



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA NO CULTIVO DE *Chlorella* sp.

DÉBORA JAMILA NÓBREGA DE MELO

**ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LÍBIA DE SOUSA CONRADO
OLIVEIRA**

**CAMPINA GRANDE
SETEMBRO DE 2015**

DÉBORA JAMILA NÓBREGA DE MELO

UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA NO CULTIVO DE *Chlorella* sp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Recursos Regionais e Meio Ambiente

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Líbia de Sousa Conrado Oliveira

CAMPINA GRANDE

SETEMBRO 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

M528u Melo, Débora Jamila Nóbrega de.
Utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella* sp. / Débora Jamila Nóbrega de Melo. – Campina Grande, 2015.
81 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro Ciências e Tecnologia, 2015.

"Orientação: Prof^a. Dr^a. Líbia de Sousa Conrado Oliveira".
Referências.

1. Bicombustíveis - Resíduos. 2. Microalgas. 3. Vinhaça.
4. *Chlorella* sp. I. Oliveira Líbia de Sousa Conrado. II. Título.

CDU 662.7(043)

DÉBORA JAMILA NÓBREGA DE MELO

UTILIZAÇÃO DE VINHAÇA NO CULTIVO DE *Chlorella* sp.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Orientador(a)

Prof. Dr. Luis Gonzaga Sales Vasconcelos
Examinador Interno

Prof^ª. Dr^ª. Weruska Brasileiro Ferreira
Examinador Externo

Prof^ª. Dr^ª. Sharline Florentino de Melo
Examinador Externo

CAMPINA GRANDE,
SETEMBRO DE 2015

*"Sem cooperação não poderia existir o amor; e o amor
é a força de Deus, que equilibra o universo."*

Emmanuel (Livro Paulo e Estevão)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de amor e misericórdia, pelo dom da vida e por guiar e iluminar meus passos sempre nos caminhos do bem e da felicidade.

Aos meus pais, Anita e France, por todo amor, carinho e dedicação que me ofertam nessa longa caminhada da vida.

Às minhas avós, Maria e Nevinha, por todas as orações nos momentos de angústia e felicidade.

Ao meu irmão e minha cunhada, Danilo e Faguinha, por me trazerem um anjo do céu, Maria Regina, fazendo meu coração transbordar de tanto amor.

Às minhas primas, em especial, Flavinha, Thalita e Vanessa, por estarem presentes em minha vida sempre me aconselhando e apoiando a cada degrau e obstáculo a ser vencido.

À Renata e tia Francisca, por me receberem com tanto carinho em seu lar.

Às professoras, Líbia e Weruska, por todos os ensinamentos, orientações, dedicação, paciência e principalmente por tê-las como amigas.

Aos amigos da UEPB que tanto me ajudaram e ensinaram, em especial, Olga, Yohanna, Ianna, Tássio e Thiago, obrigada por estarem comigo em todas as manhãs, tardes e madrugadas de trabalho.

Agradeço aos meus chefes, Sharline, Flávio e Vital, por todos os ensinamentos, pela amizade e por serem tão compreensivos quando precisei me ausentar do trabalho para execução de diversas atividades do mestrado.

Agradeço aos amigos da UFCG e UFPB, Lorena, Josy, Nagel, Sófacles, Rafael, Marcelo, Paulo, Josevan, Ângela, Taliana, Edilza, Maniza, Thiago Baracho e Clebson, por sempre estarem dispostos a me ajudar e por fazerem meus dias de trabalho sempre mais alegres.

Aos Laboratórios de Saneamento Ambiental, na UEPB, de Engenharia Bioquímica, na UFCG, e de Bioengenharia, na UFPB, por toda infra-estrutura que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Fermento-Destilados e ao Engenho Triunfo, por fornecerem vinhaça para as diversas atividades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a conclusão desta pesquisa.

A todos, que de forma direta ou indireta contribuíram com a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

Diante da futura escassez dos recursos energéticos originados do petróleo e seus derivados, aliados aos impactos ambientais causados pelo consumo desenfreado de recursos naturais, faz-se necessário a busca por produção de energias alternativas e limpas. Nesse ínterim, surgem as microalgas como potenciais de produção de biocombustíveis, por sua elevada taxa de crescimento e capacidade produtiva de lipídios e carboidratos. Porém, o alto custo de manutenção ainda inviabiliza sua produção. Dessa forma, esse trabalho busca aumentar a produção de microalgas utilizando a vinhaça, um resíduo da indústria sucroalcooleira altamente nutritivo e poluidor, e reutilizando resíduos do próprio cultivo como suplementação nutricional ao meio de cultura. A microalga *Chlorella* sp. foi cultivada em meio *Bold's Basal Medium* (BBM) modificado, suplementado com de 5, 10 e 15% de vinhaça e resíduos de cultivos com diferentes concentrações, reutilizados por até três vezes. O sistema de cultivo adotado foi o mixotrófico. Foram calculadas as velocidades específicas de crescimento máximas e os tempos de geração dos cultivos suplementados com vinhaça e resíduos de cultivos. Calcularam-se as remoções de Demanda Química de oxigênios dos cultivos suplementados com vinhaça. Foram quantificados os teores de açúcares redutores e lipídios das biomassas cultivadas com 10% de vinhaça e sem suplementação. Foi verificado que os cultivos suplementados com 5 e 10% de vinhaça apresentaram maior densidade celular que o cultivo sem suplementação. As taxas de crescimento máximas e os tempos de geração dos cultivos com 5 e 10% de vinhaça foram muito próximas, diferente do cultivo suplementado com 15% de vinhaça que apresentou inibição no crescimento. As remoções de DQO foram elevadas e em média 85%. A utilização dos resíduos de cultivos favoreceu o crescimento das microalgas, apresentando melhores resultados os cultivos suplementados com resíduos de segunda reutilização, em especial os cultivos suplementados com resíduos originados de um cultivo com adição de vinhaça. A biomassa da *Chlorella* sp. cultivada com suplementação de 10% de vinhaça apresentou 11,50% de lipídios, 0,33% de açúcares redutores. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para uma melhor caracterização da biomassa para verificar a influência da suplementação do meio com vinhaça na produção de proteínas e carboidratos totais.

Palavras-chaves: Microalgas, *Chlorella* sp., vinhaça, resíduos, biocombustíveis.

ABSTRACT

In the face of future scarcity of energy resources derived from oil and its derivatives, coupled with the environmental impacts caused by rampant consumption of natural resources, it is necessary to search for a renewable and clean energy. In the meantime, there are microalgae with potential of biofuel production due to its high growth rate and productivity capacity of lipids and carbohydrates. However, the high cost of maintenance still prevents its manufacture. In this way, the present work aims to increase the production of microalgae using vinasse which is a residue of highly nutritious sugarcane industry and a polluter, and reusing waste from the own cultivation as a nutritional supplement to the culture medium. The microalgae *Chlorella* sp. was grown in a modified Bold's Basal Medium (BBM), supplemented with 5, 10 and 15% of vinasse and residues of cultivations with different concentrations in what they were reused at maximum of three times. The adopted cultivation system was the mixotrophic. Calculations were made to obtain the specific maximum speed of growth and the generation times of cultivations supplemented with vinasse and cultivation waste. Also, it was calculated the removals of Chemical Oxygen Demand (COD) of cultivations supplemented with vinasse. For the next step, it was quantified the reducing sugars and lipids of biomass cultivated with 10% of vinasse and without supplementation. It was verified that the cultivation supplemented with 5 and 10% of vinasse showed higher cell density than the unsupplemented cultivation. The maximum growth rates and generation times of cultivations with 5 and 10% of vinasse were very close whereas cultivation supplemented with 15% of vinasse showed growth inhibition. The removals of COD were high and averaged at 85%. The use of cultivation residue has favored the microalgae growth, presenting best results for the cultures supplemented with second reuse waste, in particular cultures supplemented with residues derived from a culture with addition of vinasse. The biomass of cultivated *Chlorella* sp. with supplementation of 10% of vinasse showed 11.50% lipids, 0.33% of reducing sugars. Further studies should be performed to better characterize the biomass to check the influence of the medium supplementation with vinasse in the production of proteins and total carbohydrates.

Keywords: Microalgae, *Chlorella* sp., vinasse, waste, biofuels.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual do consumo de energia no Brasil em 2012	18
Figura 2- Percentual de participação na Matriz Energética.....	18
Figura 3 - Emissões de CO ₂ per capita no ano de 2010	19
Figura 4-Emissões totais em MtCO ₂ em 2012	20
Figura 5 – Tanque circular para cultivo de microalgas	26
Figura 6 - Tanques <i>raceway</i> e lagoas agitadas	27
Figura 7 - Fotobiorreator tubular	27
Figura 8 - Curva de crescimento microbiano representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B).	32
Figura 9 - Fotografia da <i>Chlorella sp.</i> vista através de microscópio com aumento de 400x.....	40
Figura 10 - Fluxograma da sequência de procedimentos experimentais da Etapa 1	43
Figura 11 - Experimentos com diferentes concentrações de vinhaça.....	44
Figura 12 - Cultivos de <i>Chlorella sp.</i> em diferentes fases de crescimento	45
Figura 13 - Fluxograma da sequência dos procedimentos experimentais da Etapa 2	48
Figura 14 - Organograma para identificação das origens dos resíduos.....	50
Figura 15 - Fluxograma da seqüência dos procedimentos experimentais da Etapa 3	52
Figura 16 - Fotobiorreatores dos cultivos “A” e “B” (cultivo “A” à esquerda e “B” à direita).....	53
Figura 17 - Microalga concentrada (à esquerda), biomassa seca (à direita).....	54
Figura 18 - Pesagem e sonicação da biomassa	55
Figura 19 - Filtração, separação das fases e evaporação do solvente.....	56
Figura 20 - Curvas de crescimento da <i>Chlorella sp.</i> em meio de cultivo sem adição de vinhaça (E0), com adição de 5% (E1), 10% (E2) e 15%(E3) de vinhaça.....	60
Figura 21 - Remoção da DQO dos meios de cultivos suplementados com vinhaça	63
Figura 22 - Curvas de crescimento da <i>Chlorella sp.</i> em meios de cultivos suplementados com resíduos de 1ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo).....	65

Figura 23 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de 2ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo)..... 68

Figura 24 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de 3ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo)..... 70

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Oferta interna de energia	17
Tabela 2 - Porcentagem lipídica de algumas microalgas	24
Tabela 3 - Comparativo entre sistemas de cultivos abertos e fechados.....	28
Tabela 4 - Valores mínimos, médios e máximos do pH, temperatura, nutrientes e de outros componentes encontrados na vinhaça.....	35
Tabela 5 - Composição do meio de cultivo <i>Bold's Basal Medium</i> modificado.....	41
Tabela 6 - Concentração de resíduo nos diversos meios de cultivos.....	51
Tabela 7 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempos de geração (t_g) da <i>Chlorella</i> sp. nos cultivos suplementados com vinhaça	61
Tabela 8 - Remoção da DQO de cultivos com suplementação de vinhaça	63
Tabela 9 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempos de geração (t_g) da <i>Chlorella</i> sp. nos cultivos suplementados com resíduos (1 ^a reutilização).....	66
Tabela 10 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempos de geração (t_g) da <i>Chlorella</i> sp. nos cultivos suplementados com resíduos (2 ^a reutilização).....	69
Tabela 11 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempos de geração (t_g) da <i>Chlorella</i> sp. nos cultivos suplementados com resíduos (3 ^a reutilização).....	71
Tabela 12 - Teores de lipídios totais nas biomassas	72
Tabela 13 - Teor de sólidos solúveis nas biomassas	73
Tabela 14 - Teor de açúcares redutores nas biomassas	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE ENERGIA NO BRASIL.....	17
3.2 BIOCOMBUSTÍVEIS.....	20
3.3 MICROALGAS.....	22
3.3.1 <i>Chlorella</i> sp.	22
3.4 MICROALGAS COMO FONTE DE BIOCOMBUSTÍVEIS	23
3.5 CULTIVOS DE MICROALGAS.....	25
3.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS	29
3.7 MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR	30
3.8 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS	31
3.9 VINHAÇA.....	34
3.10 ESTADO DA ARTE	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 A MICROALGA <i>Chlorella</i> sp.	40
4.2 O MEIO DE CULTIVO	40
4.3 A VINHAÇA.....	41
4.3.1 Tratamento da vinhaça.....	42
4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	42
4.4.1 Etapa 1 – Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com vinhaça.....	43
4.4.1.1 Preparação dos Cultivos de <i>Chlorella</i> sp.....	43

4.4.1.2 Acimaatãõ dos Cultivos de <i>Chlorella</i> sp.	44
4.4.1.3 Determinaãõ dos parâmetros cinéticos	45
4.4.1.4 Análise de remoãõ da Demanda Química de Oxigênio - DQO.....	46
4.4.2 Etapa 2 – Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com resíduo de cultivo.....	47
4.4.2.1 Preparaãõ dos Cultivos de <i>Chlorella</i> sp suplementados com resíduos.....	49
4.4.2.2 Determinaãõ dos parâmetros cinéticos dos cultivos	51
4.4.3 Etapa 3 – Quantificaãõ dos teores de lipídios e açúcares redutores das biomassas.....	52
4.4.3.1 Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. para produãõ de biomassa	53
4.4.3.2 Determinaãõ de lipídios totais	54
4.4.3.3 Quantificaãõ de sólidos solúveis totais - SST.....	56
4.4.3.4 Quantificaãõ de açúcares redutores– AR.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1 ETAPA 1 – CULTIVO DE <i>Chlorella</i> sp. EM MEIO SUPLEMENTADO COM VINHAÇA.....	59
5.1.1 Cinética de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com vinhaça.....	59
5.2 ETAPA 2 – CULTIVO DE <i>Chlorella</i> sp. EM MEIO SUPLEMENTADO COM RESÍDUO.....	64
5.2.1 Cinética de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com resíduos (1ª reutilizaãõ)	64
5.2.2 Cinética de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com resíduos (2ª reutilizaãõ)	67
5.2.3 Cinética de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em meio suplementado com resíduos (3ª reutilizaãõ)	70
5.3 ETAPA 3 – QUANTIFICAãõ DOS TEORES DE LIPÍDIOS E AÇÚCARES REDUTORES DAS BIOMASSAS.....	71
5.3.1 Teores de lipídios totais contidos nas biomassas.....	71
5.3.2 Teores de sólidos solúveis	72
5.3.3 Teores de açúcares redutores	73
6. CONCLUSãõ	75

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	76
----------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos que produzem glicose para sua nutrição por meio de reações entre dióxidos de carbono, água e luz solar, são denominados microalgas. Estes microrganismos multiplicam sua biomassa em baixos períodos de tempo (BRENNAM; OWENDE, 2010) e produzem substâncias que podem ser extraídas e convertidas em produtos com maior valor agregado como: carboidratos, lipídios, proteínas, bicomcombustíveis, corantes, enzimas, antibióticos e vitaminas (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

As microalgas são compostas por organismos procarióticos, como as cianobactérias, e eucarióticos, como as algas verdes unicelulares. Essa diversidade de espécies englobadas no grupo de microalgas demonstra que não existe qualquer tipo de classificação quanto às semelhanças das espécies, tal a taxonomia (BONINI, 2012).

A mais antiga forma de utilização das microalgas que se tem notícia é para alimentação humana. Uma espécie de biscoito era produzida por povos nativos da região sub-Saariana na África, e no México durante o período pré-colombiano (CIFERRI; TIBONI, 1985). A produção de microalgas com a finalidade de uso comercial iniciou na década de 60 com a produção de suplementos dietéticos a partir da *Chlorella* e *Spirulina*, de bioprodutos como o β -caroteno e a astaxantina da *Dunaliella salina* e do *Haematococcus pluvialis*, respectivamente, e de outras espécies para alimentação de bivalves na aquicultura. Também na década de 60, foi estudada a utilização das microalgas em programas espaciais como fonte de alimentos e para renovação do ar (BENEMAN, 1990 apud BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008, p.10).

Atualmente com a crescente preocupação do homem quanto à futura escassez dos recursos energéticos originados do petróleo e seus derivados aliado aos impactos ambientais causados devido ao consumo desenfreado de recursos naturais faz-se necessário a busca por produção de energias alternativas e limpas. Nesse ínterim, surgem as microalgas como potenciais de produção de biocombustíveis devido sua capacidade de armazenamento de lipídios e carboidratos, bem como, a alta taxa de crescimento (RAHEEM et. al, 2015).

Quanto à produção de biocombustíveis, os cultivos de microalgas são mais produtivos que as culturas oleaginosas, não necessitam de terras agricultáveis, não disputando assim com as culturas de alimentos, e consomem menos água que as demais culturas agrícolas.

Entretanto, apesar de todas essas vantagens em relação às outras matérias - primas o alto custo de manutenção ainda inviabiliza a sua produção (CHISTI, 2007).

O Brasil se destaca como referência em produção de energia alternativa, de acordo com os dados da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) produziu no ano de 2013 27,8 milhões de m³ de bioetanol, e para cada litro de bioetanol produzido gerou em média dez litros de vinhaça (BRASIL, 2014; BRASIL, 2009). A vinhaça é um resíduo nutritivo muito utilizado para irrigação de lavouras, mas por ser altamente tóxico o seu excesso pode causar acidez de solos, lixiviação de corpos d'água e eutrofização de rios e lagoas, causando assim um desequilíbrio ambiental na fauna e flora.

Estudos mostram que as microalgas quando são cultivadas em meio mixotrófico, isto é, quando possuem uma fonte de carbono orgânica inserida em seu meio de cultivo sintético induzindo a heterotrofia, possuem uma maior taxa de crescimento que as microalgas cultivadas em meio exclusivamente autotrófico e que a diversidade de substratos produzem biomassas com diferentes composições. Essa capacidade de absorção de nutrientes simples e complexos possibilita a utilização das microalgas no tratamento de efluentes domésticos e industriais diminuindo a carga orgânica e removendo os metais pesados do meio (ANDRADE; COSTA, 2008).

Diante da necessidade de aumentar a produção de microalgas e empregar a grande quantidade de vinhaça gerada pelas usinas, esse trabalho tem por objetivo estudar o efeito causado pela introdução da vinhaça e de resíduos de cultivo como suplementação ao meio de cultura, para aumentar a produção da microalga e diminuir os possíveis efeitos ambientais causados pela má disposição dos efluentes.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a influência da vinhaça como suplementação nutricional no cultivo da microalga *Chlorella* sp. avaliando parâmetros de crescimento, composição da biomassa microalgal e diminuição de carga orgânica do substrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular a taxa de crescimento e o tempo de geração da *Chlorella* sp. em meio de cultivo semi-sintético suplementado com diferentes proporções de vinhaça;
- Avaliar a reutilização dos resíduos de cultivo como suplementação nutricional da *Chlorella* sp. por meio da taxa de crescimento e do tempo de geração da microalga em diferentes cultivos;
- Quantificar a remoção de demanda química de oxigênio, DQO, dos meios de cultivos suplementados com diferentes proporções de vinhaça;
- Verificar os teores de lipídios e açúcares redutores das biomassas obtidas no cultivo de *Chlorella* sp. cultivadas em meio semi-sintético sem adição de vinhaça e com adição de 10% de vinhaça;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO E CONSUMO DE ENERGIA NO BRASIL

De acordo com os dados do Balanço Energético Nacional (BEN) do Ministério de Minas e Energia, apresentados na Tabela 1, a oferta interna de energia em 2012 (total de energia demandada no país) atingiu 283,6 Mtep (milhões de toneladas equivalentes de petróleo), dos quais, 120,2 Mtep correspondem à oferta por meio de fontes renováveis e 163,4 Mtep por meio de fontes não-renováveis.

Tabela 1 - Oferta interna de energia

Fonte	Em Mtep	
	2012	2011
RENOVÁVEIS	120,2	119,8
Energia hidráulica e eletricidade	39,2	39,9
Biomassa de cana	43,6	42,8
Lenha e carvão vegetal	25,7	26,0
Outras renováveis	11,8	11,1
NÃO RENOVÁVEIS	163,4	152,5
Petróleo	111,2	105,2
Gás natural	32,6	27,7
Carvão mineral	15,3	15,5
Urânio (U ₃ O ₈)	4,3	4,2

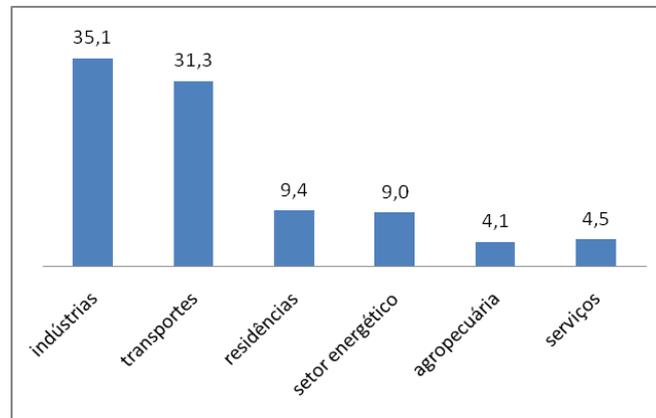
Fonte – (Adaptado de BRASIL, 2013)

O petróleo e seus derivados representaram no ano de 2012 39,2% de toda a oferta de energia, em seguida, teve-se a biomassa da cana como maior representante das fontes renováveis com 15,4% de toda produção de energia.

O consumo de energia nacional durante o ano de 2012 foi de 253,4 Mtep, um aumento de 3,1% referente ao ano anterior (BRASIL, 2013) causado pelo aumento da frota de transportes de cargas e de veículos leves. A Figura 1 apresenta o percentual de consumo de

energia de cada setor, e segunda ela, os maiores consumidores de energia foram os setores da indústria e dos transportes com 35,1% e 31,3%, respectivamente.

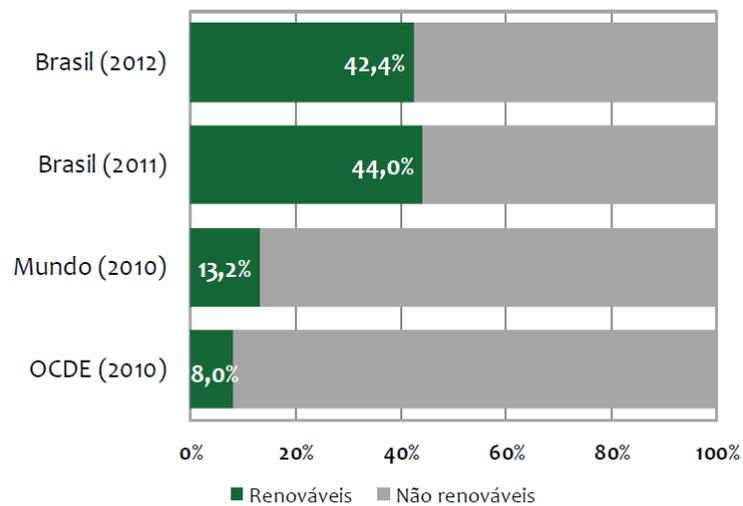
Figura 1 - Percentual do consumo de energia no Brasil em 2012



Fonte – (Adaptado de BRASIL, 2013)

A Figura 2 apresenta o percentual de produção de energias renováveis e não-renováveis na matriz energética brasileira, no mundo e no grupo de países que compõe a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, OCDE.

Figura 2- Percentual de participação na Matriz Energética

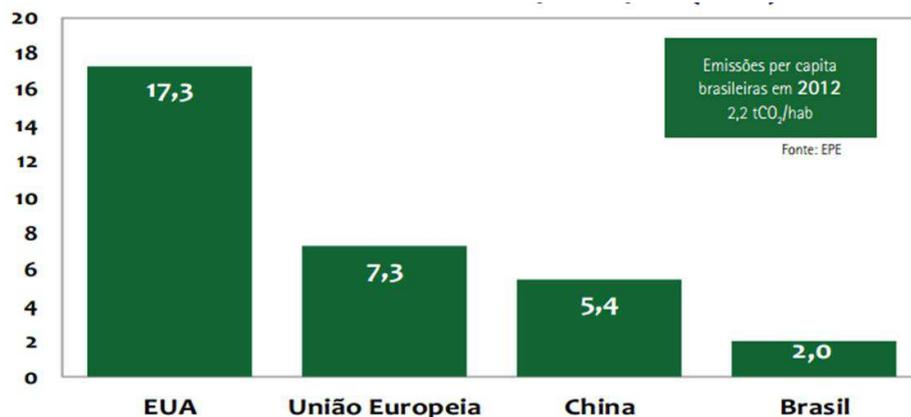


Fonte – BRASIL (2013).

Observa-se, na Figura 2, que em 2012 a participação de renováveis na Matriz Energética Brasileira manteve-se entre as mais elevadas do mundo, com um percentual de 42,4%, com pequena redução em relação ao ano anterior devido à menor oferta de energia hidráulica e de etanol. Referente à mesma pesquisa o Mundo apresentou uma participação na Matriz Energética de 13,2%.

O alto consumo de energia reflete diretamente na produção de CO₂, um gás responsável pelo agravamento do efeito estufa, e conseqüente aumento na temperatura global. Sabe-se que combustíveis produzidos por fontes renováveis produzem menos gases nocivos ao meio ambiente quando comparados com combustíveis fósseis. As emissões de CO₂ medidas em toneladas por número de habitantes produzidas em 2010 pelos Estados Unidos, pela União Européia, pela China e pelo Brasil estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Emissões de CO₂ per capita no ano de 2010

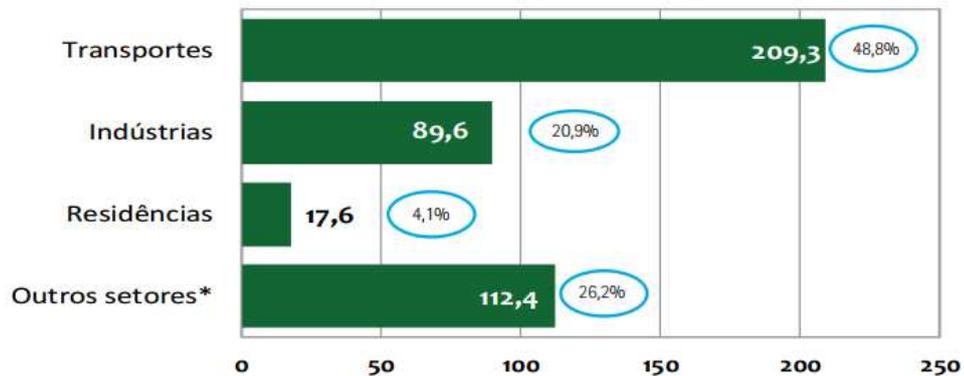


Fonte – BRASIL (2013).

Segundo a Figura 3, em 2010 as emissões brasileiras foram de 2,2 tCO₂/hab, enquanto os EUA emitiram 17,3 tCO₂/hab e a União Européia 7,3 tCO₂/hab, essa diferença substancial entre as emissões nacionais e os outros países se deve à grande participação de energias renováveis na matriz energética.

Segundo o BEN, do Ministério de Minas e Energia as emissões antrópicas associadas à matriz energética brasileira atingiram 429,0MtCO₂.eq (BRASIL,2013) e os setores que mais foram responsáveis por essas emissões estão distribuídos na Figura 4.

Figura 4-Emissões totais em MtCO₂ em 2012



*Inclui os setores agropecuário, serviços, energético, elétrico e as emissões fugitivas.

Fonte – BRASIL (2013).

Segundo a Figura 4 o setor de transportes foi o que mais emitiu CO₂ com 209,3 milhões de toneladas sendo responsável por 48,8%, seguido pela indústria com 89,6 milhões de toneladas de CO₂, responsável por 20,9% de toda emissão nacional no ano de 2012.

Esses dados apresentados revelam a importância de se aumentar a produção e o consumo de combustíveis renováveis de tecnologia limpa, surgindo assim as microalgas como potencial para atender esse mercado que visa a necessidade dos transportes de carga com a produção do biodiesel e os transportes de passeio com a produção de bioetanol.

3.2 BIOCMBUSTÍVEIS

A biomassa é considerada uma matéria-prima atrativa por ser um recurso renovável que pode ser desenvolvido de forma sustentável no futuro, produzir baixos teores de enxofre, não produzir liberação líquida de dióxido de carbono, visto que o CO₂ é absorvido e incorporado na biomassa durante seu crescimento e por ter grande potencial econômico caso o preço dos combustíveis fósseis venha a aumentar no futuro (BALAT; BALAT, 2009).

De acordo a Lei nº 12.490, de 16/9/2011 os biocombustíveis são substâncias derivadas de biomassa renovável, tal como biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), que pode ser empregada diretamente ou mediante alterações em motores a combustão interna ou

para outro tipo de geração de energia, podendo substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2014).

Os biocombustíveis são classificados de acordo com a biomassa empregada sua em produção. As biomassas ricas em sacarose como a cana-de-açúcar e a betarraba, em amido como o milho, e em óleos vegetais como a semente de girassol e mamona, originam o biocombustíveis de primeira geração. As biomassas ricas em açúcares e amido são convertidas em bioetanol por meio da fermentação de microrganismo e as biomassas ricas em óleos são convertidas em biodiesel através de processos de transesterificação (PAULO, 2011).

Biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir da bioconversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis. Diferente da produção do bioetanol de primeira geração, nesse há uma etapa de pré-tratamento que irá desagrupar a lignina da celulose, e essa por hidrólise ácida ou enzimática irá ser rompida em cadeias menores de carboidrato para possibilitar a fermentação. A produção de biocombustíveis de segunda geração visa ampliar a capacidade de produção das usinas sem a necessidade de aumentar a área e plantio (LIMA et al., 2015).

A terceira geração dos biocombustíveis se caracteriza pelo uso da biomassa microalgal. Estas podem ser utilizadas na produção de bioetanol, biodiesel, biogás e biohidrogênio. Segundo Cristi (2007) as microalgas são a única fonte de biomassa capaz de atender a demanda existente de biodiesel para o transporte, pois a produção de óleo de microalga excede a produtividade das culturas oleaginosas mais produtoras (PEÑARANDA; ROLDÁN; VILLANUEVA, 2013; SOUZA et al., 2012; BRENNAM; OWENDE, 2010).

De acordo com a ANP a produção de biocombustíveis no Brasil está localizada em maior escala nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, sendo a região Sudeste maior produtora de bioetanol e a região Centro-Oeste a maior produtora de biodiesel. A biomassa utilizada na produção de bioetanol é a cana-de-açúcar e as matérias-primas mais utilizadas na produção de biodiesel são o óleo de soja, a gordura animal e o óleo de algodão. Em 2013 a produção de bioetanol foi de 27,8 milhões de m³, um aumento de 18,1% se relacionada ao ano anterior e de 2,9 milhões de m³ de biodiesel (B100) 7,4% maior que a produção de 2012, mas ainda assim inferior a capacidade nominal de produção que é de 8 milhões de m³ (BRASIL, 2014).

3.3 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos de hábitat aquático, podendo ser de água doce ou marinha. Na natureza são grandes responsáveis pelo balanço global da fotossíntese, e no mar representam a base da cadeia alimentar como produtores primários, sendo assim fundamentais no equilíbrio dos ecossistemas costeiros e oceânicos (LOURENÇO, 2006). São microrganismos muito diversificados, mas como características gerais são unicelulares, alguns são formadores de colônias, geralmente são fotoautotórficos e por apresentarem pigmentos fotossintetizantes são coloridos (OLAIZOLA, 2003).

Dentre os organismos fotossintetizantes elas possuem o mais rápido crescimento celular, e para produzir uma tonelada de biomassa microalgal consomem cerca de duas toneladas de CO₂ (MALLICK et al., 2012).

Por serem microrganismos muito heterogêneos possuem uma composição bioquímica bastante diversificada para cada espécie. A composição celular também é afetada por fatores ambientais como luz e temperatura e pela forma que são cultivadas (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011).

A tecnologia de microalgas é altamente promissora devido à diversidade de aplicações da biomassa em áreas relevantes, tais como: alimentação humana pela ingestão de produtos nutracêuticos (BELAY et al., 1993); nutrição animal através da fabricação de rações para aquicultura (JAMALI; AHMADIFARD; ABDOLLAHI, 2015), produção de bioetanol, biodiesel (CHISTI, 2007; CHEN et al., 2011, SCHENK, et al., 2008), biogás (MUSSGNUMG et al., 2010) e biohidrogênio (BRENNAN; OWENDE, 2010), tratamento de efluentes domésticos e industriais (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012), produção de pigmentos (VALDUGA et al., 2009) e fertilizantes, entre outros.

3.3.1 *Chlorella* sp.

As microalgas do Gênero *Chlorella* pertencem ao Domínio *Eukaryota*, Reino *Plantae*, Subreino *Viridiplantae*, Filo *Chlorophyta*, Sub-filo *Chlorophytina*, Classe *Trebouxiophyceae*, Ordem *Chlorellales* e Família das *Chlorellaceae* (GUIRY, 2015).

Podem ser encontradas em diversos habitats, como lagos, valas de terras úmidas, oceanos e mares. Quando secas apresentam em média 20% de óleo, 45% de proteínas, 20% de carboidratos e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011).

São fotossintetizantes e apresentam características semelhantes às plantas superiores: clorofila a e b, pigmentos, amido como carboidrato de reserva e parede celular rígida (WEIER et al., 1982; RAVEN; EVERT; EITCHHORN, 1992).

3.4 MICROALGAS COMO FONTE DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Diante do aumento da temperatura global, em virtude das altas emissões de gases de efeito estufa, vê-se como uma alternativa mitigadora para redução nas emissões de dióxido de carbono um maior desenvolvimento de combustíveis biológicos, uma vez que os mesmos não inserem mais carbonos nos ecossistemas, pois utilizam os carbonos presentes na biosfera, diferente dos combustíveis fósseis que além de serem mais poluentes inserem na atmosfera frações de carbono que não estavam presente nos ecossistemas superficiais (LOURENÇO, 2006).

As microalgas surgem como uma alternativa promissora na produção de biocombustíveis. Sua composição rica em carboidratos, lipídios e proteínas fornece matéria-prima para produção de diversos combustíveis como: biodeisel, bioetanol, biogás e biohidrogênio. A seleção da espécie utilizada no cultivo é fator decisivo para uma maior produção da substância desejada.

A Tabela 2 apresenta algumas espécies de microalgas produtoras de lipídeos e suas respectivas quantidades em massa seca.

Tabela 2 - Porcentagem lipídica de algumas microalgas

Microalga	Conteúdo de óleo (% massa seca)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 – 75
<i>Chlorella</i> sp.	28 – 32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16 – 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochysis</i> sp.	25 – 33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20 – 35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31 – 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 – 54
<i>Nitzschia</i> sp.	45 – 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 – 30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50 – 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 – 23

Fonte: CHISTI (2007)

As vantagens do uso de microalgas como matéria-prima para produção de biocombustíveis em relação às plantas superiores são descritas por Ferreira (2012), tais como:

- As microalgas apresentam elevadas taxas de crescimento, podendo sofrer de 1 a 3 duplicações por dia. Produzem em média 20-50% de lipídios que são armazenados em suas células;
- O rendimento na produção de óleo por área utilizada é maior no cultivo de microalgas do que no plantio das oleaginosas mais produtivas;
- O cultivo de microalgas não compromete a produção agrícola convencional, pois não necessita de terras aráveis e pode utilizar água salobra, salgada e salgada costeira;

- As microalgas podem utilizar diversas fontes de águas residuais como substrato para captarem nitrogênio e fósforo necessários a sua nutrição, proporcionando o benefício da biorremediação a esses efluentes;
- O cultivo das microalgas não necessita de herbicidas nem de pesticidas para produzir diversos compostos com alto valor agregados;

3.5 CULTIVOS DE MICROALGAS

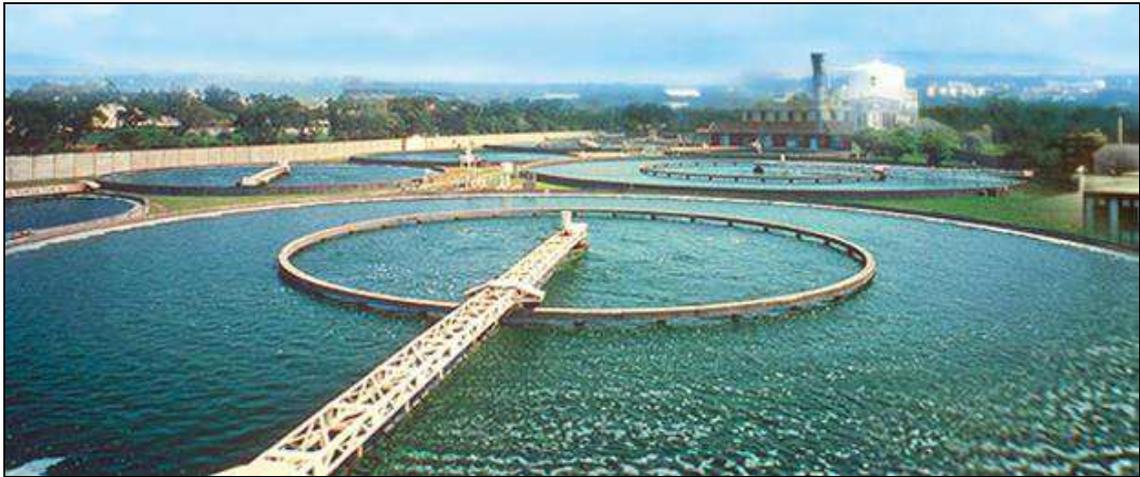
As microalgas são capazes de se adaptarem às alterações ambientais promovendo um desvio em suas rotas metabólicas. Podem assumir metabolismos diversos para produção energia (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010) e a partir daí define-se o tipo de cultivo para a produção do microrganismo. De acordo com Chojnacka e Marquez-Rocha (2004) os cultivos de microalgas podem ser:

- Photoautotrófico: quando a luz é usada como única fonte de energia, sendo convertida em energia química através das reações de fotossíntese que envolvem as moléculas de água e dióxido de carbono;
- Heterotrófico: quando somente compostos orgânicos são usados como fonte de carbono e energia. O cultivo heterotrófico das microalgas deve ser feito com ausência de luz;
- Mixotrófico: quando as microalgas são cultivadas sob iluminação e na presença de compostos orgânico e CO₂ inseridos em seu meio, sendo a fotossíntese a principal fonte de energia. Um caso específico é a anfitrofia em que a concentração de compostos orgânicos e a intensidade da luz disponível induzem o metabolismo para autotrofia ou heterotrofia do microrganismo;
- Fotoheterotrófico: quando a luz é necessária para promover as reações que degradam os compostos orgânicos inseridos no meio de cultivo.

Para a produção comercial da biomassa de microalgas utilizam-se sistemas de grande porte. Estes podem ser abertos ou fechados, utilizando luz solar direta ou indireta, luz artificial ou até mesmo ser isento de iluminação como no caso de cultivos heterotróficos.

Como exemplo de sistema de cultivo aberto tem-se lagoas naturais, tanques circulares, tanques *raceway* e tanques agitados. A Figura 5 apresenta o cultivo de *Chlorella* produzida no parque industrial de Taiwan em tanque circular.

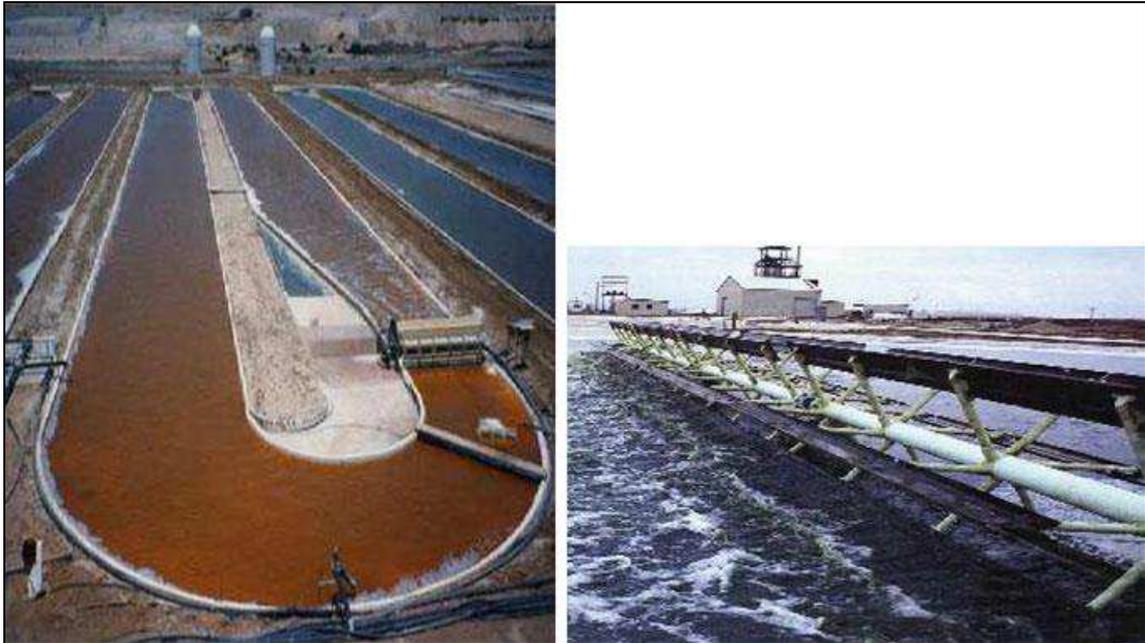
Figura 5 – Tanque circular para cultivo de microalgas



Fonte: http://www.paversul.com.br/chlorella_taiwan

Podem ser vistos na Figura 6 dois tipos de cultivos abertos de microalgas, à direita têm-se cultivo em lagoa agitada e à esquerda em tanque tipo *raceway*.

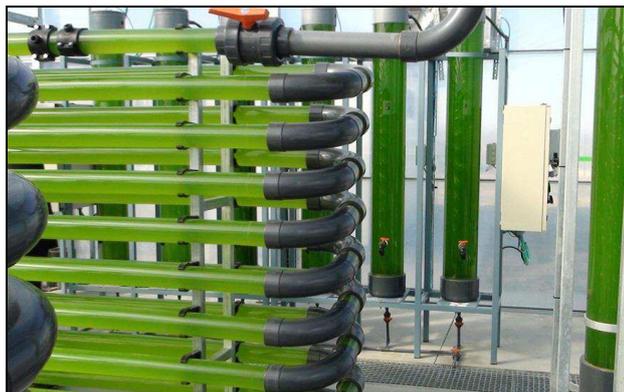
Figura 6 - Tanques *raceway* e lagoas agitadas



Fonte: (GOUVEIA, 2011)

Os sistemas de cultivos fechados que recebem iluminação são chamados de fotobiorreatores. Normalmente são cilíndricos, tubulares ou planos, como visto na Figura 7.

Figura 7 - Fotobiorreator tubular



Fonte: <http://www.algaenergy.es/wp-content/uploads/tubular-cerrado-y-columnas-burbujeo2.jpg>

Os sistemas de cultivo abertos são mais baratos e de mais fácil manutenção que os fotobiorreatores, entretanto estão mais sujeitos à contaminação, alterações de temperatura e

variações de luminosidade. A Tabela 3 apresenta uma comparação sob várias variáveis de processos entre os sistemas de cultivos abertos e fechados.

Tabela 3 - Comparativo entre sistemas de cultivos abertos e fechados

Sistemas de Cultivos de Microalgas	Sistemas Fechados (PBRs)	Sistemas Abertos (Lagoas)
Controle de contaminação	Fácil	Difícil
Risco de Contaminação	Reduzido	Alto
Esterilização	Pode ser realizada	Não pode ser realizada
Controle de processo	Fácil	Difícil
Controle de espécies	Fácil	Difícil
Homogeneização	Uniforme	Deficiente
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Espaço requerido	Depende da produtividade	PBRs ~ Lagoas
Razão área/volume	Alta (20-200 m ⁻¹)	Baixa (5-10 m ⁻¹)
Densidade celular	Alta	Baixa
Investimento	Alto	Baixo
Custo da operação	Alto	Baixo
Capital/custo de operação de lagoas	Lagoas 3-10 vezes menor custo	PBRs > Lagoas
Eficiência na utilização da luz	Alta	Baixa
Controle de temperatura	Temperatura mais uniforme	Difícil
Produtividade	3-5 vezes mais produtivo	Baixa
Perda de água	Depende do projeto de refrigeração	PBRs ~ Lagoas
Estresse das algas por hidrodinâmica	Baixo-Alto	Muito baixo
Evaporação do meio de crescimento	Baixa	Alta

Controle da transferência de gases	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Depende de pH, alcalinidade, etc.	PBRs ~ Lagoas
Inibição por O ₂	Mais problemas em PBRs	PBRs > Lagoas
Concentração de Biomassa	3-5 vezes mais crescimento em PBRs	PBRs > Lagoas
Scale-up	Difícil	Difícil

Fonte: (Adaptado de MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

3.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

A recuperação da biomassa do meio de cultivo representa um dos maiores obstáculos para a produção de biocombustíveis de terceira geração. Em geral, o processo de separação se dá por meio de operações unitárias de separação sólido – líquido e o custo energético empregado é muito dispendioso, segundo Gudin e Therpenir (1986) representa entre 20 – 30% do custo total da produção.

As principais técnicas de separação da biomassa empregadas atualmente são: filtração, centrifugação, floculação e flotação (UDUMAN et al., 2010).

A separação por meio da filtração consiste em passar o meio de cultivo contendo as células em um filtro, membrana porosa ou tela de malha. É ideal para o tratamento de pequenos volumes, pois as células das microalgas tendem a entupir rapidamente o meio filtrante e o processo perde muita eficiência (FERNANDES, 2013).

A centrifugação é um processo de separação que utiliza alta rotação para impor às células uma força que as faz deslocar para o fundo do recipiente. Pode ser utilizada para pequenos volumes como as centrífugas de bancada ou em escalas industriais, porém com elevado gasto energético. A eficiência na centrifugação depende dos diâmetros das células, do tempo de residência, e da profundidade do líquido (GRIMA et al., 2003; HEASMAN et al., 2000).

A floculação promove a aglutinação e decantação das células de microalgas. É um processo bastante adequado na separação de biomassa em sistemas de grande porte, pode ser

realizado espontaneamente ou induzido através de alterações do pH do meio por adição de agentes flocculantes. Os agentes flocculantes mais utilizados são bases e ácidos, fortes, sais inorgânicos e cal (NaOH, HCl, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, FeCl_3 , e CaO) (LOURENÇO, 2006).

A flotação é um processo de separação que se caracteriza pela introdução de bolhas de ar no meio aquoso de forma que as bolhas adsorvam as partículas presentes no meio e as arraste para a superfície do líquido. De acordo com o tamanho das bolhas produzidas no processo de flotação a metodologia pode ser dividida em flotação por ar dissolvido (FAD), flotação por ar disperso e flotação eletrolítica (CHEN et al., 2011). No processo de FAD as bolhas são criadas por despressurização de um fluxo de água saturado com ar (UDUMAN et al., 2010), na flotação por ar disperso a produção das bolhas é feita pela combinação de um sistema de injeção de ar com um agitador mecânico de alta velocidade (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002) e na flotação eletrolítica micro-bolhas de gases são produzidas por eletrólise da água com a utilização de eletrodos de sacrifício (ALFAFARA et al., 2002).

Christenson e Sims (2011) acreditam que estudos de otimização dos processos de autofloculação podem ser a chave para reduzir parcialmente os custos da produção de microalgas e ainda com o benefício de não se adicionar produtos químicos às mesmas.

3.7 MÉTODOS DE ROMPIMENTO CELULAR

Os compostos produzidos pelas microalgas ficam armazenados em seu interior e para serem extraídos das células estas devem ser rompidas. A parede e as membranas celulares das microalgas são bastante resistentes e a escolha do método adequado é fundamental para aumentar a eficiência da extração dos compostos desejados (LEE et. al., 2010).

Os métodos de rompimento celular são classificados quanto à forma de rompimento, estes podem ser físicos ou não-físicos. Os métodos físicos mais estudados são: moinho de pérolas, a termólise, micro-ondas, homogeneizador de alta pressão e ultrassonicação, enquanto os não-físicos utilizam ácidos, bases, enzimas ou choques osmóticos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Halim et al., (2012) estudaram a alguns métodos de rompimento celular em escala laboratorial utilizando a microalga *Chlorococum* sp. Os métodos comparados foram: homogeneização sob alta pressão, ultrassonicação, moinho de pérolas e tratamento com ácido sulfúrico. Os parâmetros utilizados na avaliação foram a redução de células intactas na

contagem e a diminuição do diâmetro médio das colônias. Os melhores resultados obtidos no rompimento celular foram pela homogeneização sob alta pressão e pelo tratamento com ácido sulfúrico.

O rompimento celular é um processo que requer bastante energia e Segundo Lee, Lewis, Asman (2012), em escala laboratorial, a energia necessária para o rompimento da célula por métodos mecânicos é maior que a energia que se pode obter da microalga e que esse balanço energético negativo mostra a necessidade de haver mais pesquisas e inovações nas áreas de rompimento celular e extração de lipídio para que se possa produzir biocombustíveis de baixo custo.

3.8 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

O crescimento das microalgas é influenciado por diversos fatores como: luminosidade, temperatura, pH do meio de cultivo, pela quantidade de nutrientes presentes, pela vazão de aeração, entre outros.

Para as microalgas fotoautotróficas a luz é a principal fonte de energia. Ela induz as atividades enzimáticas, influencia na síntese de proteínas (RUYTERS, 1984; UMINO; SATOH; SHIRAIWA, 1991), na produção de biomassa e na taxa de crescimento (LACAZ-RUIZ, 1996; DERNER, 2006).

A composição das microalgas e o crescimento celular são influenciados pela temperatura. Cada espécie apresenta resposta diversa a essa influência (FERREIRA, 2012). A faixa de temperatura ideal para que se aumente a composição de carboidratos e diminua a produção de proteínas da *Chlorella* sp. é entre 25 °C e 35 °C (OGBONNA; TANAKA, 1996).

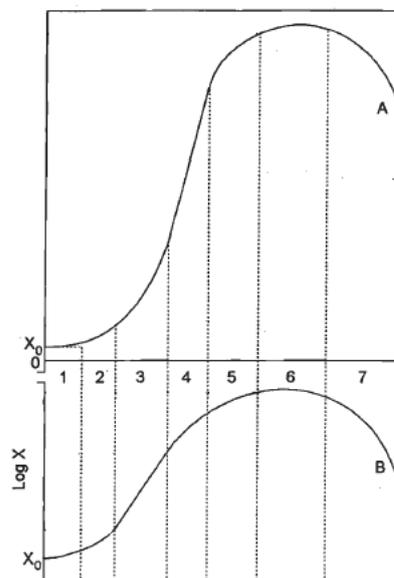
O pH ótimo para o cultivo de microalgas verdes está na faixa entre 4,0 e 8,5. O pH do meio é influenciado pelas proporções entre carbonatos, bicarbonatos e dióxidos de carbono (LOURENÇO, 2006).

O meio de cultivo para produção da *Chlorella* sp. deve conter em média, para cada 100 partes de carbono, 15 partes de nitrogênio, 5 partes de fósforo, 2,5 de magnésio, 1,8 de potássio e 1,6 partes de enxofre (FERREIRA, 2012). Segundo Cozza (1999) o gasto com substratos para produção de microalgas pode representar até 60 % do custo total de produção.

A aeração dos cultivos de microalgas proporciona agitação no meio, evitando estratificação térmica, mantém as células em suspensão e evita a formação de gradientes de concentração de nutrientes (BECKER; VENKATARMAN, 1981).

Para avaliar a influencia de qualquer um desses fatores é necessário que se faça o estudo do crescimento da microalga. A curva de crescimento microbiano em função do tempo é apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Curva de crescimento microbiano representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B).



Fonte: (Adaptado de BORZANI et al., 2001).

As fases do crescimento microbiano apresentadas na Figura 8, são:

- Fase 1- Conhecida como fase “lag”, essa fase se segue imediatamente após a inoculação do microrganismo no meio de cultivo. É um período de adaptação em que as células irão sintetizar as enzimas necessárias para degradar os componentes presentes no meio. Nessa fase não há crescimento celular;
- Fase 2 – É a fase de transição, nesta fase os microrganismos começam a se reproduzir;

- Fase 3 – Fase exponencial, também conhecida como fase “log”. Nela a velocidade de específica de crescimento é proporcional à concentração de células, constante e máxima;
- Fase 4 - Fase de crescimento linear, existe um decaimento na velocidade específica de crescimento devido limitações no transporte de nutrientes;
- Fase 5 – Fase de desaceleração. Diminuição do crescimento devido esgotamento dos nutrientes e devido ao acúmulo de metabólitos inibidores;
- Fase 6 – Fase estacionária, a concentração de células atinge o ponto máximo e existe um equilíbrio entre a taxa de crescimento e de morte do microrganismo;
- Fase 7 – Fase de declínio, caracterizada pela diminuição da biomassa, o número de células que morrem é maior que o número de células que são geradas.

Os parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas são calculados na fase exponencial. Como nesta fase a velocidade específica de crescimento (μ_x) é máxima ela passa a ser chamada velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{máx}$). A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração X, isto é:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{máx} X \quad (01)$$

Onde:

X é a concentração de células

t é o tempo de cultivo

Integrando-se a equação 01, temos

$$\int_{X_i}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_{máx} dt$$

$$\ln X - \ln X_i = \mu_{máx} (t - t_i)$$

$$\ln X = \mu_{m\acute{a}x}(t - t_i) + \ln X_i \quad (02)$$

A representação de $\ln X$ versus o tempo de cultivo, na fase exponencial, resulta em uma reta, com coeficiente angular igual a velocidade específica máxima de crescimento.

A fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração t_g , que é o tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular ($X = 2X_i$).

$$\ln 2X_i = \mu_{m\acute{a}x}(t - t_i) + \ln X_i \quad (03)$$

$$\ln \frac{2X_i}{X_i} = \mu_{m\acute{a}x} t_g$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (04)$$

Como $\mu_{m\acute{a}x}$ é constante então t_g também  constante nesta fase (BORZANI et al., 2001).

3.9 VINHAÇA

A vinhaça, também conhecida como restilo ou vinhoto, é um sub-produto gerado pela fermentação alcoólica nas indústrias sulcroalcooleiras. O Brasil, como maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar produz em média 278 bilhões de litros de vinhaça ao ano, visto que, para produzir um litro de etanol são gerados em média dez litros de vinhaça (BRASIL, 2014).

É uma substância com alto valor nutritivo e por isso muito utilizada como fertilizante nos canaviais, porém altamente poluente, cerca de cem vezes mais que os esgotos domésticos. Apresenta baixo pH, elevada temperatura quando sai dos destiladores, alta carga orgânica e por isso uma elevada Demanda Química de Oxigênio (DQO). Em conseqncia de apresentar todos esses fatores poluentes é altamente nociva à fauna e  flora (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A vinhaça é considerada um resíduo sólido, apesar da aparência líquida, pela NBR 10.004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT (2004), pois pelos padrões exigidos pela lei não há solução convencional para seu tratamento. Um estudo realizado por Elia Neto e Nakahodo (1995) verificaram a carga poluidora da vinhaça em 28 usinas da

Copersucar, as usinas produziram uma média de 10, 85 litros de vinhaça com 175gDBO/L para cada litro de etanol (BRASIL, 2009).

A Tabela 4 apresenta a composição e as características físico – químicas das vinhaças estudadas por Elia Neto e Nakahodo (1995).

Tabela 4 - Valores mínimos, médios e máximos do pH, temperatura, nutrientes e de outros componentes encontrados na vinhaça.

Parâmetros	Mínimo	Média	Máximo
pH	3,5	4,15	4,9
Temperatura	65	89	111
Sólidos Tot. (mg L ⁻¹)	10780	25155	38680
N Total (mg L ⁻¹)	90	357	885
Amônia (mg L ⁻¹)	1	11	65
P Total (mg L ⁻¹)	18	60	188
K Total (mg L ⁻¹)	814	2035	3852
Cálcio (mg L ⁻¹)	71	515	1096
Magnésio (mg L ⁻¹)	97	226	456
Sódio (mg L ⁻¹)	8	52	220
Manganês (mg L ⁻¹)	1	5	12
Ferro (mg L ⁻¹)	2	25	200
Cloreto (mg L ⁻¹)	480	1219	2300
Sulfato (mg L ⁻¹)	790	1538	2800
Sulfito (mg L ⁻¹)	5	36	153
Etanol (%)	0,01	0,09	1,19
Levedura (%)	0,38	1,35	5
Glicerol (%)	0,26	0,59	2,5

Fonte: (ELIA NETO; NAKAHODO,1995 apud BRASIL, 2009).

Observando a Tabela 4 pode-se comprovar alguns fatores poluentes da vinhaça, pelo seu baixo pH em torno de 4,15 e sua elevada temperatura em torno de 89 °C, mas verifica-se também na mesma tabela fatores nutritivos como: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio, elementos fundamentais para nutrição dos seres vivos.

Segundo Silva, Griebeler e Borges (2007) a utilização da vinhaça para fertirrigação pode ocasionar modificações nas propriedades físicas dos solos e contaminar as águas subterrâneas e superficiais de diferentes formas. Quando o solo sofre agregação a capacidade de infiltração é aumentada e as águas subterrâneas podem ser contaminadas por meio de lixiviação dos íons. Em outro caso, a vinhaça pode ocasionar no solo a dispersão das partículas e reduzir a taxa de infiltração promovendo o aumentando do escoamento e a possível contaminação de águas superficiais.

3.10 ESTADO DA ARTE

Marques et al., (2013) estudaram o crescimento da *Chlorella vulgaris* em vinhaça tratada por digestores anaeróbicos. A vinhaça foi diluída com esgoto doméstico tratado para ter uma Demanda Química de Oxigênio- DQO corrigida para 2g.L^{-1} e posteriormente foi tratada por digestão anaeróbica. Três condições de crescimento da *Chlorella vulgaris* foram estudadas: crescimento em 100% de vinhaça, em 50% de vinhaça e 25% de vinhaça. As diluições dos meios foram feitas com efluente de esgoto doméstico tratado. Os cultivos foram iluminados durante período de 12 horas. Obtiveram uma velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$) $0,76\text{ d}^{-1}$ para o cultivo com 100% de vinhaça, $0,56\text{ d}^{-1}$ para o cultivo com 50% de vinhaça e $0,45\text{ d}^{-1}$ para o cultivo com 25% de vinhaça. O teor de lipídios obtido nas microalgas foi 23,68%, 24,95%, 26,45% para os cultivos com 100%, 50% e 25% de vinhaça, respectivamente. Constataram que a vinhaça sem tratamento em concentrações acima de 4% é altamente tóxica para *Chlorella vulgaris* e que é possível integrar o indústria sucroalcooleira com o cultivo microalgas através da digestão anaeróbica da vinhaça.

Barrocal et al., (2010) estudaram o cultivo mixotrófico de *Spirulina máxima* em meio Schlosser suplementado com vinhaça de açúcar de beterraba com as concentrações variando de 1 a 7 g.L^{-1} e com vinhaça alcalinizada e diluída variando de 2 a 5 g.L^{-1} de concentrações. Os resultados obtidos em ensaios de batelada mostraram que *S. maxima* foi capaz de crescer em meio Schlosser contendo até 5 g.L^{-1} (corresponde a 0,5%) de vinhaça e de vinhaça alcalinizada e diluída. As concentrações de biomassa e velocidades específicas de crescimento obtidas foram $3,5\text{ g.L}^{-1}$ e $0,08\text{ d}^{-1}$ o que corresponde a aproximadamente $0,003\text{ h}^{-1}$ e tempo de geração 208 h no cultivo suplementado com vinhaça alcalinizada e diluída e $4,8\text{ g.L}^{-1}$ de concentração de biomassa e $0,17\text{ d}^{-1}$ de velocidade específicas de crescimento o que

corresponde a $0,007 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 97,85 h no cultivo suplementado com vinhaça. Concluíram que a vinhaça produz um efeito positivo no crescimento das microalgas.

Bonini (2012) estudou o cultivo *Aphanothece microscopica Nægeli* e da *Chlorella vulgaris* em meios sintéticos com adição glicose, acetato de potássio, glicerol e em vinhaça previamente tratada por hidrólise ácida e autoclavada. Nos ensaios mixotróficos utilizou as concentrações 25 g.L^{-1} e $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1}$ de acetato de potássio e $0,46 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol como ideais para o cultivo de *Aphanothece* e *Chlorella*, respectivamente, obtendo uma velocidade específica de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx}}$) entre $0,0072 \text{ h}^{-1}$ e $0,043 \text{ h}^{-1}$. No cultivo heterotrófico em vinhaça obteve uma velocidade específica de crescimento de $0,1496 \text{ h}^{-1}$ para *Aphanothece* com remoção de 60,8% de DQO e no cultivo de *Chlorella* o $\mu_{\text{máx}}$ foi $0,0024 \text{ h}^{-1}$ com 25% de remoção de DQO. De acordo com os resultados apresentados, acreditam que a vinhaça é uma alternativa para o aproveitamento de águas residuárias com a possibilidade de produzir biomassa de alto valor agregado a partir de um meio de baixo custo.

Ilman e Shales (2000) estudaram o valor calórico de cinco linhagens de *Chlorella* cultivadas em meio Watanabe (microalgas dulcícolas) e Guillard's (microalgas marinhas) e em meios com baixos teores de nitrogênio. As microalgas estudadas foram as espécies de águas doces *C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides* e *C. sorokiniana* e a *C. minutíssima*, espécie marinha. O melhor crescimento obtido foi pela *C. vulgaris* em meio Watanabe sem redução de nitrogênio. A taxa de crescimento específica foi de $0,99 \text{ d}^{-1}$ o que corresponde a $0,041 \text{ h}^{-1}$ e um tempo de geração de aproximadamente 16,80 horas. Concluíram também, que o valor calórico está mais relacionado ao teor de lipídios do que a qualquer outro elemento das microalgas.

Bertoldi et al., (2007) estudaram a biorremediação de nitrogênio e fósforo de solução hidropônica residual utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*. Estudaram três concentrações de solução hidropônica residual: 100%, 50%, 25%, as diluições foram feitas com água deionizada. Obtiveram uma remoção de 82,2% de amônia, 80,50% de nitrato, 84,2% de nitrito e 51,9% de fósforo total, utilizando a solução hidropônica residual sem diluição (100%) como meio de cultura. Concluíram que a *Chlorella vulgaris* é efetiva na remoção dos elementos em estudo e que a solução hidropônica residual apresentou ser uma alternativa como meio de cultura para produção de biomassa algal.

Gouveia e Oliveira (2009) analisaram seis espécies de microalgas quanto aos teores de lipídios. As microalgas estudadas foram *Chlorella vulgaris*, *Spirulina maxima*, *Nannochloropsis* sp., *Neochloris oleabundans*, *Scenedesmus obliquus* e *Dunaliella tertiolecta*. A *Neochloris oleabundans* e a *Nannochloropsis* sp. provaram ser as mais indicadas para produção de biocombustíveis pois apresentaram, respectivamente, 29 % e 28,7 % de lipídios, em contrapartida a *Chlorella vulgaris* apresentou um baixo teor de lipídios com apenas 5,1%. Porém, quando cultivadas em meio de cultivo deficiente de nitrogênio todas as espécies apresentaram um aumento na produção de lipídios, aproximadamente 50%.

Matos et al., (2015) estudaram os teores de proteínas e lipídios da *Chlorella* sp. cultivada em meio de cultura BBM modificado pela adição de extrato de levedura e 250 mL.L⁻¹ de concentrado de dessalinização residual. Os cultivos foram desenvolvidos em fotobiorreatores cônicos invertidos, com capacidade de 4 L, e mantidos durante 28 dias, resultando em 4 ciclos de cultivos. A cada ciclo o cultivo era centrifugado em centrifuga refrigerada e o meio era recomposto quimicamente com 10 mL.L⁻¹ de nitrato de sódio e devolvido ao fotobiorreator para novo ciclo. O primeiro ciclo de cultivo apresentou maior teor de proteínas (48,8%). O maior teor de lipídeos (11,4%) foi obtido no segundo ciclo de cultivo. Foi observado, também, em seus estudos que a produtividade em biomassa (P_B) está diretamente correlacionada com a produtividade lipídica (P_L), indicando que quanto maior a P_B maior será a P_L . Os autores demonstraram que é possível utilizar o concentrado de dessalinização residual como meio de cultura alternativo e obter biomassa ao longo de quatro ciclos de cultivo sem comprometer a produção de lipídios e proteínas.

Fu et al., (2010) estudaram a hidrólise da parede celular da *Chlorella* sp. por meio da reação enzimática para produção de açúcares redutores e extração de lipídios. O cultivo de microalgas foi centrifugado e as células foram lavadas para retirada de sal marinho residual e secas em liofilizador. O substrato para reação enzimática foi preparado com 0,3 g de biomassa e 15 mL de tampão acetato. Sob condições ótimas de hidrólise a celulase converteu 62% de celulose. O rendimento da reação manteve-se em 40% depois de 5 vezes de reutilização da enzima e a eficiência do processo de extração de lipídios aumentou de 32% para 56%.

Ferreira (2012) estudou o desenvolvimento da *Chlorella* sp. e da *Chlorella vulgaris* em meio *Bold's Basal Medium* modificado com adição de concentrado de dessalinização de água salobra via osmose inversa. O estudo foi realizado em duas etapas, uma em escala de bancada e outra a céu aberto. No estudo em escala de bancada a *Chlorella vulgaris* apresentou

maior produtividade atingindo um crescimento de $5,9 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, e 8,56% de lipídios. No cultivo a céu aberto os resultados não foram satisfatórios devido a variação de temperatura e luminosidade, a biomassa apresentou 2,88% de lipídios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 A MICROALGA *Chlorella* sp.

A cepa de microalga utilizada no presente estudo foi a *Chlorella* sp. presente no Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) da cidade de Campina Grande, Estado da Paraíba. As culturas de microalgas eram mantidas em frascos Erlenmeyers a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitadas por meio de injeção direta de ar comprimido, iluminadas por lâmpadas fluorescentes de 40W que proporcionaram uma iluminação de 4 klux durante um período de 12 h diárias. Semanalmente eram repicadas em novos cultivos para que não houvesse perda da atividade celular devido o envelhecimento das células, escassez de nutrientes e acúmulo de metabólitos no substrato. A Figura 9 mostra a fotomicrografia da *Chlorella* sp. utilizada em todo o estudo.

Figura 9 - Fotografia da *Chlorella* sp. vista através de microscópio com aumento de 400x



Fonte: Próprio Autor

4.2 O MEIO DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado para manutenção de estoque e para o crescimento da microalga *Chlorella* sp. foi o *Bold's Basal Medium* (BBM) que é recomendado pelo Centro de cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP) com suplementação de $0,30\text{ g.L}^{-1}$

de extrato de levedura. O pH do meio é aproximadamente 6,5 e a composição do BBM modificado está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do meio de cultivo *Bold's Basal Medium* modificado

Nutrientes	Concentração (mg.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	14
MgSO ₄ .7H ₂ O	75
NaNO ₃	90
CaCl ₂ .2H ₂ O	25
NaCl	25
EDTA-Na ₄	50
FeSO ₄ . 7H ₂ O	4,98
H ₃ BO ₃	11,42
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,232
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,41
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,252
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0,192
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,080
Extrato de levedura	300

Fonte: (CONNON, 2007)

4.3 A VINHAÇA

A vinhaça utilizada na pesquisa foi disponibilizada pelo Engenho Triunfo, indústria de cachaça situada no município de Areia e pelo Laboratório de Produtos Fermento/Destilados (LPFD) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) da cidade de João Pessoa, ambos do Estado da Paraíba.

Foi realizado um tratamento físico-químico na vinhaça para evitar a inibição do crescimento da *Chlorella* sp., em virtude do baixo pH, aproximadamente 3,5, e da grande

quantidade de materiais suspensos que poderiam dificultar o processo de fotossíntese das células.

4.3.1 Tratamento da vinhaça

A vinhaça foi colocada para decantar, à temperatura ambiente, em copos béqueres com capacidade volumétrica de 1 L. Após 24 h de repouso, a vinhaça clarificada foi armazenada sob refrigeração, na geladeira, e o material decantado foi descartado.

O pH da vinhaça foi sempre corrigido minutos antes de ser adicionada ao meio de cultura. A vinhaça clarificada foi retirada da geladeira e deixada repousar para que atingisse a temperatura ambiente. Pequenas alíquotas (1 a 2 mL) de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% de concentração em massa foram adicionadas à vinhaça, sob constante agitação, sempre verificando o pH, em pHmetro digital, até que fosse atingido o pH 7.

4.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

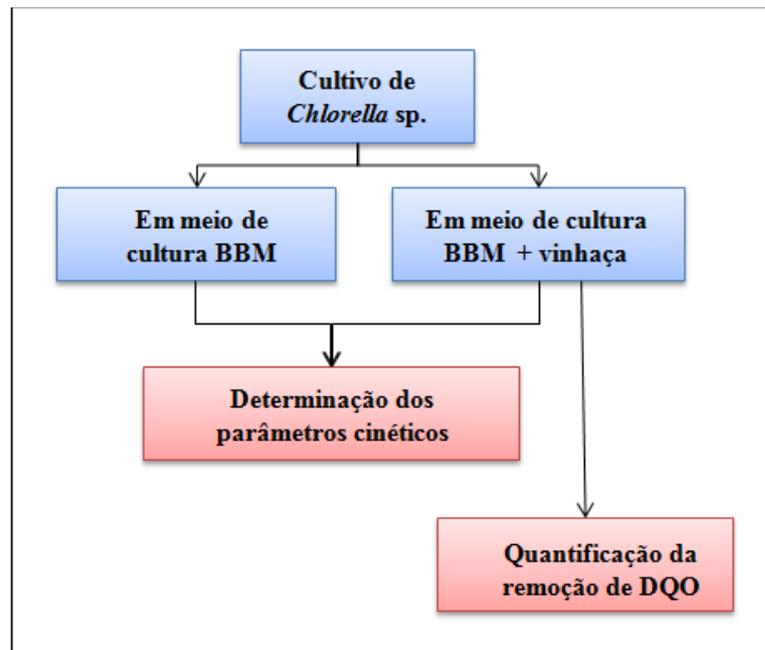
O presente estudo foi desenvolvido em três etapas:

- Etapa 1 – Estudo do crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com vinhaça na proporção de 5%, 10% e 15% e da remoção de Demanda Química de Oxigênio (DQO) dos respectivos cultivos;
- Etapa 2 – Estudo do crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de cultivos de 1^a, 2^a e 3^a reutilizações;
- Etapa 3 – Quantificação dos teores de lipídios e açúcares redutores nas biomassas produzidas pelo cultivo de *Chlorella* sp. em meio de cultivo suplementado com vinhaça;

4.4.1 Etapa 1 – Cultivo de *Chlorella* sp. em meio suplementado com vinhaça

A Figura 10 apresenta o fluxograma com a seqüência das atividades desenvolvidas durante a Etapa 1 da pesquisa.

Figura 10 - Fluxograma da seqüência de procedimentos experimentais da Etapa 1



4.4.1.1 Preparação dos Cultivos de *Chlorella* sp.

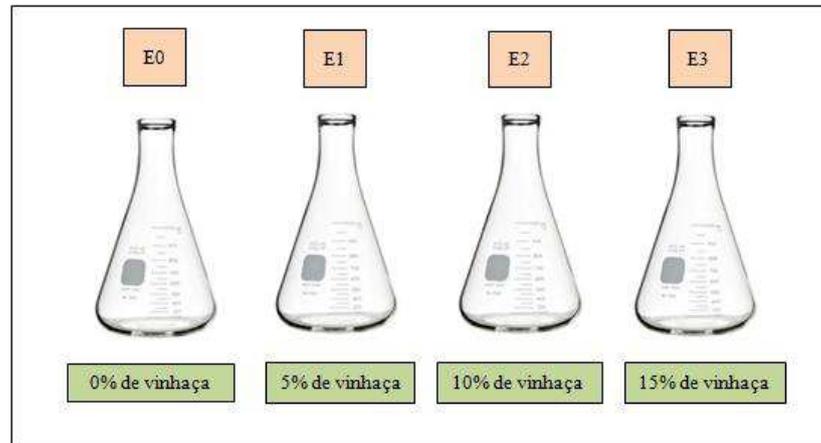
Em um balão volumétrico de 500 mL foram adicionados os nutrientes listados para preparação do BBM modificado (Tabela 5), adicionou-se vinhaça na proporção desejada e água destilada/autoclavada a 121° durante 15 min.

Sob condições assépticas, foram transferidos 360 mL do meio de cultivo para um frasco Erlenmeyer com capacidade de 500 mL e a ele adicionou-se o inóculo, 40 mL (proporção de microalgas 1:10 do cultivo) de suspensão de *Chlorella* sp. de um cultivo em crescimento.

Dessa forma foram preparados 4 cultivos. Os cultivos foram denominados E0, E1, E2 e E3 para diferenciar a quantidade de vinhaça adicionada em cada meio de cultura. O cultivo E0 foi preparado apenas com o BBM modificado, ou seja, sem adição de vinhaça e os cultivos

E1, E2 e E3 foram preparados com a adição de 5%, 10% e 15% de vinhaça, respectivamente, como mostra a Figura 11:

Figura 11 - Experimentos com diferentes concentrações de vinhaça



4.4.1.2 Aclimação dos Cultivos de *Chlorella* sp.

Os cultivos foram incubados a uma temperatura de $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, agitados por meio de injeção direta de ar comprimido e iluminados por lâmpadas fluorescentes de 40 W que proporcionaram uma iluminação de 4 klux durante um período de 12 h diárias. O tempo de iluminação foi mantido por controlador automático. A Figura 12 mostra cultivos de *Chlorella* sp. incubados nas aclimações descritas.

Figura 12 - Cultivos de *Chlorella* sp. em diferentes fases de crescimento



Fonte: Próprio Autor

4.4.1.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

O crescimento da *Chlorella* sp. nos diversos cultivos foi acompanhado por meio do aumento da densidade celular. A partir da inoculação da microalga no meio de cultivo, uma alíquota da cultura foi retirada diariamente e levada ao microscópio para contagem de células em câmara de Neubauer. O microscópio foi ajustado para aumento de 400x e os resultados das contagens foram expressos em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹). As contagens foram realizadas em triplicata.

Com os dados obtidos foram construídas as curvas de crescimento da microalga nos cultivos E0, E1, E2 e E3. As mesmas foram expressas pelo número de células.mL⁻¹, no eixo da ordenada, e pelo tempo de cultivo em horas, no eixo da abscissa.

A partir da linearização das curvas de crescimento da *Chlorella* sp. e utilizando as Equações (02) e (04) foram determinadas as velocidade específica de crescimento máxima e os tempos de geração dos cultivos.

4.4.1.4 Análise de remoção da Demanda Química de Oxigênio - DQO

As análises de DQO foram realizadas nos cultivos E1, E2 e E3. O equipamento utilizado foi o Fotocolorímetro digital AquaColor – DQO (os reagentes, DQO1, DQO2 e DQO 800 ppm, utilizados nas análises são fornecidos pelo fabricante).

Para não sofrer interferência de leitura por conta das células, as análises foram realizadas no meio de cultivo, antes da introdução do inóculo, e no resíduo do cultivo após separação da *Chlorella* sp.

Para calibração do equipamento foi necessária a preparação de uma amostra de branco e uma amostra de fundo de escala. Para preparação do branco, em um tubo de ensaio foram adicionados 2,5 mL de água destilada, com 1,5 mL do reagente DQO1 e 3,5 mL do reagente DQO2. O fundo de escala foi preparado em tubo de ensaio com adição de 2,5 mL do reagente DQO 800 ppm, com 1,5 mL do reagente DQO1 e 3,5 mL do reagente DQO2.

Para análise das amostras: em diferentes tubos de ensaios foram adicionados 2,5 mL dos meios diluído 1:5, cultivos E1 e E2 e 1:10 do cultivo E3, à 1,5 mL do reagente DQO1 e 3,5 mL do reagente DQO2.

Os tubos foram misturados lentamente, incluindo as amostras de branco e fundo de escala, e levados ao bloco digestor por 2 h à temperatura de 150 °C. Decorrido o tempo necessário, os tubos foram retirados do bloco digestor para resfriamento em temperatura ambiente, com cuidado para não receber ventilação e desestabilizar a cor. O fotocolorímetro foi calibrado com as amostras de branco e fundo de escala e as demais amostras foram lidas, os resultados foram expressos em mg.L⁻¹.

Após o sexto dia de cultivo, as microalgas foram separadas dos resíduos por meio de centrifugação, em centrífuga de bancada à 3500 rpm durante 10 min, e as análises procederam como descrito anteriormente utilizando-se a diluição de 1:5 para todas as amostras. As análises foram realizadas em triplicada e as porcentagens de remoção de DQO foram calculadas, seguindo a equação 5:

$$\%REMOÇÃO_{DQO} = \frac{DQO_{INICIAL} - DQO_{FINAL}}{DQO_{INICIAL}} \times 100 \quad (05)$$

Onde :

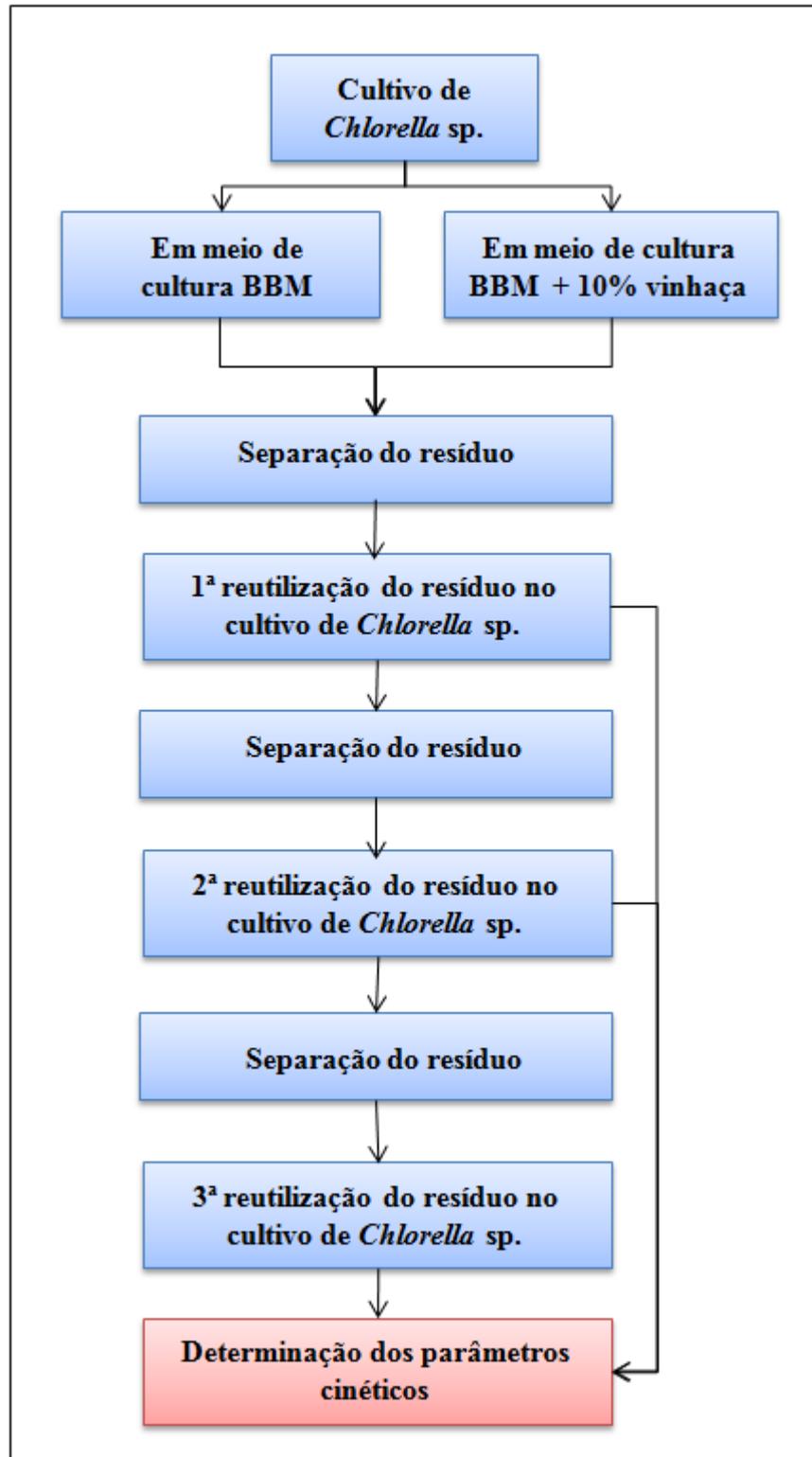
$DQO_{INICIAL}$ - É a demanda química de oxigênio do meio de cultivo

DQO_{FINAL} - É a demanda química de oxigênio do resíduo de cultivo

4.4.2 Etapa 2 – Cultivo de *Chlorella* sp. em meio suplementado com resíduo de cultivo

A seqüência das atividades desenvolvidas na segunda etapa da pesquisa é apresentada pelo fluxograma da Figura 13.

Figura 13 - Fluxograma da sequência dos procedimentos experimentais da Etapa 2



4.4.2.1 Preparação dos Cultivos de *Chlorella* sp suplementados com resíduos

Os cultivos de microalgas estudados nesta Etapa-2 foram preparados como descrito no tópico 4.4.1.1, sempre respeitando a proporção 1:10 para calcular o volume de inóculo a ser adicionado ao meio de cultura. Os cultivos foram aclimatados de acordo com a descrição do tópico 4.4.1.2.

Para a produção dos resíduos foram preparados dois cultivos, o S4 e o V5. O cultivo S4 foi preparado apenas com BBM modificado (como o E0) e o cultivo V5 foi preparado com BBM modificado suplementado com 10% de vinhaça (semelhante o cultivo E2). Semanalmente esses cultivos foram transferidos para frascos maiores e realimentados com mais substrato até atingirem uma alta população de microalgas em um volume de 6L.

Os cultivos S4 e V5 foram centrifugados, para obtenção dos resíduos, em centrífuga de bancada com rotação de 3500 rpm durante o tempo de 8 min. As biomassas foram utilizadas em testes pré-liminares e os resíduos foram armazenados sob refrigeração para evitar deterioração.

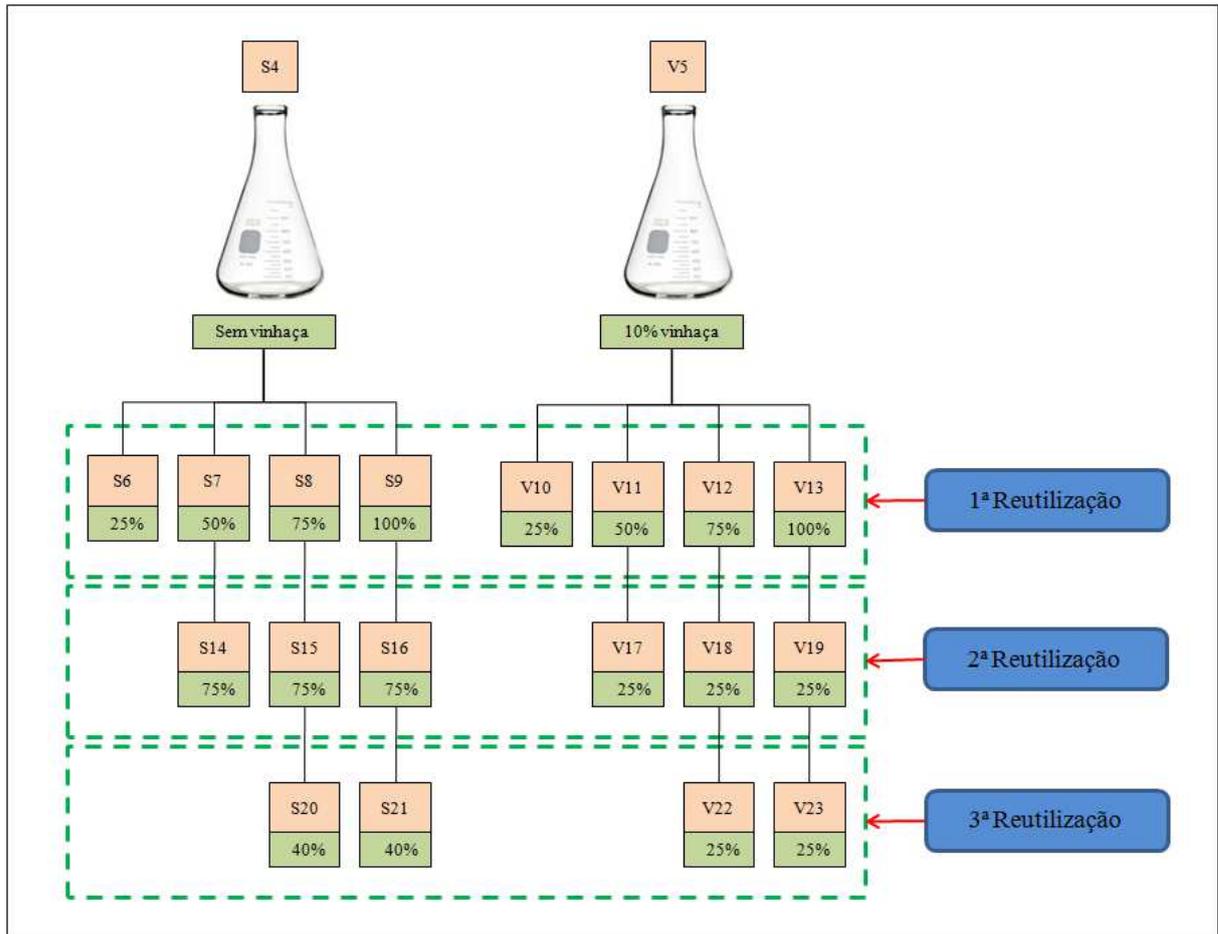
1ª Reutilização dos resíduos: foram preparados os cultivos S6, S7, S8, S9, V10, V11, V12 e V13 com o meio suplementado com os resíduos dos cultivos S4 e V5 em diferentes proporções. Após o sexto dia de incubação os cultivos foram centrifugados em centrífuga de bancada com rotação de 3500 rpm durante o tempo de 8 min.

2ª Reutilização dos resíduos: foram preparados os cultivos S14, S15, S16 com os meios suplementados com 75% de resíduos e os cultivos V17, V18 e V19 com meios suplementados com 25% de resíduos. Os resíduos utilizados como suplementação aos meios foram os resíduos obtidos a partir da última centrifugação. Após o sexto dia de incubação esses cultivos foram também centrifugados como anteriormente para aproveitamento dos resíduos.

3ª Reutilização dos resíduos: Os cultivos S20 e S21 foram preparados com adição de 40% de resíduos e os cultivos V22 e V23 foram preparados com adição de 25% de resíduos ao meio.

O fluxograma da Figura 14 identifica de quais cultivos os resíduos foram originados e onde foram utilizados. Por exemplo, o cultivo S20 recebeu o resíduo centrifugado do cultivo S15, já o cultivo V19 recebeu o resíduo do cultivo V13.

Figura 14 - Organograma para identificação das origens dos resíduos



As concentrações dos resíduos adicionados aos cultivos como suplementação nutricional são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de resíduo nos diversos meios de cultivos

Cultivo	Concentração de resíduo (%)
S6	25
S7	50
S8	75
S9	100
V10	25
V11	50
V12	75
V13	100
S14	75
S15	75
S16	75
V17	25
V18	25
V19	25
S20	40
S21	40
V22	25
V23	25

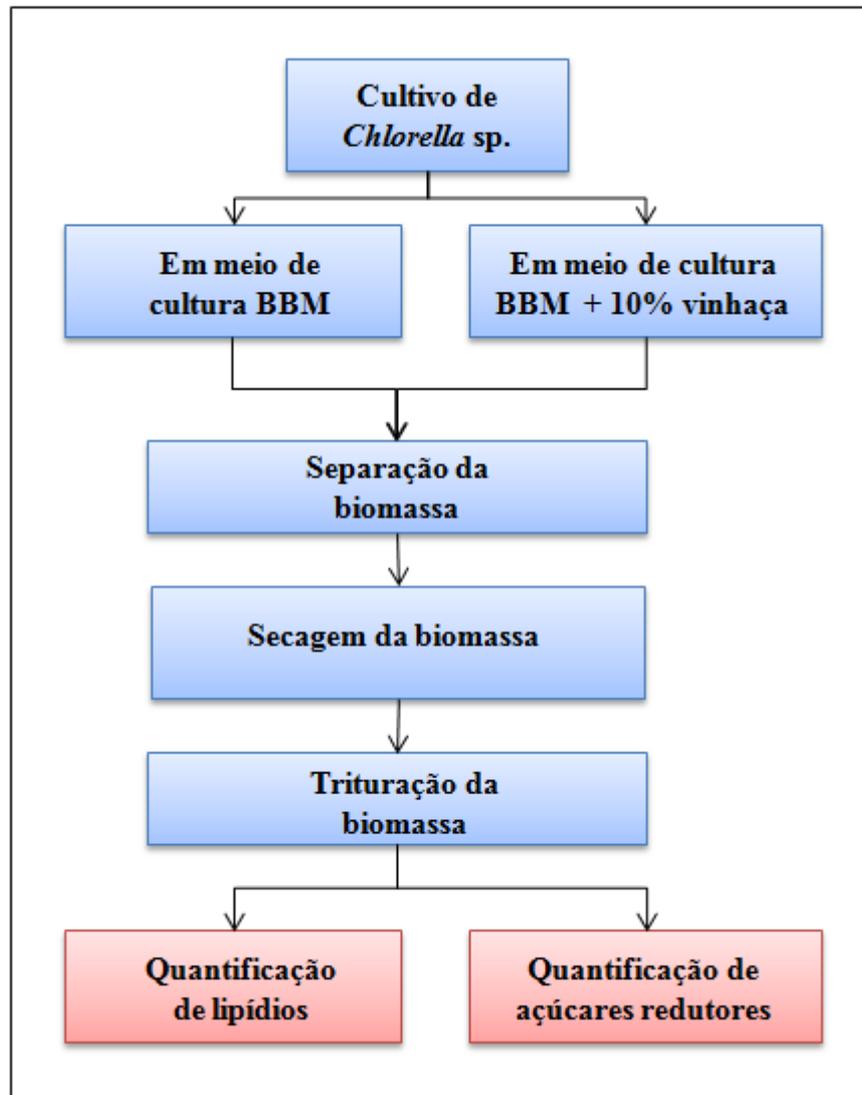
4.4.2.2 Determinação dos parâmetros cinéticos dos cultivos

Assim como nos cultivos suplementados com vinhaça, o crescimento da *Chlorella* sp. nos meios suplementados com resíduos foi acompanhado por contagem celular em câmara de Neubauer, seguindo o mesmo procedimento descrito no tópico 4.4.1.3. Da mesma forma construiu-se as curvas de crescimento e utilizando as Equações (02) e (04) foram obtidas as velocidade específica de crescimento máxima e os tempos de geração dos cultivos.

4.4.3 Etapa 3 – Quantificação dos teores de lipídios e açúcares redutores das biomassas

A Figura 15 apresenta a seqüência das atividades desenvolvidas na terceira etapa da pesquisa.

Figura 15 - Fluxograma da seqüência dos procedimentos experimentais da Etapa 3



4.4.3.1 Cultivo de *Chlorella* sp. para produção de biomassa

Dois cultivos foram preparados para produção das biomassas “A” e “B”.

Preparação dos inóculos: Para preparação do inóculo do cultivo “A”, em um balão volumétrico de 1 L foram adicionados os nutrientes listados do BBM modificado (Tabela 5) e água destilada/autoclavada a 121° durante 15 min. Sob condições assépticas, foram transferidos 720 mL do meio de cultivo para um frasco Erlenmeyer com capacidade de 1 L e a ele adicionou-se 80 mL de suspensão de *Chlorella* sp. Semanalmente o cultivo foi transferido para Erlenmeyer de 2 L e depois de 6 L sempre realimentado com mais substrato até atingir uma alta população de microalgas. O inóculo do cultivo “B” foi preparado da mesma forma que o “A”, tendo como única diferença a adição de 10% de vinhaça na preparação do meio de cultivo. Os inóculos foram aclimatados sob as condições citadas no tópico 4.4.1.2.

Preparação dos cultivos: Foram preparados 30 L de meio de cultivo sem adição de vinhaça (cultivo A) e 30 L de cultivo com adição de 10% de vinhaça (cultivo B). Esses meios foram colocados em fotobiorreatores plásticos semi-transparentes de capacidade de 55 L. O fotobiorreator 1 recebeu o meio sem vinhaça e o inoculo “A”, o fotobiorreator 2 recebeu o meio de cultivo suplementado com 10% de vinhaça e o inóculo “B”. Os fotobiorreatores foram cobertos com plástico transparente, e recebiam aeração por injeção direta de ar comprimido através de 5 pipetas como mostra a Figura 16. Os sistemas receberam iluminação natural por luz solar. Durante o crescimento das microalgas os cultivos foram alimentados com mais 20 L de meio, cada um.

Figura 16 - Fotobiorreatores dos cultivos “A” e “B” (cultivo “A” à esquerda e “B” à direita)



Separação das biomassas: Após o aumento da população de microalgas nos cultivos as separações das biomassas foram realizadas por meio de ultrafiltração seguida de centrifugação. O sistema de ultrafiltração é constituído por uma membrana Spiracel UP010 com porosidade nominal de 10 kDa e a base de polietersulfona (PES), operando a uma pressão de entrada de $1,5 \text{ kgf.cm}^{-2}$ e 1 kgf.cm^{-2} na saída da membrana. A centrifugação foi realizada utilizando centrífuga de bancada com rotação de 3500 rpm por 8 min.

Secagem das biomassas: Após a centrifugação, as biomassas foram colocadas em bandejas plásticas e levadas à estufa de esterilização e secagem a uma temperatura de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante.

Após a secagem, as biomassas foram trituradas em almofariz e armazenadas em recipientes fechados longe de umidade. A Figura 17 mostra a biomassa concentrada após a centrifugação e triturada após a secagem.

Figura 17 - Microalga concentrada (à esquerda), biomassa seca (à direita)



4.4.3.2 Determinação de lipídios totais

Os lipídeos totais foram determinados através da metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957), que consiste em submeter as amostra à extração por meio de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1) seguida de evaporação do solvente em estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Devido à resistência da parede celular das microalgas, a metodologia foi adaptada introduziu-se uma etapa de rompimento celular com o uso de banho ultrassônico. As análises foram realizadas em triplicata.

Para cada análise foram pesados 2 g de biomassa, seca e triturada, em balança analítica. As amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyers com capacidade volumétrica de 125 mL e adicionados 30 mL da mistura clorofórmio: metanol (2:1). Os

frascos foram imediatamente vedados com filme plástico para evitar a volatilização do solvente. Os mesmos foram levados ao banho ultrassônico a uma frequência de 25 kHz durante 20 minutos, como é visto na Figura 18.

Figura 18 - Pesagem e sonicação da biomassa



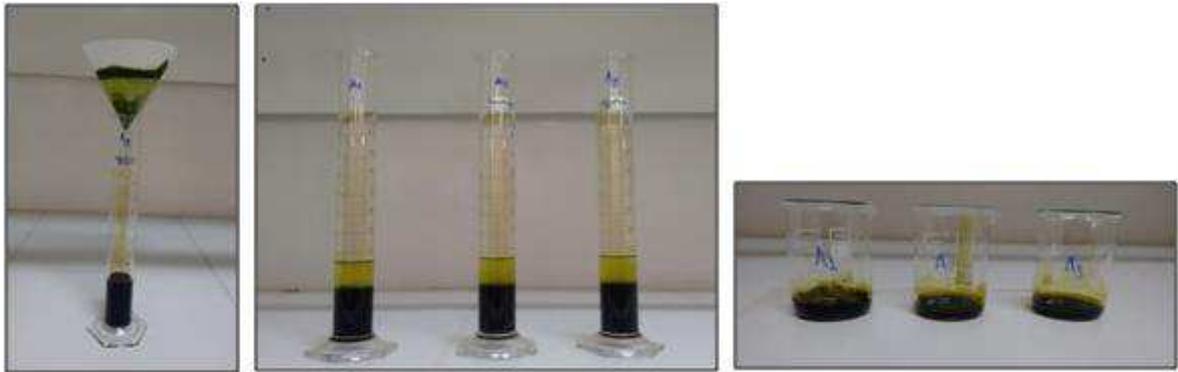
As misturas foram filtradas em provetas de 100 mL com a utilização de papéis de filtro qualitativos. Após a filtração foram adicionados 10 mL do solvente clorofórmio-metanol (2:1) para lavar as paredes dos frascos. Os volumes finais dos extratos filtrados foram lidos.

Uma solução de sulfato de sódio com concentração de 1,5 % foi adicionada a cada uma das provetas contendo o extrato filtrado. Os volumes da solução de sulfato de sódio adicionados corresponderam a 20 % dos volumes de extratos filtrados. As provetas foram agitadas para propiciar a separação das fases. Os volumes das fases inferiores foram lidos, e as fases superiores foram retiradas através de sucção com pipeta graduada e descartadas.

Uma alíquota de 5 mL do extrato (fase inferior) foi retirada com pipeta volumétrica, de cada proveta, e transferida para um béquer, previamente seco em estufa a 105 °C e pesado.

Os béqueres foram levados à estufa a 105 °C para evaporar a mistura de solventes. Verificado o término da secagem os béqueres foram acondicionados no dessecador para resfriar. Após transcorrido o tempo de 15 minutos os béqueres com os lipídios foram pesados em balança analítica. A Figura 19 apresenta a seqüência de etapas descritas: a filtração da mistura, a separação das fases e os béqueres contendo os lipídios após a evaporação do solvente.

Figura 19 - Filtração, separação das fases e evaporação do solvente



As porcentagens de lipídios das amostras foram calculadas pelo produto dos volumes das fases inferiores dos extratos, após a separação das fases, pelas diferenças das massas dos béqueres com lipídios e béqueres tarados, divididos por 5 e pelas massas das amostras (biomassas), multiplicados por 100, conforme a Equação 6:

$$\%Lipídeo = \frac{volume_{fase\ inf} \times (massa_{final} - massa_{inicial})}{5 \times M} \times 100 \quad (06)$$

Onde:

$volume_{fase\ inf}$ - Volume do extrato da fase inferior

$massa_{final}$ - Massa final do béquer com lipídio

$massa_{inicial}$ - Massa do béquer seco

M - massa da amostra

4.4.3.3 Quantificação de sólidos solúveis totais - SST

A análise de sólidos solúveis totais foi realizada como um teste preliminar da quantificação de açúcares redutores. Seu objetivo foi avaliar a melhor proporção de água para extrair os açúcares das amostras. As biomassas “A” e “B” foram misturadas para produzir uma única amostra para teste “AB”.

Em quatro tubos de ensaios adicionou-se 0,5 g de amostra e diferentes volumes de água destilada respeitando a proporção 1:2, 1:4, 1:5 e 1:6.

Os tubos de ensaios foram levados ao banho ultrassônico por 20 minutos a uma frequência de 25 kHz. Após o intervalo de tempo estabelecido as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos vórtex e levadas à centrifugação, em centrífuga mini-spin, por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi levado ao refratômetro digital e realizou-se a leitura. Os valores lidos foram corrigidos de acordo com a diluição estabelecida.

Após a obtenção da melhor proporção de amostra/água para extração de açúcares, ou seja, a que propiciou o resultado com o maior °Brix, repetiu-se o procedimento com as amostras A e B, porém utilizando 1 g de amostra e o volume de água estabelecido pela melhor proporção.

4.4.3.4 Quantificação de açúcares redutores– AR

Os açúcares redutores foram determinados utilizando-se uma modificação do método do DNS, originalmente proposto por Miller (1959). O teste de DNS (ácido dinitrosalicílico) tem por fundamento a formação de um composto colorido avermelhado originado pela reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo) que é identificado no espectrofotômetro - UV em comprimento de onda de 540 nm. A modificação adicionada foi a introdução de uma etapa de rompimento celular com o uso de banho ultrassônico.

Uma curva padrão foi construída para que a leitura em absorbância pudesse ser convertida em miligramas de açúcar redutor por mililitro de solução. Na construção da curva padrão foram pesados 250 mg (0,25 g) de glicose e dissolvido em 250 mL de água destilada em balão volumétrico. Após agitação vigorosa para homogeneizar, transferiu-se 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 e 5,0 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e o volume foi completado para 5 mL com água destilada. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos tipo vórtex e de cada tubo transferiu-se 1 mL da solução com 4 mL de água destilada para novos tubos de ensaio. Foi retirado 1 mL de solução de glicose diluída de cada tubo e adicionados com 1 mL de DNS. Os tubos foram homogeneizados e aquecidos a 100°C em banho-maria por cinco minutos e então resfriados em banho com água fria por três minutos. A cada tubo foram adicionados 8 mL de água destilada, após homogeneizado, a absorbância foi lida a 540 nm. Foi construída a curva de absorbância versus concentração. A Figura 18 mostra

os tubos de ensaio contendo as soluções após reação com o DNS para construção da curva de calibração.

Para análise das biomassas 1 g de cada amostra seca foi pesado em balança analítica. As amostras foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 4 mL de água destilada. Os tubos de ensaio foram levados ao banho ultrassônico por 20 minutos a uma frequência de 25 kHz. Decorrido o tempo as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos vórtex e levadas à centrifugação, em centrífuga mini-spin, por 10 minutos a 10.000 rpm. Transferiu-se 0,5 mL do sobrenadante para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução DNS. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e levados para banho de água fervente por 5 minutos. Após este intervalo, os tubos foram retirados do banho de água quente e colocados em banho de água fria por três minutos, até completo resfriamento. Em cada tubo foi adicionado 4 mL de água destilada e feita à leitura imediatamente em espectrofotômetro a 540 nm.

As análises dos AR das biomassa foram realizadas em triplicata e os resultados foram convertidos para porcentagem.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

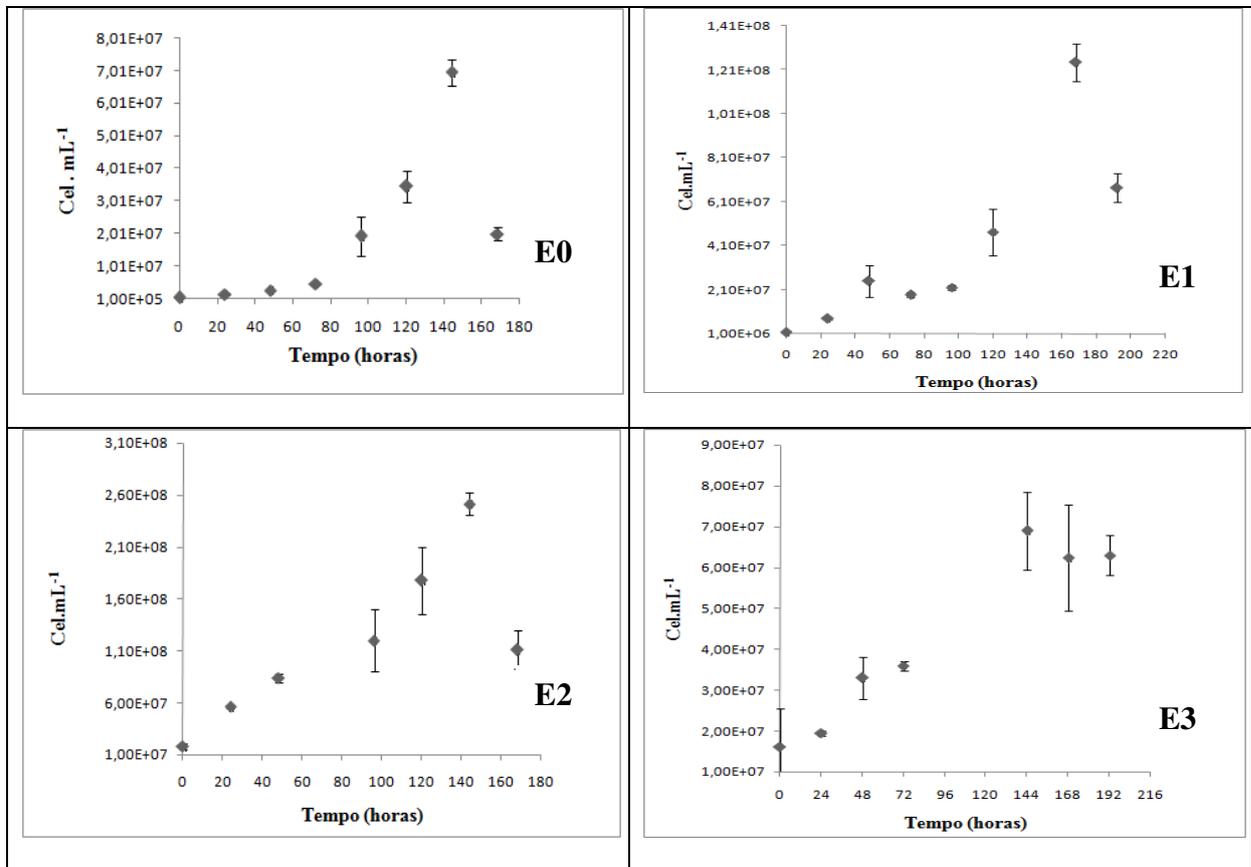
5.1 ETAPA 1 – CULTIVO DE *Chlorella* sp. EM MEIO SUPLEMENTADO COM VINHAÇA

5.1.1 Cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em meio suplementado com vinhaça

A *Chlorella* sp. apresentou um bom desenvolvimento nos cultivos suplementados com vinhaça, obtendo uma alta densidade celular, em especial nos cultivos suplementados com menores concentrações, no caso o E1 e E2. Vale salientar que a vinhaça é um resíduo de alta toxicidade e esta não passou por nenhum tratamento de alto custo, ela apenas foi submetida a um processo de decantação, seguido de correção de pH com solução de hidróxido de sódio a 10% de concentração em massa.

A Figura 20 apresenta as curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meio de cultivo sem adição de vinhaça e com adição de 5%, 10% e 15%, cultivos E0, E1, E2 e E3, respectivamente.

Figura 20 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meio de cultivo sem adição de vinhaça (E0), com adição de 5% (E1), 10% (E2) e 15% (E3) de vinhaça



Observa-se na Figura 20 que o cultivo sem adição de vinhaça (E0) apresentou uma maior fase de adaptação que os demais cultivos devido ter iniciado com uma baixa densidade celular de $4,23 \times 10^5$ cel.mL⁻¹, diferente dos demais que iniciaram com uma população de $1,45 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ (E1), $1,81 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ (E2) e $1,49 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ (E3).

O cultivo com suplementação de 10% de vinhaça (E2) atingiu a maior densidade celular com $2,51 \times 10^8$ cel.mL⁻¹ no tempo 144 h, ou seja, sexto dia de cultivo. O cultivo E1, com 5% de vinhaça também atingiu uma densidade celular alta com $1,25 \times 10^8$ cel.mL⁻¹, no tempo 168 h. Os cultivos E0 e E3 apresentaram praticamente a mesma densidade máxima com $6,96 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ e $6,90 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, respectivamente, também com 144 h.

Ferreira (2012) estudando duas cepas de *Chlorella* sp. e uma de *Chlorella vulgaris*, cultivadas em meio BBM e sob as mesmas condições de aclimação usadas nesta pesquisa, obteve uma densidade celular máxima com $5,9 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ no cultivo da *Chlorella vulgaris* valores mais baixos que os obtidos nesta pesquisa com a adição de vinhaça.

O cultivo E3 foi o único que apresentou fase estacionária, esta iniciou no tempo 144 h. Os demais cultivos iniciaram a fase de declínio após o ponto de densidade celular máxima que se deu no sexto ou sétimo dia de cultivo.

A adição de vinhaça aos meios de cultivo proporcionou uma nova fonte de nutrientes às microalgas estimulando o crescimento heterotrófico nos períodos sem luminosidade, dessa forma os cultivos E1 e E2 puderam atingir uma maior densidade celular que o cultivo E0 que após atingir uma população de 10^7 teve seus nutrientes esgotados. O cultivo E3 apesar de ter mais nutrientes que os demais cultivos não atingiu a maior densidade celular porque a vinhaça na concentração de 15% já foi tóxica para as células dificultando o seu metabolismo.

A Tabela 7 mostra as velocidades específicas de crescimento máximas e os tempos de geração dos cultivos.

Tabela 7 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da *Chlorella* sp. nos cultivos suplementados com vinhaça

Experimento	Concentração de vinhaça (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2	t_g (h)
E0	0	0,036	0,979	19,254
E1	5	0,020	0,972	34,657
E2	10	0,018	0,987	38,508
E3	15	0,008	0,979	86,643

De acordo com a Tabela 7 o cultivo E0 apresentou maior velocidade específica de crescimento máxima com $0,036 \text{ h}^{-1}$, valor semelhante ao obtido por Marques et al., (2013) no cultivo de *Chlorella vulgaris* em 100% de vinhaça tratada anaerobicamente. Porém, Bonini (2012) também estudou o cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça tratada, mas por hidrólise ácida, diferente de Marques et al., (2013) ela obteve uma velocidade específica de crescimento máxima menor que o trabalho mencionado, $0,0024 \text{ h}^{-1}$.

Os cultivos E1 e E2, suplementados com 5% e 10% de vinhaça obtiveram valores muito próximos de velocidades específicas de crescimento máximas, $0,020 \text{ h}^{-1}$ e $0,018 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Velocidades melhores que as obtidas por Barrocal et al., (2010) no cultivo de *Spirulina máxima* em meio Schlosser suplementado com vinhaça de açúcar de beterraba, eles obtiveram $0,007 \text{ h}^{-1}$ e $0,003 \text{ h}^{-1}$.

O cultivo E3 apresentou a menor velocidade específica, com $0,008 \text{ h}^{-1}$, o que é justificado por Marques et al., (2013), eles comprovaram que a vinhaça a partir de 4% de concentração é tóxica para o crescimento da *Chlorella*.

O tempo de geração do cultivo E0 foi de 19,25 h, tempo menor que obtidos por Marques et al., (2013) no cultivo de *Chlorella vulgaris*. O melhor tempo de geração obtido por eles foi de 21,89 h.

Os cultivos E1, E2 e E3 obtiveram, respectivamente, 34,66 h, 38,51h, 86,64 h de tempos de geração, valores bem menores que os obtidos por Barrocal et al.,(2010) no cultivo de *Spirulina máxima*, este obteve 97,86 h e 207,94 h, e por Bonini (2012) no cultivo de *Chlorella vulgaris* que obteve 288,81 h. O alto tempo de geração obtido por Bonini (2012) pode estar relacionado pela falta de iluminação visto que seus cultivos foram heterotróficos, diferente de Marques et al.,(2012) que utilizou fotoperíodo de 12 h.

Comparando os cultivos E0 e E1 vemos que a adição de 5% de vinhaça proporcionou um acréscimo de 15,4 h, porém esse mesmo acréscimo entre os cultivos E1 e E2 proporcionou um aumento no tempo de geração muito baixo, menor que 4h. A diferença no tempo de geração entre os cultivos E2 e E3 foi muito alta, 48 h, um aumento de 12 vezes de acréscimo quando comparado ao aumento entre os cultivos E1 e E2.

5.1.2 Remoção da DQO dos cultivos suplementados com vinhaça

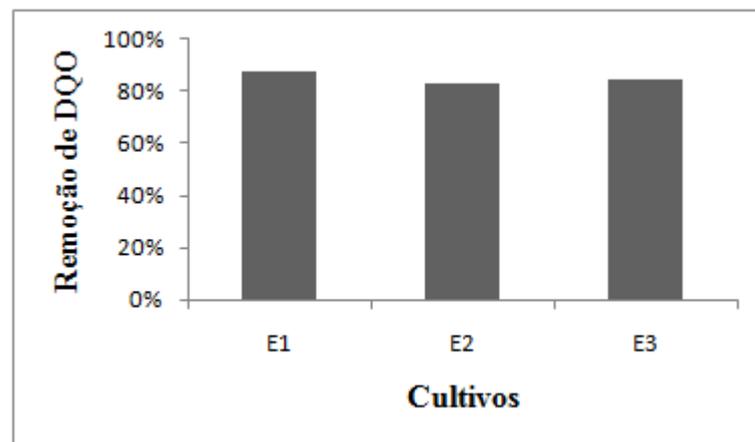
O cultivo da *Chlorella* sp. proporcionou uma alta remoção da carga poluidora dos cultivos suplementados com vinhaça. As Demandas Químicas de Oxigênio apresentadas inicialmente pelos meios de cultura dos cultivos E1, E2 e E3 foram $1528,33 \text{ mg.L}^{-1}$, 3125 mg.L^{-1} e $4583,33 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. Ao final do sexto dia esses mesmos cultivos apresentaram uma DQO de 190 mg.L^{-1} , $528,33 \text{ mg.L}^{-1}$ e 705 mg.L^{-1} . Os percentuais de remoção da DQO dos cultivos são apresentados na Tabela 08.

Tabela 8 - Remoção da DQO de cultivos com suplementação de vinhaça

Cultivo	Concentração vinhaça (%)	Remoção de DQO (%)
E1	5	87,57 ± 1,67
E2	10	83,09 ± 2,60
E3	15	84,62 ± 3,36

Observa-se na Tabela 08 que a remoção da DQO foi mais eficiente no cultivo E1 com 87,57%, seguida dos cultivos E2 e E3 com 83,09% e 84,63%, valores praticamente iguais levando em consideração os desvios padrões. A Figura 21 apresenta os dados da Tabela 08 sob a forma de gráfico.

Figura 21 - Remoção da DQO dos meios de cultivos suplementados com vinhaça



Observando a Figura 21 constata-se que as porcentagens de remoção da DQO dos cultivos foram praticamente constantes, não sofrendo variação com o aumento da concentração de vinhaça. O que provavelmente não ocorreria se as concentrações de vinhaça fossem superiores a 15%, visto que, o crescimento da microalga seria afetado negativamente. O exemplo disso é que Bonini (2012) cultivando a *Chlorella vulgaris* em 100% de vinhaça obteve apenas 25% de remoção de DQO e um baixo crescimento celular, como já foi mencionado.

Romanholo Ferreira et al., (2011) obtiveram melhores resultados que Bonini (2012) utilizando o fungo da espécie *Pleurotus sajor-caju* na biodegradação da vinhaça, eles

atingiram uma redução de 82,8% de DQO, 73,5% de DBO, 99,2% de remoção de cor e 99,7% de turbidez.

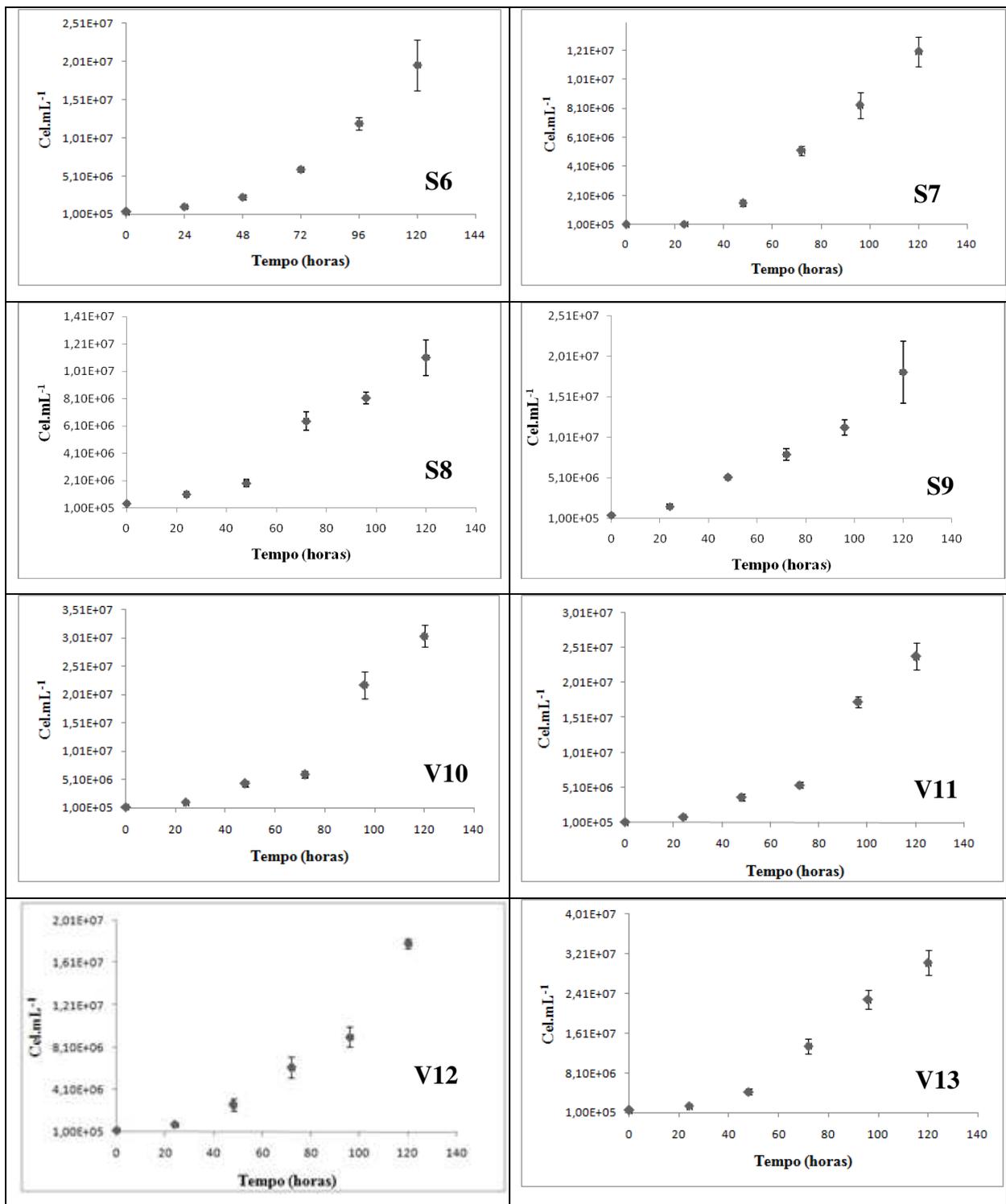
Outro trabalho foi apresentado por Bertoldi et al., (2007) utilizando a *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. Eles conseguiram uma remoção de 82,2% de amônia, 80,50% de nitrato, 84,2% de nitrito e 51,9% de fósforo total.

5.2 ETAPA 2 – CULTIVO DE *Chlorella* sp. EM MEIO SUPLEMENTADO COM RESÍDUO

5.2.1 Cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em meio suplementado com resíduos (1ª reutilização)

As curvas de crescimento dos cultivos suplementados com resíduos oriundos dos cultivos S4 e V5 são apresentadas na Figura 22.

Figura 22 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de 1ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo)



De acordo com a Figura 22 as curvas apresentaram um perfil de crescimento muito similar. Observa-se nas figuras mencionadas um aumento populacional de células da

grandeza de 10^5 a 10^7 cel.mL⁻¹ em seis dias de cultivo. Dos cultivos suplementados com resíduos oriundos do cultivo S4 o que obteve maior densidade celular foi o cultivo S6 com $1,96 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, e dos cultivos suplementados com resíduos do V5 a maior densidade celular foi obtida pelo cultivo V10 com $3,05 \times 10^7$ cel.mL⁻¹.

A partir das curvas de crescimento calculou-se as velocidades específicas de crescimento máximas e os tempos de geração. Os valores mencionados foram dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da *Chlorella* sp. nos cultivos suplementados com resíduos (1ª reutilização)

Experimento	Concentração de resíduo (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	R ²	t_g (h)
S6	25	0,035	0,996	19,80
S7	50	0,057	0,930	12,16
S8	75	0,031	0,969	22,36
S9	100	0,039	0,967	17,77
V10	25	0,044	0,967	15,75
V11	50	0,032	0,921	21,66
V12	75	0,044	0,994	15,75
V13	100	0,043	0,995	16,12

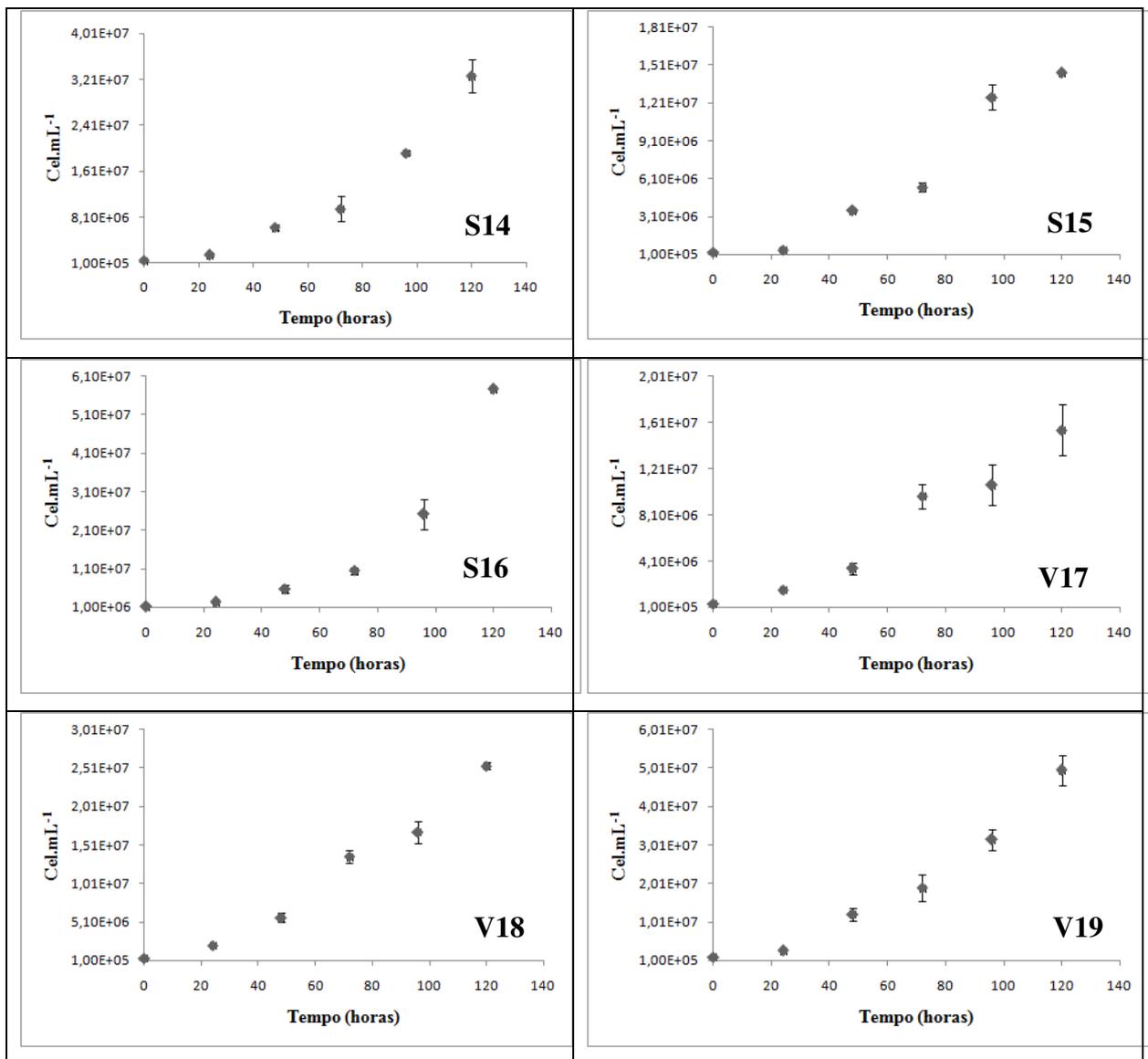
De acordo com a Tabela 9, dos cultivos suplementados com o resíduo do cultivo S4 o que obteve a melhor velocidade específica de crescimento máxima foi o cultivo S7 com 0,057 h⁻¹ e dos cultivos suplementados com resíduos oriundo do V5 os que obtiveram as melhores velocidades específicas de crescimento máximas foram os cultivos V10 e V12 com 0,044 h⁻¹. Todos os cultivos apresentaram uma velocidade específica de crescimento máxima superior aos cultivos suplementados com vinhaça (E1, E2 e E3), e valores muito próximos ou superiores ao cultivo preparado com o meio BBM modificado (E0).

O melhor tempo de geração foi obtido pelo cultivo S7 com 12,16 h e dentre os cultivos suplementados com o resíduo do V5 os que obtiveram melhor tempo de geração foram os cultivos V10 e V12 com 15,75 h. Os cultivos S7, S9, V10, V12 e V13 apresentaram menor tempo de geração que o cultivo E0 ($t_g=19,25$) e o cultivo S6 obteve uma valor aproximado.

5.2.2 Cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em meio suplementado com resíduos (2ª reutilização)

A Figura 23 apresenta as curvas de crescimento dos cultivos suplementados com resíduos reutilizados pela segunda vez.

Figura 23 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de 2ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo)



Observando a Figura 23 vê-se que as curvas apresentam um crescimento muito semelhante entre si e com as curvas da Figura 22. Os cultivos foram iniciados com uma população da grandeza de 10^5 cel.mL^{-1} , com exceção do S16 que iniciou com uma população $1,09 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$. Ao final do tempo de cultivo a maior densidade celular foi a apresentada pelos cultivos S16 com $5,77 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ e pelo V19 com $4,96 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$.

As velocidades específicas de crescimento e os tempos de gerações dos cultivos foram calculados a partir das curvas de crescimento e dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da *Chlorella* sp. nos cultivos suplementados com resíduos (2ª reutilização)

Experimento	Concentração de resíduo (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2	t_g (h)
S14	75	0,037	0,962	18,73
S15	75	0,042	0,953	16,50
S16	75	0,033	0,997	21,00
V17	25	0,042	0,988	16,50
V18	25	0,048	0,975	14,44
V19	25	0,043	0,964	16,12

Observando a Tabela 10, verifica-se que os experimentos que obtiveram as melhores velocidades específicas de crescimento máximas e os melhores tempos de geração foram os cultivos V18 com $\mu_{\text{máx}} = 0,048 \text{ h}^{-1}$ e $t_g = 14,44 \text{ h}$ e o V19 com $\mu_{\text{máx}} = 0,043 \text{ h}^{-1}$ e $t_g = 16,12 \text{ h}$. Os dois cultivos foram suplementados com resíduos a princípio originados do cultivo V5 (com vinhaça).

Todos os cultivos apresentaram velocidades específicas de crescimento mais altas e menores tempos de geração que os cultivos suplementados com vinhaça (E1, E2 e E3) e com exceção do S16 também obtiveram velocidades específicas maiores e tempos de geração menores que o cultivo E0.

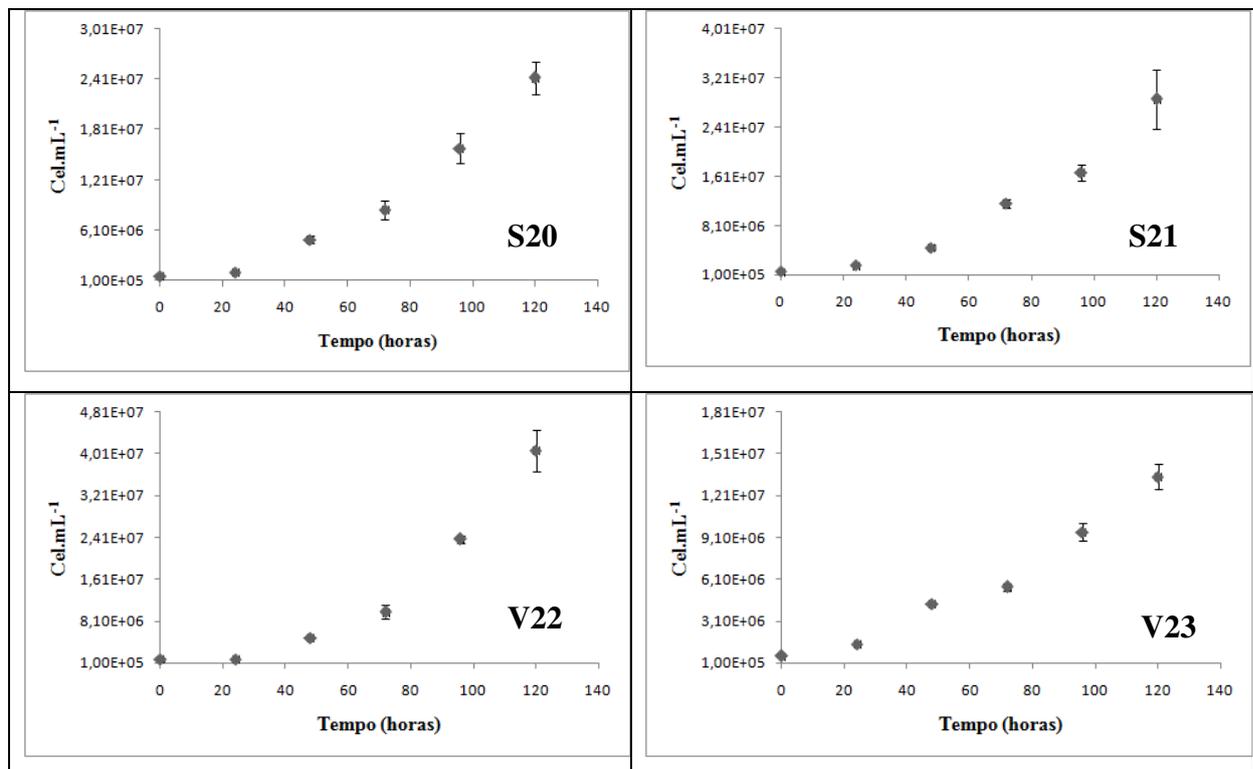
Os cultivos V17, V18 e V19 que receberam suplementação de resíduos a princípio oriundos do experimento V5, tendo por tanto baixas concentrações de vinhaça, apresentaram melhor taxa de crescimento e menores tempos de geração que os cultivos S14, S15 e S16.

No geral os resultados obtidos com os cultivos suplementados com resíduos de segunda reutilização (S14 a V19) foram melhores que os obtidos com os cultivos suplementados com resíduos de primeira reutilização (S6 a V13).

5.2.3 Cinética de crescimento da *Chlorella* sp. em meio suplementado com resíduos (3ª reutilização)

As curvas de crescimento dos cultivos suplementados com resíduos reutilizados pela terceira vez são apresentadas na Figura 24.

Figura 24 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meios de cultivos suplementados com resíduos de 3ª reutilização (a numeração de cada Figura corresponde ao próprio cultivo)



De acordo com a Figura 24, os cultivos que apresentaram maior densidade celular foram os cultivo V22 com $4,07 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ e o S21 $2,88 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$. Todos os cultivos iniciaram com uma densidade populacional na gradeza de 10^5 cel.mL^{-1} e atingiram uma população de 10^7 cel.mL^{-1} , apresentando um ótimo crescimento. A Tabela 11 apresenta as velocidades específicas de crescimento e os tempos de gerações dos cultivos .

Tabela 11 - Velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{\text{máx}}$) e tempos de geração (t_g) da *Chlorella* sp. nos cultivos suplementados com resíduos (3ª reutilização)

Experimento	Concentração de resíduo (%)	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2	t_g (h)
S20	40	0,035	0,963	19,8
S21	40	0,035	0,979	19,8
V22	25	0,035	0,953	19,8
V23	25	0,028	0,952	24,73

De acordo com a Tabela 11, observa-se que os cultivos S20, S21 e E2 obtiveram as mesmas velocidades específicas e os mesmos tempos de geração, $\mu_{\text{máx}}=0,035\text{h}^{-1}$ e $t_g=19,8\text{h}$, os quais foram melhores que a velocidades específica máxima e o tempo de geração do cultivo V23, $\mu_{\text{máx}}=0,028\text{h}^{-1}$ e $t_g=24,73\text{h}$.

Os cultivos S20, S21, V22 e V23 apresentaram velocidades específicas de crescimento mais altas e menores tempos de geração que os cultivos suplementados com vinhaça (E1, E2 e E3). Os cultivos S20, S21, V22 também obtiveram melhores resultados que o cultivo S20 com , $\mu_{\text{máx}}=0,036\text{h}^{-1}$ e $t_g=19,25\text{h}$.

No geral, as velocidades específicas de crescimento máximas e os tempos de geração dos cultivos, obtidos com suplementação de resíduos de terceira reutilização, não foram melhores que os obtidos pelos experimentos de primeira e segunda reutilização, mas diferença entre eles e o cultivo E0 é tão pequena que a produção em larga escala justifica a reutilização do resíduo visando os efeitos benéficos da diminuição de descartes de resíduos e da economia de água proporcionada ao processo.

5.3 ETAPA 3 – QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE LIPÍDIOS E AÇÚCARES REDUTORES DAS BIOMASSAS

5.3.1 Teores de lipídios totais contidos nas biomassas

Os teores de lipídios totais contidos nas biomassas “A” e “B” cultivadas em meio BBM modificado e em meio BBM modificado suplementado com vinhaça foram descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Teores de lipídios totais nas biomassas

Experimento	Concentração vinhaça (%)	Teor de lipídios (%)
A	0	14,70 ± 0,34
B	10	11,50 ± 0,58

De acordo com Tabela 12 a biomassa “A” apresentou 14,70% de lipídios e a biomassa “B” apresentou 11,50% de lipídios. Isso indica que a introdução da vinhaça ao meio de cultivo favoreceu a produção de biomassa, mas que não favoreceu a produção de lipídios.

Segundo Ratledge (2004) para que se consiga aumentar a produção de lipídios em um microrganismo este deve ser cultivado em meio rico de carbono, mas com limitação de nitrogênio afim de que o microrganismo cresça e esgote as fontes de nitrogênio, canalizando todo o consumo de carbono para a produção de lipídios. Os BBM’s modificados utilizados nos cultivos “A” e “B” continham a mesma proporção de carbono/nitrogênio, mas a adição de vinhaça ao meio de cultivo “B” desequilibrou a relação C/N visto que a vinhaça é rica em nitrogênio. Dessa forma, está justificada a diferença no teor de lipídios das amostras.

Ainda assim, os valores obtidos nas biomassas foram melhores que os referenciados na literatura para o cultivo de microalgas do gênero *Chlorella* sp.

Gouveia e Oliveira (2009) analisaram seis espécies de microalgas quanto aos teores de lipídios, dentre elas a *Chlorella vulgaris* que apresentou um baixo teor de lipídios com apenas 5,1%. Porém, utilizando o meio de cultivo BBM, Ferreira (2012) obteve 8,56% de lipídios no cultivo de *Chlorella vulgaris* e 9,26% quando cultivada em meio suplementado com concentrado de dessalinização.

Matos et. al, (2015) estudaram os teores de proteínas e lipídios de *Chlorella* sp. cultivadas em concentrado de dessalinização residual e obtiveram 11,4% como o maior teor de lipídeos dentre os cultivos.

5.3.2 Teores de sólidos solúveis

Os teores de sólidos solúveis extraídos das amostras com diferentes proporções de solvente estão exibidos na Tabela 13.

Tabela 13 - Teor de sólidos solúveis nas biomassas

Amostra	Proporção amostra:solvente	Teor de Sólidos Solúveis (°Brix)
AB	1:1	0
AB	1:4	15,5
AB	1:5	10,8
AB	1:6	6,4
A	1:4	17,00 ± 0,87
B	1:4	8,5 ± 1,73

De acordo com a Tabela 13, a proporção de amostra/solvente que favoreceu a maior extração de sólidos solúveis foi a proporção 1:4 que extraiu 15,5 ° Brix da amostra “AB”. Utilizando essa mesma proporção verificou-se os teores de sólidos solúveis das amostras “A” e “B” e a amostra “A” apresentou maior teor de sólidos solúveis com 17 ° Brix enquanto a amostra “B” apresentou 8,5 ° Brix.

5.3.3 Teores de açúcares redutores

Os teores de açúcares redutores presentes nas biomassas “A” e “B” estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Teor de açúcares redutores nas biomassas

Experimento	Concentração vinhaça (%)	Teor de AR (%)
A	0	0,59 ± 0,01
B	10	0,33± 0,02

Os teores de açúcares redutores extraídos das amostras analisadas estão proporcionalmente de acordo com os resultados obtidos nas análises de sólidos solúveis. A biomassa “A” cultivada em meio BBM modificado apresentou maior quantidade de açúcares

redutores com 0,59%, enquanto a biomassa “B” cultivada em meio BBM modificado suplementada com 10% de vinhaça apresentou 0,33% de AR.

Os açúcares redutores compõem, em geral, os monossacarídeos e dissacarídeos, que são açúcares fermentescíveis. Os principais carboidratos da composição celular das microalgas são o amido e a celulose. A biomassa de microalgas deve ser hidrolisada para que esses carboidratos sejam convertidos em açúcares redutores.

Fu et al., (2010) estudaram a hidrólise da parede celular da *Chlorella* sp. por meio da reação enzimática com enzimas imobilizadas. Utilizando a celulase sob ótimas condições de hidrólise converteu 62% de celulose em açúcares redutores.

Segundo Brányiokavá et al., (2011) os fatores que afetam a produção de amido pela *Chlorella* são a iluminação resultante entre a intensidade da luz incidente e a concentração de biomassa. O consumo de amido pela própria microalga para manutenção dos processos metabólicos, em especial da reprodução, também é um fator chave na produção de amido. Dessa forma para produzir uma biomassa rica em amido é necessário evitar a divisão celular o que pode ser feito através diminuição de nitrogênio ou enxofre.

Como a produção de açúcares redutores também é influenciada pela intensidade da luz a biomassa do cultivo “B”, suplementado com vinhaça, pode ter sido prejudicada pelo escurecimento da vinhaça após a correção do pH. Visualizando a Figura 16 é possível comparar as diferentes cores dos cultivos “A” e “B”.

6. CONCLUSÃO

Por meio dos estudos desenvolvidos de suplementação do meio de cultivo da microalga, *Chlorella* sp. com adição de vinhaça e resíduos de cultivos, pode se concluir:

- Os cultivos suplementados com 5 e 10% de vinhaça apresentaram maior densidade celular que o cultivo produzido apenas em meio BBM modificado;
- As taxas de crescimento máximas e os tempos de geração dos cultivos com 5 e 10% de vinhaça foram muito próximas, diferente do cultivo suplementado com 15% de vinhaça que apresentou inibição no crescimento;
- As porcentagens de remoção da DQO dos cultivos foram elevadas, em média 85%, não sofrendo grandes variações com o aumento da concentração de vinhaça;
- As reutilizações dos resíduos de cultivo como suplementação ao meio de cultura proporcionaram um ótimo crescimento, sendo a segunda reutilização a que mais favoreceu o crescimento celular;
- Os cultivos suplementados com resíduos originados do experimento V5 (com vinhaça) apresentaram melhor crescimento que os cultivos suplementados com resíduos originados do S4 (sem vinhaça), nos estudos de primeira e segunda reutilização dos resíduos;
- A utilização da vinhaça como suplementação ao meio de cultivo diminuiu a produção de lipídios e açúcares redutores pela *Chlorella* sp.;
- Estudos mais aprofundados devem ser realizados para uma melhor caracterização da biomassa para verificar a influência da suplementação do meio com vinhaça na produção de proteínas e carboidratos totais.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALFAFARA, C. G.; NAKANO, K.; NOMURA, N.; IGARASHI, T.; MATSUMURA, M. Operating and scale-up factors for the electrolytic removal of algae from eutrophied. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 77, p -871-876, 2002.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina Platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciênc. agrotec.**,v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

BALAT, M., BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273-2282, 2009.

BARROCAL,V.M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁ LEZ-BENITO, G.;COCA, M. Production of biomass by *Spirulina máxima* using sugar cane beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v.27, n.6, p. 851-856, 2010.

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. **Biotechnology and Exploratio of algae- The Índia Approach.** IGC/AICPA. Magalore: Sharada, 1981. p. 24-79.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA. K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v.5, p. 235-241, 1993.

BENEMAN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Journal of Industrial Microbiology**, v.31, n.5, p.247-256, 1990.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia das microalgas, **B. CEPPA**, v.26, n.1, p. 9-20, 2008.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 85-92, 2007.

BONINI, M. A. **CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Aphanothece microscópica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E EM VINHAÇA.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agricultura e Ambiente, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E, W. Cinética de processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.,. **Biotecnologia Industrial.** São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.2, p.93-122, 2001.

BRÁNYIKOVÁ, I.; MARSÁLKOVÁ, B.; DOUCHA, J.; BRÁNYIK, T.; BISOVÁ, K.; ZACHLEDER, V.;VÍTOVÁ, M. Microalgae-Novel Highly Efficient Starch Producers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 4, p. 766-776, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Águas. **Manual de conservação e reuso de água na agroindústria sucroenergética**; Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; União da Indústria da Cana-de-Açúcar; Centro de Tecnologia Canavieira. - Brasília: ANA, 2009. 288 p.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis : 2014** / Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. - Rio de Janeiro : ANP, 2008, 2014.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balço Energético Nacional 2013 – Ano base 2012; Relatório Síntese**. Rio de Janeiro; EPE, 2013. 55p.

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**. v.14, p.557-577, 2010.

CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, out./dez. 2011.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnol.**v.26, n. 3, p. 126-131, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advanced**, v. 25, p. 294-306, 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F-J. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p.. 21-34, 2004.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 6, p. 686-702, Nov-Dec 2011. ISSN 1873-1899

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potencial of *Spirulina*. **Ann. Rev. Microbiology**, v.39, p.503-526, 1985.

CONNON, R. **Culturing of *Chlorella vulgaris*** – Standard Operating Procedure, SOP on how to prepare Bold's Basal Medium (BBM), 2007. University of Reading.

COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentaos**. 1999. 204p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Fundação Universidade Federal di Rio Grande, Rio Grande. 1999.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967. 2006.

ELIA NETO, A.; NAKAHODO, T. (1995). **Caracterização físico-química da vinhaça**: relatório técnico da seção de tecnologia do tratamento de águas do centro de tecnologia Copersucar. Piracicaba, 1995. 26 p. (Projeto nº 9500278).

FERNANDES, M. S. M. **separação de microalgas através de membrana de osmose inversa e cerâmica com aproveitamento do permeado para futuros cultivos**. dissertação (mestrado em engenharia química) – UFCG – Campina Grande, 2013.

FERREIRA, W. B.; **Aproveitamento do concentrado da dessalinização via osmose inversa para desenvolvimento de *Chlorella sp.* E *Chlorella vulgaris* visando a produção de biocombustível**. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-UFCG, Campina Grande-PB, 2012.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J. Biol. Chem.** v. 226 (1), p.497-509, 1957.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Guaíba: Agropecuária**, 2000. 203p.

FU, C-C.; HUNG, T-C.; CHEN, J-Y.; SU, C-H.; WU, W-T. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extractio. **Bioresour. Technol.**, v.101, p. 8750–8754, 2010.

GOUVEIA, L. ; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 269–274, 2009.

GOUVEIA, L. **Microalgae as a feedstock for biofues**. Springer briefs in microbiology. Springer, 2011.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnol. Adv**, v. 20, p. 491–515, 2003.

GUDIN, C.; THERPENIER, C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae . **Adv. Biotechnol. Processes**, v. 6, p. 73–110, (1986).

GUIRY, M. D. AlgaBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2015. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>> . Acesso em: 15 out. 2015.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, 2012.

HALIM, R.; HARUN, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Microalgae cell disruption for biofuel development. **Applied Energy**, v. 91, p. 116-121, 2012.

HARUN, R. Thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p.990–999, 2015.

HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O' CONNOR, W.; SUSHAMES, T.; FOULKES, L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs - a summary. **Aquacult Res**, v. 31, p.637– 659, 2000.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen médium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27 , p. 631–635, 2000.

JAMALI, H.; AHMADIFARD, N.; ABDOLLAHI, D. Evaluation of growth, survival and body composition of larval white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed the combination of three types of algae. **Int Aquat Res**, v.7, p.115–122, 2015.

LACAZ-RUIZ, R. **Utilização de meios de cultura a base de solução de cinzas, efluente da indústria cítrica e meios de cultura alternativos formulados através de programa específico de computação para cultivo de *Spirulina platensis* (Norst.)** 1996. 133p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1996.

LEE, A. K.; LEWIS, D. M.; ASHMAN, P. J. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. **Biomassa and Bioenergy**, v. 46, p. 89-101, 2012.

LEE, J-Y.; YOO, C.; JUN, S-Y.; AHN, C-Y.; OH H- M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresour Technol**, v. 101, p. S75-S77, 2010.

LIMA, E. E.; SILVA, F. L. H.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, A. S.; NETO, J. M. S. Produção de etanol de segunda geração proveniente do bagaço do pedúnculo do caju. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 2, p. 26 – 35, 2015.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa. 606 p, 2006.

MALLICK, N. et al.. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 87, p.137 – 145, 2012.

MARQUES, S. S. I.; NASCIMENTO, I. A.; ALMEIDA, P. F.; CHINALIA, F. A. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse:The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Appl Biochem Biotechnol**, v.171, p.1933–1943, 2013.

MATA, T. M.; MARTINS, A.A; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.217-232, 2010.

MATOS, A. P.; MORIOKA, L. R. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. Cultivated in residual concentrated desalination. **Ciência Rural**, v.45, n.2, p.364-370, 2015.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426 – 428, 1959.

MUSSGUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLUTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 51–56, 2010.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 6, p.558-564, 1996.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.459-466, 2003.

PAULO, V.P.F., **Optimização da produção de açúcares por microalgas para a produção de bioetanol**, Dissertação (mestrado em engenharia alimentar), p 116, Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

PEÑARANDA, M. T. A.; ROLDÁNI, A. J. M.; VILLANUEVA, R. O. C.; Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. **Acta Bio. Colomb.**, v. 18, n.1, p.43-68, 2013.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, S. R.; KONWAR, K. B.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potencial bio-energy feedstock, **Applied Energy**, 2011.

RAHEEM, A.; WAN AZLINA, W. A. K. G.; TAUFIQ YAP, Y. H.; DANQUAH, M. K.; RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. **Biochimie**, v. 86, p. 807–815, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1992.

ROMANHOLO FERREIRA, L. F.; AGUIAR, M. M.; MESSIAS, T. G.; POMPEU, G. B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A. M. SILVA, D. P.; MONTEIRO, R. T. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.132–137, 2011.

RUBIO, J.; SOUZA, M. L.; SMITH, R. W. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 139-155, 2002.

RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. In: Blue light effects in biological, Systems. Berlin, **Springer-Verlag**, p. 283 - 301, 1984.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGUNG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. **Bioenerg Res**, 1: 20-43, 2008.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v.4, n.01, p.48-60, 2012.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108–114, 2007.

SOUZA, M. P.;BJERK, T. R.; GRESSLER, P.D.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, V. A.; MORAES, M. S. A. as microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis parte i: bioetanol. **TECNO-LÓGICA**, v. 16, n. 2, p. 108-116, 2012.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. **J. Renew. Sust. Energ.** 2, 012701.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and change in $K_{1/2}(\text{CO}_2)$ of photosynthesis in *C. vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, v. 32, p. 379-384, 1991.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.

WEIER, T. E.; STOCKING, C. R.; BARBOUR, M. G.; ROST, T. L. **Botany: An introduction to plant biology**. Editora Wiley, 1982, 720 p.