular depende de vários fatores, como a espécie da microalga, o conteúdo inicial de lipídeo e a quantidade de biomassa a ser tratada por vez.

Por ser a técnica mais difundida e utilizada em literatura, o foco desse estudo será dado à técnica de extração por solventes orgânicos.

#### **3.4.1 Extração via solvente**

De acordo com Ranjan e colaboradores (2010), existem dois mecanismos pelos quais a extração de lipídeos via solvente pode ocorrer: (1) difusão dos lipídeos através da parede celular, se a biomassa algal estiver suspensa no solvente com alta solubilidade e seletividade pelo lipídeo; (2) rompimento da parede celular com liberação do conteúdo da célula no solvente. Importante

ressaltar que o primeiro mecanismo é menos eficiente e mais demorado, pois depende da velocidade de difusão das moléculas, que é geralmente lenta. Esse mecanismo é descrito detalhadamente a seguir.

Segundo Halim et al. (2012), os princípios envolvendo extração por solventes orgânicos de lipídeos de microalgas são baseados no conceito químico de que semelhante dissolve semelhante. Quando uma célula de microalga é exposta a um solvente orgânico apolar ou fracamente polar, como hexano, clorofórmio ou éter de petróleo, o solvente penetra no citoplasma através da membrana celular e interage com os lipídeos neutros para formar o complexo solvente-lipídeo por meio de forças de van der Waals. Esse complexo se difunde através da membrana por diferença de concentração, e uma camada estática envolvendo a célula se difunde na massa do solvente. Conseqüentemente, os lipídeos neutros são extraídos para o exterior da célula e permanecem dissolvidos no solvente orgânico apolar ou fracamente polar. Essa camada estática ao redor da célula é formada devido a interações entre o solvente orgânico e a parede celular e permanece inalterada por qualquer fluxo de solvente ou agitação. Por sua vez, lipídeos polares são removidos por solventes polares (metanol ou isopropanol), uma vez que são ligados por pontes de hidrogênio a proteínas no citoplasma celular. O solvente orgânico (polar e apolar) penetra através da parede celular no citoplasma e interage com o complexo lipídico. Durante essa interação, o solvente apolar envolve o complexo lipídico, formando associações de van der Waals com os lipídeos neutros, enquanto o solvente polar forma pontes de hidrogênio com os lipídeos polares. As pontes de hidrogênio são fortes

o suficiente para deslocar as associações lipídeo-proteína que ligam os complexos lipídicos à membrana celular. Dessa forma, a adição de um solvente orgânico polar a um solvente apolar facilita a extração de complexos lipídios neutros associados à membrana. No entanto, esse processo leva também à inevitável co-extração de lipídeos polares (Halim et al., 2012).

Na maioria das práticas laboratoriais, ambos solventes polares e apolares são adicionados às células para garantir a completa extração dos lipídeos neutros, seja os que estão na forma de glóbulos livres ou aqueles que se encontram na forma de complexos associados à membrana. Kumari et al. (2011) afirmam que a precisão dos diferentes métodos de extração depende da solubilidade dos constituintes lipídicos no solvente utilizado e da natureza da amostra. Para Ranjan et al. (2010), a seletividade do solvente com o lipídeo é o que mais influencia na eficiência da extração. Christie (2007) destaca que a mistura de solventes deve ser suficientemente polar para remover os lipídeos dos constituintes celulares, porém não tão polar que os solventes não solubilizem prontamente todos os triacilglicerídeos e outros lipídeos apolares ou que extraiam uma maior gama de outros produtos indesejados para a produção de biodiesel como glicerol, colesterol, pigmentos, fosfolipídeos e polifenóis.

A cinética e os mecanismos envolvendo a extração por solventes de lipídeos em microalgas ainda não são totalmente entendidos e requerem estudos adicionais. Esse tipo de extração possui diversas desvantagens, dentre elas destacam-se: o método consome grandes quantidades de solventes, geralmente tóxicos, é lento e demanda energia para a remoção do solvente. Além disso, o

alcance da extração por um dado volume de solvente é termodinamicamente restrito pelo equilíbrio de transferência de massa (Wang e Weller, 2006). Porém, é um método barato, se comparado a outras técnicas mais sofisticadas, e também é de fácil replicação.

Um ponto chave, de merecido destaque, é a dependência da técnica extração do método de rompimento celular, ou seja, a eficiência da técnica de extração está intimamente relacionada com a eficiência do método de rompimento. Se por exemplo, a ruptura da celular for total, a extração de lipídeos será máxima.

### **3.5 Rendimento lipídico de microalgas cultivadas em águas residuárias**

Microalgas podem produzir algumas vezes quantidades significativas de lipídeos. O tipo de lipídeo produzido, ácidos graxos saturados, insaturados, glicolipídeos ou triacilglicerídeos, e a quantidade de lipídeos produzida vai depender das espécies de microalgas e das condições de cultivo (Chisti, 2007; Hu et al., 2008; Griffiths e Harrison, 2009). De acordo com Griffiths e Harrison (2009), altas quantidades lipídicas não são observadas em lagoas de alta taxa. No entanto, as altas concentrações de lipídeos nas células tendem a ser associados com baixa produção de biomassa, especialmente quando são induzidas por *stress* ambientais como limitações de nutrientes (Rodolfi et al., 2009; Dean et al., 2010).

Segundo Pittman et al. (2011), recentes estudos baseados em cultivos laboratoriais de microalgas em batelada, em lotes de fluxo semi-contínuo ou em bioreatores reportam uma razoável acumulação de lipídeos para águas residuárias

como meio de cultivo. Esses resultados variam de menos que 10% até 25-30% de lipídeos na biomassa seca. E em alguns estudos, esses resultados podem refletir em alta produção lipídica se associados à elevada produtividade de biomassa algal (Pittman et al., 2011). Kong et al. (2010) cultivaram biomassa da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* em esgoto doméstico e obtiveram 25% de lipídeo na biomassa seca, correspondendo a uma produtividade diária de 505 mg.L<sup>-1</sup> de lipídeos. Martínez et al. (2000) e Orpez et al. (2009), cultivaram microalgas em efluente doméstico secundariamente tratado e conseguiram resultados de 31% e 18% de conteúdo lipídico no peso seco, respectivamente. No caso do estudo de Orpez et al. (2009), o teor lipídico foi maior na cultura cultivada com água residuária do que a cultivada com meio sintético de cultivo (rendimento de 11% de lipídeos na massa seca), indicando que as condições estressantes promovidas com o cultivo em águas residuárias podem induzir o aumento na síntese de lipídeos.

Três estudos indicaram o potencial de cultivo de algas em efluente de indústria de laticínios. Woertz et al. (2009) determinaram o conteúdo lipídico de um consórcio de algas originalmente isolado de lagoas de tratamento de água residuais e cultivadas em efluente de laticínios digerido anaerobicamente em reatores ao ar livre. Após 6 dias de crescimento, o pico de acumulação de lipídeos atingiu 14 a 29% da massa seca, correspondendo a uma produtividade lipídica de 2,8g.m<sup>-2</sup>. dia<sup>-1</sup>. Wang et al. (2010) avaliaram o cultivo de microalga (*Chlorella sp.*) em efluente de laticínios digerido anaerobicamente e produziram uma análise detalhada do perfil lipídico das células. O conteúdo de ácidos graxos

totais, incluindo lipídeos neutros (ésteres e triacilgliceróis), fosfolipídeos e glicolipídeos, variou de 9 a 13% do peso seco, dependendo da concentração da água residuária usada no cultivo. O terceiro estudo também avaliou o crescimento de *Chlorella* em efluente de laticínios e comparou o cultivo em cultura suspensa ou aderida a um meio suporte de poliestireno (Johnson e Wen, 2010). O conteúdo de ácidos graxos totais foi similar nos dois sistemas de crescimento (9% da biomassa seca), porém a produtividade da biomassa foi superior no meio aderido de crescimento.

Mulbry et al. (2008) analisaram o crescimento de algas utilizando como meio de cultivo efluentes de suinocultura (bruto) e de laticínios (bruto e digerido anaerobicamente) com e sem adição de CO<sub>2</sub>. As algas foram cultivadas em um fotobioreator (*algal turf scrubber*) de escala laboratorial, e foram determinadas as produtividades de biomassa e de lipídeos. O conteúdo lipídico foi maior no efluente de suinocultura (9% do peso seco), porém a produtividade da biomassa foi superior para o efluente de laticínios (mais de 21 g do peso seco. m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, se comparado a 10,7 g do peso seco. m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup> do efluente da suinocultura).

Chinnasamy et al. (2010) desenvolveram estudos com efluente bruto de indústrias de carpetes misturado com efluente doméstico. A biomassa foi cultivada em lagoas de alta taxa de 950 litros, com adição de CO<sub>2</sub> e nitrogênio. O potencial de produção de biomassa algal foi de aproximadamente 9 a 18 toneladas por hectares por ano e o rendimento lipídico ficou em torno de 7% do peso seco. O rendimento do processo produtivo de biodiesel foi de 64%.

Sydney et al. (2011) apresentaram resultados de um levantamento de espécies de microalgas capazes de acumular lipídeos e remover nitrogênio e fósforo de efluente doméstico secundariamente tratado. Análises da biomassa indicaram um acúmulo de 36% de lipídeos no peso seco. A composição de ácidos graxos foi dominada pelos ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1), além de quantidades consideráveis dos ácidos esteárico (C18:0), linoleico (C18:2) e alfa-linoleico (C18:3).

### **3.6 Produção de biodiesel a partir de microalgas**

O biodiesel pode ser produzido a partir da transesterificação ou alcoólise dos triacilgliceróis, reação na qual esses compostos reagem com metanol ou etanol, resultando em ésteres de cadeia longa e uma molécula de glicerol (Chisti, 2007; Song et al., 2008). Além de ser renovável, possui vantagens sobre o diesel de petróleo como: emite menos gases na sua queima, não contribuindo para as mudanças climáticas e não emite compostos aromáticos, reduzindo seu impacto ambiental negativo (Meng et al., 2009; Huang et al., 2010).

Entre os microrganismos capazes de armazenar óleos, que são alternativas para o conflito com a produção de alimentos das plantas, destacam-se as microalgas, fungos, leveduras e bactérias. As microalgas sobressaem-se pela sua capacidade de produção de lipídio semelhante às plantas oleaginosas, por utilizarem o CO<sub>2</sub> como fonte de carbono (Takagi e Yoshida, 2005; Meng et al., 2009).

Para a produção de biodiesel é necessário que a matéria prima seja rica em triglicerídeos com cadeia carbônica de 14 a 18 carbonos, que são facilmente

transesterificáveis (Huang et al., 2010). As razões por essa preferência são duas. A primeira é que a escala industrial de transesterificação é focada em catálise alcalina e possui eficiência limitada em outras frações de lipídeos, como os polares e os ácidos graxos livres (Lang et al., 2001; Christie, 2007). A segunda é que acilgliceróis, geralmente, tem um baixo grau de insaturação se comparado às outras frações, produzindo assim, biodiesel com alta estabilidade de oxidação (Halim et al., 2012). A composição lipídica das microalgas compreende até 80% de triglicerídeos dos lipídeos totais extraídos, conforme a idade do cultivo, sendo esses triglicerídeos formados por ácidos graxos de cadeia longa, de 16 a 18 carbonos, principalmente para as microalgas de água doce (Meng et al., 2009). De acordo com Harwood e Guschina (2009), a maioria desses ácidos graxos são polinsaturados, o que é uma desvantagem do uso de microalgas como matéria prima para a produção de biodiesel, devido à facilidade desse óleo sofrer oxidação durante a estocagem.

Além dessas características, o óleo de microalga, principalmente as de água doce, possui características semelhantes às dos óleos de plantas oleaginosas e se enquadra dentro das principais exigências da ANP (Agência Nacional de Petróleo) para a qualidade do biodiesel, como o ponto de fulgor mínimo de 115° e baixo índice de acidez (menor que 0,8 mg de KOH/g) (Teixeira, 2008). Também, geralmente costuma se enquadrar dentro das exigências da Sociedade Americana de Teste de Materiais (ASTM) para Biodiesel, conforme Tabela 1.

**Tabela 1. Comparação das propriedades de óleo de microalgas, diesel convencional e exigências da ASTM**

<b>Propriedades</b>	<b>Biodiesel de microalga (<i>Chlorella protothecoides</i>)</b>	<b>Diesel convencional</b>	<b>Exigências da ASTM para biodiesel *</b>
<b>Densidade (Kg/L)</b>	0,864	0,838	0,84 – 0,90
<b>Viscosidade (mm<sup>2</sup>/s a 40°C)</b>	5,2	1,9 – 4,1	3,5 – 5,0
<b>Ponto de fulgor (°C)</b>	115	75	Min 100
<b>Ponto de solidificação (°C)</b>	-12	-50 a 10	—
<b>Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)</b>	-11	-3 (máx. -6,7)	Verão: máx. 0 Inverno: máx. < -15
<b>Índice de acidez (mg KOH/g)</b>	0,374	Máx. 0,5	Máx. 0,5
<b>Calor para aquecimento (MJ/kg)</b>	41	40 - 45	—
<b>Razão H/C</b>	1,81	1,81	—

Fonte: Xu et al., 2006.

\* ASTM, 2002.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Descrição da unidade experimental

As lagoas de alta taxa foram instaladas na Unidade Experimental de Tratamento de Esgotos e Utilização de Efluentes da Violeira (ETE Violeira), no município de Viçosa, MG. Durante toda a duração desse projeto as lagoas foram alimentadas continuamente com efluente do reator UASB (Up-flow Anaerobic Sludge Blanket) construído em escala real para o tratamento do esgoto de aproximadamente 600 habitantes do bairro da Violeira ( $Q_{med} = 115 \text{ m}^3 \cdot \text{dia}^{-1}$ , volume =  $48 \text{ m}^3$ , altura = 5,70 m e tempo de detenção hidráulica (TDH) = 7 h). De toda a vazão efluente do reator, uma parte, em torno de 2 a  $4 \text{ m}^3 \cdot \text{dia}^{-1}$ , foi encaminhada ao sistema de lagoas.

Foram construídas doze lagoas de alta taxa em fibra de vidro com 1,28 m de largura, 2,86 m de comprimento e 0,5 m de altura, sendo a altura útil de 0,3m, área superficial de  $3,3 \text{ m}^2$  e volume útil de  $1 \text{ m}^3$  (Figura 3). Para prover o fluxo nas unidades, foram instaladas pás giratórias impulsionadas por um conjunto motor redutor que teve sua velocidade angular controlada por um inversor de frequência WEG CFW10, para prover o fluxo do efluente, fornecendo ao meio uma velocidade de 0,10 a  $0,15 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ . O TDH de 4 dias foi ajustado através do controle manual da vazão em  $10,4 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ .

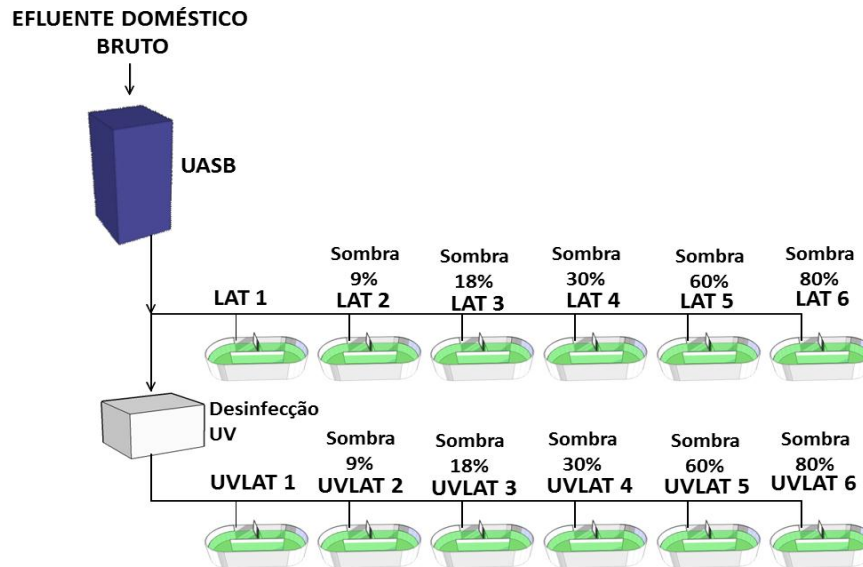


**Figura 3. Foto das LATs instaladas**

As doze LATs instaladas operaram em paralelo. Uma linha era composta de seis lagoas que receberam efluentes diretamente do reator UASB, e a outra linha de outras seis lagoas que tiveram como substrato efluente doméstico do UASB que passou por processo prévio de desinfecção ultravioleta. O sistema de desinfecção ultravioleta foi dimensionado para atingir o padrão de  $10^3$  NMP.100mL<sup>-1</sup>, com dose efetiva adotada de 21 mJ.cm<sup>-2</sup> e absorbância de 42%, sugeridas por Gonçalves et al. (2003), que estudaram a remoção de *Escherichia coli* por desinfecção UV em efluentes de UASB. Portanto, a unidade de desinfecção possuiu dose aplicada por volume de 5,64 Wh.m<sup>-3</sup>. As dimensões do reator de desinfecção eram de: 0,16 m de largura, 0,76 m de comprimento, 0,10 m de lâmina d'água, e 8,4 segundos de TDH. Foram instaladas três lâmpadas emersas de radiação UV-C, feitas em tubo de quartzo, potência de 15 W cada, sendo de baixa pressão, com dimensões de 436 mm de comprimento, 26 mm de diâmetro, colocadas no sentido longitudinal. O objetivo da etapa de desinfecção

foi o de remoção de organismos predadores de microalgas e competidores por nutrientes, consistindo em melhoria para o crescimento da biomassa algal.

De forma a avaliar a influência de diferentes intensidades de radiação solar no processo de crescimento da biomassa e acúmulo de lipídeos, as LATs receberam uma cobertura com telas de sombreamento. As telas de sombreamento foram instaladas com a altura máxima de 1,3 m e distante da borda do tanque no solo de aproximadamente 0,3 m. As telas utilizadas foram as mesmas utilizadas em cultivo agrícola protegido, fabricadas de polietileno de alta densidade da marca equipesca®, sombrite®. As primeiras lagoas, tanto da linha sem, quanto da linha com a desinfecção, LAT1 e a UV1, respectivamente, foram consideradas testemunhas e, portanto, operaram sem cobertura. A cobertura da radiação cresceu em intensidade da LAT2 e UV2 para a LAT6 e UV6, de forma que as LAT2 e UV2 tinham 9% de bloqueio da luz solar, as LAT3 e UV3 18%, as LAT4 e UV 4 30%, LAT5 e UV5 60% e LAT6 e UV6 80%. Na Figura 4 é apresentado um diagrama esquemático do experimento instalado.



**Figura 4. Diagrama esquemático do experimento**

#### **4.2 Caracterização das condições ambientais e do meio de cultivo**

Análises de qualidade do esgoto doméstico afluente e efluente às lagoas foram feitas semanalmente de 31 de janeiro a 19 de novembro de 2012, totalizando 36 campanhas de amostragens. A coleta de amostras para análises dos parâmetros físicos e químicos foi realizada de forma composta com frequência de duas horas (de 8:00 h às 18:00 h).

As análises físicas e químicas do afluente e efluente às unidades seguiram, essencialmente, as disposições do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005): nitrogênio amoniacal (4500–NH<sub>3</sub>C), nitrato (4500–NO<sub>3</sub>E), fósforo total solúvel (4500 PC–filtrada a 0,45 μm). Entre parênteses, na frente de cada variável monitorada, encontra-se o número do procedimento adotado em cada análise. Para determinação do carbono orgânico total (COT) e carbono inorgânico (CI) utilizou-se o TOC 5000 Shimadzu. O

carbono total (CT) foi considerado como sendo a soma do carbono orgânico total e do carbono inorgânico. Adicionalmente, nas datas de monitoramento e amostragem, a cada duas horas realizaram-se as medições de pH, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura. Para tais variáveis, utilizou-se sensor da marca Hach modelo HQ40d (Luminescent Dissolved Oxygen (LDO) para oxigênio dissolvido). Também se mediu radiação solar fotossinteticamente ativa (PAR) (400-700 nm) na superfície da água e a radiação fotossinteticamente ativa (400-700nm) subaquática (subPAR) (aproximadamente 10 cm de profundidade, medida realizada no centro da lagoa) utilizando-se radiômetro LI-COR - LI-193 Underwater Spherical Quantum Sensor.

### **4.3 Caracterização da biomassa e da comunidade fitoplanctônica**

#### **Quantificação da biomassa**

Como o meio de cultivo utilizado foi o esgoto doméstico, a quantificação da biomassa foi realizada por meio de dois parâmetros: sólidos suspensos voláteis (SSV) e clorofila *a*. O parâmetro SSV exprime a quantidade de biomassa total (algas, bactérias e outros) produzida em cada lagoa; já o parâmetro clorofila *a* exprime somente a quantidade de biomassa algal produzida em cada unidade.

As determinações do teor de SSV (2540E) de acordo com APHA (2005) e clorofila *a* foram realizadas nas mesmas datas de coleta e amostragem, para a caracterização do meio de cultivo, descritas no tópico anterior.

A determinação da produtividade da biomassa algal foi feita com base na análise de clorofila *a*. Para a determinação da concentração da clorofila *a*, as amostras foram filtradas em membranas de microfibras de vidro (Millipore AP 20;

47 mm de diâmetro e 0,8 - 8,0µm de porosidade) e conservadas no freezer até o momento da extração. No laboratório, a extração foi feita com etanol 80%. A análise dos extratos foi feita por espectrofotometria, segundo a metodologia descrita em APHA (2005), na faixa de 665nm e 750nm. Para a determinação da clorofila *a* e da feofitina foram utilizadas as fórmulas, descritas em Nush (1980) e modificadas segundo a Norma Holandesa (Nederlands Norm Nen 6520,1981).

A proporção de biomassa algal foi estimada a partir da concentração de clorofila *a* utilizando a Equação 1 (Raschke, 1993):

$$Biomassa\ Algal\ (g.m^{-3}) = \frac{Clorofila\ a}{1,5} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

De acordo com a equação, a clorofila *a* representa 1,5% da biomassa algal (peso seco), sendo esta proporção constante. Sabe-se que tal relação não é constante e varia de acordo com as espécies, densidade das células e disponibilidade de luz (Park e Craggs, 2011). Porém, a título de comparação entre as lagoas deste estudo, esta medida foi utilizada, no intuito de determinar qual lagoa possuía maior produção de biomassa algal.

### **Caracterização da comunidade fitoplanctônica**

As coletas foram realizadas quinzenalmente em cada uma das lagoas de alta taxa no período de 31 de janeiro a 22 de outubro de 2012.

#### *Análise qualitativa*

Para as análises qualitativas utilizou-se uma rede própria para amostragem de organismos planctônicos, rede de 20µm. O volume de 150mL de amostra coletada, que permaneceu no copinho da rede após a filtragem, foi fixado com

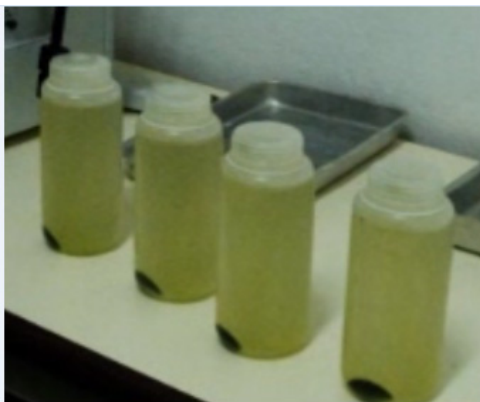
150mL de solução de formol a 4%. A identificação taxonômica foi feita, em nível de gênero com auxílio de um microscópio binocular (Olympus IX70). As características morfológicas e morfométricas da vida vegetativa e reprodutiva de valor taxonômico para as espécies foram analisadas de acordo com bibliografia especializada.

#### *Análise quantitativa*

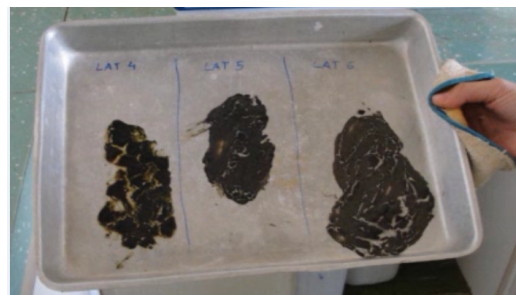
Para análise quantitativa foram coletadas amostras de um litro em frascos de vidro âmbar. Tais amostras foram conservadas em geladeira até a fixação com solução lugol. A quantificação foi realizada por meio de contagens de células, em câmara Sedgwick-Rafter, de acordo com a Norma Técnica L5.303 Cetesb (2005). Após o período de decantação, o sobrenadante foi descartado, resultando em concentrado de aproximadamente 100 mL. Este concentrado foi homogeneizado e 1 mL transferido com pipeta para câmara de Sedgwick-Rafter. Após 15 minutos, a câmara foi levada ao microscópio (Olympus IX70) e analisada em aumento de 40x. Os resultados foram reportados em concentração de indivíduos por mL de amostra. Importante ressaltar que essa medida de concentração está sujeita a interpretações falhas, devido a não consideração do biovolume celular. Células entre gêneros ou entre indivíduos diferentes variam enormemente e influenciam diretamente na análise quantitativa das espécies presentes (Lyakh, 2007; Rott et al., 2007; Vadrucchi et al., 2007). No entanto, mesmo sujeitos a falhas, os resultados apresentados de organismos por mL nos permite inferir sobre a densidade de organismos em cada lagoa para fins de comparação.

#### 4.4 Quantificação do lipídeo acumulado e da produtividade lipídica

As coletas foram realizadas com frequência quinzenal de 31 de maio a 12 de novembro de 2012. A biomassa coletada na saída de cada lagoa em galões de 10L foi concentrada em centrífuga refrigerada de alta rotação (Hitachi CR 21GII, rotor R10A3), a 10.000 rpm e 15°C por 5 minutos. Após concentração, a biomassa foi submetida à estufa a  $50 \pm 10^\circ\text{C}$  por no mínimo 12 horas para secagem. A biomassa seca foi macerada e deixada em dessecador para análise. A secagem foi realizada visando minimizar a quantidade de água na biomassa, uma vez que a água forma uma barreira que impede a efetiva transferência de massa lipídica da célula para o solvente (Halim et al., 2012). As Figuras 5 e 6 ilustram a biomassa centrifugada e seca, respectivamente.



**Figura 5. Biomassa centrifugada**



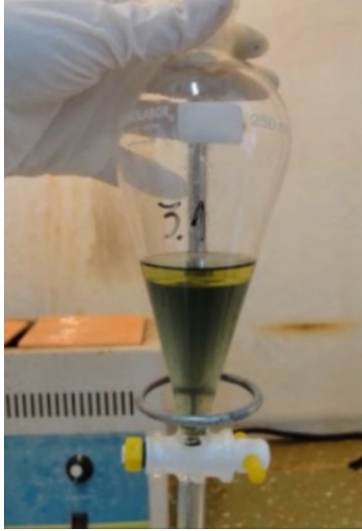
**Figura 6. Biomassa seca**

A análise do teor lipídico consistiu, primeiramente, na pesagem da biomassa seca (0,1g) para posterior rompimento da parede celular, com adições de 5mL de HCl 3M, 4mL de éter de petróleo e 25mL de metanol. A importância do rompimento da parede celular para maior eficiência da extração é consumada em literatura, pois libera no meio os lipídeos intracelulares (Gouveia et al., 2007; Lee et al., 2010). Dentre diferentes métodos de pré-tratamentos não-mecânicos

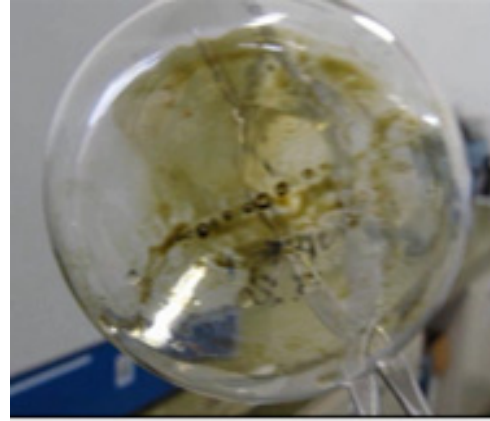
(ácidos, bases, enzimas ou choque osmótico) (Chisti e Moo-Young, 1986), a adição de ácido foi escolhida para a lise celular por ter se apresentado como mais eficiente em testes comparativos (observação do estado celular em microscópio binocular Olympus IX70) para a biomassa nas condições dessa pesquisa. A mistura foi, então, levada a aquecimento em chapa aquecedora por 15 minutos a 50°C.

Como segunda parte, procedeu-se à 3 extrações via solvente em funis de separação com adições de 10mL, 20mL e 10mL de éter de petróleo na primeira, segunda e terceira extração, respectivamente. A escolha do éter de petróleo deu-se pelo fato de que esse solvente orgânico é menos polar, extraíndo lipídeos de maior interesse para a produção de biodiesel (de baixa polaridade) e arrastando assim, menos impurezas, pigmentos e lipídeos não neutros (Sakthivel et al., 2011), se comparado ao clorofórmio (solvente utilizado na difundida metodologia Bligh and Dyer, (Bligh e Dyer, 1959)).

Após a extração, a terceira parte consistiu na lavagem do óleo + solvente com adição de 10mL de acetato de chumbo a 4% para retirada de impurezas e pigmentos. A última etapa caracterizou-se pela quantificação do óleo por gravimetria com a evaporação de solvente em chapa aquecedora (50°C) e posterior secagem em estufa por 2 horas a 105°C. A determinação do teor lipídico foi feita em duplicata nas 12 lagoas e no efluente do reator UASB. As Figuras 7 e 8 ilustram o processo de extração.



**Figura 7. Separação da fase lipídica (superior)**



**Figura 8. Fase lipídica após a evaporação do solvente**

O teor lipídico (% de lipídeos na biomassa seca) foi calculado de acordo com Equação 2:

$$\text{Teor lipídico (\%)} = \frac{(\text{peso recipiente cheio}) - (\text{peso recipiente vazio})}{(\text{peso da biomassa seca})} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

A produtividade lipídica foi obtida multiplicando-se a produtividade de biomassa total (SSV) pelo teor lipídico de cada lagoa, obtidos em cada data de coleta.

#### **4.5 Caracterização do lipídeo acumulado: perfil de ácidos graxos**

Cruzando dados de SSV e de teor lipídico, foi possível obter a produtividade lipídica de cada lagoa de alta taxa. Para as duas lagoas mais produtivas de cada linha (sem e com desinfecção UV) e as lagoas testemunhas (LAT1 e UV1), caracterizou-se qualitativamente o óleo produzido. O óleo bruto foi extraído de acordo com o mesmo procedimento descrito no item anterior, porém com a pesagem de maior quantidade de biomassa (0,5g) e uso de agitador magnético por 10 minutos para solubilização da biomassa na mistura ácido-

solvente. Adicionalmente, a mistura (óleo + solvente) após a lavagem com acetato de chumbo a 4% foi filtrada com sulfato de sódio anidro para remoção de impurezas e umidade.

O óleo de cada lagoa escolhida foi então pesado (aproximadamente 0,01g) e a ele adicionados 0,2mL de tolueno, 1,5mL de metanol e 0,3mL de 8% de HCl em metanol. A mistura foi levada a estufa por 24 horas a 45°C. No dia seguinte, foram adicionados 2mL de hexano e 1mL de água e a fase superior coletada e acondicionada em ultra freezer para análise da composição de ácidos graxos em cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG-2010). As condições da análise foram as seguintes: coluna HP-88 (cianopropilo com polissiloxano, 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm), temperatura da coluna de 260°C, splitless, o forno foi aquecido a 60°C em 1 minuto, passando a 130°C (20°C min<sup>-1</sup>) e 240°C (5°C. min<sup>-1</sup>) e mantido a 240°C por 10 minutos. A vazão do gás hélio foi de 2,46mL. min<sup>-1</sup> a 363,8 kPa e a temperatura do detector de ionização de chama foi de 270°C. Os picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados através dos tempos de retenção por comparação com padrões autênticos e quantificados por normalização de área. Foram utilizados os seguintes padrões de ésteres metílicos para calibração do equipamento: C12, C14, C16, C18, C19, C20 e C24.

#### **4.6 Análises Estatísticas**

Os dados de produtividade lipídica foram submetidos a teste de significância para diferenciação estatística das médias de cada lagoa de alta taxa. Com o auxílio do software ASSISTAT, versão 7.6 beta, 2012, foi realizada

análise de variância (ANOVA), presumindo experimento inteiramente casualizado (DIC) para aplicação do teste t a 5% de significância.

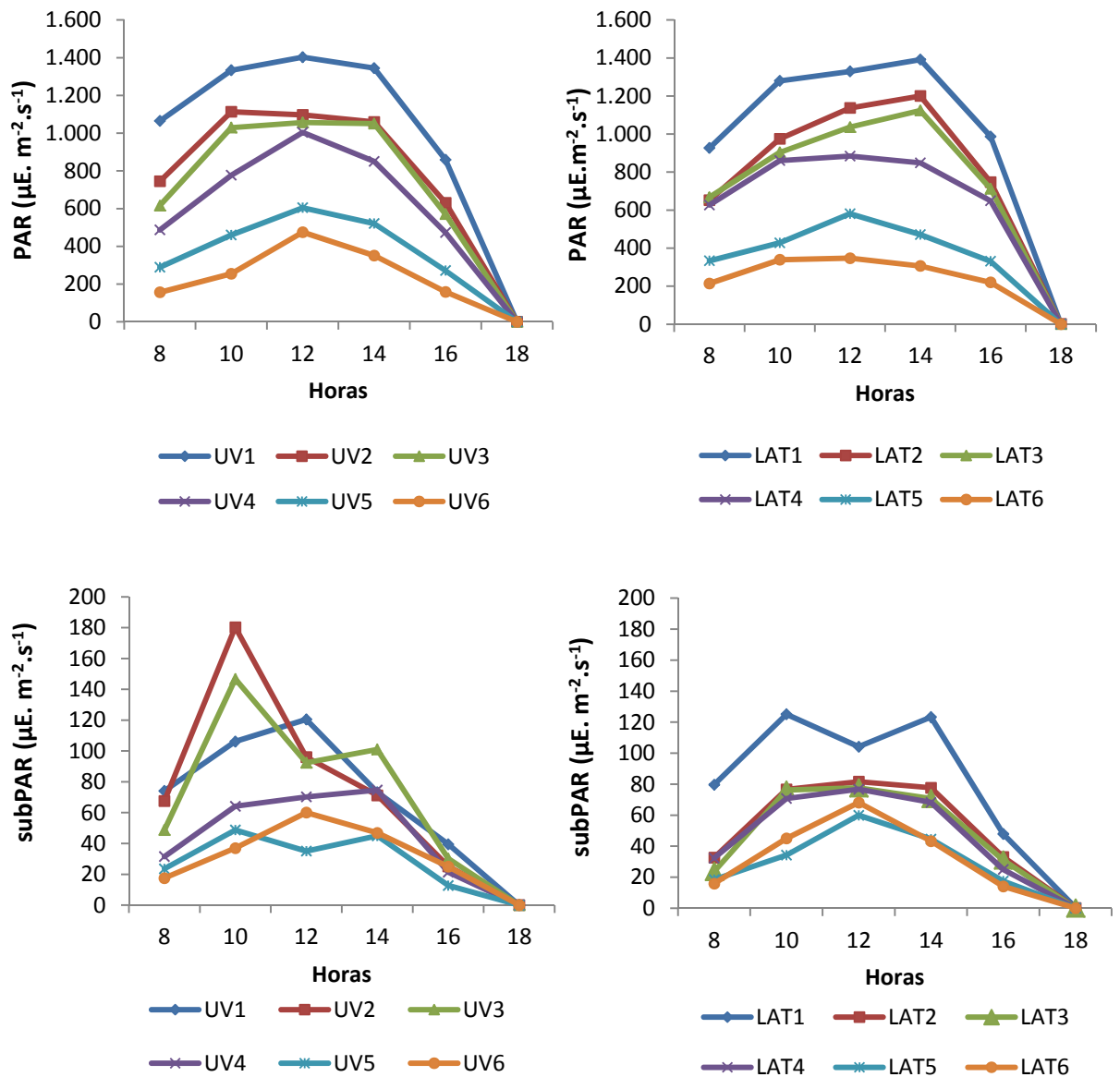
Com o auxílio do software Genética Quantitativa e Estatística Experimental versão 2009.7.0, Genes, (Cruz, 2006) tentou-se ajustar modelos de regressão múltipla para explicar a relação causa-efeito das variáveis radiação fotossinteticamente ativa do ar, radiação fotossinteticamente ativa subaquática, concentração de SSV e concentração de clorofila *a* na produção de lipídeos (% lipídeos totais). Foram utilizados dados médios de cada variável, totalizando seis pontos para a equação de regressão, um para cada condição de intensidade luminosa. Os coeficientes da equação foram calculados e testados quanto as suas significâncias a 5% pelo teste t bilateral.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

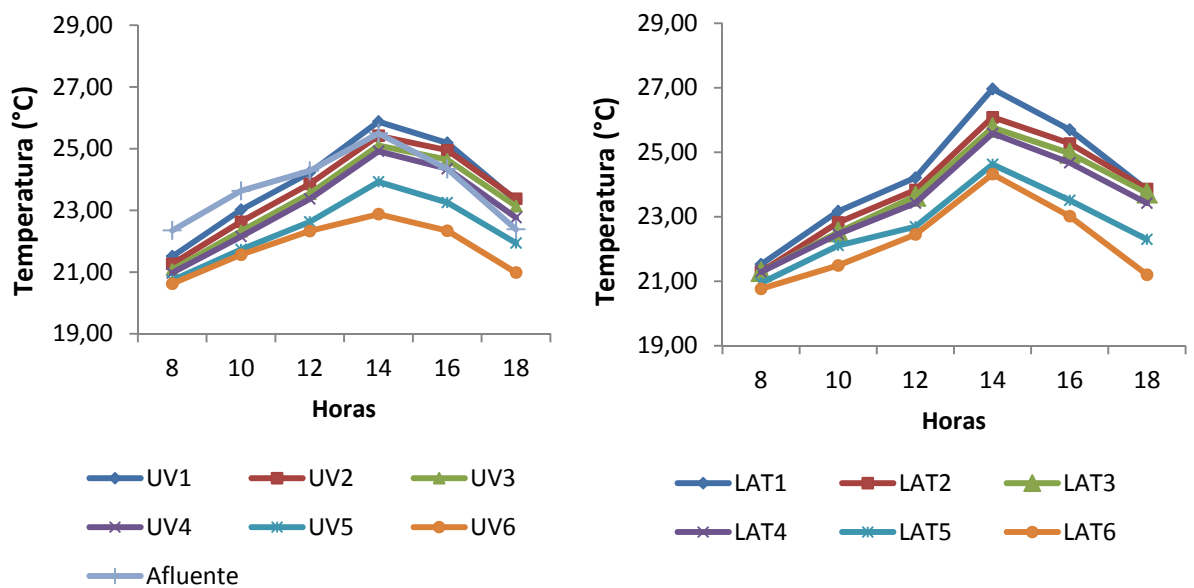
### **5.1 Caracterização das condições ambientais e do meio de cultivo**

Tradicionalmente, as variáveis que controlam a dinâmica de crescimento das comunidades aquáticas são: radiação solar, mistura da água e nutrientes (Sand-Jensen, 1989; Makkay et al., 2008). Com exceção da radiação, pode-se assumir que os demais recursos foram fornecidos sem nenhuma variação entre as lagoas. Assim, a radiação solar pode ser considerada como a variável controladora da dinâmica do ambiente das lagoas de alta taxa estudadas nessa pesquisa, interferindo intimamente no comportamento dos parâmetros temperatura, OD e pH.

As Figuras 9 e 10 apresentam, respectivamente, o comportamento diurno dos parâmetros radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e radiação fotossinteticamente ativa subaquática (subPAR) e temperatura.



**Figura 9. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) dos parâmetros radiação fotossinteticamente ativa do ar (PAR) e subaquática (subPAR) nas lagoas com a pré-desinfecção UV (lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito)**



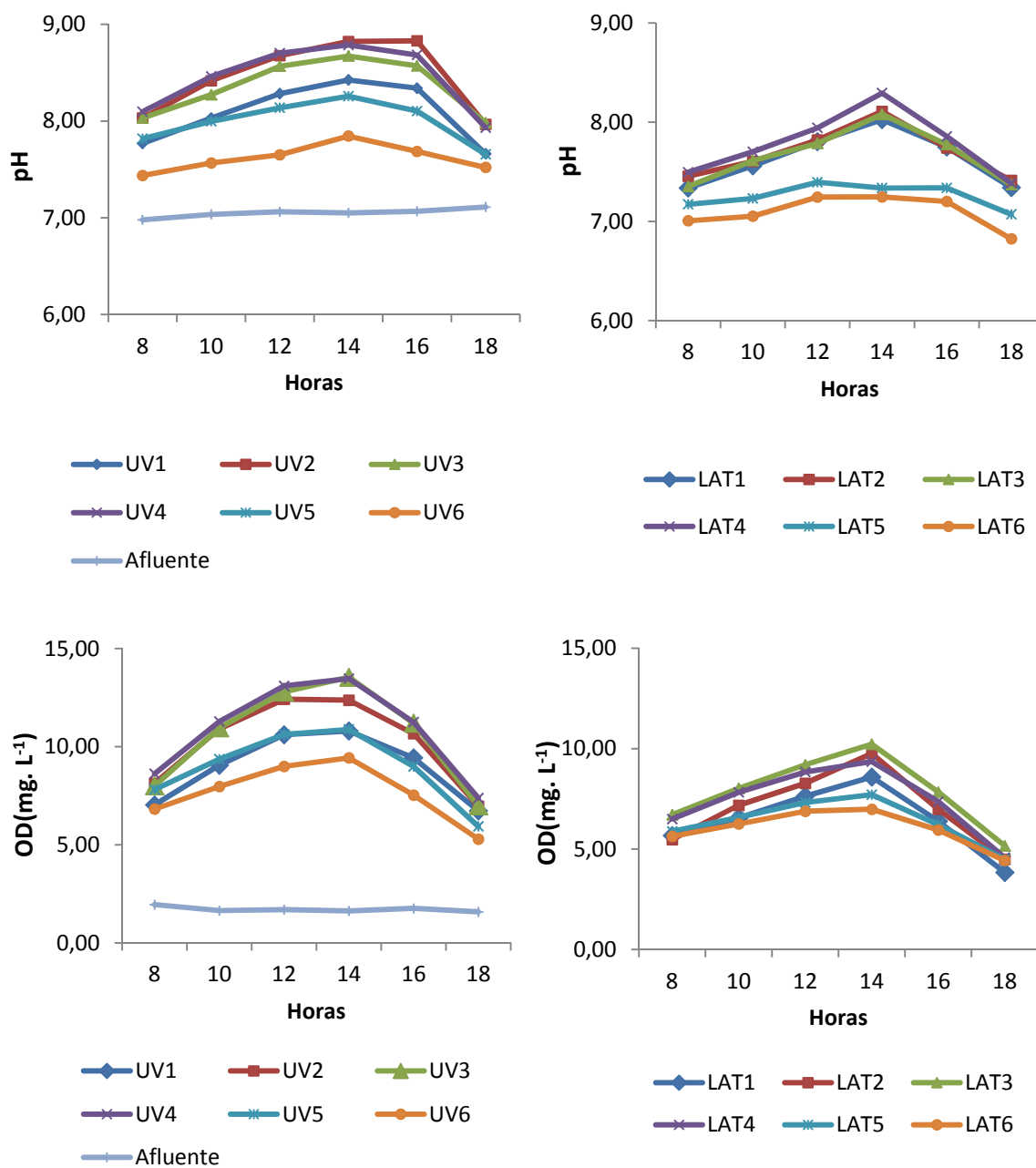
**Figura 10. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) do parâmetro temperatura nas lagoas com a pré-desinfecção UV e no esgoto afluente (UASB) (lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito)**

Uma vez que a subPAR é uma variável influenciada pela quantidade de material suspenso e dissolvido na água, seja esse material pigmentos ou sólidos, a variável PAR se torna relevante, já que indica o quanto de radiação fotossinteticamente ativa incide nas lagoas, sendo independente de qualquer outra variável e demonstrando o efeito das coberturas. Como era de se esperar, as unidades UV6 e LAT6 apresentaram a menor radiação (PAR) incidente, seguida das unidades UV5 e LAT5, fato devido às coberturas instaladas. A temperatura da água também apresentou o mesmo comportamento entre as lagoas, independente da presença da pré-desinfecção. Ou seja, de acordo com as Figuras 9 e 10, pode-se afirmar que quanto maior a interceptação, menor a PAR incidente e a temperatura.

Comparando a radiação medida no ar e na água, é possível observar a diminuição drástica da radiação real disponível para a biomassa algal. Da

radiação que atinge a superfície da água, uma parte penetra e a outra é refletida, voltando para a atmosfera. A quantidade de radiação refletida depende das condições da superfície da água (plana ou ondulada) e principalmente do ângulo de incidência da radiação sobre esta. Ao penetrar na coluna d'água, a radiação é submetida a profundas alterações, tanto na sua intensidade quanto na sua qualidade espectral. Estas alterações dependem de vários fatores, dentre eles da quantidade de material dissolvido e quantidade de material em suspensão (Calijuri, 1999). A primeira alteração sofrida é a mudança de direção provocada pela redução da velocidade ao penetrar no meio líquido devido à refração. Em seguida, parte da radiação é absorvida e transformada em outras formas de energia, como por exemplo, química pela fotossíntese e calorífica pelo aquecimento da água. Outra parte da radiação sofre dispersão devido ao choque com partículas suspensas ou dissolvidas na água. A absorção e a dispersão são os dois fatores principais, responsáveis pela atenuação da radiação com a profundidade nos ecossistemas aquáticos (Camourze, 1994).

A Figura 11 apresenta os resultados do comportamento diurno dos parâmetros pH e oxigênio dissolvido (OD) nas unidades experimentais e no esgoto afluyente.



**Figura 11. Comportamento diurno (média de todos os dias de coleta) dos parâmetros pH e oxigênio dissolvido (OD) nas lagoas com a pré-desinfecção UV (lado esquerdo) e sem a pré-desinfecção UV (lado direito) e no esgoto afluente (UASB)**

Em termos de pH e OD, ambos os parâmetros, nas lagoas com a pré-desinfecção, apresentaram uma tendência de comportamento polinomial com picos atenuados e tendências de crescimento e decaimento suavizadas. Há uma

primeira fase de crescimento a partir do início da manhã e uma segunda fase menos acentuada de crescimento entre meio dia e duas da tarde. A partir das 14 horas há uma fase de decaimento dessas variáveis até às 18 horas. No entanto, a variação para as lagoas sem a pré-desinfecção foi mais brusca, com tendências lineares claras de crescimento até às 14 horas (pico máximo) e de decréscimo a partir desse horário.

Nas unidades com a pré-desinfecção, o parâmetro OD apresentou valores superiores aos de saturação, na maior parte do período diurno. Valores em torno de  $14\text{mg.L}^{-1}$  foram encontrados nas lagoas UV4 e UV3 nas horas de maior temperatura, demonstrando, provavelmente, intenso metabolismo autotrófico, no qual a produção primária supera a respiração (Odum, 1956; Wang et al., 2003). Para as lagoas sem a presença de pré-desinfecção, os valores de OD também foram superiores ao de saturação, porém somente nos horários de maior incidência luminosa (10 horas e 12 horas). O valor máximo medido foi de  $10\text{mg.L}^{-1}$  na LAT3.

Os valores de pH foram, na totalidade dos dados, superiores à neutralidade, sendo os maiores valores observados também nas horas de maior temperatura e radiação solar. Valores básicos de pH, maiores que 8,5, foram atingidos nas lagoas UV2 e UV4.

Em relação ao esgoto afluente, como era de se esperar em um tratamento anaeróbio, o OD obteve valores baixos, não superiores a  $2\text{mg.L}^{-1}$ , devido à aeração no transporte do efluente no interior na canalização entre o reator UASB

e as lagoas. O pH do esgoto afluente manteve comportamento constante, com valores próximos à neutralidade.

Comparando o comportamento das lagoas, as UVs apresentaram os maiores valores de pH e OD, o que pode ser explicado, inferindo uma maior atividade fotossintética nessas unidades. A atividade fotossintética consome do meio aquático  $\text{CO}_2$  e libera  $\text{O}_2$ , contribuindo respectivamente com o aumento do pH e do OD. Além disso, com a fotossíntese, a capacidade de fixação do carbono é maior do que a dissolução do  $\text{CO}_2$  atmosférico na interface ar-água, contribuindo ainda mais com o aumento do pH (Rodrigues et al., 2010; Holland et al., 2012).

Ressalta-se que variações dos parâmetros discutidos (PAR, subPAR, temperatura, pH e OD) ao longo do período diurno, quando comparados com a literatura (Renaud et al., 2002; Li e Qin, 2005; Khotimchenko e Yakovleva, 2005; Cade-Menun e Paytan, 2010), não foram bruscas o suficiente para promover condições de *stress* e nem para limitar o crescimento das microalgas.

O esgoto afluente e efluente às lagoas foi periodicamente analisado para obtenção das características químicas, de forma a monitorar variações na concentração de nutrientes (carbono, nitrogênio e fósforo) ao longo do ano. A Tabela 2 apresenta os resultados de carbono total (orgânico e inorgânico), nitrato, nitrogênio total e amoniacal e fósforo solúvel total nos pontos monitorados.

**Tabela 2. Caracterização do meio de cultivo afluente e efluente às lagoas de alta taxa (média ± desvio padrão)**

	<b>Afluente</b>	<b>LAT1</b>	<b>LAT2</b>	<b>LAT3</b>	<b>LAT4</b>	<b>LAT5</b>	<b>LAT6</b>	<b>UV1</b>	<b>UV2</b>	<b>UV3</b>	<b>UV4</b>	<b>UV5</b>	<b>UV6</b>
<b>COT</b>	41,28	19,70	19,52	17,50	18,91	16,83	16,92	18,53	19,95	18,90	18,63	18,84	17,96
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±12,3	±7,3	±7,0	±6,9	±7,0	±6,8	±8,5	±6,9	±7,4	±6,3	±7,0	±6,7	±6,6
<b>CI</b>	47,62	14,25	18,44	11,29	18,58	14,26	12,92	12,99	13,67	15,76	8,49	14,05	13,41
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±17,4	±12,8	±15,7	±11,4	±16,1	±12,4	±13,9	±11,2	±13,5	±14,0	±7,3	±12,3	±12,6
<b>CT</b>	88,90	32,98	35,79	27,97	36,43	30,21	28,98	30,62	32,66	33,67	26,35	31,01	30,48
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±23,1	±17,2	±21,3	±16,9	±20,8	±17,5	±21,4	±15,3	±17,7	±17,9	±12,2	±16,3	±16,5
<b>NTK</b>	48,35	28,37	26,12	20,30	25,89	27,05	31,14	23,84	22,72	25,14	20,93	23,08	23,64
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±18,1	±14,8	±15,1	±11,0	±15,2	±11,4	±40,6	±13,0	±11,8	±11,7	±7,7	±12,4	±14,1
<b>N-NO<sub>3</sub></b>	2,58	16,62	17,40	18,2	13,31	14,95	17,02	16,39	19,49	23,79	22,39	19,05	16,13
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±1,4	±9,4	±14,7	±10,5	±10,0	±12,2	±13,2	±13,8	±15,3	±16,7	±15,2	±10,8	±10,4
<b>N-NH<sub>3</sub></b>	39,82	11,70	14,89	9,79	13,90	14,34	13,10	10,22	11,41	13,82	5,72	13,80	12,50
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±13,1	±9,8	±13,7	±8,8	±13,5	±8,9	±11,5	±9,5	±11,8	±12,0	±5,6	±12,0	±10,5
<b>PTS</b>	4,05	3,47	3,45	3,34	3,24	3,15	3,15	3,28	3,14	3,13	3,15	3,27	3,44
<b>(mg.L<sup>-1</sup>)</b>	±1,1	±1,3	±1,3	±1,2	±1,2	±1,3	±1,7	±1,3	±1,3	±1,2	±1,1	±1,3	±1,3

COT=carbono orgânico total; CI=carbono inorgânico; CT= carbono total; NTK= nitrogênio total kjeldhal; N-NO<sub>3</sub>=nitrato; N-NH<sub>3</sub>= nitrogênio amoniacal; PTS= fósforo solúvel total.

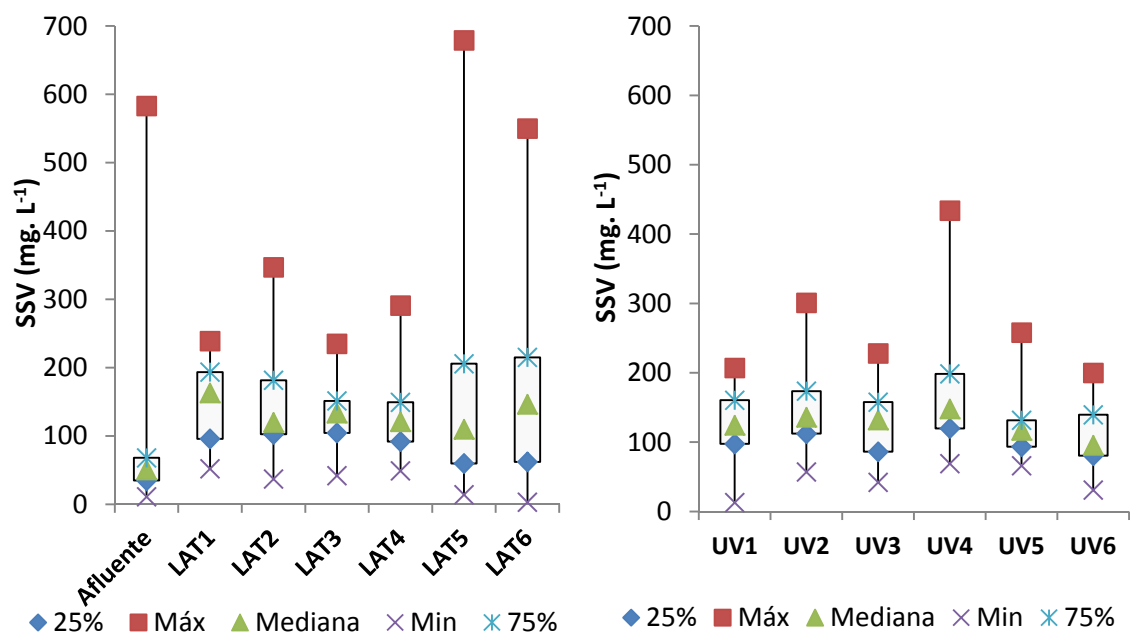
Hillebrand e Sommer (1999) afirmaram que para meio de cultivo com quantidades balanceadas de nitrogênio (N) e fósforo (P), uma relação mássica ótima de C:N:P 46,1:7,7:1 é desejada para microalgas bentônicas. De acordo com Woertz et al. (2009), relações típicas de C:N e C:P no esgoto doméstico, de 3,5:1 e 20:1, respectivamente, são baixas se comparadas com as exigidas para um rápido crescimento algal. O esgoto bruto como meio de cultivo utilizado nesse experimento apresentou relação mássica C:N:P de aproximadamente 22:12:1, para o carbono total como fonte de carbono, uma relação insuficiente, caracterizando-se como um ambiente com limitação de carbono. Chinnasamy et al. (2010) utilizaram efluente de indústria de carpetes misturado ao esgoto doméstico como meio de cultivo e obtiveram ambiente com limitação de nitrogênio, com relação N:P de 4:1 para o efluente bruto. No entanto, para esse estudo, as concentrações de nitrogênio e fósforo pareceram suficientes para suportar o crescimento algal.

Em relação à remoção de nutrientes e carbono nas unidades, ressalta-se a maior remoção de nitrogênio amoniacal e de carbono inorgânico nas lagoas UV4 e LAT3. A lagoa com a presença da pré-desinfecção registrou remoção média de 34,1 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal e a unidade sem a prévia desinfecção registrou remoção média de 30 mg.L<sup>-1</sup>. Essa remoção é, principalmente, devida à conversão de amônia em nitrato pelas bactérias nitrificantes, à volatilização da amônia e à assimilação pela biomassa algal, gerando nitrogênio orgânico. A lagoa UV4 apresentou o maior consumo de carbono inorgânico, de 39,13 mg.L<sup>-1</sup>, demonstrando elevada assimilação algal, se comparada com as outras lagoas.

Pode-se afirmar que o consumo de carbono inorgânico foi ainda maior que esse valor, uma vez que as bactérias estão em frequente processo de respiração, com contínua produção de CO<sub>2</sub> nas lagoas. No entanto, esse consumo real não foi mensurado. A remoção de fósforo solúvel total foi pequena e não variou significativamente entre as unidades.

## 5.2 Caracterização da biomassa e da comunidade fitoplanctônica

As concentrações de SSV para todas as unidades avaliadas estão apresentadas na Figura 12.



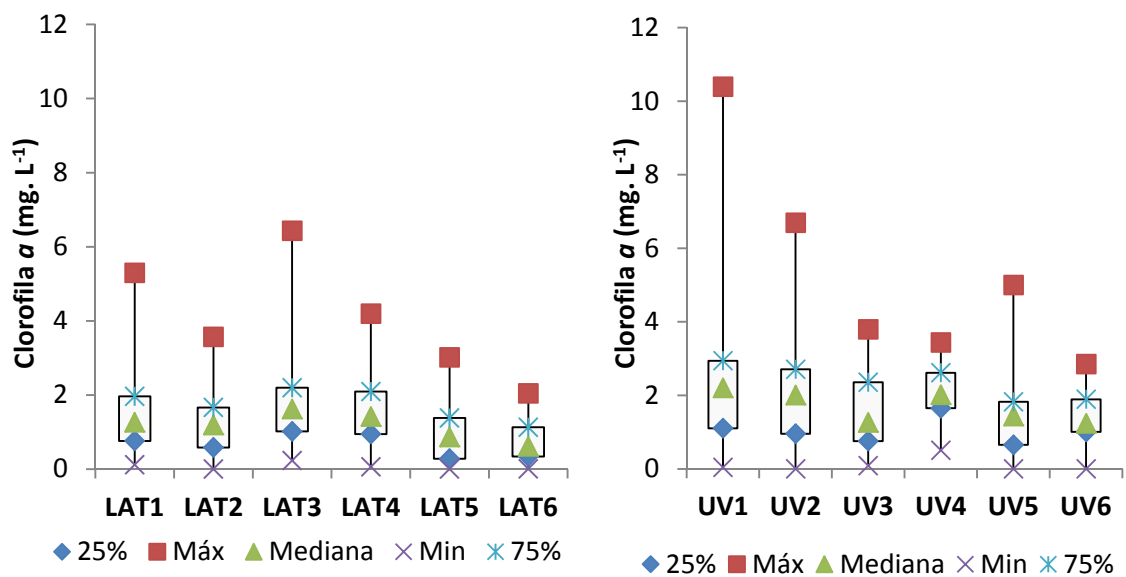
**Figura 12. Concentrações de SSV no esgoto afluente e nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito)**

A concentração mediana de SSV no afluente foi de 50,5 mg.L<sup>-1</sup>, havendo um aumento dessa concentração nas lagoas de alta taxa, pelo crescimento da biomassa bacteriana e algal, conforme pode ser observado na Figura 10. As lagoas de alta taxa sem a pré-desinfecção apresentaram melhor desempenho para

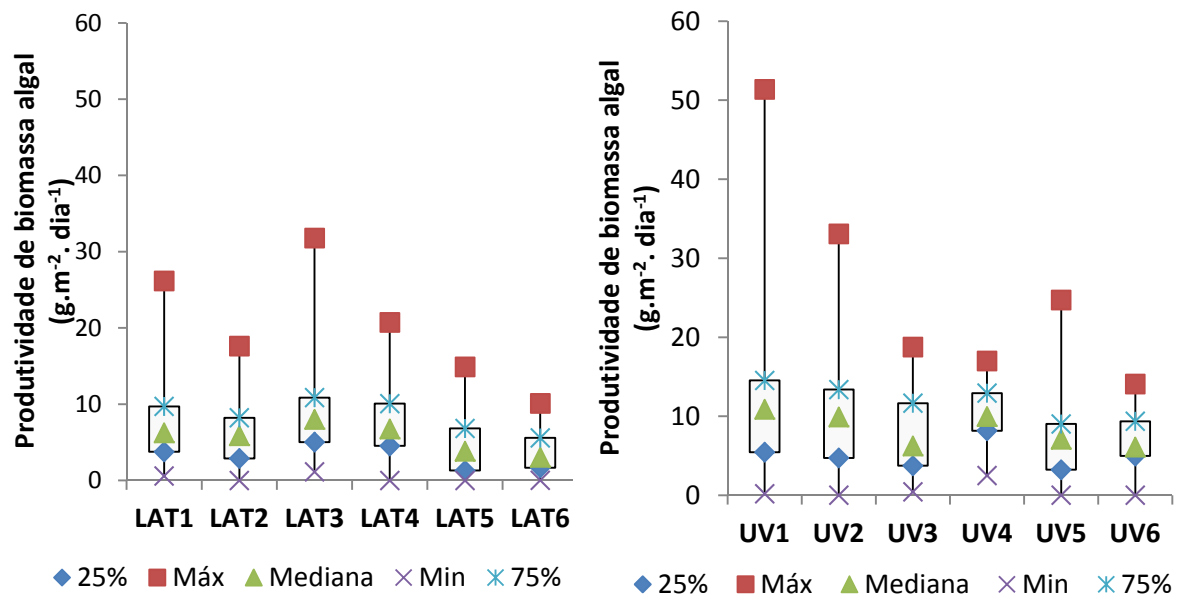
a produção de biomassa total, quando comparadas às lagoas com a presença do dispositivo UV. As lagoas LAT1 seguida da LAT6 obtiveram os maiores valores medianos para esse parâmetro, 163 e 146,5 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Na linha de pré-desinfecção, as lagoas UV4 e UV2 apresentaram os maiores resultados, com concentrações medianas de 148 e 136 mg.L<sup>-1</sup> de SSV, respectivamente. As lagoas UV6 e LAT5 destacaram-se com as menores concentrações apresentadas em cada respectiva característica. A UV6 apresentou concentração mediana de 95,5 mg SSV.L<sup>-1</sup> e a LAT5 de 110 mg SSV.L<sup>-1</sup>.

Woertz et al. (2009) obtiveram concentrações de SSV de 700-800 mg.L<sup>-1</sup> em reatores de bancada com tempo de detenção de 3 e 4 dias, tratando esgoto doméstico misturado com efluente de laticínios com adição de CO<sub>2</sub>. Para o tratamento testemunha, sem a adição de CO<sub>2</sub>, a concentração média de SSV ficou em torno de 200 mg.L<sup>-1</sup>. Chinnasamy et al. (2010), em escala laboratorial, apresentaram resultados de até 1.470 mg.L<sup>-1</sup> de SSV, no nono dia de cultivo com elevada adição de CO<sub>2</sub> a 25°C no esgoto doméstico. Os resultados de SSV do presente estudo foram inferiores aos reportados em literatura, principalmente devido a não suplementação com uma fonte externa de carbono.

As concentrações de clorofila *a* e os valores de produtividade de biomassa algal para todas as unidades avaliadas estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.



**Figura 13. Concentrações de clorofila a nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito).**



**Figura 14. Produtividade de biomassa algal nas lagoas de alta taxa (sem a pré-desinfecção, lado esquerdo e com a pré-desinfecção, lado direito).**

Seguindo a tendência contrária do parâmetro SSV, as lagoas de alta taxa com a presença da desinfecção apresentaram maiores concentrações de clorofila *a*, e conseqüentemente maiores valores de produtividade algal. Como esperado,

houve de fato o efeito positivo da desinfecção UV no crescimento e produção de microalgas no esgoto doméstico. Provavelmente, esse efeito deveu-se à eliminação de certa quantidade de microrganismos, principalmente bactérias, que se tornariam possíveis concorrentes das microalgas por nutrientes, espaço e luz (Cho et al., 2011).

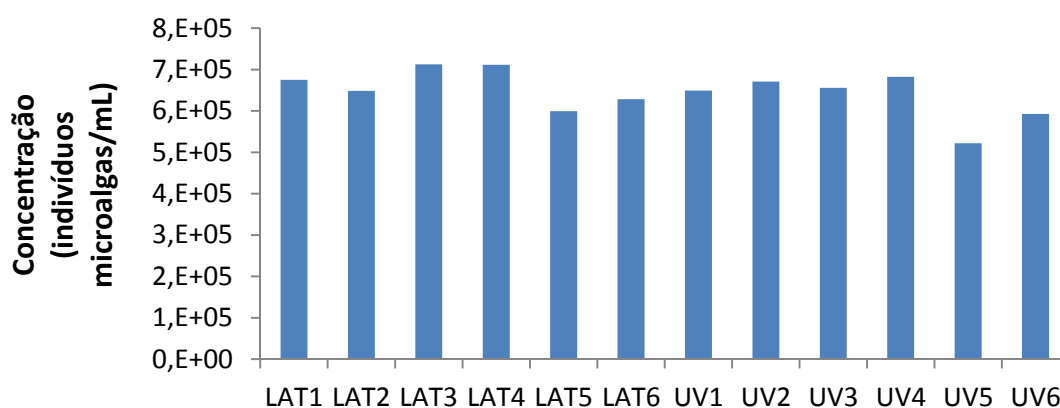
Na linha sem a prévia desinfecção, as lagoas LAT3 e LAT4 apresentaram as maiores produções de biomassa algal, com valores medianos de 8,0 e 6,8  $\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente e a LAT6 apresentou a menor produtividade (3,0  $\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ ). Na linha de pré-desinfecção, as lagoas UV1, UV4 e UV2 foram as que apresentaram maiores produtividades algais, com valores medianos de 10,9, 10,0 e 9,9  $\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente, reafirmando que na maior parte do tempo, a biomassa dessas lagoas com maior incidência luminosa não sofreu com os efeitos da fotoinibição. A menor produção de biomassa algal foi apresentada pela UV6, com valor mediano de 6,11  $\text{g.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$ .

Os resultados indicam ainda que a cobertura de 80%, não foi eficiente no crescimento da biomassa algal, bloqueando grande parte da radiação solar disponível para as microalgas, independente da presença da pré-desinfecção.

Assim como os resultados de SSV, os resultados de clorofila *a* e produtividade algal obtidos nesse estudo foram inferiores aos resultados reportados em literatura que utilizaram, em sua grande maioria, suplementação de fonte de carbono com adição de  $\text{CO}_2$  ao esgoto doméstico. Craggs et al. (2012), em lagoas de alta taxa de grande escala (4.375  $\text{m}^3$ ) para tratamento de esgoto doméstico com suplementação de  $\text{CO}_2$ , reportaram concentrações

próximas de 250 mg SSV.L<sup>-1</sup> no verão, representando uma produtividade alga+bactéria superior a 10 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>. Mulbry et al. (2008) utilizando efluente bruto de laticínios como meio de cultivo em um fotobioreator (*algal turf scrubber*) de escala laboratorial sem adição de CO<sub>2</sub>, obtiveram produtividade algal máxima de 21,3 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, para taxa de aplicação de 1,6 g NT.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, produtividade bem superior à do presente estudo. Essa maior produtividade pode ser explicada por se tratar de um reator fechado, o que acarreta em maior controle operacional e em menor interferência de fatores externos, além da utilização de um efluente bruto mais rico em matéria orgânica do que o esgoto doméstico, garantindo fonte de carbono às algas. Park e Craggs (2010) reportaram resultados de 548 mg.L<sup>-1</sup> de SSV para lagoas de alta taxa tratando esgoto doméstico com TDH de 8 dias e 341 mg SSV.L<sup>-1</sup> para lagoas de 4 dias de tempo de detenção, com adição de CO<sub>2</sub>. Nesse mesmo estudo, os autores apresentaram dados de produtividade algal de 9 e 16,7 g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>, para as lagoas de 8 e 4 dias de tempo de detenção hidráulica, respectivamente. Em se tratando de biomassa algal, os resultados aqui obtidos se aproximam e até superam os dados reportados por Park e Craggs (2010), porém sem a adição de CO<sub>2</sub>, representando economia de recursos financeiros.

A comunidade microbiológica de sistemas de tratamento de esgoto doméstico está continuamente exposta a *stress* e a poluentes, dessa forma, há uma grande variabilidade da sua composição qualitativa e quantitativa. A Figura 15 apresenta o quantitativo médio da concentração de indivíduos de microalgas por mL para cada lagoa estudada.

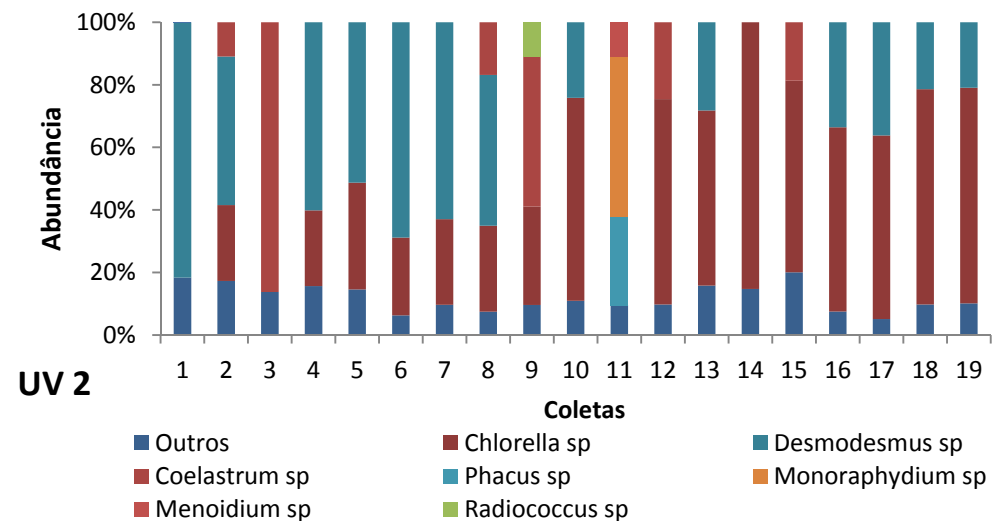
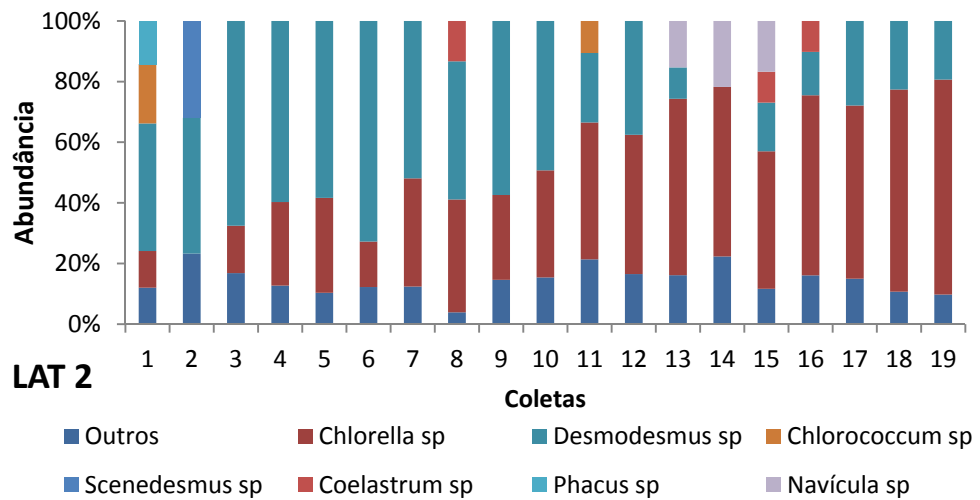
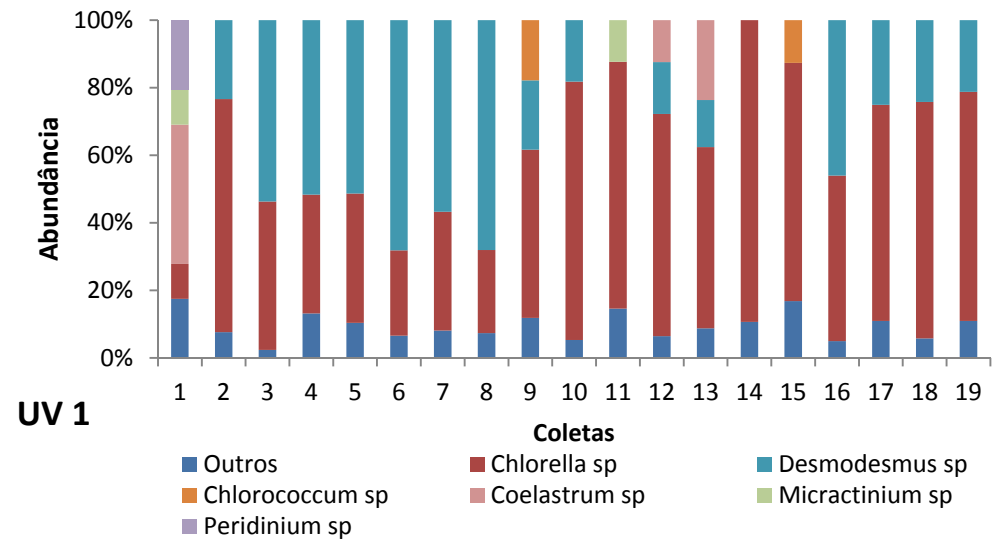
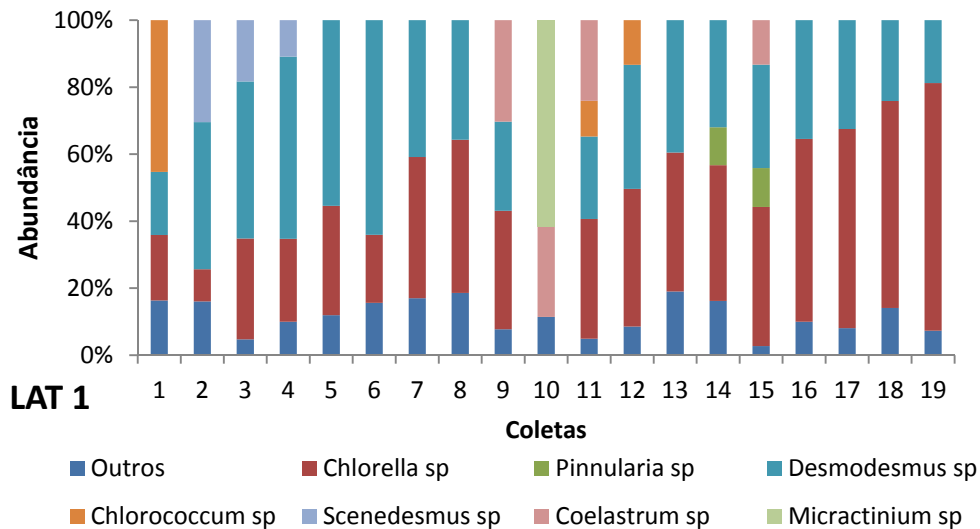


**Figura 15. Concentração média de indivíduos de microalgas para cada lagoa**

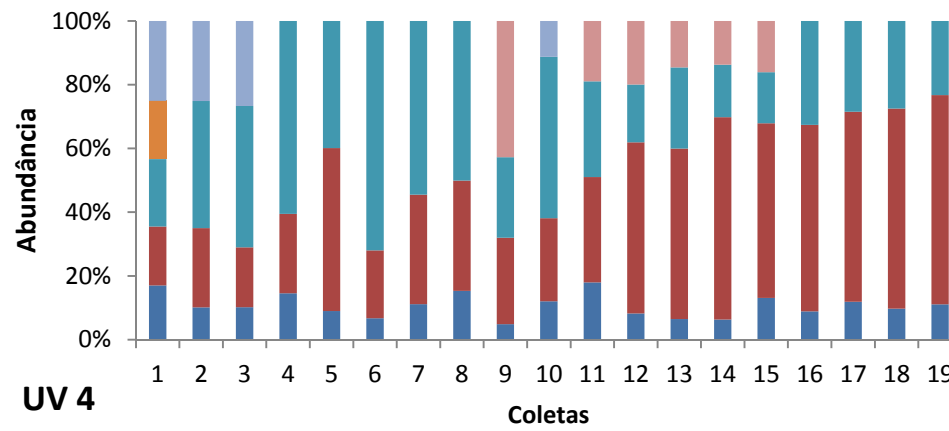
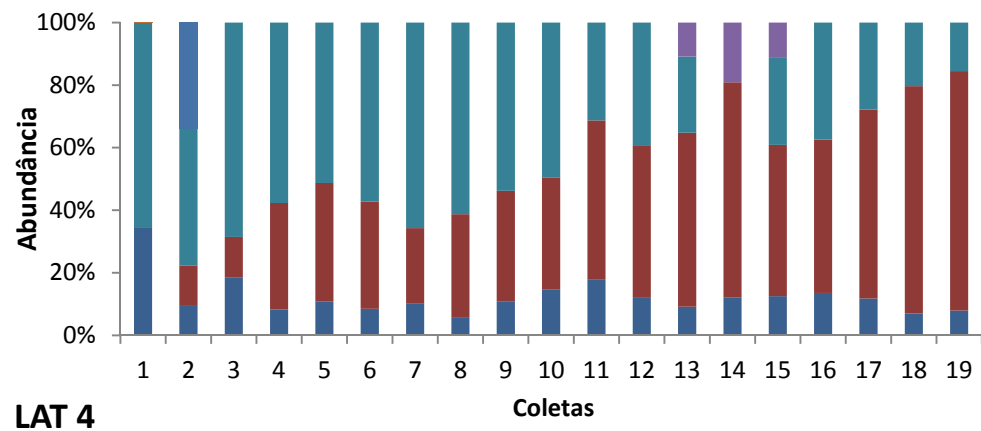
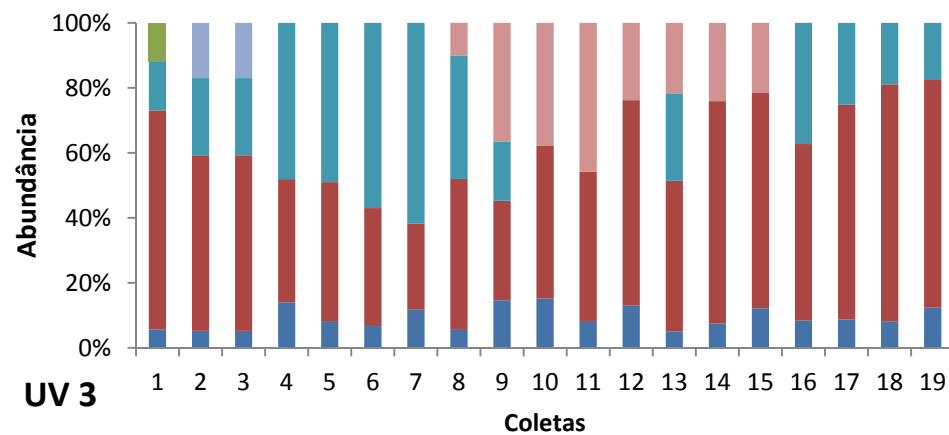
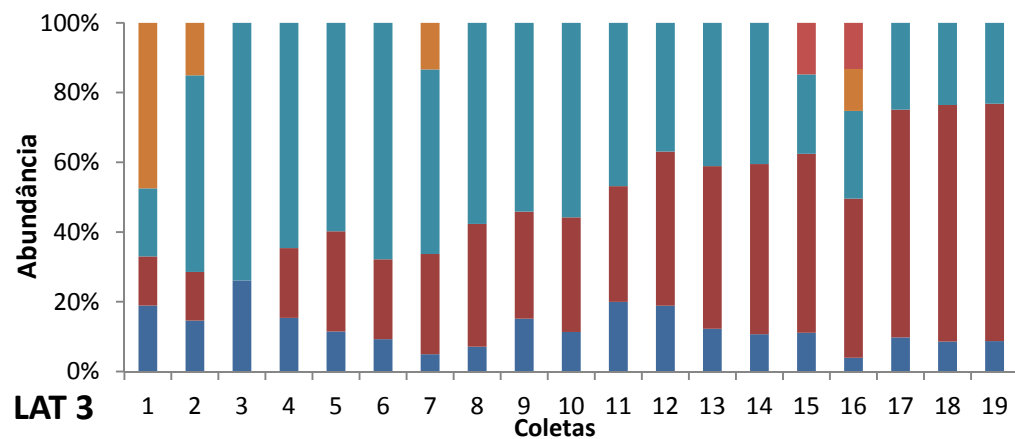
Observa-se na Figura 13 uma maior quantidade de indivíduos nas lagoas LAT3 e LAT4, com ambas as unidades apresentando concentrações superiores a  $7 \times 10^5$  indivíduos por mL. Na linha com a prévia desinfecção, a lagoa UV4 apresentou a maior concentração média de indivíduos, de  $6,8 \times 10^5$  ind. mL<sup>-1</sup>. E a lagoa UV5 com concentração média de  $5,2 \times 10^5$  ind. mL<sup>-1</sup> foi a unidade com a menor concentração média de indivíduos.

Quantitativamente, os perfis de ácidos graxos são quase sempre similares entre espécies do mesmo filo ou classe. Porém, diferem enormemente entre classes e filios, desde culturas com baixo rendimento lipídico, como as cianobactérias até aquelas com alto rendimento, como o gênero das Diatomáceas (Huerlimann et al., 2010). Diante dessa grande variabilidade do conteúdo lipídico entre diferentes filios e até entre gêneros, a composição da comunidade fitoplanctônica foi determinada durante os meses de janeiro a novembro, abrangendo as variações sazonais ao longo do ano e está apresentada na Figura 16. Foram identificados 44 gêneros, e os filios Chlorophyta, Cyanophyta e Bacillariophyta, e respectivamente suas classes, Chlorophyceae, Cyanophyceae e

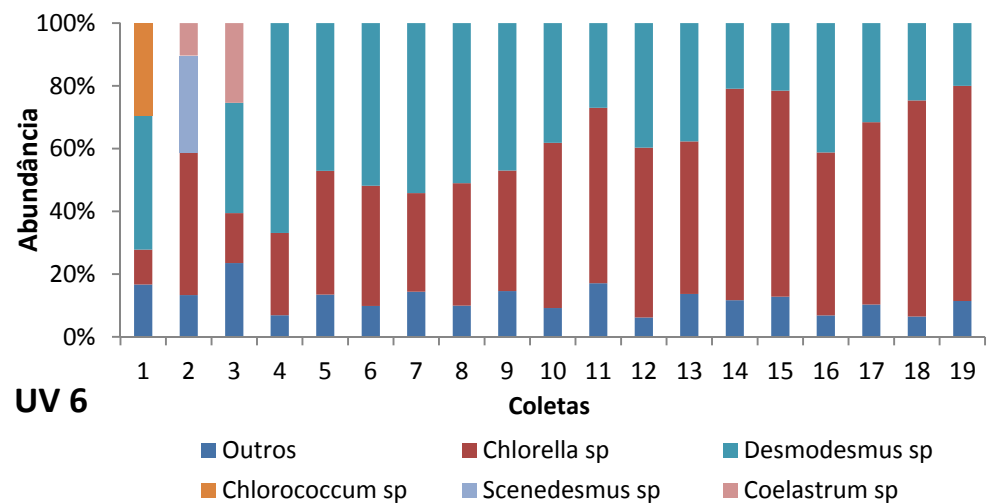
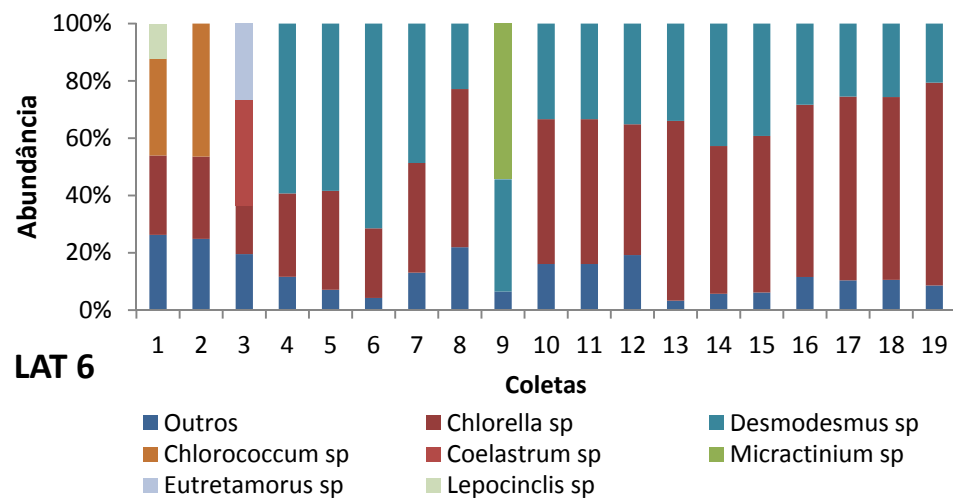
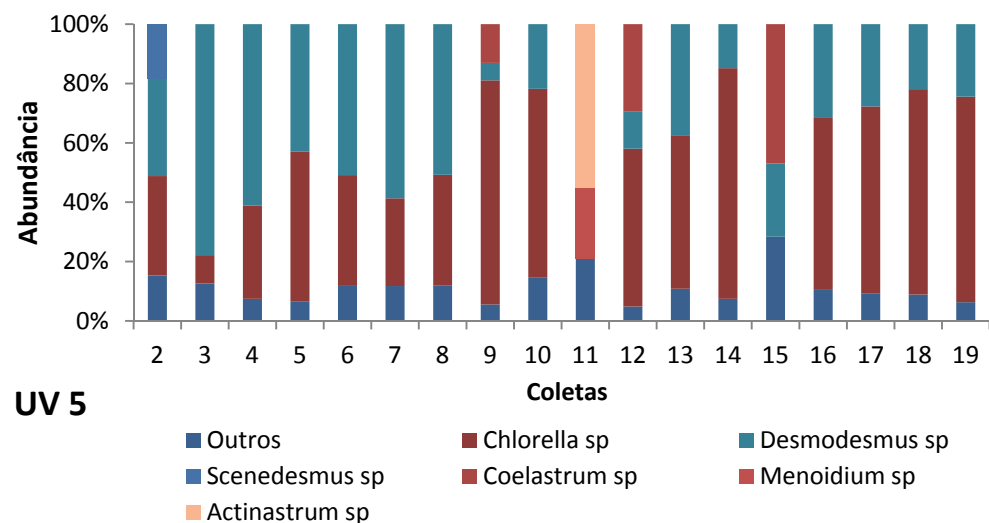
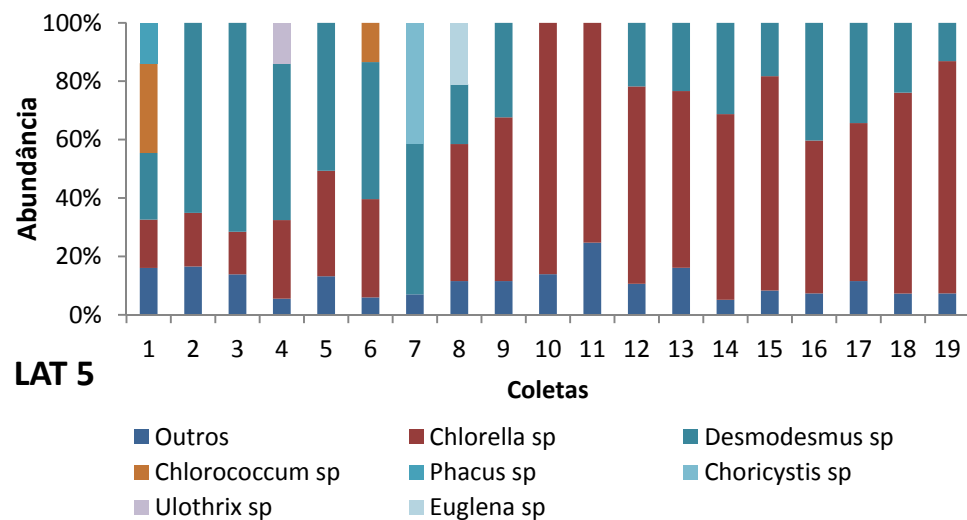
Bacillariophyceae foram os principais presentes, em termos de indivíduos. Assim como em ambientes naturais, observou-se uma tendência para flutuações sazonais na comunidade fitoplanctônica das lagoas de alta taxa. O filo Chlorophyta foi o mais abundante durante todo o período amostrado, sendo os gêneros *Chlorella* e *Desmodesmus* os dominantes em todas as lagoas. A abundância desses gêneros alternou-se de acordo com variações sazonais, com tendência geral de maior número de indivíduos do gênero *Desmodesmus* no verão (coletas 1-4) e outono (coletas 5-10) e do gênero *Chlorella* no inverno (coletas 11-16) e primavera (coletas 17-19). Nas lagoas UV5 e UV6 essa tendência não foi tão forte e na lagoa UV3 essa tendência não foi observada. As lagoas LAT3 e LAT4 destacaram-se pela baixa diversidade de gêneros.



**Figura 16. Variações na comunidade fitoplanctônica nas lagoas de alta taxa ao longo do período amostral (abundância de indivíduos, %).**



**Figura 16 (continuação). Variações na comunidade fitoplanctônica nas lagoas de alta taxa ao longo do período amostral (abundância de indivíduos, %).**



**Figura 16 (continuação). Variações na comunidade fitoplanctônica nas lagoas de alta taxa ao longo do período amostral (abundância de indivíduos, %)**

De acordo com Craggs et al. (2011), lagoas de alta taxa tratando esgoto doméstico, são na maioria das vezes dominadas por pequenas colônias de algas de gêneros como: *Scenedesmus*, *Micractinium*, *Actinastrum* e *Pediastrum*. Park et al. (2011b) citaram como espécies principais encontradas em lagoas de alta taxa tratando esgoto doméstico, as espécies *Desmodesmus sp*, *Micractinium sp*, *Actinastrum sp*, *Pediastrum sp*, *Dictyosphaerium sp* e *Coelastrum sp*. Em monitoramento de um ano de uma lagoa de alta taxa na Nova Zelândia, os autores identificaram 13 gêneros de algas verdes, que são comumente encontrados em águas eutrofizadas e quatro espécies de algas coloniais que incluem: *Pediastrum sp.*, *Desmodesmus sp.*, *Micractinium pusillum* e *Dictyosphaerium sp*. Essas espécies, tipicamente, dominam o ambiente de lagoas de alta taxa que usam esgoto doméstico como meio de cultivo, em todo o mundo (Benemann et al., 1978, 1983; Benemann, 1986; García et al., 2000; Park and Craggs, 2010; Craggs et al., 2011).

O gênero *Chlorella*, assim como o gênero *Monoraphidium*, apresenta preferência por ambientes rasos, turbulentos e ricos em nutrientes, com altas taxas de crescimento e de respiração e elevadas exigências de fósforo, oxigênio, mistura e radiação solar. Além dessas razões, a dominância desse gênero no estudo em questão, apesar da não abundância desse gênero em outros estudos, provavelmente deveu-se, às condições climáticas locais com temperaturas mais elevadas ao longo de todo o ano, se comparadas, por exemplo, às temperaturas neozelandesas.

A relação entre nutrientes e a comunidade algal em sistemas de águas residuárias não é muito bem entendida (Chinnasamy et al., 2010). As respostas de uma mesma espécie para condições similares de enriquecimento nutricional diferem de acordo com o estudo, sugerindo que outros parâmetros, que não nutrientes, são mais importantes na determinação da composição da comunidade fitoplanctônica. A atividade biológica de um ambiente complexo dominado por águas residuárias está relacionada, provavelmente, com interações entre os diferentes componentes, não havendo substância de efeito dominante (Walsh et al., 1980). El Sheik et al. (2000) e Joseph e Joseph (2002), sugeriram que fatores como clima, competição e outros tipos de relação com demais organismos, além da produção de produtos químicos pelas algas, foram os responsáveis pela diversidade das espécies e variações sazonais na composição da comunidade fitoplanctônica de águas residuárias de indústrias de carpetes. Esses mesmos fatores podem também explicar a variabilidade e diversidade da comunidade fitoplanctônica encontrada no presente estudo, ou seja, em lagoas de alta taxa que utilizam esgoto doméstico como meio de cultivo.

### **5.3 Quantificação do lipídeo acumulado e da produtividade lipídica**

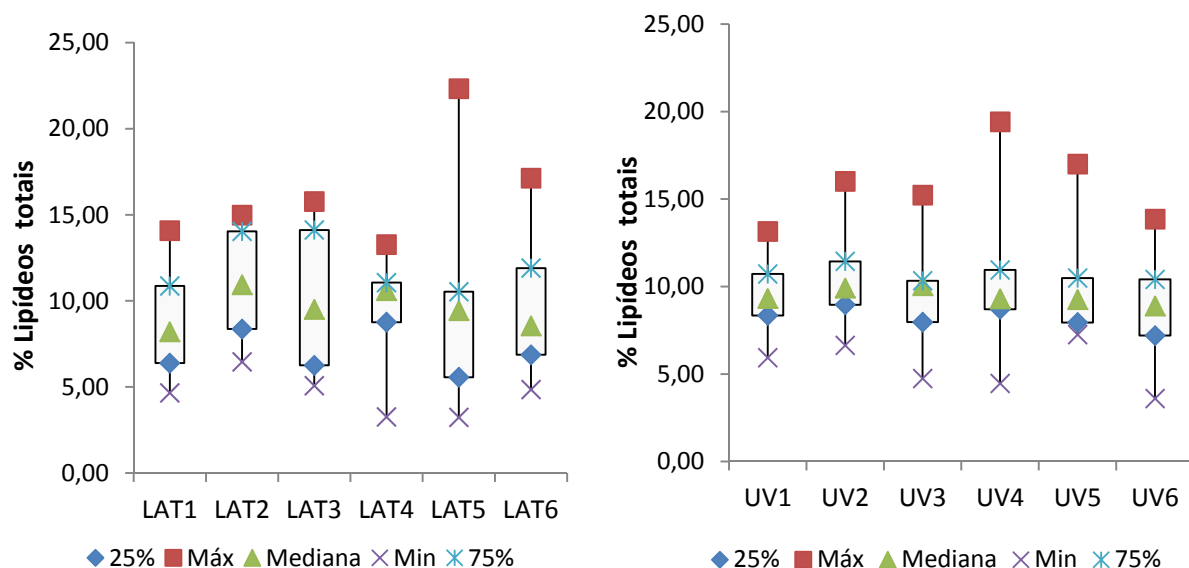
Durante os meses de maio a novembro análises de extração lipídica foram realizadas em duplicata com o objetivo de quantificar o lipídeo total acumulado na biomassa de cada lagoa de alta taxa. A Tabela 3 apresenta a concentração média ( $\text{mg. g}^{-1}$ ) de lipídeos totais na biomassa seca nas datas de coleta para todas as doze lagoas estudadas.

Entre as lagoas avaliadas, a lagoa LAT5 obteve a maior e a menor concentração média de lipídeos totais, valores iguais a 223,3 mg.g<sup>-1</sup> e 32,6 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Ambos os valores foram mensurados na coleta do mês de junho. O esgoto afluente apresentou concentração média de lipídeos totais de 143 mg.g<sup>-1</sup>. Esse valor é a média de todas as coletas realizadas para o esgoto afluente.

**Tabela 3. Concentração média (mg.g<sup>-1</sup>) de lipídeos totais na biomassa seca para cada lagoa de alta taxa nas datas de coleta.**

	<b>LAT1</b>	<b>LAT2</b>	<b>LAT3</b>	<b>LAT4</b>	<b>LAT5</b>	<b>LAT6</b>	<b>UV1</b>	<b>UV2</b>	<b>UV3</b>	<b>UV4</b>	<b>UV5</b>	<b>UV6</b>
<b>30/mai</b>	110,3	148,5	142,7	132,8	78,9	74,4	117,7	160,1	74,8	86,2	105,3	138,6
<b>13/jun</b>	61,9	116,0	52,2	123,9	223,3	171,3	131,6	131,1	152,3	194,2	170,0	69,1
<b>25/jun</b>	92,0	115,7	139,9	108,5	32,3	162,6	106,1	89,6	94,3	44,6	72,6	93,9
<b>30/jul</b>	72,0	149,9	105,5	32,6	101,6	95,9	89,7	89,7	47,5	83,9	92,9	58,1
<b>15/ago</b>	46,5	79,1	50,7	110,8	106,5	66,8	96,8	66,4	103,7	110,2	81,9	83,7
<b>27/ago</b>	46,5	149,8	157,7	103,3	97,2	77,3	59,4	106,7	100,5	107,5	103,7	107,0
<b>20/set</b>	140,8	75,3	84,6	8,60	47,9	56,7	82,0	116,9	100,5	96,4	92,2	80,7
<b>24/set</b>	69,6	64,6	61,4	7,82	39,6	48,5	107,6	94,9	102,2	89,6	72,7	36,0
<b>22/out</b>	112,7	97,4	66,0	109,9	132,0	126,8	73,0	103,3	122,3	124,9	78,6	109,2
<b>12/nov</b>	104,0	103,1	141,6	92,4	91,5	93,7	87,7	68,0	72,6	89,6	107,3	95,5

A Figura 17 apresenta os resultados de teor lipídico (% de lipídeos totais na biomassa seca) para cada lagoa de alta taxa.



**Figura 17. Percentual de lipídeos totais em relação à biomassa seca nas lagoas sem a pré-desinfecção (lado esquerdo) e com a pré-desinfecção (lado direito).**

De acordo com a Figura 17, as maiores variações do teor lipídico foram observadas nas lagoas sem a presença de pré-desinfecção, demonstrando maior vulnerabilidade da biomassa dessas lagoas à fatores externos, como as condições ambientais, qualidade do esgoto afluente, contaminações, dentre outros.

Os valores medianos de teor lipídico, no entanto, quase não se diferenciaram entre as doze lagoas, seja entre lagoas com as mesmas características, seja entre unidades distintas. Teores lipídicos medianos de 8,20, 10,94, 9,50, 10,59, 9,43, 8,55% foram quantificados nas lagoas LAT1, LAT2, LAT3, LAT4, LAT5 e LAT6, respectivamente. Para as lagoas de alta taxa com a pré-desinfecção, UV1, UV2, UV3, UV4, UV5 e UV6, os teores lipídicos medianos foram de 9,32, 9,91, 10,05, 9,30, 9,26 e 8,88%, respectivamente.

Observou-se um singelo maior acúmulo de lipídeos nas unidades intermediárias, ou seja, unidades que não foram submetidas aos extremos de incidência luminosa.

As lagoas LAT2 com 9% de bloqueio da radiação solar e PAR média incidente de  $1.031 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e UV3 com 18% e  $919 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  foram as que mais acumularam lipídeos, em suas respectivas características. Por outro lado, as lagoas LAT1, sem cobertura e com PAR média incidente de  $1.245 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , e UV6, com 80% de cobertura e  $307 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  PAR média incidente, foram as unidades que menos acumularam lipídeos. De acordo com Cuhel e Lean (1987), sob condições de alta intensidade luminosa, ou seja, incidências maiores que  $1.600 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , há aumento no acúmulo de lipídeos e proteínas. Li e Qin (2005), por sua vez, concluíram que incidências de 280 e  $466 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  foram mais favoráveis para o acúmulo de lipídeos em espécies de *Botryococcus braunii*, se comparadas com  $1.400 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Segundo os autores, a síntese de hidrocarbonetos é favorecida por irradiâncias entre 186 e  $419 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . No presente estudo, as intensidades de radiação solar das lagoas que mais acumularam lipídeos apresentaram, entretanto, ordem de grandeza intermediária se comparada com ambos os estudos citados. Porém, ressalta-se que os dados de literatura correspondem a culturas axênicas, com fornecimento de luz artificial e cultivo em escala de laboratório, o que provavelmente influenciou na diferenciação dos resultados encontrados.

De forma a explicar o acúmulo de lipídeos nas condições desse estudo, foi realizada uma regressão linear múltipla, com auxílio do software Genes (Cruz, 2006), no qual os coeficientes da equação foram submetidos ao teste t para determinação das significâncias estatísticas.

Características do meio de cultivo, como concentração de nutrientes e temperatura, além de características de operação do reator e composição da comunidade fitoplanctônica são comumente consideradas como influenciadoras do acúmulo de lipídeos de microalgas (Alonso et al., 2000; Beardall et al., 2001; Renaud et al., 2002; Li e Qin, 2005; Khotimchenko e Yakovleva, 2005; Cade-Menun e Paytan, 2010; Craggs e Park, 2011). No entanto, para as condições desse estudo, essas variáveis se mantiveram constantes entre as unidades ou não apresentaram variações bruscas de comportamento, não gerando no ambiente de cultivo condições de *stress*. Portanto, para esse estudo, considerou-se como variáveis independentes, ou seja, influenciadoras do acúmulo de lipídeos, a radiação fotossinteticamente ativa subaquática (subPAR), radiação fotossinteticamente ativa do ar (PAR), concentração de SSV e concentração de clorofila *a*.

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da regressão múltipla para as lagoas sem a pré-desinfecção e com a presença da pré-desinfecção UV, respectivamente. Os valores de probabilidade dos coeficientes mostram que todos foram estatisticamente significativos a 5% de significância. Para as lagoas de alta taxa com a pré-desinfecção UV, a variável PAR não foi significativa a

5%, por isso o acúmulo de lipídeos nessas unidades foi equacionado sem a influência dessa variável.

**Tabela 4. Resultados da análise de regressão múltipla para as lagoas sem a pré-desinfecção (% de lipídeos acumulada é a variável dependente)**

<b>ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade</b>
<b>Regressão</b>	4	5,8487	1,4622	2434,1837	0,01520
<b>Desvio</b>	1	0,00006	0,0006		
<b>Total</b>	5	5,8493			
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99,9897				
<b>R<sup>2</sup> ajustado (%)</b>	99,9486				
<b>ESTIMATIVAS DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO</b>					
<b>Nome</b>	<b>Coefficientes (β)</b>	<b>Desvio</b>	<b>t</b>	<b>Probabilidade*</b>	
<b>subPAR</b>	-0,6	0,0122	-49,22	0,0147	
<b>PAR</b>	0,0725	0,0011	67,407	0,012	
<b>SSV</b>	-0,223	0,0023	-95,95	0,0099	
<b>Clorofila <i>a</i></b>	-5,58	0,0791	-70,53	0,0117	
<b>Constante</b>	46,849				

\*A probabilidade foi obtida para o teste t bilateral. FV=fontes de variação; GL=graus de liberdade; SQ=soma dos quadrados; QM= quadrados médios.

$$\%LipLATs = -0,6subPAR + 0,07PAR - 0,22[SSV] - 5,6[clorofila a] + 46,8$$

**Tabela 5. Resultados da análise de regressão múltipla para as lagoas com a pré-desinfecção (% de lipídeos acumulada é a variável dependente)**

<b>ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade</b>
<b>Regressão</b>	3	0,9465	0,3155	24,5239	0,0394
<b>Desvio</b>	2	0,0257	0,01287		
<b>Total</b>	5	0,9723			
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	97,3535				
<b>R<sup>2</sup> ajustado (%)</b>	93,3838				

**ESTIMATIVAS DOS COEFICIENTES DE REGRESSÃO**

<b>Nome</b>	<b>Coefficientes (β)</b>	<b>Desvio</b>	<b>t</b>	<b>Probabilidade*</b>
<b>subPAR</b>	0,5259	0,0667	7,8894	0,0124
<b>SSV</b>	0,0352	0,0044	7,9633	0,0121
<b>Clorofila <i>a</i></b>	-3,74	0,4886	-7,656	0,0133
<b>Constante</b>	8,2114			

\*A probabilidade foi obtida para o teste t bilateral. FV=fontes de variação; GL=graus de liberdade; SQ=soma dos quadrados; QM= quadrados médios.

$$\%LipUVs = 0,53subPAR + 0,03[SSV] - 3,74 [clorofila a] + 8,21$$

De acordo com a análise estatística de regressão múltipla, o acúmulo de lipídeos nas lagoas sem a pré-desinfecção pode ser explicado pelas variáveis PAR, subPAR, concentração de SSV e de clorofila *a*. No entanto, pode-se

afirmar pelos valores dos coeficientes que a variável PAR teve pouca influência no acúmulo de lipídeos e que a concentração de clorofila *a*, por sua vez, apresentou uma influência elevada, porém inversamente proporcional. Inversamente proporcional à porcentagem de lipídeos, também foram as variáveis subPAR e concentração de SSV. Para as lagoas com a presença da pré-desinfecção, o acúmulo de lipídeos foi explicado pelas variáveis subPAR, concentração de SSV e de clorofila *a*. Diferentemente das unidades desprovidas da pré-desinfecção, somente a concentração de clorofila *a* apresentou comportamento inversamente proporcional ao acúmulo de lipídeos. A concentração de SSV devido ao seu pequeno valor teve pouca influência, indicando novamente, o efeito positivo da desinfecção ultravioleta na produção de biomassa algal.

De acordo com o fundamentado em literatura, comprovou-se o efeito do *stress* no maior acúmulo de lipídeos por parte das microalgas (Hu et al., 2008; Roleda et al., 2013). A variável clorofila *a* inversamente proporcional ao acúmulo de lipídeos em ambas as condições testadas, demonstra que condições estressantes limitam o crescimento da biomassa algal, porém induzem, geralmente, ao maior acúmulo desse composto por parte dessa biomassa. Somando duas condições principais de *stress*, pode-se dizer que a biomassa de microalgas desse estudo foi exposta a condições desfavoráveis de cultivo. As principais condições de *stress* observadas foram a competição entre microalgas e bactérias por espaço e nutrientes (mesmo nas unidades com a pré-desinfecção

essa competição existiu) e a limitação do crescimento algal pela quantidade insuficiente de carbono.

Craggs e Park (2011) concluíram que mudanças na dominância de espécies pareceram não se correlacionar com mudanças no conteúdo lipídico ao longo de um ano de monitoramento. Sugeriram ainda que a operação das lagoas, particularmente a concentração de nutrientes e tempo de detenção hidráulica sejam mais importantes para explicar a variação observada do teor lipídico. Em se tratando do presente estudo, pode-se também afirmar que a variabilidade e diversidade da comunidade fitoplancônica teve pouco efeito na produtividade lipídica das lagoas estudadas. Fato devido, principalmente, a fatores como a relevante contribuição da produção de óleo pela biomassa bacteriana e a pequena variabilidade dessa comunidade, com dominância da classe Chlorophyceae em todas as unidades, havendo certo padrão de comportamento entre os gêneros *Chlorella* e *Desmodesmus* na maioria das lagoas. No entanto, apesar do afirmado por Craggs e Park (2011), a concentração de nutrientes e o tempo de detenção hidráulica foram mantidos constantes entre as unidades aqui estudadas, por isso não foram considerados para a análise de regressão múltipla. Outras variáveis já descritas e comprovadas estatisticamente, como radiação fotossinteticamente ativa (do ar e subaquática), concentração de SSV e de clorofila *a* pareceram explicar melhor o acúmulo de lipídeos nas lagoas estudadas.

A produtividade lipídica depende do conteúdo lipídico da célula (% lipídeos totais), bem como da produção de biomassa. Porém, condições ótimas de

cultivo são diferentes para o acúmulo de lipídeo e produção de biomassa. Assim, maximizar a produtividade lipídica não é uma tarefa fácil (Pruvost et al., 2009).

A Tabela 6 resume os resultados de produtividade de biomassa total, de biomassa algal e lipídica encontrados para cada lagoa.

**Tabela 6. Conteúdo lipídico mediano e produtividades médias de biomassa total, biomassa algal e de lipídeos para cada lagoa de alta taxa.**

	<b>Produtividade de biomassa total (g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>Produtividade de biomassa algal (g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>% Lipídeos totais</b>	<b>Produtividade lipídica (g.m<sup>-2</sup>.dia<sup>-1</sup>)</b>
<b>LAT1</b>	11,40	7,77	8,20	0,94
<b>LAT2</b>	8,95	6,32	10,94	1,02
<b>LAT3</b>	8,99	8,90	9,50	0,96
<b>LAT4</b>	8,69	7,36	10,59	0,86
<b>LAT5</b>	12,37	4,76	9,43	1,02
<b>LAT6</b>	12,76	3,71	8,55	1,21
<b>UV1</b>	9,81	9,93	9,32	0,92 a*
<b>UV2</b>	9,17	7,06	9,91	0,96 a*
<b>UV3</b>	8,05	7,09	10,05	0,79 ab*
<b>UV4</b>	9,45	9,34	9,30	0,94 a*
<b>UV5</b>	7,64	4,91	9,26	0,74 ab*
<b>UV6</b>	7,30	7,09	8,88	0,61 b*

\*Foi aplicado teste t a 5% de significância. As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A Tabela 6 permite avaliar qual fator, produção de biomassa ou teor lipídico, influenciou mais a produtividade lipídica em cada unidade. Explica-se a maior produtividade lipídica da lagoa LAT6 pela elevada produtividade de

biomassa total, assim como ocorreu com a LAT5 e UV1. A lagoa LAT2 destacou-se pelo elevado teor lipídico, o que conseqüentemente influenciou na produtividade lipídica da mesma. As lagoas UV2 e UV4 foram as mais equilibradas em termos de produtividade de biomassa e conteúdo lipídico, conseguindo aliar esses dois fatores para alcançar uma produtividade lipídica significativa. No entanto, de maneira geral, percebe-se que dada a pouca variação do conteúdo lipídico, o fator produtividade de biomassa total se mostrou mais relevante na maximização da produtividade lipídica do que o conteúdo de lipídeos totais.

As lagoas sujeitas a menores intensidades luminosas e sem a pré-desinfecção UV foram as mais produtivas, possivelmente, pelo maior crescimento e desenvolvimento nessas unidades de biomassa bacteriana. A biomassa bacteriana apresentou elevado teor lipídico, superior cerca de 50% ao da biomassa total, de acordo com as análises do esgoto afluyente às lagoas de alta taxa. Destaca-se, ainda, que essa biomassa não encontrou condições limitantes para seu crescimento e desenvolvimento, que são mais rápidos, se comparados à biomassa algal.

Na linha de pré-desinfecção sobressaiu-se a biomassa algal e as lagoas sujeitas a maiores intensidades luminosas foram as mais produtivas.

O teste t de significância das médias de produtividade lipídica, para as lagoas com a pré-desinfecção, mostrou que o bloqueio da radiação solar em níveis superiores a 30% é prejudicial para a produtividade lipídica, de forma que a UV4 foi o limite para uma produtividade significativa. A pouca intensidade

luminosa disponível influenciou na redução tanto da produção de biomassa total, quanto do acúmulo de lipídeos nas unidades com a pré-desinfecção UV. Esse mesmo teste para as lagoas sem a pré-desinfecção não mostrou diferença estatística entre as médias de produtividades lipídicas.

Na Tabela 6, ressaltam-se, pequenas diferenças entre valores de produtividade de biomassa total e de biomassa algal, sendo que em algumas lagoas a produtividade algal foi superior (UV1) ou muito próxima (LAT3 e UV4) à de biomassa total. O cálculo da produtividade algal, no qual a clorofila *a* é considerada como 1,5% da biomassa algal, representa uma relação que não é constante e que varia de acordo com as espécies, densidade das células e disponibilidade de luz (Park e Craggs, 2011), podendo não refletir a realidade de algumas lagoas. Outro problema reside no fato de que a célula algal apresenta variação de conteúdo de clorofila, não sendo essa concentração uniforme para a totalidade da população de células. Portanto, a produtividade de biomassa total, calculada baseada no parâmetro SSV, que expressa além da biomassa bacteriana e algal, biomassa de zooplâncton e detritos diversos, deveria ser superior à produtividade de biomassa algal, que foi nesse caso superestimada.

Teores lipídicos e produtividades lipídicas maiores do que os obtidos nesse estudo são frequentes em literatura, principalmente para cultivos específicos com condições de cultivo controladas, uso de meio sintético, escala de bancada e com a indução de algum tipo de *stress* à cultura, geralmente o nutricional. Pruvost et al. (2009) obtiveram teor lipídico de 37%, aliado a produtividade de  $3,8 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  para a microalga *Neochloris oleoabundans*,

cultivada em fotobiorreator tipo *airlift* de 1L de volume com limitação progressiva de minerais. Sem a limitação de minerais, a cultura apresentou 23% de lipídeos totais em relação à biomassa seca, com produtividade lipídica de apenas  $0,5 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ . Abou-Shanab et al. (2011), cultivando *Chlorella vulgaris* em escala laboratorial apresentaram resultados de 26% de teor lipídico. Teor lipídico de 52% foi obtido por Moazami et al. (2012) com o cultivo de *Nannochloropsis sp* em lagoa de alta taxa de  $2\text{m}^3$ , com injeção de  $\text{CO}_2$ , controle de temperatura, meio de cultivo salino e velocidade de rotação da pá de  $2,1 \text{ rad.s}^{-1}$ . Jiang et al. (2011) também cultivando a espécie marinha *Nannochloropsis sp* apresentaram resultados de 59,9% de conteúdo lipídico com *stress* por elevada incidência de intensidade luminosa ( $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e privação de nitrogênio. O cultivo foi feito em fotobiorreatores cilíndricos de 1L de volume com composição do meio de cultivo de 50% de esgoto doméstico e adição de ar com 15% de  $\text{CO}_2$ . Produtividade lipídica de  $2,8 \text{ g. m}^{-2}.\text{d}^{-1}$  e teor de lipídeos totais de 29% foram obtidos por Woertz et al. (2009) cultivando microalgas em tanques abertos de 40L com esgoto doméstico misturado com 25% de efluente de laticínios, adição de 5% de  $\text{CO}_2$  e exposição a 3500 lux. Chinnasamy et al. (2010) obtiveram teor lipídico mais aproximado ao do presente estudo, de 12,20%, tratando efluente de indústria de carpete em lagoas de alta taxa de 950L com suplementação de nutrientes e adição de 5-6% de  $\text{CO}_2$ . Craggs e Park (2011) tratando esgoto doméstico em lagoas de alta taxa em escala real com adição de  $\text{CO}_2$  e recirculação de biomassa apresentaram resultados de

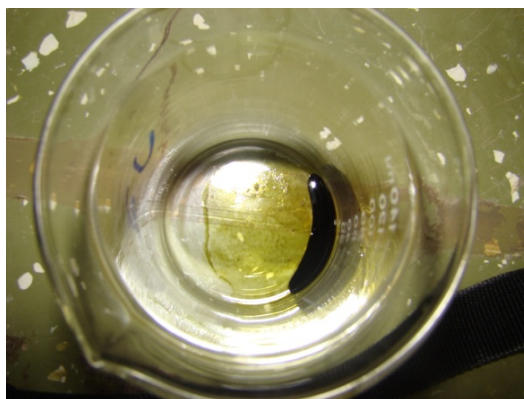
32% de conteúdo lipídico no verão e 22% no inverno, com produtividades lipídicas respectivas de, 3,6 e 1,2 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>.

Ressalta-se que apesar dos altos valores lipídicos reportados em literatura, o elevado custo de biocombustíveis produzidos a partir de biomassa cultivada em condições controladas com alto requerimento tecnológico, pode inviabilizar toda a cadeia produtiva, além da possível implicação em perda de eficiência quando houver o escalonamento do processo produtivo. Woertz et al (2009) afirmaram ainda que sem nenhum aperfeiçoamento da tecnologia, a produtividade lipídica em lagoas de alta taxa de grande escala tende a ser menor do que em reatores fechados, devido a fatores como: insolação e temperaturas no período de inverno e predação entre os organismos presentes. Além desses fatores, a não suplementação por uma fonte de carbono e a utilização de éter de petróleo para extração lipídica (mais específico do que clorofórmio, solvente utilizado na maioria dos estudos citados) podem ser as causas para os baixos valores lipídicos, tanto de produtividade como de conteúdo, encontrados nesse estudo. A escolha do uso do éter de petróleo em detrimento ao clorofórmio foi feita devido à necessidade das tecnologias de extração de lipídeos para produção de biodiesel de microalgas requererem um alto grau de especificidade, de forma a minimizar a co-extração de contaminantes não lipídicos (Halim et al., 2012). Portanto, de acordo com Medina et al. (1998), para reduzir etapas futuras de separação e purificação, a tecnologia de extração deve ser mais seletiva para acilgliceróis do que para outras frações lipídicas que não são prontamente convertidas a biodiesel, como por exemplo, hidrocarbonetos, cetonas, esteróis, carotenoides e

clorofilas. Essa seletividade aumenta com o uso do éter de petróleo que é menos polar que o clorofórmio, refletindo, conseqüentemente, na extração de quantidades menores de lipídeos.

#### **5.4 Caracterização do lipídeo acumulado: perfil de ácidos graxos**

O óleo extraído apresentou textura líquida viscosa, com coloração escura, entre o preto e o verde. Na Figura 19 o óleo pode ser visualizado.



**Figura 18. Óleo extraído para análise cromatográfica**

Como já mencionado, a composição lipídica e a produtividade das microalgas dependem das condições de cultivo, como composição do meio de cultivo, radiação e temperatura (Huerlimann et al., 2010). Por outro lado, as propriedades de um biocombustível, incluindo sua qualidade de ignição, calor de combustão, ponto de congelamento, estabilidade oxidativa, viscosidade, dentre outras são determinadas pelas estruturas dos ácidos graxos que o compõe (Lee et al., 2010). Dessa forma, partiu-se para a identificação e quantificação dos ácidos graxos (ésteres metílicos de ácidos graxos) presentes no óleo extraído via cromatografia gasosa. Para a análise de cromatografia escolheu-se as duas lagoas mais produtivas em termos de lipídeos de cada linha (LAT5 e LAT6, UV2 e

UV4), além das lagoas testemunhas (LAT1 e UV1). A lagoa LAT5 foi escolhida em detrimento da LAT2, apesar de ambas apresentarem o mesmo valor de produtividade lipídica, devido à sua maior geração de biomassa total, fator já discutido como de maior peso para o cálculo da produtividade lipídica nas condições desse estudo.

Com exceção dos padrões, os cromatogramas apresentaram picos não muito definidos, com interferências de fundo. O esgoto doméstico como meio de cultivo influenciou no óleo extraído, de forma que as interferências podem ser explicadas por ésteres metílicos de ácidos graxos já degradados ou em degradação oriundos do processo de decomposição da matéria orgânica. Outra possível explicação foi o tempo muito longo e temperatura muito elevada de secagem da biomassa, que puderam ter levado à degradação de alguns ácidos graxos, principalmente os polinsaturados.

A Tabela 7 apresenta a composição lipídica (percentual de cada éster metílico de ácido graxo encontrado) do óleo acumulado nas lagoas analisadas.

**Tabela 7. Composição (%) dos ácidos graxos.**

Ácidos graxos		LAT1	LAT5	LAT6	UV1	UV2	UV4
<b>C12</b>	Laurico	0,8	0,5	0,8			
<b>C14</b>	Mirístico	2,7	3,3	2,4	3,5	7,7	15,9
<b>C16</b>	Palmitico	30,9	38,3	26,7	24,1	21,7	
<b>C16:1</b>	Palmitoleico	10,5		16,8	4,7	16,8	10,7
<b>C16:2</b>		13,7	32,5	7,0	14,9	6,4	
<b>C18</b>	Estearico	0,8		6,1	4,4	2,0	2,6
<b>C18:1n9</b>		18,5	16,9	11,3		9,8	
<b>C18:1n9 trans</b>	Elaidico				8,1		6,0
<b>C18:1n9 cis</b>	Oleico				3,2		21,4
<b>C18:2n6</b>		8,5	4,3	10,3			
<b>C18:2n6 trans</b>	Linolelaidico				6,8	9,6	5,4
<b>C18:2n6 cis</b>	Linolenico				8,6	6,2	
<b>C18:3n3</b>	$\alpha$ -Linoleico	13,6	4,2	18,7	18,4	19,7	37,8
<b>C20</b>	Araquidônico				3,2		0,2
<b>Desconhecidos</b>		6,5	4,5	8,8	4,1	4,4	8,7
<b>Saturados*</b>		35,2	42,2	36,0	35,1	31,4	18,7
<b>Insaturados*</b>		64,8	57,8	64,0	64,9	68,6	81,3
<b>Monoinsaturados</b>		29,0	16,9	28,1	16,0	26,6	38,1
<b>Polinsaturados</b>		35,8	41,0	36,0	48,8	41,9	43,2

\* Porcentagem foi calculada com base no total de ácidos graxos identificados.

Em contraste com plantas superiores, o perfil lipídico de microalgas tende a ser bem variado (Hu et al., 2008). Essa variedade pode ser observada na Tabela 7, que apresenta o perfil lipídico composto dos seguintes ácidos graxos: C12, C14, C16, C16:1, C16:2, C18, C18:1, C18:2, C18:3 e C20. Houve, no entanto, maior predominância dos ácidos C16, C18:1 e C18:3. Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com perfis de ácidos graxos reportados previamente para uma comunidade fitoplanctônica composta basicamente por espécies variadas do filo Chlorophyta (Wood, 1988; Benemann e Oswald, 1996). Hu et al.

(2008) afirmaram que os ácidos graxos predominantes em espécies do filo Chlorophyta são C16 e C18:1. Chinnasamy et al. (2010) reportaram quinze ácidos graxos identificados em microalgas cultivadas em águas residuárias com também maior predominância dos ácidos C16, C18:1 e C18:3. Mulbry et al. (2008), cultivando microalgas em efluentes de laticínios e suinocultura, identificaram C16, C16:1, C18:1, C18:2 e C18:3, com grande predominância de C16 e quantidades não significativas de ácidos graxos com cadeia carbônica maior que dezoito carbonos.

Nas lagoas sem a pré-desinfecção a porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados foi de certa forma constante, representando entre 35 a 42% de ácidos saturados e 58 a 65% de ácidos insaturados. A lagoa LAT5, entretanto, foi a que apresentou maior equilíbrio nessa composição. Nas unidades com a pré-desinfecção, com exceção da lagoa UV1, o grau de instauração foi acentuado com porcentagens maiores que 65%.

Na linha de pré-desinfecção, provavelmente devido à maior presença de biomassa algal, foi possível observar o efeito da intensidade luminosa na insaturação dos ácidos graxos. Houve um aumento da insaturação nas unidades menos expostas à radiação solar, se comparado com a lagoa testemunha. A insaturação aumentou de 64,9% na lagoa UV1 para 81,3% na UV4, com bloqueio de 30% da PAR. A porcentagem de polinsaturação, por sua vez, se manteve praticamente constante. Resultados encontrados em literatura que afirmam que baixas intensidades luminosas induzem a formação de lipídeos polares de membranas associados ao cloroplasto (Khotimchenko e Yakovleva,

2005; Hu et al., 2008). Khotimchenko e Yakovleva (2005) concluíram que a exposição da alga vermelha *Tichocarpus crinitus* a 8-10% da PAR induziu a formação de lipídeos constituintes das membranas celulares, enquanto que uma exposição a maiores intensidades (80% da PAR) resultou em aumento de 1,5 vezes na quantidade de lipídeos de armazenamento. No presente estudo, as porcentagens de polinstauração para as lagoas com pré-desinfecção se mantiveram no intervalo de 41,9 a 48,8%, não apresentando aumento com a diminuição da incidência de PAR. Esse fato pode ser explicado pela presença de uma biomassa bastante complexa e diversificada nas lagoas, não havendo predominância de organismos autotróficos, mais influenciados pela radiação solar.

Considerando o óleo extraído como matéria-prima para a produção de biodiesel, é desejável que esse óleo contenha quantidades significativas de ácidos graxos saturados, com baixos conteúdos de C18:2 e C18:3. A Norma Europeia EN 14214 (2004) para combustíveis automotivos limita em 12% o conteúdo de C18:3 para obtenção de um combustível de qualidade. Uma maior quantidade de C18:3 para obtenção de um combustível de qualidade. Uma maior quantidade de C18:1, no entanto, é desejável. De acordo com Rashid et al. (2008), óleos com um alto conteúdo de C18:1 possuem um razoável equilíbrio das propriedades combustíveis. Lee et al. (2010) afirmaram ainda, que alto conteúdo de C18:1 aumenta a estabilidade oxidativa do combustível e diminui seu ponto de congelamento, para uso em regiões de clima frio. Assim, agrupando todas essas características, duas lagoas se sobressaem, a LAT5 e UV1. A lagoa LAT5 apresentou um óleo com 16,9% de C18:1, conteúdos de 4,3% e 4,2% de C18:2 e

C18:3, respectivamente e 42,2% de ácidos graxos saturados e 41% de ácidos polinsaturados. A lagoa UV1, por sua vez, apresentou um conteúdo de 11,3% C18:1, 15,5% de C18:2 e 18,4% de C18:3, 35,1% de saturação e 64,8% de polinsaturação. A UV4 apesar de apresentar o maior conteúdo de C18:1 (27,4%), foi também a lagoa que apresentou a maior porcentagem de C18:3 (37,8%), podendo ser considerada como a lagoa com as condições menos favoráveis para a produção de biodiesel. Importante ressaltar, que os óleos aqui obtidos não apresentaram qualidades desejadas para a produção de um bom biodiesel, principalmente pelo elevado grau de insaturação do perfil lipídico. Dessa maneira, sugerem-se processos para modificações das características desses óleos, como por exemplo, processos de hidrogenação e mistura com outros óleos mais saturados, como o óleo de palma.

## 6. CONCLUSÕES

A pré-desinfecção UV influenciou positivamente na produção de biomassa algal e em relação à produção de biomassa total, as unidades mais favorecidas foram unidades não precedidas da desinfecção UV, devido ao maior crescimento de biomassa bacteriana.

A comunidade fitoplanctônica apresentou variações ao longo de um ano monitorado, porém com dominância na maior parte do tempo e em todas as unidades da Classe Chlorophyceae, com alternância entre os gêneros *Chlorella* e *Desmosdesmus* de acordo com a estação do ano, não demonstrando relação com a variação da radiação solar e presença da pré-desinfecção. As unidades sem a prévia desinfecção UV foram as que apresentaram maiores quantidades de organismos por mL.

A quantidade de lipídeos totais produzida variou pouco entre as diferentes condições de cultivo, sendo as unidades com maior bloqueio da radiação solar as que menos acumularam lipídeos. O acúmulo de lipídeos foi estatisticamente explicado pelas variáveis PAR, subPAR, concentração de clorofila *a* e concentração de SSV para as lagoas sem a prévia desinfecção e pelas variáveis subPAR, concentração de clorofila *a* e concentração de SSV para as unidades precedidas da pré-desinfecção, indicando que além da variável intensidade luminosa, outras variáveis influenciaram no acúmulo de lipídeos para as condições desse estudo. Ao analisar conjuntamente, a produção de biomassa total e o acúmulo de lipídeos, as unidades com maiores produtividades lipídicas foram as lagoas da linha sem a pré-desinfecção. Para o cálculo da produtividade

lipídica, o fator produtividade de biomassa total foi tido como o de maior influência, já que o conteúdo lipídico pouco variou entre as unidades.

Com relação ao perfil lipídico, os óleos produzidos pelas lagoas LAT5 e UV1 foram os mais adequados para a produção de biodiesel, apresentando melhores características em termos estabilidade oxidativa, ponto de congelamento e quantidade de ácidos graxos polinsaturados. Na linha de pré-desinfecção, provavelmente devido à maior presença de biomassa algal, foi possível observar o efeito da intensidade luminosa na insaturação dos ácidos graxos. Houve um aumento do grau de polinsaturação com a diminuição da exposição à radiação solar.

Uma vez que o uso de esgoto doméstico como meio de cultivo inclui, além da biomassa algal, outros tipos de biomassa como a bacteriana, conclui-se que o aumento da produtividade lipídica deve ser realizado no sentido de aumentar a produtividade de biomassa total. Nesse sentido, a suplementação por uma fonte externa de carbono se faz de grande importância, já que o esgoto doméstico é insuficiente para a manutenção da demanda de carbono das algas. Conclui-se ainda que o uso da pré-desinfecção ultravioleta foi efetivo no aumento da produtividade de biomassa algal, diminuindo, porém a produtividade de biomassa total e consequentemente a produtividade lipídica dessas unidades. Em relação à intensidade luminosa, conclui-se que essa variável não explicou sozinha o acúmulo de lipídeos por parte da biomassa total e que influenciou na qualidade dos lipídeos produzidos, à medida que aumentou a insaturação dos ácidos graxos produzidos nas unidades precedidas pela pré-desinfecção. De forma geral, a

condição com 60% de sombra e sem a pré-desinfecção UV, foi a que aliou as melhores características, em termos de quantidade e qualidade, dos lipídeos acumulados para produção de biodiesel.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Shanab, R.A.I., Matter, I.A., Kim, S.N., Oh, Y.K., Choi, J., Jeon, B.H. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. *Biomass e Bioenergy*, 35, pp 3079-3085. 2011.

Alonso, D.L., Belarbi, E.H., Fernández-Sevilla, J.M., Rodriguez-Ruiz, J., Grima, E.M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Photochemistry*, 54, pp 461 – 471. 2000.

ANP, Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - 2012. Ministério de Minas e Energia. Rio de Janeiro, 2012. 250p. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=62402&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1357732753036>. Acesso em: 05/01/2013.

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation. 2005.

ASTM, American Society for Testing and Materials. Standard specification for biodiesel fuel (b100) blend stock for distillate fuels. Designation D6751- 02. West Conshohocken (PA): ASTM International; 2002.

Balseiro, E., Souza, M.S., Modenutti, B., Reissing, M. Living in transparent lakes: low food P:C ratio decreases antioxidant response to ultraviolet radiation in *Daphnia*. *Limnol.Oceanogr.*, 53, pp 2383-2390. 2008.

Beardall, J., Young, E., Roberts, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences*, 63, pp 44 – 69. 2001.

Benemann, J.R. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae systems energy. *Energy Conversion Management*, 38, pp 475-479. 1997.

Benemann, J.R. *Microalgae Biotechnology: Products, Processes and Opportunities*, vol. 1. OMEC International Inc. 1986.

Benemann, J.R., Goebel, R.P., Weissman, J.C., Augenstein, D.C. Production of liquid fuels and chemicals by microalgae. Proceedings of the March 1983 Principal Investigators Meeting, Aquatic Species Program Solar Energy Research Institute, Golden, Colorado, SERI/CP-231-1946, pp. 19e32. 1983.

Benemann, J.R., Koopman, B.L., Weissman, J.C., Eisenberg, D.M., Oswald, W.J. An integrated system for the conversion of solar energy with sewage-grown microalgae. Report, Contract D(0-3) 34 U.S. Depto. Of Energy, SAN-003-4-2, June, 1978.

Benemann, J.R., Oswald, W.J. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of carbon dioxide to biomass. Pittsburgh Energy Technology Center Pittsburgh, PA. Disponível em: <http://www.govdocs.aquaque.org/cgi/reprint/2004/915/9150050>. Acesso em: 01/05/2012.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophysiol*, 37, pp 911-915. 1959.

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

Burlew, J.S., editors. *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Washington (DC): Carnegie Institution of Washington Publication. 600. 1953.

Cade-Menun, B.J., Paytan, A. Nutrient temperature and light stress alter phosphorus and carbon forms in culture-grown algae. *Marine Chemistry*, 121, pp 27-36. 2010.

Calijuri, M.C. A comunidade fitoplanctônica em um reservatório tropical (Barra Bonita - SP). 211 fls. Tese (Livre-Docência). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 1999.

Camourze, J.P. *O Metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. São Paulo: Editora Edgard Blücher-Fapesp, 1994. 253p.

García, C. M.C., Sevilla, J.M.F., Fernández, F.G.A., Grima, E.M., Camacho, F.G. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology*, 12, pp 239 – 248. 2000.

Cetesb, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Norma Técnica L5.303: fitoplâncton de água doce - métodos qualitativo e quantitativo (método de ensaio). São Paulo, 2005.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., Das, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresour. Technol*, 101, pp 3097–3105. 2010.

Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, pp 294–306. 2007.

Chisti, Y., Moo-Young, M. Review: disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, pp 194-204. 1986.

Cho, S., Luong, T.T., Lee, D., Oh, Y.K., Lee, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. *Bioresour. Technol*, 102, pp 8639-45. 2011.

Christie, W.W. Methylation of fatty acids – a beginner's guide. <http://www.lipidlibrary.co.uk/topics/methests/index.htm>. 2007. Acesso em 15/11/2012.

Cohen, Z., Norman, H.A., Heimer, Y.M. Microalgae as a source of w-3 fatty acids. *World Rev Nutr Diet*, 77, pp 1–31. 1995.

Craggs, R.J. Advanced integrated wastewater ponds. In: Shilton, A. (Ed.), *Pond Treatment Technology*, IWA Scientific and Technical Report Series, IWA, London, UK, pp 282–310. 2005.

Craggs, R.J., Heubeck, S., Lundquist, T.J., Benemann, J.R. Algae biofuel from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Science and Technology* 63, 660-665. 2011.

Craggs, R.J., Park, J.B.K. Algal/bacterial lipid production in wastewater treatment ponds. 9<sup>th</sup> IWA Specialist Group Conference on Waste Stabilization Ponds. Australia, 2011. ISBN: 9781-921335-17-4. 2011.

Craggs, R.J., Sutherland, D., Campbell, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 24, pp 329-337. 2012.

Cruz, C.D. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

Cuhel, R.L., Lean, D.R.S. Influence of light intensity, light quality, temperature and day length on uptake and assimilation of carbon dioxide and sulphate by lake plankton. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 44, pp 2118-2132. 1987.

Dean, A.P., Sigeo, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101, pp 4499–4507. 2010.

Derner, R.B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos polinsaturados. 158 fls. Tese (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennete, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, pp 235-240. 2008.

El Sheik, M.M., El Nagger, A.H., Osman, M.E.H., Haider, A. Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile. *Water air Soil Pollution*, 124, pp 187-204. 2000.

Engler, C.R. Disruption of Microbial Cells. *Comprehensive Biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed., Moo-Yoong, M. Ed: Pergamon Press: Oxford, pp 305-324. 1985.

- Fábregas, J., Morales, E.D., Lamela, T., Cabezas, B., Otero, A. Mixotrophic productivity of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* cultured with soluble fractions or rye, wheat and potato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, pp 349 – 351. 1997.
- Garbayo, I., Cuaresma, M., Vílchez, C., Vega, J.M. Effect of abiotic stress on the production of lutein and  $\beta$ -carotene by *Chlamydomonas acidophila*. *Process Biochem.*, 43, pp 1158-1161. 2008.
- García, J., Green, B.F., Lundquist, T., Mujeriego, R., Hernández-Mariné, M., Oswald, W.J. Long term diurnal variations in contaminant removal in high rate ponds treating urban wastewater. *Bioresource Technology*, 97, pp 1709–1715. 2006.
- García, J., Hernández-Mariné, M., Mujeriego, R. Influence of phytoplankton composition on biomass removal from high-rate oxidation lagoons by means of sedimentation and spontaneous flocculation. *Water Environment Research*, 72, pp 230-237. 2000.
- Geciova, J., Bury, D., Jelen, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in dairy industry- A review. *Int. Dairy J.*, 12, pp 541-553. 2002.
- Gómez-Villa, H., Voltolina D., Nieves, M., Pina, P. Biomass production and nutrient budget in outdoor cultures of *Scenedesmus obliquus* (chlorophyceae) in artificial wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlán, Sinaloa, Mexico. *Vie et Milieu*, 55, pp 121 – 126. 2005.
- Gonçalves, R.F.; Filho, B.C.; Chernicharo, C.A.L.; Lapoli, F. R.; Aisse, M.M.; Piveli, R.P.; Desinfecção por radiação ultravioleta. In: GONÇALVES, Ricardo Franci. *Desinfecção de Efluentes Sanitários*. Vitória: ABES, p. 209-276. 2003.
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., León, C., García, P. A., Muñoz, R. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photobioreactor using algae– bacteria consortia. *Water Science and Technology*, 58, pp 95 – 102. 2008.
- Gouveia, L., Nobre, B.P., Marcelo, F.M., Mrejen, S., Cardoso, M.T., Palavra, A.F., Mendes, R.L. Functional food oil colored by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, 101, pp 717-23. 2007.
- Grant, C. Characteristics of nitrogen- and iron-limited growth in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, and in natural Phytoplankton population. Thesis (Doctor in Philosophy). University of Auckland. 2001.
- Greene, E.R.M., Geider, R.J., Falkowsk, P.G. Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. *Limnol. Oceanogr*, 8, pp 1772 – 1782. 1991.

- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol*, 21, pp 493–507. 2009.
- Grima, M., Camacho, F. G., Sanchez, Pérez. J. A., Fernandez Sevilla, J. M., Acién Fernández, F. G., Contreras Gómez, A. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 61, pp 167-173. 1994.
- Guzzon, A., Bohn, A., Diociaiuti, M., Albertano, P. Cultured phototrophic biofilms for phosphorus removal in wastewater treatment. *Water Research*. 42, pp 4357 – 4367. 2008.
- Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A. Extraction of oil form microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30, pp 709-732. 2012.
- Harwood, J.L., Guschina, I.A. The Versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie.*, 91, pp 1–6. 2009.
- Hillebrand, H., Sommer, U. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnol. Oceanogr.*, 44, pp 440-446. 1999.
- Hirano, A., Hon-Nami, K., Kunito, S., Hada, M., Oguschi, Y. Temperature effect on continuous gasification of microalgal biomass: theoretical yield of methanol production and its energy balance. *Catalysis Today*, 45, pp 399-404. 1998.
- Hirano, A., Ueda, R., Hirayama, S., Ogushi, Y. CO<sub>2</sub> fixation and ethanol production with microalgae photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy*, 22, pp 137-142. 1997.
- Holland, D.P., Pantorno, A., Orr, P.T., Stojkovic, S., Beardall, J. The impacts of a high CO<sub>2</sub> environment on a bicarbonate user: The cyanobacterium *Cylindrosperopsis raciborskii*. *Water Research*, 46, pp 1430-1437. 2012.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, pp 621-639. 2008.
- Huang, G., Feng, C., Dong, W., Zhang, X. W., Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 37, pp 38-46. 2010.
- Huerlimann, R., de Nys, R., Heimann, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology Bioengineering*, 107, pp 245-257. 2010.
- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. *Applied Energy*, 88, pp 3336-3341. 2011.

Johnson, M. B., Wen, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 85, pp 525 – 534. 2010.

Joseph, V., Joseph, A. Ecology and seasonal variation of microalgal community in an oil refinery effluent holding pond: monitoring and assessment. *Environ. Monit. Assess.*, 80, pp 175-185. 2002.

Kaixian, Q., Borowitzka, M. A. Light and Nitrogen Deficiency Effects on the Growth and Composition of *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38, pp 93 – 103. 1993.

Ketheesan, B., Nirmalakhandan, N. Development of a new airlift-driven raceway reactor for algal cultivation. *Applied Energy*, 88, pp 3370-3376. 2011.

Khotimchenko, S.V., Yakovleva, I.M. Lipid composition of the red algal *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, 66, pp 73-79. 2005.

Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, pp 696 – 701. 2006.

Kong, Q.X., Li, L., Martinez, B., Chen, P., Ruan, R. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, pp 9–18. 2010.

Kumari, P., Reddy, C.R.K., Bhavanath Jha. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Analytical Biochemistry*, 415, pp 134-144. 2011.

Lang, X., Dalai, A.K., Bakhshi, N.N., Reaney, M.J., Hertz, P.B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology*, 80, pp 53-62. 2001.

Lee, J.Y., Yoo, C., Jun, S.Y., Ahn, C.Y., Oh H.M. Comparison of several methods for effective lipid extraction form microalgae. *Bioresource Technology*, 101, pp 75-7. 2010.

Lehninger. Principles of Biochemistry. 4th Edition - D L Nelson, M Cox Lehninger - W H Freeman. 2004.

Li, Y., Qin, J.G. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *Journal of Applied Phycology*, 17, pp 551-556. 2005.

Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., Ruan, R. R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresource Technology*, 102, pp 10861 – 10867. 2011.

- Liu, Z., Wang, G., Zhou, B. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99, pp 4717 – 4722. 2008.
- Lombardi, A. T., Wangersky, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series*, 77, pp 39 – 47. 1991.
- Lourenço, S.O. *Cultivo de Microalgas Marinhas - princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, 2006.
- Lundquist, T. J., Woertz, I. C., Quinn, N. W. T., Benemann, J. R. A realistic technology and engineering assessment of algae biofuel production. Berkeley, California: Energy Biosciences Institute. 2010.
- Lyakh, A. A new method for accurate estimation of diatom biovolume and surface area. In: Kusber, W.H., Jahn, R. (editors), *The 1<sup>st</sup> Central European Diatom Meeting* Botanic Garden and Botanic Museum Berlin-Dahlem. Freie Universität Berlin. 2007.
- Makkay, K., Pick, F.R., Gillespie, L. Predicting diversity versus community composition of aquatic plants at the river scale. *Aquatic Botany*, 88, pp 338-346. 2008.
- Martínez, M. E., Sánchez, S., Jiménez, J. M., El Yousfi, F., Munõz, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73, pp 263 – 272. 2000.
- Medina, A.R., Grima, E.M., Gimenez, A.G, Ibanez, M.J. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*, 16, pp 517-80. 1998.
- Meeting, F.B. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, pp 477-489. 1996.
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, 34, pp 1 – 5. 2009.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Egtesadi, R., Nejad, A.S. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass e Bioenergy*, 39, pp 449-453. 2012.
- Mock, T., Kroon, B.M.A. Photosynthetic energy conversion under extreme conditions-II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, 61, pp 53-60. 2002.
- Mulbry, W., Kondrad, S., Buyer, J. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *J. Appl. Phycol*, 20, pp 1079– 1085. 2008.

Nederlands Norm (NEN). NEN 6520. Norma holandesa sobre determinação de clorofila *a* pelo método do etanol, 1981.

Nush, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Arch. Hydrobiol.*, v. 4, p. 14-36, 1980.

Odum, H.T. Primary Production inflowing Waters. *Limnology and Oceanography*, 1, pp 102-117. 1956.

Ono, E., Cuello, J.L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. *Biosystems Engineering*, 95, pp 597-606. 2006.

Orpez, R., Martinez, M. E., Hodaifa, G., El Yousfi, F., Jbari, N., Sanchez, S. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Desalination*, 246, pp 625–630. 2009.

Park, J.B.K., Craggs, R.J. Nutrient removal in high rate algal ponds with CO<sub>2</sub> addition. *Water Science Technology*, 63, pp 1758–1764. 2011.

Park, J.B.K., Craggs, R.J. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science Technology*, 61.3, pp 633-639. 2010.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, pp. 35 – 42. 2011a.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N. Recycling algae to improve species control and efficiency form a high rate algal pond. *Water Research*, 45, 6637-6649. 2011b.

Picot, B., El Halouani, H., Casellas, C., Moersidik, S., Bontoux, J. Nutrient Removal by High Rate Pond System in a Mediterranean Climate (France). *Water Science Technology*, 23, 1535-1541. 1991.

Pittman, J. K., Dean, A. P., Osundeko, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, pp 17-25. 2011.

Powell N, Shilton A, Pratt S, Chisti Y. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, 63, pp 704-709. 2011.

Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., Pratt, S. Towards a luxury uptake process via microalgae – defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43, pp 4207– 4213. 2009.

Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*, 100, pp 5988-5995. 2009.

Pulz, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, pp 287-93. 2001.

Pulz, O., Scheinbenbogan, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 59, pp 123-52. 1998.

Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V.S. Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, pp 1979-2985. 2010.

Raschid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G. Moringa oleifera oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99, pp 8175-9. 2008.

Raschke, R.L. Diatom community response to phosphorus in the Everglades National Park USA. *Phycologia*, 31, pp 48-58. 1993.

Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrunidis, G., Parry, D.L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae in batch cultures. *Aquaculture*, 211, pp 195-214. 2002.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 102, pp 100–112. 2009.

Rodrigues, C.J., Mercante, C.T.J., Carmo, C.F., Tucci, A., Osti, J.A.S., Di Genaro, A.C. Diurnal dynamics of inorganic carbon and oxygen dissolved in a Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1978) fish pond, São Paulo, Brasil. *Limnologica Brasiliensia*, 22, pp 466-473. 2010.

Roessler, P. Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology*, 26, pp 393-399. 1990.

Roleda, M.Y., Slocombe, S.P., Leakey, R.J.G., Day, J.G., Bell, E.M., Stanley, M.S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 129, 439-449. 2013.

Rossetto, M. Brasil será o maior produtor de biodiesel em 2012. (15/11/2011). *Revista Globo Rural* (on line). Entrevista concedida a Viviane Taguchi. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI278525-18077,00>

[BRASIL+SERA+MAIOR+PRODUTOR+DE+BIODIESEL+EM+DIZ+ROSSE TO.html](#). Acesso em 20/11/2012.

Rott, E., Salmaso, N., Hoehn, E. Quality control of Utermohl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia*, 578, pp 141-146. 2007.

Sakthivel, R., Elumalai, S., Mohommad arif, M. Microalgae lipid research, past, present: a critical review for biodiesel production, in the future. *Journal of Experimental Sciences*, 2, pp 29-49. 2011.

Sand-Jensen, K. Environmental variables and their effect on photosynthesis of aquatic plant communities. *Aquatic Botany*, 94, pp 5-25. 1989.

Santos, G.M., Macedo, R.V.T., Alegre, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da Composição da Biomassa. *Ciência e Tecnologia em Alimentos*, Campinas, 23, pp 17 – 21. 2003.

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J., Posten, C. Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 1, pp 20-43. 2008.

Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R.A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., Yu, T. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science*, 319, pp 1238-40. 2008.

Sharma, Y.C., Singh, B., Upadhyay, S.N. Advancements in development a characterization of biodiesel: A review. *Fuel*, 87 pp 2355–2373. 2008.

Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., Mao, E. Microalgae mass production methods. *Trans ASABE*, 52, pp 1275 – 1287. 2009.

Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409 - 416. 2009.

Sirón, R., Giusti, G., Berland, B. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricorutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Marine Ecology Progress Series*, 55, pp 95 – 100. 1989.

Song, D., Fu, J., Shi, D. Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24, pp 341-348. 2008.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci Bioeng*, 101, pp 87-96. 2006.

Suarez, P.A., Meneghetti, S.M.P. 70º Aniversário do biodiesel em 2007: Evolução histórica e situação atual no Brasil. *Química Nova*, 30, pp 2068-2071. 2007.

Sydney, E.B., da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., de Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88, pp 3291-3294. 2011.

Takagi, M., Yoshida, T. Effect of Salt Concentration on Intracellular Accumulation of Lipids and Triacylglyceride in Marine Microalgae *Dunaliella Cells*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, pp 223 – 226. 2005.

Teixeira, C.M. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. 2008. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/MicroalgaComo.pdf>. Acesso em: 13/05/2012.

Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99, pp 4021-8. 2008.

Vadrucci, M.R., Cabrini, M., Basset, A. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transition water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bulletin*, 2, pp 83-103. 2007.

Walsh, G.E., Bahner, L.H., Horning, W.B. Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. *Environ. Pollut. (Ser.A)*, 21, pp 169-179. 1980.

Walter, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C. Microalgae as bioreactor. *Plant Cell Rep*, 24, pp. 629-641. 2005.

Wang, H., Hondzo, M., Xu, C., Poole, V., Spacie, A. Dissolved oxygen dynamics of streams draining an urbanized and an agricultural catchment. *Ecological Modeling*, 160, pp 145-161. 2003.

Wang, L., Li, Y. C., Chen, P., Min, M., Chen, Y. F., Zhu, J., Ruan, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella sp.* *Bioresource Technology*, 101, pp 2623–2628. 2010.

Wang, L., Weller, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science Technology*, 17, pp 300-12. 2006.

Wei, Q., Hu, Z., Li, G., Xiao, B., Sun, H., Tao, M. Removing nitrogen and phosphorus from simulated wastewater using algal biofilm technique. *Frontiers of Environmental Science e Engineering in China*. 2, pp 446 – 451. 2008.

Wen, Z.Y., Chen, F. Optimization of nitrogen sources for heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Enzyme Microbiol Technol*, 29 pp 341–347. 2000.

Wilkie, A.C., Mulbry, W.W. Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresource Technology*, 84, pp 81 – 91. 2002.

Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., Nelson, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135, pp 1115-1122. 2009.

Wood, B.J.B. Lipids of algae and protozoa. In: Ratledge C, Wilkinson SG (ed.) *Microalgal lipids*. Academic, London. Pp 807-867. 1988.

Yongmanitchai, W., Ward, P. Growth and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions. *Applied and Environmental microbiology*, pp 419 - 425. 1991.

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