

## II-213 - AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS DE *DESMODESMUS SUBSPICATUS* E *CHLORELLA VULGARIS* CULTIVADAS EM ESGOTO DOMÉSTICO PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

**Sílvia Mariana S. Barbosa** <sup>(1)</sup>

Bacharel em Ciências Biológicas/Ambientais pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre e doutoranda em Engenharia Civil (Tecnologia Ambiental) pela UFPE.

**Marcella Vianna Cabral Paiva** <sup>(2)</sup>

Bacharel em Ciências Biológicas/Ambientais pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Mestre e doutoranda em Engenharia Civil (Tecnologia Ambiental) pela UFPE.

**Sávia Gavazza** <sup>(3)</sup>

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutorado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Professora Associada da UFPE. Pós-doutorado na Universidade de Cornell (EUA) e Universidade de Toronto (Canadá).

**Mario Takayuki Kato** <sup>(4)</sup>

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professor Titular da UFPE.

**Lourdinha Florencio** <sup>(5)</sup>

Engenheira Civil pela UFPE. Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professora Titular da UFPE.

**Endereço:** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências. Departamento de Engenharia Civil. Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA – UFPE). Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n. Cidade Universitária. CEP: 50740-530 Recife PE, Brasil. Tel: (81) 2126-8742 e-mail: [flor@ufpe.br](mailto:flor@ufpe.br); [barbosasms@gmail.com](mailto:barbosasms@gmail.com)

### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo, promover um estudo sobre a recuperação da biomassa do meio de cultivo, e a recuperação do conteúdo lipídico das espécies *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus* cultivadas em esgoto doméstico, visando estudar a viabilidade de se utilizar esta matéria-prima para produção de biodiesel. A biomassa em suspensão, foi submetida a ação de diferentes agentes coagulantes, de natureza catiônica, em diferentes concentrações. Para avaliar a recuperação da biomassa do meio, foram testadas soluções de hidróxido de sódio, sulfato de alumínio, hidroxicarbonato de sódio, cloreto férrico, sulfato de alumínio associado a cloreto férrico e solução de cloreto de alumínio. A decantação sem auxílio de flocculantes foi também avaliada. Os métodos de extração lipídica, envolveram o uso de técnicas assistidas por um equipamento ultrassom e por meio de equipamento *Soxhlet* na presença de metanol, clorofórmio e da mistura clorofórmio: metanol 2:1. Foi constatado que o uso da mistura de flocculantes sulfato de alumínio e cloreto férrico numa proporção 1:1, foi a que melhor promoveu a colheita da biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, tanto no quesito tempo de decantação, como na recuperação da biomassa do meio de cultivo utilizado (esgoto doméstico). O uso do equipamento *soxhlet*, sob ação da mistura de solventes clorofórmio e metanol 2:1, em ciclos de extração de 8h, foi a que melhor promoveu a recuperação de lipídeos intracelular da biomassa das espécies *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalgas, lipídeos, flocculantes, rendimento lipídico.

### INTRODUÇÃO

Biodiesel pode ser produzido a partir de matérias primas, tais como óleos vegetais ou gorduras animais. No entanto, sua produção proveniente de óleos vegetais como de milho, girassol, soja, canola, palma, beterraba e cana de açúcar competem com a produção de alimentos, que também necessita de vastas áreas para o cultivo, implicando no aumento de preços e o uso de práticas agrícolas insustentáveis (DEMIRBAS, 2011).

Dentre as fontes alternativas para a produção de biodiesel destaca-se o potencial das microalgas. Existe grande expectativa para a consolidação das microalgas como fonte viável de biomassa para a produção de biocombustível. Porém, este tipo de cultivo não deslocará as tradicionais áreas de cultivo voltadas para a alimentação humana (FILHO et al, 2013). As microalgas constituem um amplo e heterogêneo grupo de organismos simples tipicamente autótrofos, que tem a capacidade de produzir compostos orgânicos complexos a partir de moléculas inorgânicas através de fotossíntese ou de reações químicas (FILHO et al, 2013).

A produção de biocombustível a partir de microalgas tem como principais vantagens: (i) não competir por áreas agricultáveis, (ii) não necessitar de agrotóxicos e consumo excessivo de água, (iii) apresentar altas taxas de crescimento da biomassa com elevado teor lipídico intracelular e (iv) apresentam maior produtividade por área quando comparada as plantas oleaginosas mais produzidas (CHISTI, 2007; BAHADAR et al 2013; CRUZ, et al 2013).

Seguinte ao processo de cultivo, colhe-se e processa a biomassa para liberar os subprodutos, tais como os triglicerídeos, que são utilizados para produção de biodiesel. Os métodos de colheita da biomassa algal mais comuns incluem a sedimentação, centrifugação, filtração, ultra-filtração, podendo ser utilizada a floculação adicional ou com uma combinação de floculação-flotação. O método de extração de lipídios da biomassa microalgal para este fim deve ser o mais específico e seletivo possível, a fim de minimizar a extração das frações não lipídicas e maximizar as frações desejadas. Dentre os métodos para romper a parede celular estão os métodos mecânicos: por meio de prensas e congelamento, e os químicos: com uso de solventes orgânicos e choque osmótico; reações ácidas, básicas e enzimáticas, além da extração assistida por ultrassom e por micro-ondas, extração com CO<sub>2</sub> em estado supercrítico. As prensas mecânicas e os solventes apolares são os métodos mais utilizados para a extração de lipídeos das microalgas, assim como é realizado com oleaginosas tradicionais (GRIMA et al 2003; MATA et al 2010).

A extração química, utiliza solventes como benzeno, éter e hexano, metanol e clorofórmio e apresenta uma alta especificidade para os lipídios que são altamente solúveis, com isso consegue-se extrair os lipídios intracelulares e requer um processo de destilação subsequente para separar o excesso de solventes que ficou no extrato e a grande quantidade que utiliza para obter quantidades significativas de óleo (CHISTI, 2007).

Desse modo, esse trabalho objetivou promover um estudo sobre o a recuperação da biomassa do meio de cultivo, e a recuperação do conteúdo lipídico das espécies *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus obliquus* da divisão Chlorophyta, submetidas a ação de diferentes agentes floculantes e diferentes técnicas para extração lipídica, visando estudar a viabilidade de se utilizar esta matéria-prima para produção de biodiesel.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultivo, colheita e testes de coagulação-floculação da biomassa

O cultivo foi realizado em regime contínuo, utilizando esgoto bruto como fonte de carbono e nutrientes, proveniente da ETE Rio Formoso, litoral sul de Pernambuco. Foram utilizados aquários em vidro transparente com volume de 20L, sob iluminação artificial contínua de  $3000 \pm 100$  lux, e para favorecer a mistura, foi injetado ar atmosférico filtrado a uma vazão de  $300 \text{ L.h}^{-1}$  e temperatura controlada de  $20 \pm 1$  °C. Alcançada a fase estacionária da curva de crescimento (15 dias) aferiu-se o pH, temperatura, condutividade elétrica do cultivo, e o rendimento final da biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ). Para avaliar a eficiência da coagulação-floculação, cones de *Imhoff* em vidro com volumes de 1L foram utilizados. Foram testadas soluções de hidróxido de sódio NaOH; sulfato de alumínio  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ; hidroxicarbonato de cálcio  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , cloreto férrico  $\text{FeCl}_3$ , cloreto de alumínio  $\text{AlCl}_3$  e sulfato de alumínio + cloreto férrico na proporção 1:1 de modo que a concentração final de coagulante no volume testado, não ultrapassasse  $500\text{mg.L}^{-1}$ . Foram avaliados aspectos quanto a molaridade do composto (1 e 2M), o tempo de floculação-decantação (10, 20, 40, 60 e 120 minutos), o pH obtido ao longo do tempo de floculação-decantação, e a taxa de recolhimento (avaliada por meio da concentração de SST  $\text{mg.L}^{-1}$  do sobrenadante ao longo do tempo) para a biomassa das duas espécies. A decantação sem auxílio de coagulantes foi também avaliada como parâmetro controle. A secagem da biomassa para posterior extração, foi realizada ao sol, sob uma película plástica de 0,8 mm que se manteve exposta por um período máximo de 12 horas.

## Extração de lipídeos

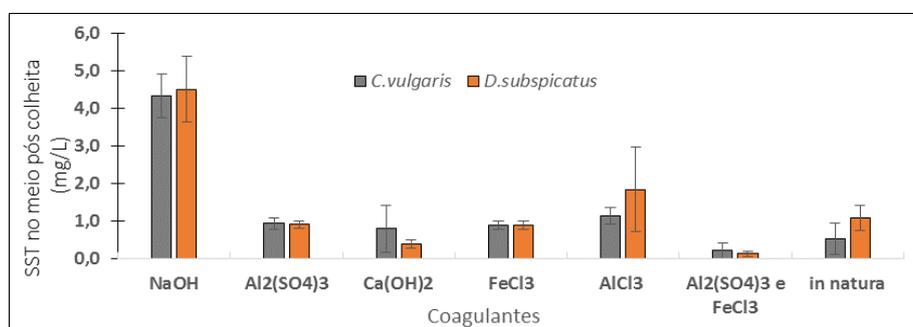
A extração de lipídeos foi realizada com a biomassa de *D. subspicatus* (Ds) e *C. vulgaris* (Cv) obtidas no melhor teste de coagulação-floculação. A recuperação lipídica foi avaliada com uso dos solventes: clorofórmio (C), metanol (M), e a mistura clorofórmio e metanol 2:1(CM). Todos os solventes foram utilizados com grau de pureza de 95%. Para auxiliar no processo de quebra da parede celular algal, foram comparados o uso de equipamento *Sohxlet* (Quimis, mod 0388-268) e ultrassom (banho ultrassom Unique, mod. USC-1850 A 120 watts 3,6 L). Para cada um dos tratamentos, foram utilizados 2g de biomassa seca e 200 mL de solvente. O período de extração foi de 4h para ambos os equipamentos, sendo este um tempo hábil para se completar 8 ciclos de lavagem no *Sohxlet*. Um retroevaporador em dois módulos (IKA, mod. HB 10 basic módulo de banho, e retroevaporador IKA mod. RV 10 basic) foi usado para remover os solventes da amostra, que se manteve em banho maria a uma temperatura de 65°C por um período de 1h. Após remoção do solvente, a quantificação total de óleo recuperado, foi obtida gravimetricamente com uso de balança analítica. A técnica utilizada foi adaptada do método de Blight & Dyer (1956). Para avaliar diferenças entre os tratamentos, foi realizado teste ANOVA, e teste *t* com nível de confiança de 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Colheita da biomassa (testes de floculação)

O pH e a temperatura de ambos os cultivos, manteve-se constante ao longo dos 15 dias de cultivo, sugerindo um equilíbrio do sistema, e a não interferência de fatores externos. O cultivo (autotrófico) favoreceu a utilização total dos nutrientes do meio. A densidade condutividade elétrica do cultivo no momento da colheita (1001 e 956  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e o pH (7,0 e 7,1) mostrou-se em valores comuns a cultivos com altas densidade de microalgas ( $902 \times 10^6$  e  $867 \times 10^6$  para *C. vulgaris* e *D. subspicatus*) respectivamente.

Os agentes coagulantes que melhor promoveram a floculação/decantação da biomassa em estudo, foram a mistura de sulfato de alumínio + cloreto férrico, e a solução de hidroxicarbonato de cálcio. Essas soluções obtiveram melhores resultados quanto ao tempo de decantação, e não promoveram o aumento do pH do cultivo para ambas as espécies. No entanto, o não uso de agentes coagulantes, também é capaz de promover a decantação significativa da biomassa, que por gravidade pode ser removida do meio de cultivo, especialmente para a espécie *Chlorella vulgaris*, o que é atribuído ao fato de a espécie possuir menor volume celular. No entanto a recuperação da biomassa ocorre num intervalo de tempo superior. A figura 1 abaixo, apresenta as concentrações de sólidos suspensos no meio de cultivo – sobrenadante, usados para cultivo de *C. vulgaris* e *D. subspicatus* após a decantação da biomassa, indicando a taxa de recuperação da mesma após a aplicação de cada um dos coagulantes.



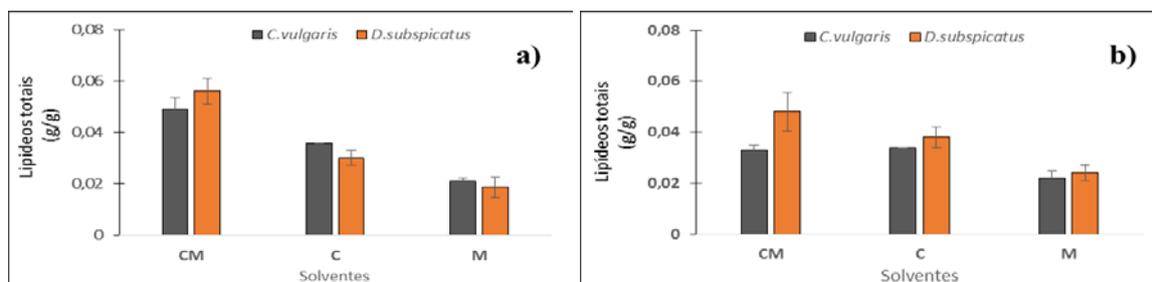
**Figura 1- Concentração de sólidos suspensos totais no meio de cultivo (esgoto doméstico) após aplicação dos coagulantes (1M) e ao início da decantação natural, obtidos após 120 minutos.**

Nota-se que a menor quantidade de sólidos foi observada no sobrenadante referente ao cultivo de *Desmodesmus subspicatus* após 120 minutos, onde utilizou-se o a mistura de sulfato de alumínio + cloreto férrico (1M), indicando que a recuperação da biomassa com uso deste agente coagulante foi a mais satisfatória. No entanto, após 10 minutos da adição do coagulante já pôde-se notar o clareamento diferenciado do sobrenadante em relação aos demais reagentes testados. Vale salientar que a recuperação da biomassa de ambas as espécies mostrou-se satisfatória, sem o uso de coagulantes, porém um real clareamento

só foi observado após 120 minutos de teste. Após a colheita, a secagem foi realizada ao sol e a biomassa seca foi armazenada em potes de vidro a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizado os testes de recuperação lipídica, fazendo uso da biomassa colhida com uso da mistura de coagulantes que se destacou nos testes de floculação.

### Recuperação lipídica (testes de extração)

O rendimento de óleo mostrou-se mais satisfatória na extração assistida pelo equipamento *Sohxlet*, fazendo uso da mistura clorofórmio metanol 2:1 (CM), principalmente para a espécie *Desmodesmus subspicatus*, que apresentou um rendimento médio de óleo de 0,053 g/g, conforme ilustra o a Figura 2 abaixo.



**Figura 2- Rendimento lipídico médio observado com uso do equipamento Sohxlet (a) e ultra-som (b) para as espécies *D.subspicatus* e *C.vulgaris* com uso de clorofórmio, metanol, e a mistura clorofórmio e metanol (2:1).**

A extração assistida pelo uso do *Sohxlet*, consegue ser mais eficiente para este fim, provavelmente pelo fato de o solvente promover uma lavagem contínua sobre a amostra, e assim removendo o óleo extraído continuamente, e agregando-o ao solvente, diferentemente do uso do ultrassom, que apesar de auxiliar o rompimento da parede celular algal com a emissão das ondas ultrassônicas, mantém o solvente estático em contato com a amostra, sendo apenas removido com auxílio de filtração. O rendimento lipídico da espécie *Desmodesmus subspicatus* mostrou-se mais satisfatória pelo fato dessa espécie ter uma natural capacidade para promover uma maior acumulação lipídica do que a *Chlorella vulgaris* (BAHADAR, 2013; DERMIBAS, 2011). A natureza apolar dos solventes utilizados, facilita o processo de ruptura de paredes celulares vegetais, pela ausência, ou baixa ocorrência de regiões eletricamente densas. Sendo assim, a mistura de dois solventes dessa natureza, pôde promover a ruptura e o acesso do óleo intracelular ao meio externo.

### CONCLUSÕES

- Pode-se concluir que o uso da mistura de coagulantes sulfato de alumínio e cloreto férrico a uma proporção 1:1, foi a que melhor promoveu a colheita da biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, tanto no quesito tempo de decantação, como na recuperação da biomassa do meio de cultivo utilizado (esgoto doméstico bruto previamente decantado).
- O não uso de agentes coagulantes, é capaz de promover uma colheita satisfatória de biomassa quando se utiliza esgoto bruto como meio de cultivo para as espécies *C. vulgaris* e *D. subspicatus*, porém em um tempo de 6 a 7 vezes superior ao uso de agentes coagulantes.
- O uso do equipamento *Sohxlet*, sob ação da mistura de solventes clorofórmio e metanol 2:1, em ciclos de extração de 8h, foi a que melhor promoveu a recuperação de lipídeos intracelular da biomassa das espécies *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus subspicatus*, devido a ação física do solvente em contínuas lavagem, e a natureza dos solventes utilizados.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização das pesquisas neste tema aos pesquisadores do LSA-UFPE (projeto PRONEX/NUTREL); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas. À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio ao projeto Rede Nacional de Tratamento de Esgotos Descentralizados (RENTED). À Companhia

de Saneamento de Pernambuco (COMPESA) e BRK Ambiental pelo suporte aos trabalhos experimentais e coleta de amostras nas estações de tratamento de esgotos de Rio Formoso e Mangueira Recife. À Fibra Revestimentos, pela cessão e suporte na operação de reatores piloto e filtros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA-AWWA-WPCF Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA, Washington, 1691 p. 2012.
2. BAHADAR, A., & BILAL KHAN, M. Progress in energy from microalgae: A review. *Renew Sust Energ Rev.* 27:128–148. 2013.
3. DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Appl Energ.* 88 (10), 3541–3547. 2011.
4. BAHADAR, A., & BILAL KHAN, M. (2013). Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 27:128–148.
5. CHISTI, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances.* 25 (3), 294–306.
6. CRUZ, R.S.; FRANCO, A. L. C.; LOBO, I. P. 2013. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova.* 36 (3), 437-448.
7. DEMIRBAS, A. (2011). Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Applied Energy.* 88 (10), 3541–3547.
8. FILHO, N.R.A.; MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B. 2013. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria prima graxa para a produção de biodiesel. *Química Nova.* 36 (1), 10-15.
9. MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14 (1), 217–232.