



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

IANA CHAIENE DE ARAUJO VIDAL

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS
ENTRE AS MICROALGAS *Chlorella* sp. E *Scenedesmus* sp. CULTIVADAS EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

**CAMPINA GRANDE
2016**

IANA CHAIENE DE ARAUJO VIDAL

**ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS
ENTRE AS MICROALGAS *Chlorella* sp. E *Scenedesmus* sp. CULTIVADAS EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, como exigência para obtenção do título de Engenheiro Sanitarista e Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira.

**CAMPINA GRANDE
2016**

Ficha catalográfica

V648e Vidal, Iana Chaiene de Araujo.
Estudo da potencialidade de produção de biocombustíveis
entre as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultivadas em
águas residuárias [manuscrito] / Iana Chaiene de Araujo Vidal. -
2016.

101 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia
Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro
de Ciências e Tecnologia, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira,
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental".

1. Biocombustíveis. 2. Biodiesel. 3. Microalgas. 4. Águas
residuárias. I. Título.

21. ed. CDD 662.88

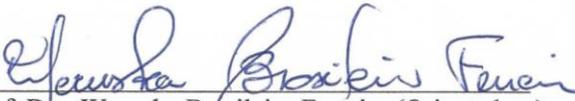
IANA CHAIENE DE ARAUJO VIDAL

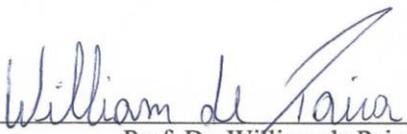
ESTUDO DA POTENCIALIDADE DE PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS ENTRE
AS MICROALGAS *Chlorella* sp. E *Scenedesmus* sp. CULTIVADAS EM ÁGUAS
RESIDUÁRIAS

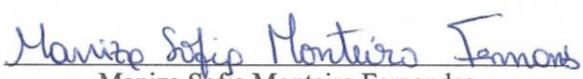
Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, como exigência para obtenção do título de Engenheiro Sanitarista e Ambiental.

Aprovada em: 18/10/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Prof. Dr. William de Paiva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)


Maniza Sofia Monteiro Fernandes
Mestre em Engenharia Química (UFCG)
Doutoranda em Engenharia Química (UFCG)

Aos meus pais, Cosme e Ivanilda, por serem o alicerce
de toda minha caminhada, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte inesgotável de amor e misericórdia, que nunca me desampara e sempre me concede forças para persistir na luta diária da vida.

Aos meus pais, por todo sacrifício realizado no intuito de me proporcionar sempre o melhor. Pelo exemplo de batalha e determinação ao qual me inspiro e almejo para minha vida.

A minha irmã, Yanne, pela relação mútua de carinho e cumplicidade além de todo apoio e confiança a mim cedido.

A todos os meus familiares, por sempre acreditarem no meu sucesso, em especial aos meus avós os quais sempre mantivemos um laço de carinho e cuidado fraterno.

A Elenilson, pessoa especial que o Senhor colocou em minha vida, por toda ajuda, paciência e companheirismo, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos como também sempre me confortando nos momentos difíceis.

A minha inestimável orientadora, Profa. Dra. Weruska Brasileiro, por ter me acompanhado desde o início dessa graduação através de suas orientações, ensinamentos e aconselhamentos. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração tanto pela sua competência profissional quanto pela pessoa que és.

Aos colegas de curso pelos momentos de amizade compartilhados, em especial, Danielle e Isabel, amigas as quais levarei para a vida toda.

Ao Grupo de Oração JUCRE, por toda amizade e fraternidade compartilhada.

Aos meus demais amigos, em especial a Alanne, Iasmim, Ionara e Nilmara por sempre estarem ao meu lado, contribuindo grandemente na minha vida.

Ao grupo de pesquisa em Microalgas, sem o qual dificilmente teria êxito em concluir todos os procedimentos experimentais, em especial a Thiago Santos, por toda ajuda e apoio concedido no desenvolver desse estudo.

A todos os Professores do DESA, pelos conhecimentos passados durante todos os cinco anos de graduação.

A Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira que, cordialmente, disponibilizou o Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG para realização de parte da análise dos lipídios.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental da UEPB, por toda infraestrutura que possibilitou a execução deste trabalho.

A Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários, por fornecerem gentilmente o efluente de UASB para as diversas atividades.

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

*“Espera no Senhor e fazei o bem; habitarás a
terra em plena segurança.
Põe tuas delícias no Senhor, e os desejos do
teu coração Ele atenderá.
Confia ao Senhor a tua sorte, espera nEle, e
Ele agirá.
Como a luz, fará brilhar a tua justiça; e como
o sol do meio-dia, o teu direito.
Em silêncio, abandona-te ao Senhor, põe tua
esperança nEle. Não invejes o que prospera
em suas empresas, e leva a bom termo seus
maus desígnios.”*

Salmo 37

RESUMO

Diante da iminente escassez dos recursos energéticos originados do petróleo e seus derivados, juntamente com os impactos ambientais causados pelo consumo desenfreado de recursos naturais, faz-se necessário a busca por produção de energias alternativas e limpas. Nesse contexto, surgem as microalgas como fontes potenciais de produção de biocombustíveis, por sua elevada taxa de crescimento e capacidade produtiva de lipídios e carboidratos. No entanto, o alto custo de produção ainda inviabiliza o processo, dessa forma, esse trabalho busca aumentar e avaliar a produção de microalgas utilizando como meio alternativo efluente de tratamento anaeróbico de esgoto doméstico e assim atenuar tais custos, bem como promover um destino adequado para esses resíduos líquidos, que se lançados em corpos hídricos poderão acarretar na eutrofização dos mesmos. No presente trabalho foram estudadas as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., cultivadas em meio *Bold's Basal Medium* (BBM) e em meio *Wright's Cryptophyte* (WC), respectivamente. Esses meios de cultivo foram submetidos a variações de pH e luminosidade, e a partir da condição ótima de crescimento foram adicionadas diferentes concentrações de efluente oriundos do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico. Foram determinadas as velocidades específicas de crescimento máximas, os tempos de geração e a produtividade em todos os cultivos realizados. Nos cultivos suplementados com efluente de UASB além dos parâmetros citados foram determinadas as remoções de Demanda Química de oxigênio dos mesmos. Foram quantificadas a produtividade lipídica da biomassa da *Chlorella* sp. cultivadas com 50% de efluente e da biomassa da *Scenedesmus* sp. cultivadas em 100% de efluente. Constatou-se que ambas as microalgas apresentaram melhor desenvolvimento celular em meios alcalinos e com tempos elevados de luminosidade. Quando avaliadas as concentrações de efluente adicionadas ao meio de cultivo verificou-se que para a *Chlorella* sp. a concentração ideal de desenvolvimento é de 50% enquanto que para a *Scenedesmus* sp. é de 100%. Os parâmetros cinéticos e as produtividades mais expressivas foram da microalga *Chlorella* sp. As remoções de DQO foram mais eficientes nos cultivos com a *Chlorella* sp. alcançando redução de 62,95%. A biomassa da *Chlorella* sp. cultivada com suplementação de 50% de efluente apresentou 18,14% de lipídios, enquanto que a biomassa da *Scenedesmus* sp. cultivada com adição de 100% de efluente revelou 10,42% de lipídios. Os métodos estatísticos evidenciaram correlação apenas entre os parâmetros velocidade específica de crescimento, tempo de geração e remoção de DQO. A produtividade mostrou-se independente dos demais parâmetros. Realizando a comparação das microalgas em estudo por meio da análise de variância dos parâmetros avaliados, observou-se que a *Chlorella* sp. apresenta-se com a mais viável a produção de biodiesel.

Palavras-Chave: Microalgas, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., biocombustíveis, águas residuárias.

ABSTRACT

In the face of imminent scarcity of energy resources derived from oil and its derivatives, together with the environmental impacts caused by rampant consumption of natural resources, it is necessary to search for the renewable and clean energy. In this sense, there are microalgae as biofuel production potential sources, due to its high growth rate and the production capacity of lipids and carbohydrates. However, the high cost of production still infeasible the process, in this way, this work seeks to increase and assess the production of microalgae using as a means of alternative effluent of anaerobic treatment of domestic sewage and thus mitigate such costs, as well as to promote a suitable destination for these waste liquids, which if released into water bodies can result in eutrophication of the same. In the present work were studied in the microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp., cultivated in the middle *Bold's Basal Medium* (BBM) and in the middle of *Wright's Cryptophyte* (WC), respectively. These means of cultivation were subjected to variations of pH and luminosity, and from the condition optimum growth were added different concentrations of the effluent from the anaerobic treatment of domestic sewage. Were determined the specific speeds of growth maximum, the generation times and productivity in all the crops performed. In cultivations supplemented with effluent of UASB in addition to the parameters mentioned were determined the removals of Chemical Demand of oxygen of the same. Were quantified productivity the lipid from the biomass of *Chlorella* sp. grown with 50% effluent and the biomass of *Scenedesmus* sp. grown in 100% effluent. It was found that both microalgae showed the best cell growth in the means alkali and with times of high brightness. When evaluated the concentrations of effluent added to the culture medium it was found that for the *Chlorella* sp. the optimal concentration of development is 50% while for *Scenedesmus* sp. it is 100%. The kinetic parameters and yields the more expressive were of unicellular *Chlorella* sp. The removals of DQO were more efficient in crops with *Chlorella* sp. achieving reduction 62,95%. The biomass of *Chlorella* sp. cultivated with supplementation of 50% of the effluent presented 18,14% of lipids, while the biomass of *Scenedesmus* sp. cultivated with the addition of 100% of the effluent revealed 10,42% of lipids. The statistical methods showed a correlation only between the parameters specific speed of growth, generation time and the removal of DQO. The productivity proved to be independent of the other parameters. Performing the comparison of the microalgae in the study by means of analysis of variance of the evaluated parameters, it was observed that the *Chlorella* sp. it presents with the most viable production of biodiesel.

Keywords: Microalgae, *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., biofuels, wastewaters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Oferta de Energia Mundial	17
Figura 2 - Oferta Interna de Energia no Brasil	18
Figura 3 - Curva de crescimento microbiano representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B)	29
Figura 4 - Produção de biocombustíveis e bioprodutos combinados com assimilação de nutrientes de efluentes e biomitigação de CO ₂	32
Figura 5 - Processos de conversão da biomassa microalgal em biocombustíveis.....	35
Figura 6 - Equação Estequiométrica da Reação de Transesterificação	36
Figura 7 - Fotomicrografia das microalgas <i>Chlorella</i> sp. (a) e <i>Scenedesmus</i> sp. (b).....	40
Figura 8 - Aclimação dos cultivos das microalgas	42
Figura 9 - Tratamento físico do efluente de UASB.....	46
Figura 10 - Bloco digestor utilizado na análise de DQO.....	47
Figura 11 - <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio suplementado com efluente de UASB no fotobioreator de 6L	49
Figura 12 - Processo de separação da biomassa	49
Figura 13 - Processo de determinação de lipídios	51
Figura 14 - Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. em meio BBM.....	53
Figura 15 - Curvas de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. sob variações de pH.....	54
Figura 16 - Curvas de crescimento da microalga <i>Chlorella</i> sp. sob variações de luminosidade	57
Figura 17 - Curva de crescimento da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio WC.....	59
Figura 18 - Curvas de crescimento da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. sob variações de pH	60
Figura 19 - Curvas de crescimento da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. sob variações de luminosidade.....	63
Figura 20 - Curvas de crescimento da <i>Chlorella</i> sp. em meio BBM suplementado com diferentes proporções de efluente de UASB.....	65
Figura 21 - Curvas de crescimento da <i>Scenedesmus</i> sp. em meio WC suplementado com diferentes proporções de efluente de UASB.....	71
Figura 22 - Comportamento da concentração celular das microalgas <i>Chlorella</i> sp. (a) e <i>Scenedesmus</i> sp.(b) sob variações de pH.....	77
Figura 23 - Comportamento da concentração celular das microalgas <i>Chlorella</i> sp. (a) e <i>Scenedesmus</i> sp.(b) sob variações de luminosidade	78

Figura 24 - Comportamento da concentração celular das microalgas <i>Chlorella</i> sp. (a) e <i>Scenedesmus</i> sp.(b) suplementados com diferentes proporções de efluente de UASB.....	78
Figura 25 - Comparativo dos resultados da remoção de DQO e da produtividade entre as microalgas estudadas	79
Figura 26 - Análise das Componentes Principais para <i>Chlorella</i> sp.	82
Figura 27 - Análise das Componentes Principais para <i>Scenedesmus</i> sp.	84
Figura 28 - Comparação das velocidades específicas de crescimento das microalgas em estudo	85
Figura 29 - Comparação dos tempos de geração das microalgas em estudo.....	85
Figura 30 - Comparação das produtividades das microalgas em estudo.....	86
Figura 31 - Comparação das remoções de DQO das microalgas em estudo.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento de extração de óleo	19
Tabela 2 - Comparativo entre sistemas de cultivos abertos e fechados.....	25
Tabela 3 - Composição química das microalgas expressas em base de massa seca (%)	33
Tabela 4 - Composição do meio sintético BBM.....	41
Tabela 5 - Composição do meio sintético WC.....	41
Tabela 6 - Condições de pH utilizadas nos cultivos das microalgas	46
Tabela 7 - Condições de luminosidade utilizadas nos cultivos das microalgas	46
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de <i>Chlorella</i> sp. sob variações de pH	55
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de <i>Chlorella</i> sp. sob variações de luminosidade.....	58
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. sob variações de pH	61
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. sob variações de luminosidade.....	62
Tabela 12 - Parâmetros avaliados nos cultivos de <i>Chlorella</i> sp. suplementados com efluente de UASB.....	68
Tabela 13 - Parâmetros avaliados nos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp. suplementados com efluente de UASB.....	73
Tabela 14 - Influência do banho ultrassônico na extração de lipídios.....	76
Tabela 15 - Resultado comparativo entre as microalgas estudadas.....	80
Tabela 16 - Matriz de correlação para a <i>Chlorella</i> sp.	81
Tabela 17 - Matriz de correlação para a <i>Scenedesmus</i> sp.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise em Componentes Principais
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i>
CCAP	Centro de Cultura de Algas e Protozoários
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
FAD	Flotação por ar dissolvido
PBRs	Fotobioreatores
IEA	International Energy Agency
OMS	Organização Mundial da Saúde
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acid
lux	unidade de iluminância
UASB	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i>
WC	<i>Wright's Cryptophyte</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL	16
2.1.1 Matriz Energética Nacional	18
2.2 BIOCOMBUSTÍVEIS	19
2.3 MICROALGAS	21
2.3.1. Chlorococcales: <i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	22
2.3.2 Cultivo	23
2.3.2.1 Cultivo em águas residuárias	26
2.3.2.1.1 <i>Tratamento de águas residuárias</i>	27
2.3.3 Crescimento	28
2.3.4 Métodos de Separação da Biomassa	30
2.3.5 Aplicação Biotecnológica	31
2.3.5.1 Lipídios nas microalgas	33
2.3.5.1.1 <i>Extração de Lipídios</i>	34
2.3.5.1.2 <i>Produção do Biodiesel</i>	34
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
2.4.1 Estatística descritiva	37
2.4.1.1 Correlações	37
2.4.1.2 Análise em Componentes Principais	38
2.4.2 Estatística Inferencial	38
3 METODOLOGIA	40
3.1 MICROALGA <i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	40
3.2 MEIO DE CULTIVO	40
3.2.1 Águas residuárias	42
3.3 ACLIMATAÇÃO DOS CULTIVOS	42
3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS MICROALGAS	42
3.4.1 Crescimento	42
3.4.2 Velocidade específica de crescimento	43

3.4.3 Tempo de geração	44
3.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE	44
3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	45
3.6.1 Desenvolvimento da 1º Etapa	45
3.6.2 Desenvolvimento da 2º Etapa	46
3.6.3 Desenvolvimento da 3º Etapa	48
3.6.4 Desenvolvimento da 4º Etapa	51
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1 CULTIVO DE MICROALGAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICA	53
4.1.1 <i>Chlorella</i> sp. sob diversas condições de pH	53
4.1.2 <i>Chlorella</i> sp. sob diversas condições de luminosidade	56
4.1.3 <i>Scenedesmus</i> sp. sob diversas condições de pH	58
4.1.4 <i>Scenedesmus</i> sp. sob diversas condições de luminosidade	61
4.2 CULTIVO DAS MICROALGAS EM EFLUENTE DE UASB	64
4.2.1 <i>Chlorella</i> sp. cultivada em meio BBM suplementado com efluente de UASB	64
4.2.2 <i>Scenedesmus</i> sp. cultivada em meio WC suplementado com efluente de UASB	70
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES LIPÍDICOS DAS MICROALGAS	75
4.3.1 Lipídios na <i>Chlorella</i> sp.	75
4.3.2 Lipídios na <i>Scenedesmus</i> sp.	75
4.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS MICROALGAS	77
5.0 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O mundo atual está enfrentando muitos desafios ambientais como a crise energética, a poluição da água, do ar e do solo, aquecimento global, e outros. Destes, a crise energética apresenta-se como um dos problemas mais críticos neste novo milênio.

O esgotamento das reservas de combustíveis fósseis vinculado ao aumento da procura global de energia e sua associação com a emissão de gases do efeito estufa eclodiram na necessidade do desenvolvimento de fontes energéticas alternativas renováveis, biodegradáveis, de produções limpas e atóxicas, que apresentem custo competitivo com as atuais fontes de energia e que ocasionem os menores impactos possíveis ao meio ambiente.

Nesse contexto, uma alternativa que tem se destacado é o uso de biocombustíveis, que são considerados como todo produto útil para a geração de energia obtido total ou parcialmente de biomassa (TOLMASQUIM, 2003). Silva e Konradt-Moraes (2015) também definem biocombustíveis como energias renováveis, oriundas de produtos vegetais e animais, que liberam de maneira significativa, menor quantidade de poluentes em relação aos combustíveis derivados do petróleo.

No Brasil, juntamente com o etanol, o biodiesel compõe uma oferta importante para o segmento de combustíveis. De acordo com o Boletim Mensal do Biodiesel (06/2016), atualmente existem 51 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP para operação no País, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 19.976,81 m³.dia⁻¹. Há ainda duas novas plantas de biodiesel autorizadas para construção e 2 plantas de biodiesel autorizada para aumento da capacidade de produção. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada poderá ser aumentada em 2.515 m³.dia⁻¹, que representa um acréscimo de 12,59 % na capacidade atual.

O biocombustível que vem se destacando no cenário mundial atualmente é representado em sua maioria pelos derivados de culturas terrestres, tais como: soja, milho, cana-de-açúcar. No entanto, vem a cada dia sendo pressionado pelo mercado de alimentos devido à necessidade de enormes áreas de terra agricultáveis para sua produção, além de contribuir com a escassez de água e o desmatamento da flora natural (VIEIRA, 2013). Como solução para essa questão, surgem as microalgas como opção atrativa para aliar o seu alto teor energético com a facilidade de absorção de grande quantidade de CO₂ durante seu processo de crescimento.

Segundo Lourenço (2006) as microalgas são microrganismos fotossintéticos que utilizam energia solar associada com água e gás carbônico (CO₂) para produzir biomassa,

sendo a fotossíntese o processo chave para transformar a energia solar em formas de energia disponível para toda vida orgânica no ambiente. Assim, as microalgas vêm sendo considerada como fonte potencialmente útil para a produção de biodiesel, pois sua produtividade supera a de qualquer vegetal comercialmente produzido no mundo, sendo os rendimentos em óleo por hectare equivalente de área utilizada, de ordens de grandeza superiores às das oleaginosas tradicionais.

A biotecnologia de microalgas também demonstrou versatilidade em outros setores, podendo atuar no tratamento de efluentes e na biorremediação de metais pesados, nitrogênio e fósforo que podem causar eutrofização quando descartados diretamente nos corpos d'água (BECKER, 2004).

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 produz 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 e COSTA, 2008).

Com base nessa perspectiva, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial biotecnológico das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. e assim verificar qual das espécies é mais viável para produção de biocombustível, avaliando-as por meio da velocidade específica de crescimento, tempo de geração e produtividade de biomassa em termos de densidade celular e concentração de lipídios, utilizando como meio de cultura efluente de tratamento anaeróbico de esgoto doméstico com vistas a reduzir o custo dos cultivos, bem como promover um destino adequado para esses resíduos líquidos, que se lançados em corpos hídricos poderão dar início ao processo de eutrofização devido as altas concentrações de nutrientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de geração de biocombustíveis das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. desenvolvidas em meio de cultura contendo resíduos líquidos provenientes do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência das condições químicas e físicas no desenvolvimento celular das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.;
- Estudar o cultivo das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. com suplementação de efluente oriundo do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico em diferentes proporções;
- Determinar a velocidade específica de crescimento, o tempo de geração e a produtividade celular das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. em meio de cultura semi-sintético suplementado com diferentes proporções de efluente resultante do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico;
- Avaliar a remoção de carga poluidora do efluente, adicionado em diferentes proporções aos meios de cultura, em termos de demanda química de oxigênio (DQO);
- Analisar o metabolismo celular da biomassa, por meio da sintetização de lipídios, obtidas no cultivo de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultivadas em diferentes condições de meio semi-sintético;
- Utilizar a estatística para verificar o nível de correlação entre os parâmetros avaliados no desenvolvimento das microalgas;
- Realizar uma análise multivariada dos dados por meio do método da Análise em Componentes Principais (ACP);
- Efetuar uma análise comparativa entre as médias dos parâmetros avaliados através dos testes de hipóteses.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA ENERGÉTICO MUNDIAL

Os principais insumos energéticos usados pela indústria no mundo são o petróleo, o gás natural e o carvão. Esses insumos têm apresentado elevadas taxas de crescimento do consumo, devido, principalmente, ao desempenho das economias emergentes, lideradas pela China e pela Índia. Esse crescimento acelerado da demanda, aliado à instabilidade política nas regiões produtoras de petróleo e gás natural e às pressões pela redução das emissões dos gases causadores do “efeito estufa”, traz preocupações sobre o equacionamento da oferta de energia e seu impacto nos preços.

A energia desempenha um papel fundamental em todas as atividades, tendo o desenvolvimento socioeconômico, das últimas décadas, sido pautado por um forte crescimento do consumo energético, proveniente essencialmente de combustíveis fósseis. A fonte energética primária para os transportes mundiais é o petróleo. Enquanto as sociedades ditas desenvolvidas estão em crescimento contínuo, economias emergentes como a Índia e a China estão a contribuir, de forma drástica, para a pressão antropogênica sobre as fontes energéticas em um futuro muito próximo (RUSSO, 2011).

O aumento do consumo de petróleo que ocorreu na década de 70, associado a escalada do seu preço, tornou a energia um importante fator de produção, passando a constituir uma problemática política e estratégica central, a nível mundial. Neste contexto, os choques petrolíferos ocorridos nos anos 70 e, posteriormente, as situações semelhantes ocorridas nos anos 80 impuseram a necessidade de procurar formas alternativas de produção energética.

Segundo Alves (2011) a energia hidrelétrica é a principal fonte geradora de energia elétrica para mais de 30 países e representa por volta de 20% de toda eletricidade gerada no mundo, no entanto, os países desenvolvidos praticamente já exploraram todos os seus recursos hidrelétricos, com exceção do Canadá e da Turquia, portanto são poucos os projetos de hidrelétricas para o futuro, ou seja, o crescimento da utilização de outras fontes renováveis deverá ocorrer, particularmente a eólica, a solar e a biomassa.

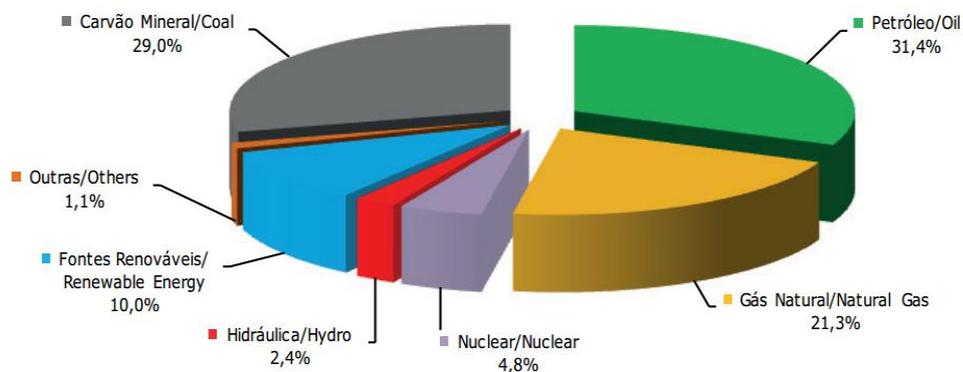
Com relação às fontes de energias não renováveis, as de mais destaque na matriz energética mundial são: o petróleo, o gás natural, o carvão e a energia nuclear. Mesmo com a diminuição da utilização do petróleo, o mesmo deverá permanecer nos próximos anos como a principal fonte de energia no mundo, já o gás natural é o combustível fóssil que mais vem

crecendo sua participação na matriz energética mundial, tanto em termos da oferta quanto de consumo.

De acordo com a Agência Internacional de Energia (2012) a utilização do gás natural em termelétricas é responsável por 22% da matriz elétrica mundial (Figura 1). Em relação a produção de carvão, esta vem crescendo acentuadamente desde 1999, amparada pelo grande aumento na produção que garante a oferta do insumo por um longo período, mesmo tendo um nível de agressão ao meio ambiente superior a outros insumos como o petróleo e o gás natural, e assim este é responsável por 29% da energia elétrica gerada no mundo.

Em relação à energia nuclear, após um acentuado crescimento entre os anos 70 e 80, a geração ficou praticamente estagnada no cenário mundial, principalmente devido à preocupação com a segurança. No mundo, a energia nuclear corresponde a aproximadamente 5% de toda energia elétrica produzida, sendo que em aproximadamente 50 países ela representa mais de 25% do total produzido.

Figura 1 - Oferta de Energia Mundial



Fonte: IEA (2012).

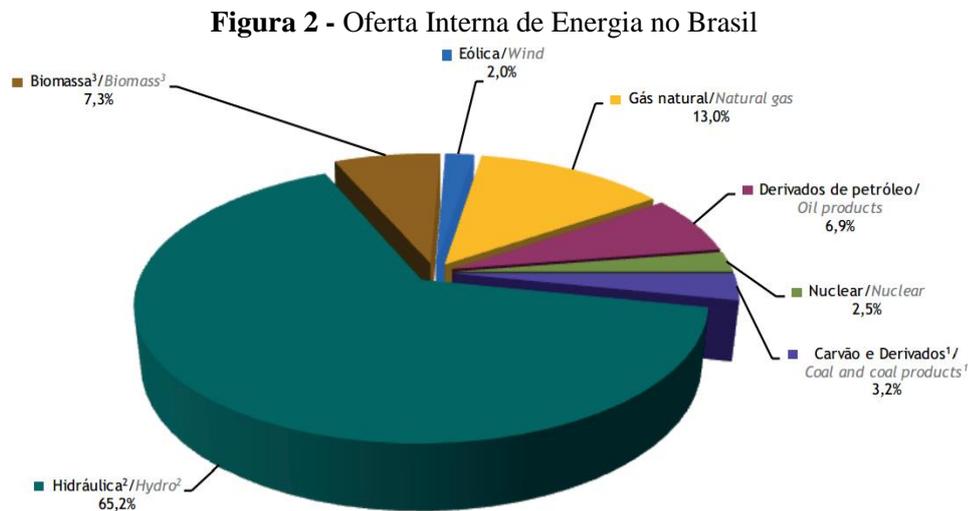
Para Moraes (2015) as fontes renováveis apresentam crescimento tanto na oferta como no consumo total de energia no mundo, em especial devido às exigências do governo e da sociedade em busca de uma matriz energética mais “limpa”.

Com a redução de preços no setor e desenvolvimento tecnológico dos materiais semicondutores utilizados na fabricação de painéis fotovoltaicos, a energia solar aumentou sua participação na oferta total de energia no mundo. No caso da energia eólica, o crescimento da utilização se deve principalmente devido ao interesse dos países em desenvolvimento, com destaque para a China. Estima-se que o potencial eólico mundial seja da ordem de 500.000

terawatts-hora por ano (TWh/ano), ou seja, mais de 30 vezes o consumo de eletricidade no mundo.

2.1.1 Matriz Energética Nacional

Segundo a Empresa de Pesquisa Energética (EPE) que publicou o Balanço Energético Nacional 2015/ano base 2014 o Brasil dispõe de uma matriz elétrica de origem predominantemente renovável, com destaque para a geração hidráulica que responde por 65,2% da oferta interna (Figura 2). As fontes renováveis representam 74,6% da oferta interna de eletricidade no Brasil, que é a resultante da soma dos montantes referentes à produção nacional mais as importações, que são essencialmente de origem renovável.



Fonte: EPE (2015).

De acordo com o Balanço Energético Nacional a produção nacional de petróleo cresceu 11% em 2014, atingindo a média de 2,25 milhões de barris diários.

Esses dados mostram o agravamento da degradação ambiental devido aos malefícios acarretados com o uso intensivo dos combustíveis fósseis, tais quais merecem destaque: o aquecimento global e alterações climáticas, a poluição (do ar, da água e da terra) e os efeitos adversos para a saúde humana. Além disso, a eminente escassez das reservas dos combustíveis fósseis força urgentemente o desenvolvimento e o uso de fontes alternativas de energias renováveis. Inserido nesse prisma os biocombustíveis são os que apresentam maiores potenciais de substituir os combustíveis fósseis e atender aos desafios do desenvolvimento moderno.

Nesse contexto as microalgas apresentaram potencialidades no processo de obtenção de biocombustíveis. Em relação às oleaginosas apresentam custo relativamente baixo para transporte e colheita, possui maior eficiência fotossintética, não competem com a produção alimentícia, não necessitam de grandes extensões de terra aráveis, são eficientes fixadoras de CO₂ e ainda, algumas espécies, podem ser cultivadas em meio salino. Sua característica unicelular assegura uma biomassa homogênea diminuindo assim a obtenção de resíduos e ainda elevada produção de lipídios de acordo com a espécie.

Diferentes estudos realizados mostram que as microalgas possuem o mais elevado teor de matéria graxa, tornando-se uma excelente alternativa para a produção de biocombustíveis – devido à sua elevada densidade de lipídios comparando com as oleaginosas tais como: canola, soja, palma, girassol etc. Dessa forma, a produção de microalgas pode promover um aumento na produção de óleo por hectare assim como a redução do custo de produção de biodiesel, conforme constatado na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento de extração de óleo

Rendimento de óleo t.ha⁻¹ano⁻¹	
Mamoma	0,5 – 1,0
Soja	0,2 – 0,6
Girassol	0,5 – 1,5
Canola	0,5 – 0,9
Pinhão manso	2,0 – 3,0
Óleo de palma (dendê)	3,0 – 6,0
Microalgas	50 - 150

Fonte: (PEREZ, 2007).

2.2 BIOCMBUSTÍVEIS

De acordo com a Lei nº 12.490/2011, biocombustível é definido como toda substância derivada de biomassa renovável, tal como biodiesel, etanol e outras substâncias estabelecidas em regulamento da 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. Pode ser entendido também como todo material biológico gasoso ou líquido que quando queimado gera energia, como por exemplo, biodiesel, etanol, hidrogênio, metanol, butanol e metanol (SUNGRANT, 2007).

Os biocombustíveis gasosos são formados pela decomposição de matéria orgânica, como tratamento de efluentes e aterros com resíduos sólidos, que são degradados

anaerobicamente. Os biocombustíveis podem ser classificados em primeira, segunda e terceira geração, conforme a o tipo de biomassa (MARTINS, 2004).

Sims et al. (2008), consideram que os biocombustíveis de primeira geração são formados por biomassas produzidas diretamente pela fotossíntese, possuindo geralmente uso alimentício, como por exemplo, cana-de-açúcar, trigo, batata, beterraba, milho e/ou óleo vegetais como o girassol, soja e colza. Devido a isso, há uma preocupação na produção de biocombustíveis originados por tais tipos de biomassa, por substituir e competir com a produção alimentícia, causar desmatamento da vegetação local, exigir alta demanda de água e ainda por influenciar na economia, elevando o preço dos alimentos. Tais biocombustíveis podem ser o biodiesel, biogás, bioetanol e *syngas*. Com exceção da cana-de-açúcar, (bagaço utilizado como co-produto para geração de calor e energia) biocombustíveis de primeira geração podem ainda não ter benefícios sustentáveis devido ao modo como são cultivados, em que o processo de conversão corresponde basicamente à tecnologia de fermentação.

Já os biocombustíveis de segunda geração são etanóis considerados avançados e que são originados a partir da lignocelulose possuindo duas rotas de conversão, sendo uma biológica - via hidrólise enzimática e a outra rota por tratamento termoquímico (LARSON, 2007). A matéria-prima para essa geração corresponde a resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar, madeiras, serragens, palhas e cascas, resíduo industrial, como licor de indústrias de papel, resíduo municipal e algumas gramíneas. A produção de biocombustível de segunda geração pode ser maior que de primeira geração devido à maior oferta e ainda possui maior potencial de não emissão de gases estufa do que os combustíveis de primeira geração. Além disso, o custo desse biocombustível é mais competitivo ambientalmente comparando-se aos combustíveis fósseis (SIMS et al., 2008). Para que ocorra a conversão de lignocelulose em bioetanol, o processo consiste em duas tecnologias, conversão termoquímica através da gaseificação, posterior pirólise e torrefação e conversão Bioquímica através da fermentação.

Quanto aos biocombustíveis de terceira geração são produzidos por resíduos pós consumo, incluindo gordura e ácidos graxos de seres vivos, basicamente produzidos por algas. Estas eram a princípio classificadas como biomassa de segunda geração, porém após perceber que o rendimento utilizando algas era significativamente maior mesmo em menor quantidade de recursos, criou-se um grupo exclusivo. As algas produzem facilmente um óleo que pode ser utilizado na obtenção de biodiesel e até mesmo alguns componentes da gasolina, e também, se modificada geneticamente, metanol, butanol e combustíveis para aviões (BIOFUEL, 2010).

Em suma, há inúmeros tipos de biocombustíveis obtidos por diferentes fontes de biomassa e tecnologias de conversão aplicadas. Os biocombustíveis líquidos utilizados como fonte de energia para transporte são o biodiesel, o bioetanol (primeira e segunda geração), o biobutanol e o metanol. O hidrogênio e metanol também são biocombustíveis, porém, gasosos a pressão e temperatura ambiente.

2.3 MICROALGAS

O termo microalgas engloba microrganismos unicelulares com clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar fotossíntese e sua caracterização sistemática implica na consideração de uma série de critérios (HOEK, 1995). As microalgas são organismos microscópicos, coloniais ou filamentosos, coloridos, fotoautotróficos, procarióticos e eucarióticos (OLAIZOLA, 2003).

Os exemplos de microalgas procarióticas são cianobactérias (Cyanophyceae) e as microalgas eucarióticas são as algas verdes (Chlorophyta) e diatomáceas (Bacillariophyta). As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na terra, representando uma grande variedade de espécies que vivem em condições externas. Estima-se que mais de 50.000 espécies existam, mas somente um número limitado, de aproximadamente 30.000, já foram estudadas e analisadas (RICHMOND 2004).

Conforme Arregondo – Vega (1995), as microalgas são produtoras primárias que armazenam energia solar para convertê-la em energia biológica, sendo as microalgas a base de inúmeras cadeias tróficas nos ambientes aquáticos.

As microalgas são principalmente encontradas no meio marinho e água doce, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra. Uma das características relevantes das microalgas é a capacidade destes microrganismos transformarem o CO₂ presente na atmosfera e a luz solar em várias formas de energia através do processo de fotossíntese. Por meio deste processo, são produzidos polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos (CHISTI, 2007).

De acordo com Richmond (2004), a biomassa de microalgas e os extratos de biomassa vêm ganhando destaque no mercado mundial, sendo aplicadas de diferentes formas como na produção de proteína unicelular, lipídios, carotenoides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas.

O aumento dessa demanda de produtos produzidos pelas microalgas deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), proteínas imunologicamente efetivas e compostos virostáticos.

2.3.1. Chlorococcales: *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.

Chlorococcales é uma ordem pertencente a classe das clorofíceas que representam um amplo grupo taxonômico do qual muitas microalgas foram identificadas como produtoras de lipídios. Isto se deve por, naturalmente acumularem mais lipídios do que outras espécies de microalgas, estarem em diversos ambientes naturais, serem facilmente isoladas e crescerem rapidamente sob condições de laboratório (HU et al., 2008).

O nome da microalga *Chlorella* provém do grego chloro (verde); e do sufixo diminutivo latino ella (pequeno), compreendendo em um gênero de algas verdes unicelulares, do Filo Chlorophyta. É uma microalga unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-10 μm , encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade de realizar fotossíntese (COSTA et al., 2006).

A microalga *Chlorella* possui 51-58% de proteínas, 12-17% de carboidratos, 14 - 22% de lipídios e 5% de minerais (BECKER, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). *Chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B12, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que juntamente com o ferro fazem desta microalga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia (VIEIRA, 2013).

A *Chlorella* sp. é uma rica fonte de nutrientes concentrados que são melhores aproveitados pelo organismo quando suas células, que são protegidas por uma parede celular, são desintegradas durante o processo de secagem, possibilitando que seus nutrientes sejam amplamente absorvidos pelo metabolismo (HENRIKSON, 1994). Os valores nutricionais da *Chlorella* sp. podem apresentar variações dependendo do modo de cultivo, quantidade de energia solar, estação climática e outros fatores.

Em relação a *Scenedesmus* sp. Ramirez (2013) afirma ser uma microalga aquática, dominante em lagos de água doce e rios. Pertencem ao grupo das algas verdes do domínio *eukarya*, *Chlorophyta* da classe *Euhlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* da família *Scenedesmaceae*. Apresentam colônias formadas por células elipsoidais, fusiformes ou ovoides, arranjas lado a lado. São algas de superfície, podendo produzir odor e sabor de

capim nas águas e vivem bem em meios com alto teor mineral e efluentes contaminados. O tamanho das microalgas *Scenedesmus* sp. pode variar entre 3 a 31 μm segundo a espécie. São pequenas e não móveis, com colônias constituídas por células alinhadas em uma placa plana. As colônias são geralmente compostas de 4-8 células.

A *Scenedesmus* sp. tem sido utilizada para produção de biomassa, tratamento de águas em lagoas de oxidação e já foi estudada a possibilidade da sua utilização no tratamento de efluentes de lagares (fábricas de extração de azeite) e de águas residuais urbanas. A microalga da espécie *Scenedesmus* sp. é de fácil obtenção, além de ser largamente utilizada como alimento para os microcrustáceos utilizados em ensaios de ecotoxicologia.

O teor de lipídios nas microalgas *Scenedesmus* sp. pode chegar até 40 % em cultivo em laboratório, dependendo das condições nutricionais do meio (BECKER, 1994).

2.3.2 Cultivo

Existem vários métodos de cultivo de microalgas, o mais comumente utilizado é baseado na indução artificial de condições eutróficas que levam a um rápido desenvolvimento de explosões populacionais denominado, “blooms”. Este método consiste na adição de um inóculo puro de microalga a um meio de cultivo (LOURENÇO, 2006).

De acordo com Chojnacka e Marquez (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 CO_2 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.

Destes, segundo Radmann et al. (2009), o cultivo mixotrófico garante maior rendimento de biomassa no qual atuam o metabolismo heterotrófico e autotrófico, e a microalga ao mesmo tempo assimila o CO₂ autotroficamente e o carbono orgânico disponível.

A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal. O dióxido de carbono (CO₂) é a fonte de carbono preferencial das microalgas, difundindo passivamente do meio de cultivo ao meio intracelular e utilizando diretamente nos processos de fixação de carbono (DERNER, 2006). Portanto, com a adição de CO₂ no meio de cultivo pode aumentar em até sete vezes a multiplicação celular enquanto que a redução da disponibilidade de carbono pode ser fator limitante para o crescimento microalgal (MORAIS, 2011).

Estes organismos podem ser cultivados em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Geralmente, o cultivo de microalgas ocorre em tanques abertos (lagoas naturais, tanques circulares, tanques *raceway* e tanques agitados) com pequena profundidade visando assegurar a incidência adequada de luz solar. Esses tanques podem ser de plástico, concreto, fibra de vidro, alvenaria ou laminados.

Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em equipamento específico, denominado fotobiorreator, com luz solar ou artificial e adição de nutrientes, visando a alcançar elevadíssima produtividade. Os cultivos são realizados em sistema fechado, em painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (DERNER et al., 2006).

Bertoldi et al. (2008) destacam que nos fotobiorreatores é possível controlar as condições de cultivo (quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc.). Isto implica uma elevada produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor de mercado. A desvantagem dos reatores em relação aos tanques abertos está relacionada com os custos de construção e manutenção. Por outro lado, o cultivo de microalgas em sistemas abertos, considerado uma forma de agricultura, tem como benefício a luminosidade natural sem custos. No entanto, há o risco de contaminação por outros organismos, alterações de temperatura e variações de luminosidade. A Tabela 2 apresenta uma comparação sob várias variáveis de processos entre os sistemas de cultivos abertos e fechados.

Tabela 2 - 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 (2010).

2.3.2.1 Cultivo em águas residuárias

Atualmente as pesquisas buscam o desenvolvimento de métodos de cultivo eficientes que diminuam os custos de produção. A utilização de águas residuárias como meio alternativo pode ser uma forma de reduzir os custos no cultivo das microalgas, o que agregaria o conceito de reuso da água e produção de biomassa com valor de mercado aos sistemas de tratamento de efluentes (PITTMAN et al., 2011).

No contexto brasileiro, três resíduos são produzidos em grandes quantidades que são de interesse para a produção de combustível algal. O primeiro é a vinhaça, um resíduo líquido proveniente da indústria de etanol, que é gerado após destilação de álcool e é composto principalmente de minerais como potássio, sulfato, cálcio, fósforo, magnésio, ferro e nitrogênio, que são os mesmos utilizados em meios artificiais para produção de algas.

O segundo subproduto de interesse é o resíduo líquido da indústria de processamento de mandioca, a manipueira. Estudos demonstram a possibilidade da produção de biocombustíveis através da biomassa de microalgas ricas em proteínas. Finalmente, o terceiro resíduo de interesse para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas, que são as águas residuais domésticas.

Os questionamentos ambientais sobre o esgoto sanitário são muitos, principalmente quando se leva em consideração o fato de que nem toda a população tem acesso a um sistema de tratamento adequado. Mesmo com o desenvolvimento atual e crescente, parte da população não possui rede coletora de esgoto e, portanto, têm seus dejetos descartados inadequadamente muitas vezes em rios ou córregos (VARGAS, 2013).

Considera-se que o esgoto sanitário é constituído basicamente por água (cerca de 99,9%), e por impurezas de natureza orgânica e inorgânica (cerca de 0,1%), constituídas de sólidos suspensos e dissolvidos, bem como de microrganismos. O esgoto sanitário possui em sua composição nitrogênio e fósforo, compostos que causam a eutrofização de lagos (NUVOLARI et al., 2011). Além disso, é fonte de transmissão de doenças, o que caracteriza o saneamento não apenas como um problema ambiental, mas também de saúde e econômico (MOTA E VON SPERLING, 2009). Dados da OMS (2009) aponta que 88% das mortes por diarreia no planeta são causados por condições precárias de saneamento básico. Dessa forma, quando se investe em saneamento se previne o surgimento de doenças provenientes do esgoto, que gerariam gastos ao sistema de saúde e mortalidade principalmente de crianças.

Com tais características e composição, o esgoto é um potencial meio de cultivo alternativo para o cultivo de microalgas, uma vez que esses organismos necessitam

principalmente de nitrogênio e fósforo para seu crescimento. Ao crescerem, as microalgas consomem esses nutrientes e conseqüentemente promovem o tratamento desse efluente, possibilitando assim uma disposição ambientalmente adequada. Isso pode ser observado em experimentos como o desenvolvido por De Alva et al. (2013) em que os autores trabalharam com esgoto municipal sem tratamento, após pré-tratamento e com enriquecimento pela adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio). Em todos os meios houve crescimento de biomassa e remoção de nutrientes.

2.3.2.1.1 Tratamento de águas residuárias

Antes do lançamento em corpos de águas, é necessário que o esgoto sanitário seja previamente tratado, atingindo os padrões estabelecidos na resolução CONAMA nº 430/2011. O tratamento mais difundido atualmente é o biológico, que se divide em aeróbio e anaeróbio, e dentre estes, existem diversas modalidades de tratamento.

Os sistemas de tratamento anaeróbios procuram remover a matéria orgânica do efluente utilizando-se da presença de microrganismos para a realização desse processo, sendo constituído por quatro etapas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Esse sistema é indicado para efluentes com alta concentração de matéria orgânica.

Atualmente, o reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) é considerado uma tendência em tratamento de esgotos no país. Ainda podem ser denominados reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e de Manta de Lodo. Por não exigir muito espaço para seu funcionamento, os reatores anaeróbios são bastante utilizados como alternativa de tratamento de efluentes (AISSE et al., 2006). Esse sistema apresenta vantagens quando diz respeito ao baixo custo de operação de manutenção e simplicidade operacional. Contudo, tem-se uma reduzida capacidade de suportar cargas tóxicas, extenso intervalo de tempo para o início do sistema, suscetibilidade a variações ambientais e há necessidade de pós-tratamento (CHERNICHARO, 1997).

A retirada de nutrientes em águas residuárias ajuda a preservar o corpo aquático receptor do efluente, pois a presença de fósforo e nitrogênio em combinação com o CO₂ acelera o processo de eutrofização do corpo hídrico. Sendo o efluente UASB rico desses nutrientes, as microalgas podem utilizá-los para seu crescimento e desenvolvimento, removendo por absorção e transformando em biomassa na fotossíntese, diminuindo os custos para alimentação e manutenção do cultivo utilizando esta alternativa.

Desse modo, quando há a utilização do esgoto pós-tratado em reator UASB como substrato para as microalgas, está sendo evitada a eutrofização dos corpos aquáticos devido ao lançamento inadequado desse efluente. Mata et al. (2010) destacam vantagens relacionadas a custo-eficácia, aos requisitos de baixa energia, a redução em formações de lodo, mitigação de gases de efeito estufa e a produção de biomassa de microalgas útil.

Mulbry (2008) afirma também que muitas microalgas são utilizadas no tratamento de águas residuárias por promoverem a depuração das águas quando absorvem os contaminantes e os nutrientes solúveis em quantidades maiores do que precisam para seu crescimento, resolvendo assim os problemas de acumulação de biomassa do processo e de eutrofização.

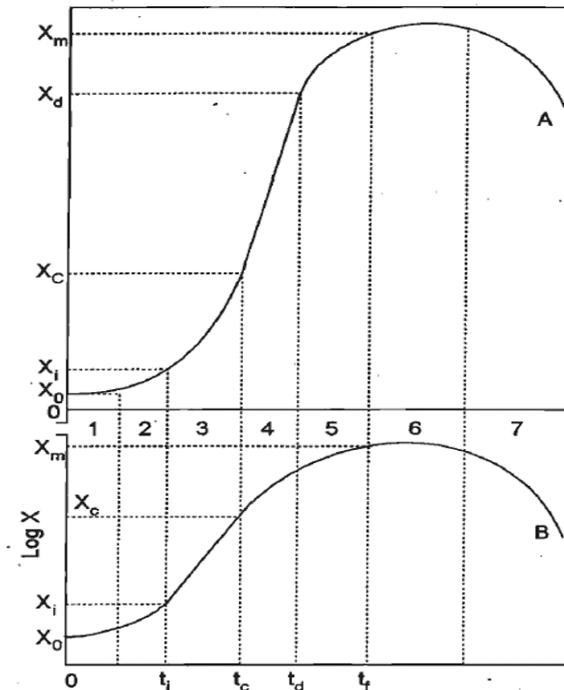
As características das microalgas *Chorella* sp. e *Scenedesmus* sp. são interessantes para o cultivo em efluentes de UASB com vistas a produção de biocombustíveis, uma vez que conseguem se adaptar em ambientes eutrofizados, possuem versatilidade metabólica (como crescimento em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas) e conseguem acumular lipídios em quantidade relevante (MATA et al., 2010; ABOU-SHANAB et al., 2011).

2.3.3 Crescimento

Em condições climáticas adequadas e nutrientes suficientes, as microalgas podem crescer profusamente. Comumente elas dobram a sua biomassa dentro de 24 h ou menos e durante a fase de crescimento exponencial elas podem completar um ciclo de vida dentro de 2 a 4 horas (MATA et al., 2010).

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 avaliar a influência de qualquer um desses fatores é necessário que se realize o estudo do crescimento da microalga (Figura 3).

Figura 3 - Curva de crescimento microbiano representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B)



Fonte: Adaptado de BORZANI et al., 2001.

De acordo com Borzani et al., (2001) as fases do crescimento microbiano apresentadas na Figura 3 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 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.

2.3.4 Métodos de Separação da Biomassa

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 Gudín 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 é um processo que remove a capacidade das células se manterem em suspensão. 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 floculantes. Os agentes floculantes 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 et al., 2002) e

na flotação eletrolítica microbolhas 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 auto-floculação 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.

2.3.5 Aplicação Biotecnológica

A aplicação biotecnológica das microalgas é diversa. As rotas metabólicas que realizam como fotossíntese e respiração podem ser exploradas biotecnologicamente para diversas finalidades. Estes microrganismos são fonte de quantidades relevantes de carboidratos, proteínas e lipídios que podem ser convertidos a produtos de interesse comercial (DEMIRBAS, 2011; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Microalgas são capazes de acumular em certas condições de cultivo acima de 50% de seu peso seco em carboidratos, sendo que a composição e o metabolismo destes compostos podem diferir significativamente de uma espécie para outra (HO et al., 2012). Geralmente, os carboidratos estão presentes na parede celular como celulose, hemicelulose, polissacarídeos e nos plastídeos na forma de amido como composto de reserva (CHEN et al., 2013). A glicose presente na forma de amido e celulose pode ser utilizada para produção de biocombustíveis, principalmente etanol e hidrogênio; já os polissacarídeos representam uma classe de compostos de alto valor agregado com aplicações na produção de alimentos, cosméticos, estabilizadores, emulsificantes, lubrificantes, espessantes e medicamentos (ARAD e LEVY-ONTMAN, 2010).

O conteúdo proteico em microalgas pode ser superior a 60% da biomassa seca, como no caso da cianobactéria *Spirulina platensis*; já nas clorofíceas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* representa 50-60% do peso seco. A fração proteica dependerá da espécie e da condição de cultivo. No geral, esses microrganismos têm proteínas com elevados valores nutricionais, pela composição em aminoácidos essenciais e por sua quantidade relevante. Dessa forma, a biomassa proteica pode ser empregada na alimentação animal e humana, além de ser uma interessante fonte de peptídeos bioativos que apresentam potencial terapêutico (KIM e KANG, 2011; IBAÑEZ e CIFUENTES,2013).

Christaki et al. (2011) informam que os pigmentos presentes nas algas constituem uma fração valiosa da biomassa. As clorofilas podem ser usadas como anti-inflamatórios, os

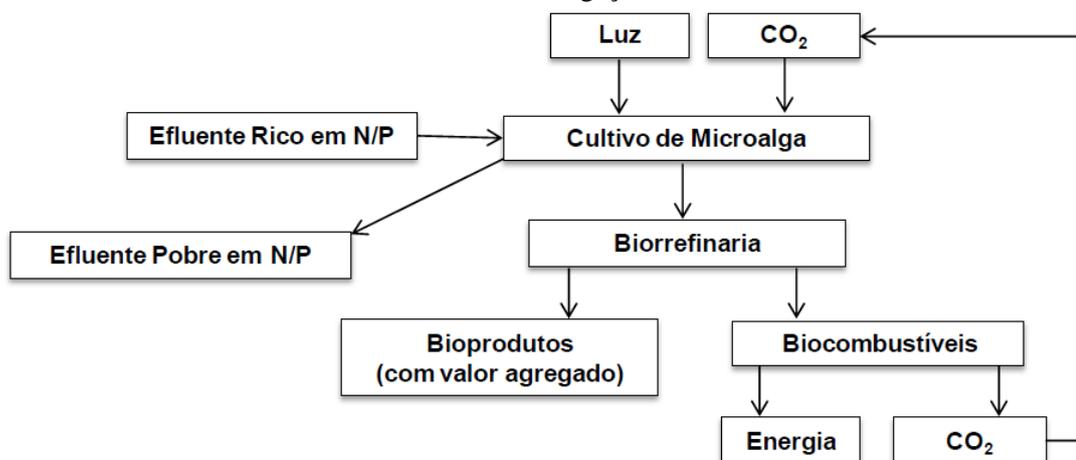
carotenóides reduzem o risco de câncer e a astaxantina é considerada um eficaz antioxidante com aplicações na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica.

De acordo com Pulz e Gross (2004) lipídios são acumulados por microalgas em condições específicas de cultivo, como por exemplo, em condição de estresse. Os lipídios presentes nesses microrganismos são classificados em dois tipos, de acordo com o tamanho de suas cadeias carbônicas, em ácidos graxos de 14-20 carbonos, os quais são apropriados para produção de biodiesel e ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), que contêm acima de 20 carbonos, que podem ser empregados no mercado de suplementos alimentares e em tratamentos profiláticos e terapêuticos.

Além da variedade de produtos derivados dos compostos da biomassa, as microalgas assimilam nutrientes como matéria orgânica, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} e metais pesados do meio em que crescem, o que possibilita seu uso no tratamento de efluentes industriais e domésticos (TAM e WONG, 2000). Outra aplicação na área ambiental é a remoção de CO_2 por biofixação, reduzindo assim a emissão desse gás de efeito estufa (WANG et al., 2008).

Wang et al. (2008) destacam também que a aplicação biotecnológica das microalgas pode ser economicamente viável e ambientalmente sustentável pela combinação do cultivo com processos de biorremediação (Figura 4). No caso da produção de biodiesel, só é ambientalmente favorável, se o sistema de cultivo estiver ligado ao uso de efluentes (CLARENS et al., 2010).

Figura 4 - Produção de biocombustíveis e bioprodutos combinados com assimilação de nutrientes de efluentes e biomitigação de CO_2



Fonte: Wang et al. (2008).

2.3.5.1 Lipídios nas microalgas

Algas crescem praticamente em qualquer lugar onde há bastante incidência do sol. Todas as algas contêm proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos em proporções variadas. O conteúdo de lipídios da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40% da massa seca e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85%. Os lipídios algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1994; DERNER et al., 2006).

O óleo das microalgas possui características semelhantes aos óleos de peixe e óleos vegetais. O conteúdo de lipídios excede a maioria das plantas terrestres e pode ser considerado como um substituto potencial para os produtos do óleo de origem fóssil (FAO, 2016).

Teixeira et al. (2006), afirmam que as microalgas contêm lipídios e ácidos graxos como componentes da membrana, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia. A biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídios, todavia, para constituir-se uma matéria-prima de biodiesel, esta deve ser rica em ácidos graxos que correspondem à maior fração dos lipídios (Tabela 3). Destaca-se que a composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada somente pela natureza de cada espécie, mas depende, também, de fatores como intensidade de luz, temperatura, pH, nutrientes e agitação.

Tabela 3 - Composição química das microalgas expressas em base de massa seca (%)

Espécie	Teor de Lipídios (%)	Espécie	Teor de Lipídios (%)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75	<i>Neochloris oleoabundans</i>	29 - 65
<i>Chlorella sp.</i>	10 - 48	<i>Scenedesmus Obliquus</i>	11 - 55
<i>Chlorella vulgaris</i>	5 - 58	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 - 71	<i>Scenedesmus sp</i>	19,6 – 21,1
<i>Nannochloris sp.</i>	20 - 56	<i>Spirulina platensis</i>	4- 16,6
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12 - 53	<i>Spirulina maxima</i>	4 - 9

Fonte: Adaptado BECKER (1994) e CHISTI (2007).

2.3.5.1.1 Extração de Lipídios

A extração de lipídios com solvente é um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) para um solvente com o qual a matriz se acha em contato. Os processos que ocorrem são meramente físicos, pois o óleo transferido para o solvente é recuperado sem nenhuma reação química (BRUM et al., 2009).

Segundo Becker (1994) os lipídios e os ácidos graxos são constituintes de todas as células vegetais, nas quais estes funcionam como componentes da membrana, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia.

O lipídio de alga compreende fosfolipídeos, glicolipídeos e triacilglicerídeos, porém somente o último é facilmente convertido em biodiesel na transesterificação. Dessa forma, a extração deve ser um método seletivo, capaz de obter apenas as substâncias desejadas para a reação de síntese de biocombustível (FRANCO et al., 2013).

Na extração do óleo da biomassa é necessário romper a membrana celular das algas, que pode ser realizado utilizando-se prensas ou extração com solventes. O processo de extração com solventes permite um rendimento maior em óleo, no entanto, a extração também pode ser realizada com CO₂ ou água ou metanol em estado supercrítico, choque osmótico, extração com enzimas juntamente com aplicação de ultrassom e micro-ondas (CHEN, 2014). Devido à grande variedade de polaridade dos lipídios encontrados nas microalgas podem ser utilizados diferentes tipos de solventes na extração. Os solventes mais utilizados são o hexano, o etanol, o clorofórmio e o éter dimetílico (GRIMA et al., 2003). Dentre os métodos de extração de lipídios empregados por pesquisadores do mundo inteiro, os mais conhecidos e, geralmente, mais efetivos e com melhor rendimento, são os que utilizam a mistura clorofórmio e metanol (TANAMATI et al., 2005).

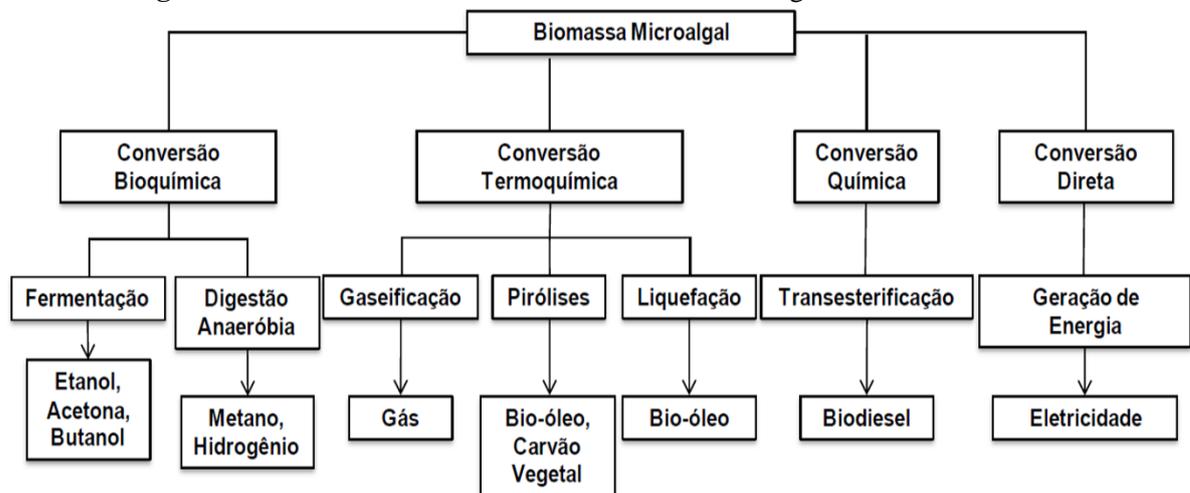
2.3.5.1.2 Produção do Biodiesel

Através dos estudos, descobriu-se que algas, organismos autótrofos presentes em locais úmidos-água doce ou salgada, podem ser aplicadas em processos industriais para produção de biodiesel, a partir de lipídios acumulados nas células, produção de bioetanol a partir da fermentação dos carboidratos nas algas assim como biogás, biohidrogênio e biobutanol (MCTI, 2015).

A conversão da biomassa microalgal em biocombustíveis está centrada em quatro principais processos: bioquímico, termoquímico, químico e combustão direta (Figura 5).

Como exemplos pode-se citar os processos que envolvem a conversão bioquímica que incluem a digestão anaeróbia para produção de metano e de fermentação para a produção de etanol (SPOLAORE et al., 2006); o processo de conversão química, envolve a extração de lipídeos acumulados pelas microalgas e a conversão dessa fração da biomassa em biodiesel pela reação de transesterificação (CHISTI, 2007); a conversão termoquímica, que compreende gaseificação para obtenção de gás combustível e, liquefação e pirólises para geração de bio-óleo (CHIARAMONTI et al., 2007). Estas tecnologias convencionais são comprovadamente eficientes no processo industrial, contudo estão focadas em um composto em detrimento de outras valiosas frações.

Figura 5 - Processos de conversão da biomassa microalgal em biocombustíveis

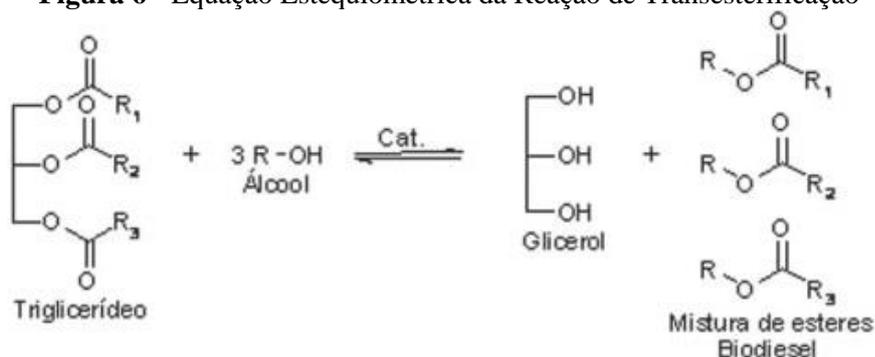


Fonte: Tsukahara e Sawayama (2005).

O biodiesel, após a extração de lipídios da biomassa, pode ser sintetizado principalmente pela transesterificação, de acordo com as características físico-químicas do óleo aplicando base, ácido ou enzima como catalisador homogêneo ou heterogêneo (FRANCO et al., 2013).

Oliveira et al. (2014) afirmam que a transesterificação ocorre quando o triglicerídeo reage com um álcool em excesso, obtendo-se uma proporção de 1:3, resultando em ésteres mono-alquílicos, que corresponde ao biodiesel e glicerol ou glicerina como subproduto, conforme observado na Figura 6.

Figura 6 - Equação Estequiométrica da Reação de Transesterificação



Fonte: OLIVEIRA et al. (2014).

O tipo mais comum de catalisador utilizado é uma base, hidróxido de sódio, que possui baixo custo e ainda gera menor emissão de poluente atmosférico por obter combustão completa do biodiesel, que possui alta composição de oxigênio entre as moléculas (OLIVEIRA et al., 2014). Porém, há estudos que mostram que a catálise alcalina influencia negativamente a qualidade do biodiesel, já que o óleo de microalgas apresenta elevada acidez, sendo assim a catálise ácida, com a utilização de ácido sulfúrico, mais adequada ao processo (ARAÚJO et al., 2012).

Outro importante componente da reação de transesterificação corresponde-se ao álcool. Esse reagente pode ser o metanol ou etanol. O primeiro é mais amplamente utilizado por apresentar baixo custo, porém o último é mais sustentável porém pouco usado devido ao custo mais elevado (OLIVEIRA et al., 2014).

Chisti (2007) destaca o glicerol como um dos subprodutos da reação de transesterificação, que deve ser separado do biodiesel para posterior venda, assim como os demais resíduos que podem ser usados como alimentos para animais e também ir para o processo de digestão anaeróbica para obtenção de biogás e ser usado como fonte de energia. Assim tais usos dos resíduos são maneiras de integrar o processo e liquidar o custo gerado no processo de biodiesel a partir de algas.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A estatística é uma ciência que se dedica à coleta, análise e interpretação de dados. Seu objetivo é apresentar informações sobre dados em análise para que se tenha maior compreensão dos fatos que os mesmos representam. É uma parte da matemática aplicada que

fornece métodos para coleta, organização, descrição, análise e interpretação de dados e para a utilização dos mesmos na tomada de decisões (CRESPO, 2002).

A estatística subdivide-se em áreas distintas: a descritiva e a indutiva ou a inferencial. A coleta, a organização, a descrição dos dados, o cálculo e a interpretação de coeficientes pertencem à estatística descritiva, enquanto a análise e a interpretação dos dados, associado a uma margem de incerteza, ficam a cargo da estatística indutiva ou inferencial, também chamada como a medida da incerteza ou métodos que se fundamentam na teoria da probabilidade (GRANZOTTO, 2002).

2.4.1 Estatística descritiva

Levando-se em consideração que normalmente a quantidade de dados estudados é geralmente grande, é difícil captar intuitivamente as informações que os dados contêm. Portanto, é necessário, que as informações sejam reduzidas até o ponto em que se possa interpretá-las mais claramente. A estatística descritiva preocupa-se em resumir essas informações através do uso de certas medidas-síntese, que tornem possível a interpretação de resultados. No sentido mais amplo, suas funções são (FERREIRA, 2001):

- Coleta de dados;
- Organização e classificação destes dados;
- Apresentação através de gráficos e tabelas;
- Cálculo de coeficientes (estatísticos), que permitem descrever resumidamente os fenômenos.

2.4.1.1 Correlações

O termo correlação refere-se a qualquer elemento de uma ampla classe de relações estatísticas envolvendo dependência. As correlações são definidas como uma medida da relação entre duas ou mais variáveis.

O tipo de coeficiente de correlação mais utilizado é o coeficiente de correlação de Pearson (r), também chamado de linear ou produto-momento de correlação. A correlação de Pearson assume que as duas variáveis são medidas em escalas intervalares à medida que os valores das duas variáveis são "proporcionais" uns aos outros.

Coeficiente de correlação pode variar de -1,0 a 1,0. O valor de -1,0 representa uma perfeita correlação negativa enquanto um valor de 1,0 representa uma perfeita correlação positiva. Segundo Dancey & Reidy (2006) correlações entre 0,10 e 0,30 podem ser consideradas fracas; entre 0,40 e 0,60 podem ser consideradas moderadas; e valores entre 0,70 e 1,0 podem ser interpretados como forte. Seja como for, o certo é que quanto mais perto de 1,0 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. No outro oposto, quanto mais próximo de zero, menor é a força dessa relação.

2.4.1.2 Análise em Componentes Principais

A Análise em Componentes Principais (ACP) é um método que tem por finalidade básica, a análise dos dados usados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

Reis (2001) descreve a Análise em Componentes Principais como um método estatístico multivariado que permite transformar um conjunto de variáveis iniciais correlacionadas entre si, num outro conjunto de variáveis não correlacionadas (ortogonais), as chamadas componentes principais, que resultam de combinações lineares do conjunto inicial. As componentes principais são calculadas por ordem decrescente de importância, isto é, a primeira explica o máximo possível da variância dos dados originais, a segunda o máximo possível de variância ainda não explicada, e assim por diante.

O objetivo principal da ACP é a obtenção de um pequeno número de combinações lineares (componentes principais) de um conjunto de variáveis, que retenham o máximo possível da informação contida nas variáveis originais. O processamento da análise de componentes principais pode ter partida na matriz de variâncias e covariâncias ou na matriz de correlação.

2.4.2 Estatística Inferencial

Abrange um conjunto de técnicas aplicadas no processo de inferências que auxiliam o pesquisador a extrair conclusões sobre uma determinada população, quando somente pequenas partes (amostras) dela foram estudadas. É importante nos testes de hipóteses científicas e na tomada de decisões mediante a interpretação de conjuntos de dados amostrais retirados de uma dada população (FONTELLES, 2012).

Os testes de hipótese são bastante úteis nas pesquisas na área de Engenharia Sanitária e Ambiental, uma vez que sempre é necessário testar hipóteses referentes a parâmetros de determinada população. Como principal item na aplicação de testes dessa natureza, tem-se o estabelecimento da hipótese nula (H_0) e da hipótese alternativa (H_a). A hipótese alternativa, ou hipótese de pesquisa, está relacionada com a teoria a qual deseja-se dar suporte, sendo assim, a hipótese nula compreende a teoria contraditória que se apoia (VON SPERLING, 2014).

Para o emprego desses testes, é necessário estimar a precisão estatística do resultado, que é definida por meio do nível de significância do teste. Este por sua vez é o complemento do nível de confiança. Para um nível de significância de 5%, tem-se um nível de confiança de 95%. Entre os níveis de significância mais comumente utilizados, tem-se 5%, 1%.

Os testes de hipótese realizados em pacotes estatísticos geralmente fornecem um valor calculado do nível de significância (muitas vezes representado pelo *p-valor*), que deve ser comparado com o adotado para o teste. Como descrito em Von Sperling (2014), quando o *p-valor* fornecido pelo teste for igual ou inferior ao nível desejado, a hipótese nula pode ser rejeitada, o oposto ocorrendo caso o nível de significância obtido seja superior.

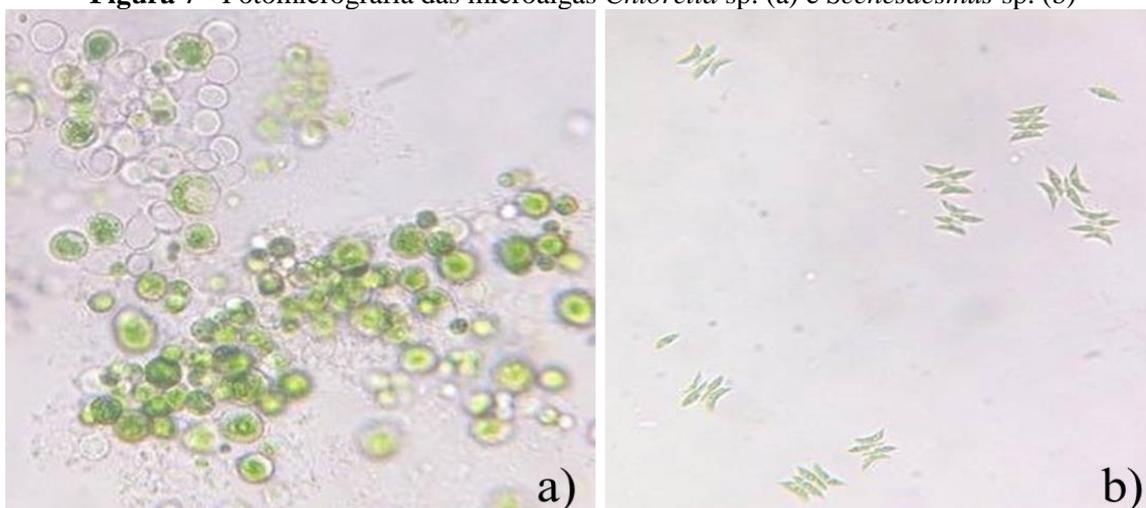
3 METODOLOGIA

3.1 MICROALGA *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Saneamento Ambiental do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba localizada na cidade de Campina Grande – PB. As cepas das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp., utilizadas nesse estudo, foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina e pela Universidade Federal de Campina Grande, respectivamente.

As espécies em estudo (Figura 7) foram escolhidas devido às suas elevadas produtividades lipídicas, descrita em diversos estudos, assim como de biomassa, o que favorece a produção de biocombustíveis. Além disso, apresentam-se como candidatas em potencial para mitigação das emissões de CO₂ e remediação de águas residuárias.

Figura 7 - Fotomicrografia das microalgas *Chlorella* sp. (a) e *Scenedesmus* sp. (b)



Fonte: Autora (2016).

3.2 MEIO DE CULTIVO

Para o cultivo da *Chlorella* sp. utilizou-se o meio sintético *Bold's Basal Medium* (BBM), recomendado pelo Centro de Cultura de Algas e Protozoários de Cambridge (CCAP). O pH do meio BBM é aproximadamente 7,0 e sua composição está descrita na Tabela 4.

Tabela 4 - Composição do meio sintético BBM

Componentes	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).

Para o cultivo da *Scenedesmus* sp. utilizou-se o meio sintético *Wright's Cryptophyte* (WC), desenvolvido por Guillard e Lorenzen (1972). O pH do meio WC é aproximadamente 9,0 e sua a composição está descrita na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do meio sintético WC

	Componentes	Concentração (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes	NaNO ₃	85,01
	CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76
	MgSO ₄ .7H ₂ O	36,97
	Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	21,20
	NaHCO ₃	12,60
	K ₂ HPO ₄	8,71
Micronutrientes	FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,15
	H ₃ BO ₃	1,00
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,18
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,02
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	6,00
Solução de Vitaminas	Tiamina - HCl (B ₁)	0,10
	Cianocobalamina (B ₁₂)	0,05
	Biotina (H)	0,05
Solução Tampão	TRIS – (Hidroximetil) Aminometano	500

Fonte: Guillard e Lorenzen (1972).

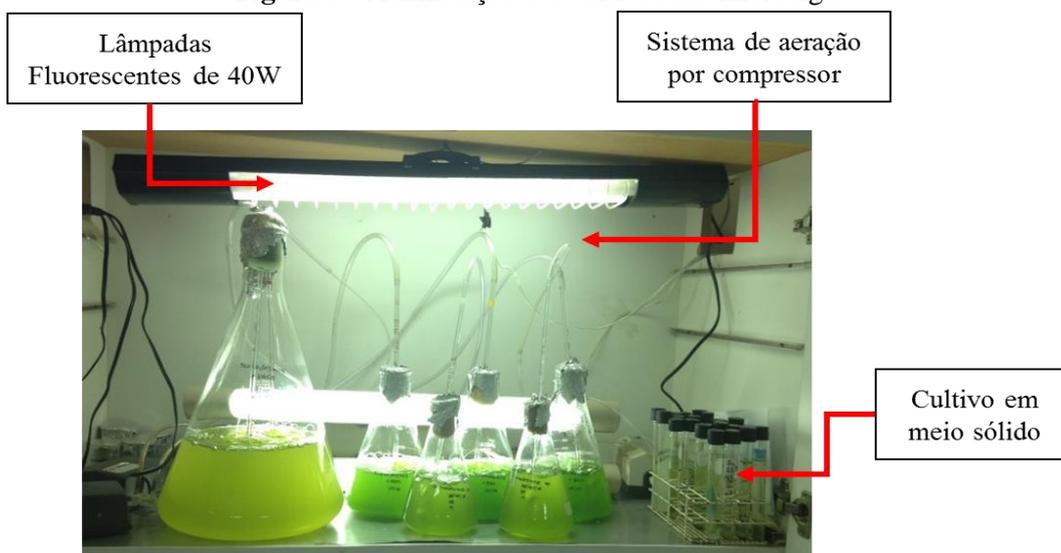
3.2.1 Águas residuárias

A água residuária utilizada na pesquisa foi resultante do tratamento anaeróbio de esgoto sanitário proveniente de reator tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), fornecida pela Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários, localizada na cidade de Campina Grande-PB. A mesma apresentava demanda química de oxigênio de 432,5 mg.L⁻¹, pH 8 e temperatura de 25°C.

3.3 ACLIMATAÇÃO DOS CULTIVOS

A aclimação dos cultivos foi realizada de modo a estabelecer um ambiente propício para a otimização do crescimento da *Chlorella* sp. e da *Scenedesmus* sp. As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyres, que foram utilizados como fotobioreatores e incubados a temperatura de 26°C±2, com agitação por meio de injeção direta de ar comprimido para garantir a homogeneização do meio. As lâmpadas fluorescentes existentes no cepário forneciam potência de 40W. A Figura 8 ilustra as condições de aclimação adotadas para o desenvolvimento das microalgas.

Figura 8 - Aclimação dos cultivos das microalgas



Fonte: Autora (2016).

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS MICROALGAS

3.4.1 Crescimento

Com o auxílio da microscopia óptica (aumento de 400x) foi possível determinar o crescimento das microalgas avaliando-se a densidade celular em função do tempo de cultivo em cada uma das unidades experimentais. As amostras foram retiradas após o início dos cultivos, a cada 24 horas, para contagem de células em câmara de Neubauer, determinando, desse modo, a densidade celular expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹).

A contagem de células foi realizada em triplicata. O número de células corresponde à média geométrica das três contagens. O tempo de cultivo foi expresso pela quantidade de dias decorridos desde o início da inoculação (período de adaptação – fase lag) até o alcance máximo da densidade celular (fase estacionária). Os gráficos de dispersão foram plotados para representar as curvas de crescimento da *Chlorella* sp. e da *Scenedesmus* sp., onde o eixo das abscissas corresponde ao o tempo de cultivo em dias e o eixo das ordenadas ao número de células.mL⁻¹.

3.4.2 Velocidade específica de crescimento

Os parâmetros cinéticos de crescimento das microalgas são calculados na fase exponencial (ou logarítmica). 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 fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é dada por $\mu_{máx}$, que representa a velocidade específica de crescimento e tem unidade de tempo h⁻¹.

Portanto a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de microrganismos em um dado instante (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, tem-se:

$$\int_{x_i}^x \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_{m\acute{a}x} \cdot dt$$

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

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

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 $\mu_{m\acute{a}x}$.

3.4.3 Tempo de geração

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

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

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

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

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

3.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUTIVIDADE

As análises de produtividade da biomassa das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultivadas em laboratório foram realizadas em triplicata no início e fim dos cultivos. Previamente foram separadas e centrifugadas amostras de 50mL do cultivo. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e a biomassa resultante das microalgas foi transferida para cápsulas de evaporação previamente pesadas e secas em estufa a 105°C.

As cápsulas foram colocadas na estufa a 60°C para secar até atingir peso constante. Verificado o término da secagem, as mesmas foram acondicionadas no dessecador para

resfriar. Após transcorrido o tempo de 15 minutos as cápsulas com a biomassa foram pesadas em balança analítica. A produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi determinada por meio da equação (05), onde a biomassa seca inicial corresponde à quantidade de biomassa no início do cultivo e a biomassa seca final corresponde à quantidade de biomassa ao término do cultivo.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{biomassa_seca}_{final} - \text{biomassa_seca}_{inicial}}{\text{tempo_de_cultura}_{final} - \text{tempo_de_cultura}_{inicial}} \quad (05)$$

3.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi desenvolvido em quatro etapas:

- 1º Etapa: Estudo do desenvolvimento celular das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. em diferentes condições químicas e físicas, avaliando-as por meio dos parâmetros cinéticos e da produtividade, a fim de verificar as condições ótimas de crescimento.
- 2º Etapa: Mediante a melhor condição de crescimento de cada microalga, adicionou-se o efluente de UASB em diferentes proporções aos seus respectivos meios de cultura, no intuito de constatar a concentração de melhor adaptação da *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.
- 3º Etapa: Em posse da concentração de melhor adaptação de cada microalga, realizou-se o cultivo destas em fotobioreatores de 6L visando produzir biomassa suficiente para quantificação dos teores de lipídios;
- 4º Etapa: Dispondo de tais resultados, foi avaliado qual das espécies de microalgas estudadas é mais viável a produção de biocombustíveis.

3.6.1 Desenvolvimento da 1º Etapa

Nessa etapa buscou-se analisar a influência de diferentes condições de pH e luminosidade. Inicialmente, desenvolveram-se cultivos de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. em meio de cultura BBM e WC, respectivamente, com variadas alterações em seu pH, mantendo-se as condições usuais de aclimação (12h de luminosidade). A alteração do pH foi realizada utilizando solução de hidróxido de sódio (para aumento) e de ácido sulfúrico (para diminuir), ambas a 10%.

Em seguida, desenvolveram-se cultivos com variação no tempo de fornecimento de luz, utilizando-se o pH que proporcionou os melhores resultados de crescimento para cada microalga. As Tabelas 6 e 7 apresentam as condições de pH e luminosidade utilizados durante essa etapa do estudo.

Tabela 6 - Condições de pH utilizadas nos cultivos das microalgas

Valores de pH conferidos aos meios de cultura BBM e WC			
5,5	6,5	7,5	8,5

Fonte: Autora (2016).

Tabela 7 - Condições de luminosidade utilizadas nos cultivos das microalgas

Quantidade de horas de luz fornecidas aos cultivos das microalgas			
6,0	12,0	18,0	24,0

Fonte: Autora (2016).

3.6.2 Desenvolvimento da 2ª Etapa

Com as condições ótimas de pH e luminosidade obtidas a partir do desenvolvimento da etapa anterior, foram realizados cultivos suplementados com efluente de UASB em diferentes proporções: 20%, 30%, 50%, 70%, 80% e 100%. Destaca-se que antes da adição do efluente ao meio, este foi filtrado (Figura 9) em papel filtro qualitativo com porosidade de 14 μ m, gramatura de 80g/m² e espessura de 205 μ m no intuito de reter sólidos suspensos que pudessem interferir nos cultivos.

Figura 9 - Tratamento físico do efluente de UASB



Fonte: Autora (2016).

Essa etapa também contemplou a análise da demanda química de oxigênio (DQO), com a finalidade de verificar se as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. promoveriam redução da carga poluidora do efluente ao final dos cultivos.

Para não ter interferência na DQO devido a presença das células de microalgas, as análises foram realizadas antes do inóculo das mesmas nos meios de cultivo suplementados com as proporções de efluente de UASB já mencionadas e nos resíduos do cultivo (sobrenadante), depois de aproximadamente nove dias, oriundos da separação por meio de centrifugação, da *Chlorella* sp. e da *Scenedesmus* sp. Desse modo, foi possível comparar os valores de DQO_{inicial} e DQO_{final} para verificar se as microalgas promoveram a biorremediação no resíduo líquido em estudo.

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

Em relação as amostras, tem-se que, em diferentes tubos de ensaios foram adicionados 2,5mL das mesmas, juntamente com 1,5mL do reagente DQO₁ e 3,5mL do reagente DQO₂. Os tubos foram misturados lentamente, incluindo as amostras de branco e fundo de escala, e levados ao bloco digestor (Figura 10) por 2h à temperatura de 150°C. Decorrido o tempo necessário, os tubos foram retirados do bloco digestor para resfriamento em temperatura ambiente.

Figura 10 - Bloco digestor utilizado na análise de DQO



Fonte: Autora (2016).

O equipamento de leitura utilizado foi o Fotocolorímetro Digital AquaColor – DQO, previamente calibrado e que expressou os resultados em mg.L^{-1} . As análises foram realizadas em triplicatas e as porcentagens de remoção de DQO foram calculadas segundo a equação (06), em que DQO_{inicial} é a Demanda Química de Oxigênio do meio de cultivo com adição de efluente de UASB e DQO_{final} é a Demanda Química de Oxigênio do sobrenadante do cultivo, após o desenvolvimento e separação das microalgas.

$$\% \text{ remoção} = \frac{DQO_{\text{inicial}} - DQO_{\text{final}}}{DQO_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (06)$$

3.6.3 Desenvolvimento da 3ª Etapa

Essa etapa iniciou-se com a preparação dos inóculos para realizar os cultivos em uma maior escala a fim de obter-se biomassa suficiente para analisar a produtividade lipídica de cada microalga.

Para preparação do inóculo do cultivo de cada microalga foi utilizado um balão volumétrico de 500mL, no qual foram adicionados os nutrientes listados na composição do BBM e do WC (Tabela 4 e 5) e água destilada/autoclavada a 121°C durante 15 min. Sob condições assépticas, foram transferidos 350mL do meio de cultivo para um Erlenmeyer com capacidade de 500mL e a ele adicionou-se 35mL (sempre respeitando a proporção de 1:10) de suspensão de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.

Após uma semana, o cultivo da *Chlorella* sp. recebeu o meio de cultura suplementado com a concentração de efluente de UASB de melhor adaptação e este foi alimentado, durante três semanas, até atingir o volume de 6L.

Em relação ao inóculo do cultivo da *Scenedesmus* sp., este foi transferido para Erlenmeyer de 1L e alimentado com 400mL do meio WC. Passado-se 7 dias, o inóculo foi dividido, em volumes iguais, e direcionado a dois fotobioreatores um com meio de cultivo WC sem modificação e o outro suplementado com a concentração de efluente de UASB de melhor adaptação para essa microalga. Assim como o da *Chlorella* sp., estes fotobioreatores foram alimentados semanalmente com 2L de meio de cultivo conforme suas condições iniciais (sem e com suplementação) até atingir o volume de 6L. A Figura 11 ilustra um dos fotobioreatores supracitados.

Figura 11 - *Scenedesmus* sp. cultivada em meio suplementado com efluente de UASB no fotobioreator de 6L

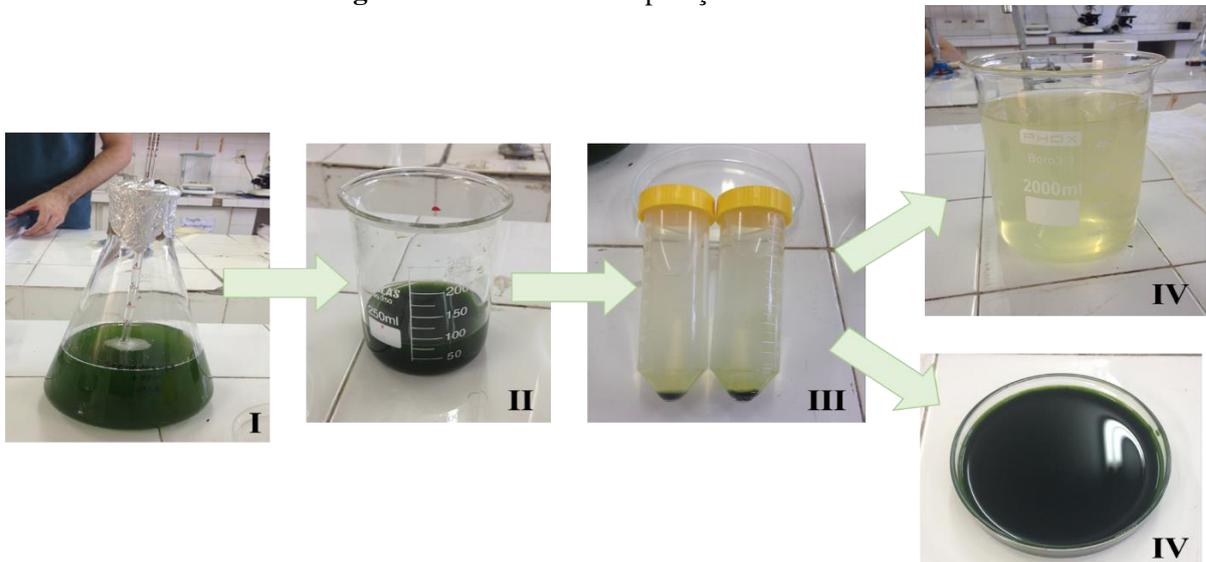


Fonte: Autora (2016).

Atingido o volume dos 6L foi realizada a separação da biomassa através da centrifugação. O processo é ilustrado na Figura 12 e descrito a seguir:

Primeiramente parte do cultivo (I) é colocado em um Béquer de volume reduzido (II) para assegurar um manuseio seguro e sem perdas de biomassa. Posteriormente o cultivo é transferido para cubetas de 50mL, as quais são levadas a uma centrífuga de bancada digital (Modelo CT-4000) por onde ficam sujeitas a uma rotação de 3.500 rpm durante 8 min. Ao final do processo a biomassa (IV) está em sua totalidade no fundo das cubetas (III) e assim é separada do sobrenadante (IV).

Figura 12 - Processo de separação da biomassa



Fonte: Autora (2016).

Esse processo de separação de biomassa é realizado nos cultivos contidos nos três fotobioreatores de 6L utilizados na pesquisa.

Após a centrifugação, as biomassas foram levadas à estufa de esterilização e secagem a uma temperatura de 55°C até ser obtida massa constante. Finalizada a secagem, as biomassas foram trituradas em almofariz e armazenadas em recipientes fechados longe de umidade para posterior determinação de lipídios (Figura 13).

Os lipídios foram determinados por meio da metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957), que consiste em submeter as amostras à extração por meio de uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1) seguida de evaporação do solvente em estufa a 105°C. Devido à resistência da parede celular das microalgas, a metodologia foi adaptada e a esta introduziu-se uma etapa de rompimento celular com o uso de banho ultrassônico.

Em cada análise foram pesados 2g de biomassa (I), seca e triturada, em balança analítica. As amostras foram transferidas para balões com capacidade volumétrica de 100mL e adicionados 30mL da mistura clorofórmio: metanol (2:1). Os balões foram imediatamente vedados com papel alumínio para evitar a volatilização do solvente. Os mesmos foram levados ao banho ultrassônico (II) a uma frequência de 25 kHz durante 20 minutos.

As misturas foram filtradas em provetas de 100mL com a utilização de papéis de filtro qualitativos (III). Após a filtração foram adicionados 10mL do solvente clorofórmio-metanol (2:1) para lavar as paredes dos balões. 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 (IV). Os volumes das fases inferiores foram lidos, e as fases superiores foram retiradas através de sucção com pipeta graduada e descartadas.

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

Os béqueres foram levados à estufa a 55°C para evaporar a mistura de solventes. Após 30 minutos na estufa, os béqueres foram acondicionados no dessecador para resfriar. Transcorrido o tempo de 15 minutos os béqueres com os lipídios (V) foram pesados em balança analítica.

Figura 13 - Processo de determinação de lipídios



Fonte: Autora (2016).

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), tudo isso multiplicado por 100, conforme a equação 7:

$$\% \text{Lipídio} = \frac{\text{volume}_{\text{faseinf}} \times (\text{massa}_{\text{final}} - \text{massa}_{\text{inicial}})}{5 \times M} \quad (07)$$

Onde:

- $\text{volume}_{\text{faseinf}}$ - Volume do extrato da fase inferior
- $\text{massa}_{\text{final}}$ - Massa final do béquer com lipídio
- $\text{massa}_{\text{inicial}}$ - Massa do béquer seco
- M - massa da amostra

3.6.4 Desenvolvimento da 4ª Etapa

Diante dos resultados obtidos nas etapas anteriores, avaliou-se os parâmetros cinéticos, a produtividade, a remoção da carga poluidora e a quantidade de lipídios de cada microalga para determinar qual espécie é mais viável a produção de biocombustível, além disso, foi realizado um estudo estatístico afim de corroborar tais conclusões.

Durante a realização deste trabalho fez-se o estudo da matriz de correlação com o objetivo de verificar o nível de relação entre as variáveis analisadas. Além deste, foi efetuado um estudo estatístico multivariado dos dados por meio da Análise em Componentes Principais a fim de estudar a formação dos grupos de variabilidades equivalentes. O critério adotado para seleção de variáveis foi a existência de uma correlação mínima de $\pm 0,6$ entre a coluna da variável e pelo menos duas outras variáveis. Para estas análises foram utilizados os programas Microsoft Excel 2016 e STATISTIC 7.0.

Para analisar a diferença entre as microalgas por meio da comparação dos parâmetros estudados, recorreu-se a análise da variância (ANOVA). Assim, foi adotado um nível de confiança de 99%, ou um *p-valor* de 0,01, e uma hipótese nula de que não existe diferença entre os parâmetros avaliados para as duas microalgas. Caso a hipótese nula não seja rejeitada, de acordo com o nível de confiança de 99%, o *p-valor* encontrado deve apresentar um valor superior a 0,01, com isso os parâmetros estudados serão iguais estatisticamente. Caso o *p-valor* seja inferior a 0,01, a hipótese nula passa a ser, estatisticamente, rejeitada, e assim os parâmetros avaliados apresentarão diferença estatisticamente significativas.

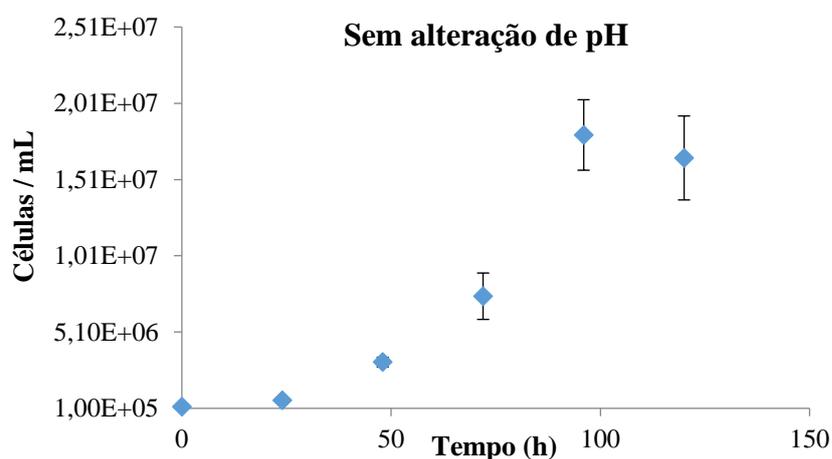
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CULTIVO DE MICROALGAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES FÍSICO-QUÍMICA

4.1.1 *Chlorella* sp. sob diversas condições de pH

Servindo de base para o estudo, realizou-se um cultivo de *Chlorella* sp. em meio de cultivo BBM sem ajuste de pH (pH do BBM = 7) e sem alteração na disponibilidade de luz. A Figura 14 ilustra a curva de crescimento da microalga nas respectivas condições, ressaltando que o cultivo iniciou com uma densidade celular de $2,16 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e alcançou a densidade máxima de $1,80 \times 10^7$ células.mL⁻¹ em apenas quatro dias.

Figura 14 - Curva de crescimento da microalga *Chlorella* sp. em meio BBM

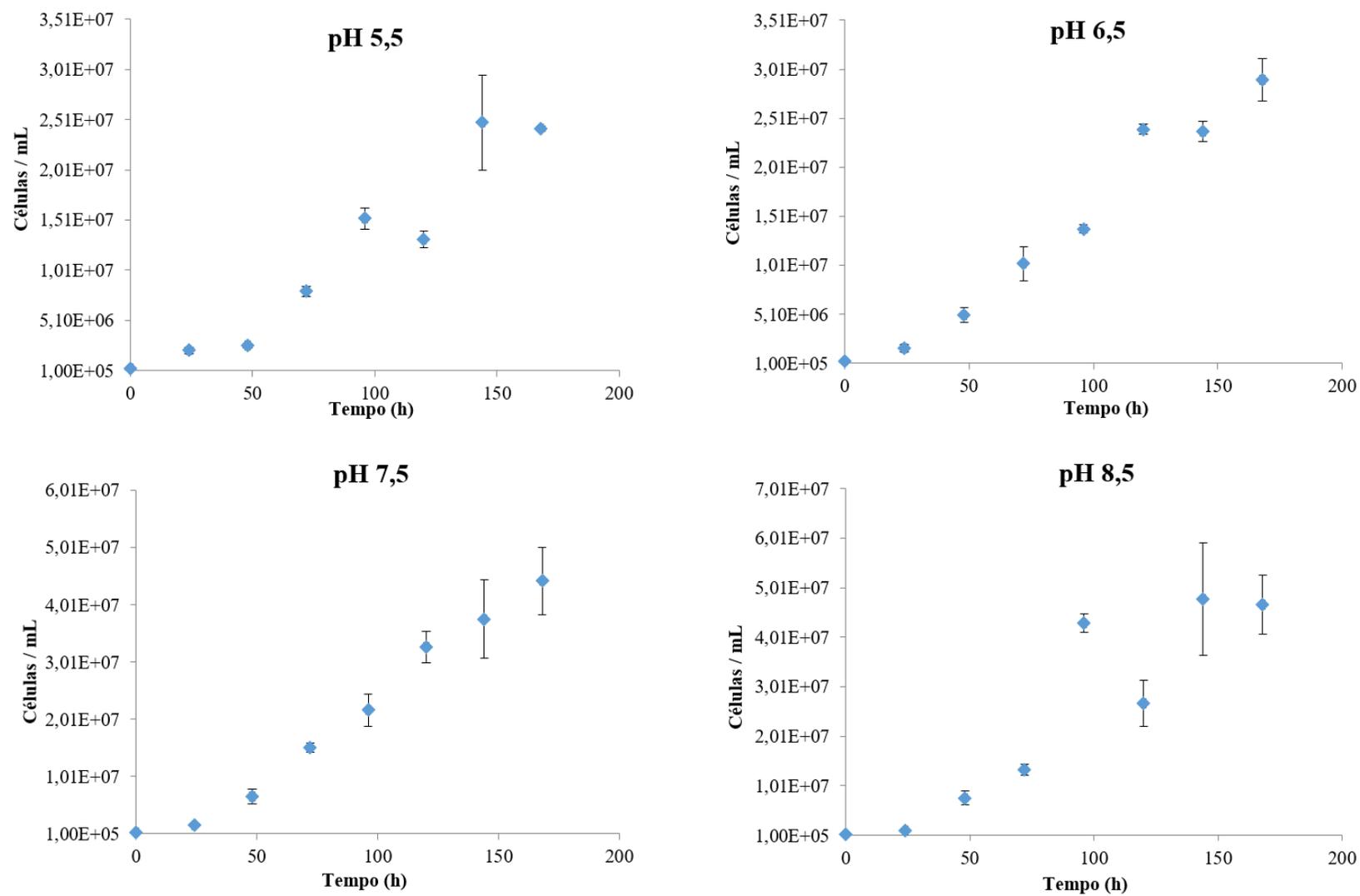


Fonte: Autora (2016).

Estudos realizados por Ferreira (2012) com cepas de *Chlorella* sp. cultivadas em meio BBM e sob as mesmas condições de aclimação usadas nesta pesquisa, obteve densidade celular em quatro dias similar ao do estudo ($1,6 \times 10^7$ células.mL⁻¹) e alcançou densidade máxima apenas do décimo sexto dia de cultivo com $5,9 \times 10^7$.cel.mL⁻¹.

Santos et al. (2010), estudaram o crescimento da *Chlorella vulgaris* em meio de cultura Conway modificado com fotoperíodo de 12 horas em fotobioreatores de vidro de 250mL com intensidade luminosa de 4000lux e obtiveram a densidade máxima celular no oitavo dia cultivo de $2,5 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, densidade bem próxima ao encontrada no estudo.

A fim de verificar a influência que a variação de pH exerce sobre os parâmetros cinéticos e sobre a produtividade de biomassa da microalga *Chlorella* sp., foram elaborados cultivos variando-se o pH do meio de cultura BBM em uma faixa de 5,0 a 9,0 (Figura 15), mantendo-se as aclimações físicas utilizadas usualmente (12h de luminosidade).

Figura 15 - Curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp. sob variações de pH

Fonte: Autora (2016).

Todos os cultivos iniciaram com uma densidade celular na ordem de 10^5 cel.mL⁻¹ e, apesar da variação de pH, apresentaram ótima adaptação e desenvolvimento celular chegando a alcançar população na ordem de 10^7 cel.mL⁻¹.

Dentre os cultivos da *Chlorella* sp., o realizado com o pH 8,5 foi o que apresentou maior densidade celular ($4,79 \times 10^7$ cel.mL⁻¹), assim como os melhores resultados de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração, conforme verificado na Tabela 8. Corroborando esse cultivo com o cultivo-base (pH 7,0), verificou-se pouca diferença entre os parâmetros cinéticos e a produtividade, indicando que os meios de cultura em pH neutro ou alcalino promovem melhor adaptação e crescimento na respectiva microalga. Salienta-se também que o pH ácido proporcionou elevado tempo de geração e assim necessitou de um tempo maior para dobrar sua concentração celular inicial.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de *Chlorella* sp. sob variações de pH

pH do meio de cultura	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
5,5	0,0293	23,66	0,0438
6,5	0,0381	18,19	0,0942
7,0 (inalterado)	0,0517	13,41	0,1123
7,5	0,0470	14,75	0,0787
8,5	0,0526	13,18	0,1008

Fonte: Autora (2016).

Marinho et al. (2009) cultivaram *Chlorella vulgaris* em meio de cultura Conway modificado mantida a temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo integral e intensidade luminosa de 5000 lux fornecida a partir de lâmpadas fluorescentes de 40W, com três variações de pH: 5,7 e 9. Em tal estudo foi observado densidade celular máxima ($1,0005 \times 10^8$ cel.mL⁻¹) na variação de pH 5,0 no nono dia de cultivo, porém até o sexto dia de cultivo foi encontrado valores superiores de densidade celular na variação de pH 7,0, evidenciando assim a possibilidade de inserir resíduos líquidos que apresentam características ácidas no meio de cultivo destas microalgas. Contudo, no presente estudo as densidades celulares na variação de pH 7,5 foram superiores a variação de pH 5,5 em todas as fases de crescimento.

Segundo Esteves (1988), em meio aquoso o carbono inorgânico pode estar na forma de CO₂, H₂CO₃ (ácido carbônico), HCO₃³⁻ (bicarbonato) ou CO₃²⁻ (carbonato) e suas proporções dependem do pH, sendo que, conforme o aumento do pH (alcalinização) as

proporções bicarbonatos e carbonatos aumentam no meio de cultura. Assim, em uma cultura com pH ácido ocorre uma maior disponibilidade de CO₂, sendo esta, a fonte de carbono preferida pelas microalgas.

Sutherland et al. (2015) investigaram os efeitos da adição de CO₂ no cultivo de microalgas em águas residuárias, ao longo de um gradiente de pH, e observaram melhor eficiência fotossintética quando o pH das culturas foram reduzidos para 8 e 6,5, onde o pH 6,5 promoveu o melhor rendimento de biomassa das microalgas *Micractinium bornhemiense* e *Pediastrum boryanum*, porém reduziu de forma significativa a eficiência na absorção de nutrientes. Isso demonstra que, para o tratamento de águas residuárias, o pH alcalino favorece a remoção de nutrientes, de modo que a microalga *Chlorella* sp. ao desenvolver melhor cinética de crescimento em pH 8,5, é uma forte candidata para remediação de efluentes alcalinos.

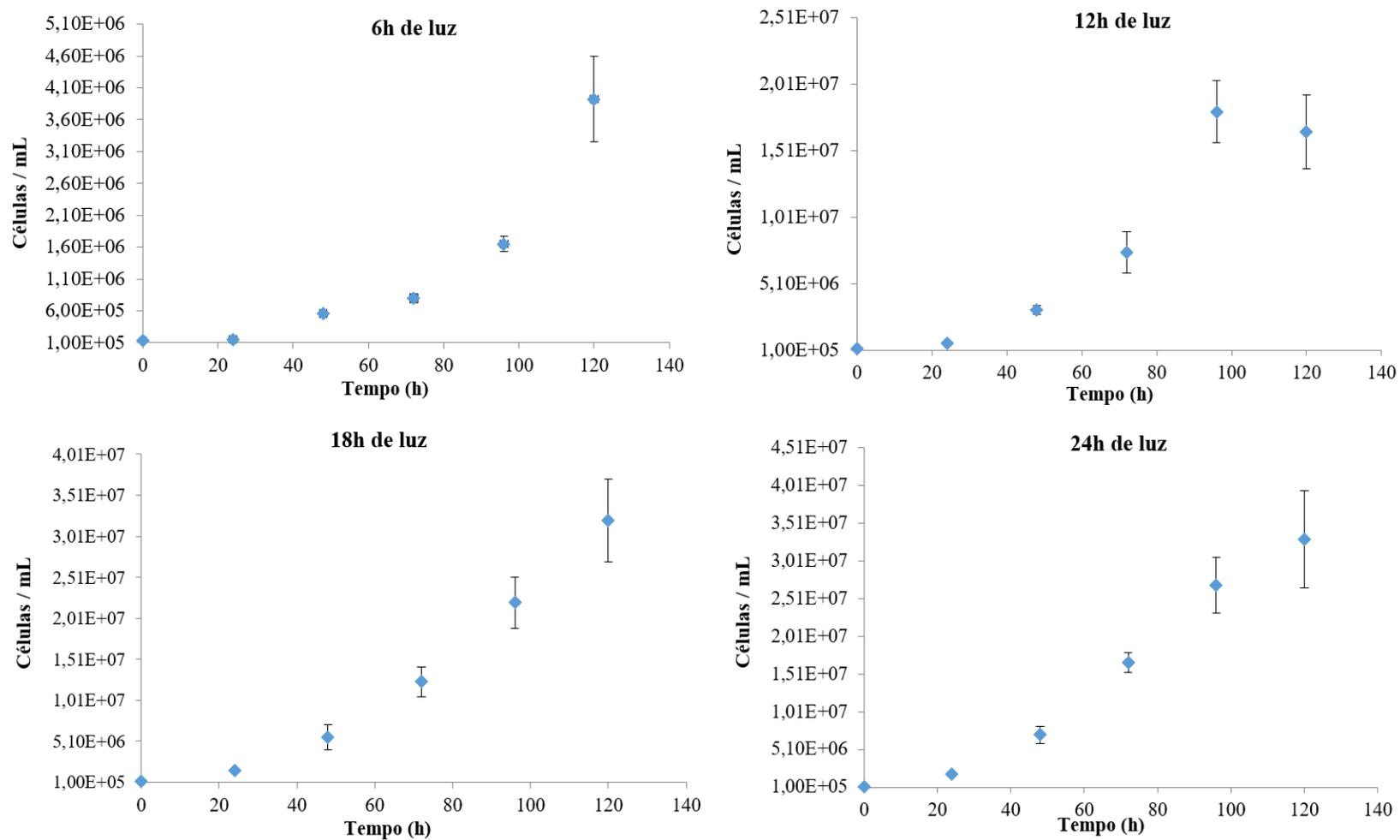
Desse modo, observando-se que do cultivo base (pH 7 - inalterado) para o cultivo com pH 8,5 os parâmetros cinéticos e a produtividade (apresentados na Tabela 8) foram quase equivalentes aliado ao fato de não necessitar de reagentes para ocasionar essa variação no pH, optou-se por selecionar essa condição química para os demais experimentos, ou seja, deu-se continuidade aos estudos com a *Chlorella* sp. sem alterar o pH do meio de cultura BBM.

4.1.2 *Chlorella* sp. sob diversas condições de luminosidade

No intuito de investigar a influência que a variação de luminosidade pode exercer sobre o crescimento da microalga *Chlorella* sp, foram elaborados cultivos variando-se a disponibilidade de luz no meio em intervalos de 6h, 12h, 18h e 24h. Ressalta-se que o cultivo com 12h de luz é o cultivo-base conforme mencionado no exposto acima.

A Figura 16 ilustra as curvas de crescimento da respectiva microalga sob as condições de luminosidade supracitadas. Os cultivos foram realizados sem alteração do pH do meio de cultura e iniciaram com uma densidade celular na ordem de 10⁵ cel.mL⁻¹.

Verificou-se que os cultivos com menor luminosidade apresentaram uma maior fase lag, o que corresponde a um lento crescimento nos primeiros dias após o inóculo. Já os cultivos com maior disponibilidade de luz rapidamente chegaram à fase exponencial devido a intensificação no processo de fotossíntese e assim apresentaram acelerado crescimento já no segundo dia após o inóculo.

Figura 16 - Curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp. sob variações de luminosidade

Fonte: Autora (2016).

O cultivo da *Chlorella* sp. com radiação luminosa por 24h foi o que obteve a maior densidade celular ($3,30 \times 10^7$ cel.mL⁻¹), porém os melhores parâmetros cinéticos foram constatados nos cultivos com luminosidade por 12h conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de *Chlorella* sp. sob variações de luminosidade

Horas de luz (h)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h⁻¹)	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa (g.L⁻¹.d⁻¹)
6	0,0227	30,54	0,00375
12	0,0517	13,41	0,11233
18	0,0436	15,90	0,13440
24	0,0464	14,94	0,14917

Fonte: Autora (2016).

Observou-se que a baixa disponibilidade de luz reduziu consideravelmente o desempenho da microalga em estudo, que apresentou menor cinética de crescimento em decorrência da iluminação de 6h. Fato comprovado em estudos realizados por Chiranjeevi e Mohan (2016), que mostraram uma maior produtividade de biomassa de microalgas na presença de luz que na ausência.

Segundo Chisti (2007) cerca de 25% da biomassa produzida durante o dia é perdida no decorrer da noite devido à alta taxa de respiração.

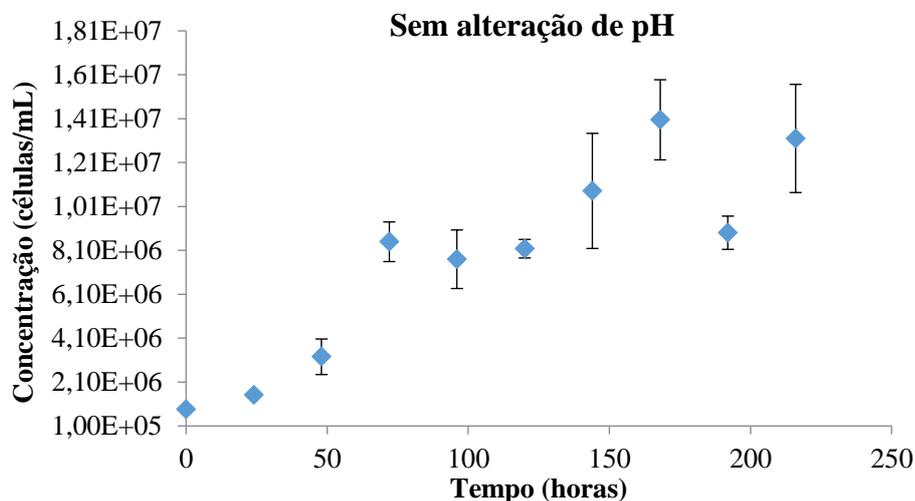
Han et al. (2015) estudaram a influência da luz no crescimento da *Chlorella* sp. fornecendo energia com intensidade na faixa de 2.000-10.000 lux, e observaram que a taxa de crescimento e o rendimento de biomassa seca apresentaram resultados mais satisfatórios à medida que se aumentava a intensidade luminosa, porém, 6.000 lux satisfaz completamente a necessidade das microalgas. Para o atual estudo, verifica-se que um tempo de exposição a luz intermediário é suficiente para as necessidades microalgais, pois promoveu a melhor cinética de crescimento. Além disso, em larga escala se pretende simular as condições externas do meio ambiente, o que reforça o a utilização do tempo de luminosidade de 12h para o cultivo de *Chlorella* sp.

4.1.3 *Scenedesmus* sp. sob diversas condições de pH

Servindo de base para o estudo, realizou-se um cultivo de *Scenedesmus* sp. em meio WC sem ajuste de pH (pH do WC = 9) e sem alteração na disponibilidade de luz. A Figura 17 ilustra a curva de crescimento da microalga nas respectivas condições, ressaltando que o

cultivo iniciou com uma concentração de $8,66 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e alcançou a densidade celular máxima de $1,40 \times 10^7$ células.mL⁻¹ no sétimo dia de cultivo.

Figura 17 - Curva de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio WC



Fonte: Autora (2016).

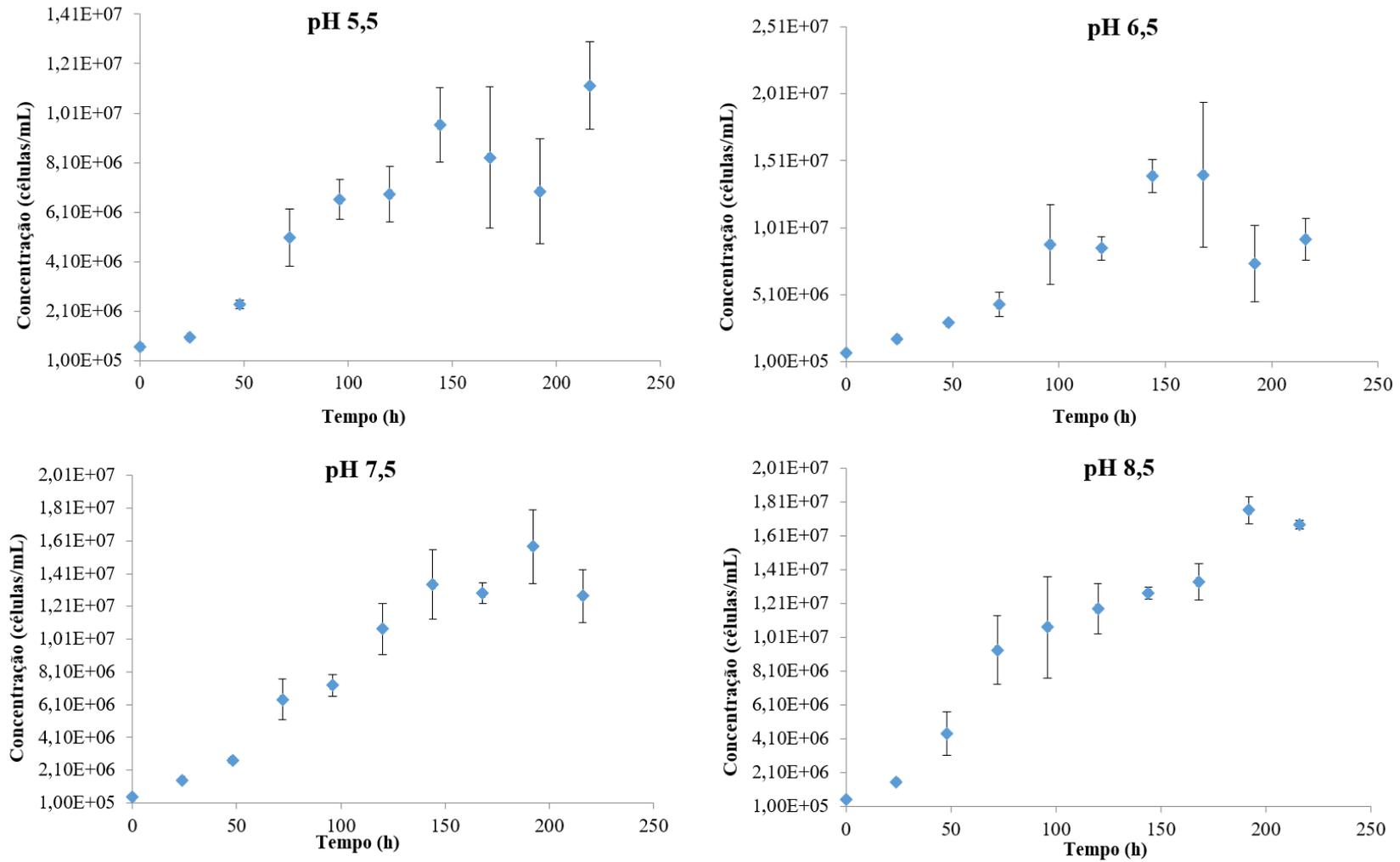
Menezes et al. (2009) realizaram cultivos de cepas de *Scenedesmus* sp. em diferentes meios e alcançaram densidade celular máxima de 6×10^6 células.mL⁻¹ no meio LC Olico e $3,8 \times 10^6$ células.mL⁻¹ no meio WC, ambos após o décimo dia de cultivo.

Estudo realizado por Lemos (2012) com a *Scenedesmus* sp. em meio Guillard – “F/2” modificado, a temperatura de 17 ± 2 °C e a iluminação em aproximadamente $111,5 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtida por meio de lâmpadas fluorescente, sem fotoper\u00edodo, obteve densidade celular máxima de $1,2 \times 10^7$ células.mL⁻¹ no décimo nono dia de cultivo, valor bem pr\u00f3ximo ao encontrado no estudo s\u00f3 que em menor tempo.

A fim de verificar a influ\u00eancia que a varia\u00e7\u00e3o de pH exerce sobre os par\u00e2metros cin\u00e9ticos e sobre a produtividade de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp., foram elaborados cultivos variando o pH do meio de cultura WC em uma faixa de 5,0 a 9,0 (Figura 18), mantendo-se as aclima\u00e7\u00f5es f\u00edsicas utilizadas usualmente (12h de luminosidade).

Todos os cultivos iniciaram com uma densidade celular na ordem de 10^5 células.mL⁻¹ e, apesar da varia\u00e7\u00e3o de pH, alcan\u00e7aram quantidades semelhantes de n\u00famero de c\u00e9lulas. O cultivo de *Scenedesmus* sp. em meio WC com pH 8,5 foi o que apresentou maior densidade celular ($1,76 \times 10^7$ cel.mL⁻¹), assim como os melhores resultados de velocidade espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento e tempo de gera\u00e7\u00e3o, no entanto, desenvolveu uma das menores produtividades quando relacionado com os demais, conforme verificado na Tabela 10.

Figura 18 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. sob variações de pH



Fonte: Autora (2016).

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de *Scenedesmus* sp. sob variações de pH

pH do meio de cultura	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
5,5	0,0329	21,07	0,05292
6,5	0,0214	32,39	0,07908
7,5	0,0303	22,88	0,08450
8,5	0,0374	18,53	0,07525
9,0(inalterado)	0,0360	19,25	0,09556

Fonte: Autora (2016).

Comparando o cultivo de *Scenedesmus* sp. em meio WC com pH 8,5 com o cultivo-base (pH 9,0), verificou-se bastante proximidade entre os parâmetros cinéticos, indicando que os meios de cultura em pH alcalino promovem melhor adaptação e crescimento para a microalga em questão. Desse modo, utilizou-se a produtividade em biomassa como fator decisivo para escolha da melhor condição química, devido a esta ser componente essencial para a produção de biocombustíveis, portanto, deu-se continuidade aos estudos com *Scenedesmus* sp. sem alterar o pH do meio de cultura WC tendo em vista que esse meio apresenta a melhor produtividade para a microalga estudada.

Tripathi et al. (2015) cultivaram *Scenedesmus* sp. em meio de cultura BG-11, com pH 7,4 e 18 h de luz, e analisaram a influência do pH alterando-o numa faixa entre 7 e 10, em que a microalga obteve sua maior produtividade em pH 8, mostrando que seu meio de cultivo deve ser alcalino. Chiranjeevi e Mohan (2016) também verificaram maior produção de biomassa em pH alcalino (8,5), que em pH ácido (6) e neutro (7,5). Fato reforçado no presente estudo, onde a produtividade da respectiva microalga aumentou juntamente com o pH.

Xin et al. (2011) descreveram que, ao cultivarem *Scenedesmus* sp. em diferentes concentrações de pH (3,9 - 10,3), o crescimento da microalga foi inibido pela condição ácida (pH<6,0). Aburai et al. (2015) cultivaram a *Scenedesmus* sp. em BBM autoclavado, com pH ajustado para 8, em Erlenmeyers de 500mL, e obtiveram uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,0112 \text{ h}^{-1}$. Corroborando essa velocidade com o presente estudo, verificou-se que o meio WC em pH alcalino, além de favorecer a produção de biomassa, também favoreceu a cinética de crescimento da microalga, cuja velocidade específica máxima de crescimento alcançou o valor de $0,0360 \text{ h}^{-1}$ em pH 9.

4.1.4 *Scenedesmus* sp. sob diversas condições de luminosidade

No intuito de investigar a influência que a variação de luminosidade pode exercer sobre o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp, foram elaborados cultivos variando-se a disponibilidade de luz no meio em intervalos de 6h, 12h, 18h e 24h. Ressalta-se que o cultivo com 12h de luz é o cultivo-base conforme mencionado no exposto acima.

A Figura 19 ilustra as curvas de crescimento da respectiva microalga sob as condições de luminosidade supracitadas. Os cultivos foram realizados mantendo-se a melhor condição de pH definida na seção anterior.

Os cultivos com 6h e 12h de luz iniciaram com um número de células na ordem de 10^5 cel.mL⁻¹, enquanto que os com 18h e 24h de luz iniciaram na ordem de 10^4 cel.mL⁻¹. Por esse motivo, os dois primeiros alcançaram maiores valores de número de células que os demais. No entanto, verifica-se que os cultivos com menor luminosidade apresentaram uma maior fase lag, o que corresponde a um lento crescimento nos primeiros dias após o inóculo. Já os cultivos com maior disponibilidade de luz rapidamente chegaram à fase exponencial, apresentando acelerado crescimento já no segundo dia após o inóculo.

Para uma melhor análise da influência da radiação luminosa sobre a microalga *Scenedesmus* sp. a Tabela 11 expõe os dados de velocidade específica máxima de crescimento, tempo de geração e produtividade de biomassa dos cultivos com 6h, 12h, 18h e 24h de iluminação.

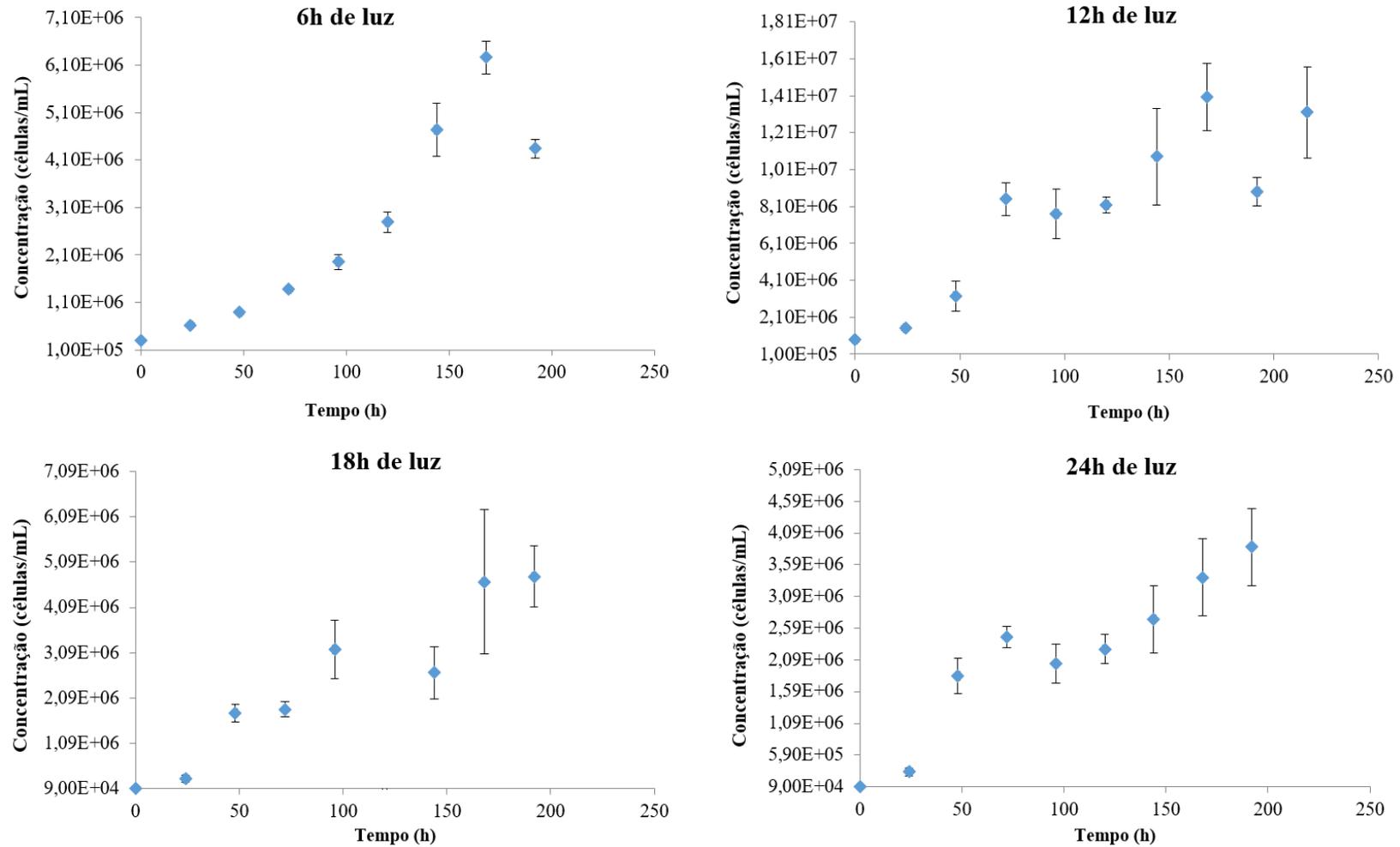
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa dos cultivos de *Scenedesmus* sp. sob variações de luminosidade

Horas de luz (h)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
6,0	0,0165	42,01	0,05217
12,0	0,0360	19,25	0,09556
18,0	0,0291	23,82	0,09517
24,0	0,0420	16,50	0,13108

Fonte: Autora (2016).

O cultivo da *Scenedesmus* sp. com radiação luminosa por 24h foi o que obteve o menor tempo de geração, ou seja, o menor tempo para duplicar sua concentração inicial, porém a justificativa para não utilizar o fotoperíodo integral neste trabalho se deve ao fato de não simular as mesmas condições ambientais do campo, uma vez que o intuito é efetuar o cultivo a céu aberto e evitando o uso de energia artificial que encarecerá o custo do cultivo.

Figura 19 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. sob variações de luminosidade



Fonte: Autora (2016).

4.2 CULTIVO DAS MICROALGAS EM EFLUENTE DE UASB

O cultivo de microalgas como a *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. tem sido associado a um grande potencial para produção de biocombustíveis. Uma das limitações para a produção de microalgas em escala industrial é a disponibilidade de suplementos nutricionais de baixo custo (CHISTI, 2007). Portanto, têm-se realizado diversos estudos com o cultivo de microalgas em efluentes, como uma forma de minimizar os custos de produção de biocombustíveis a partir das mesmas (BENEMANN, 2009).

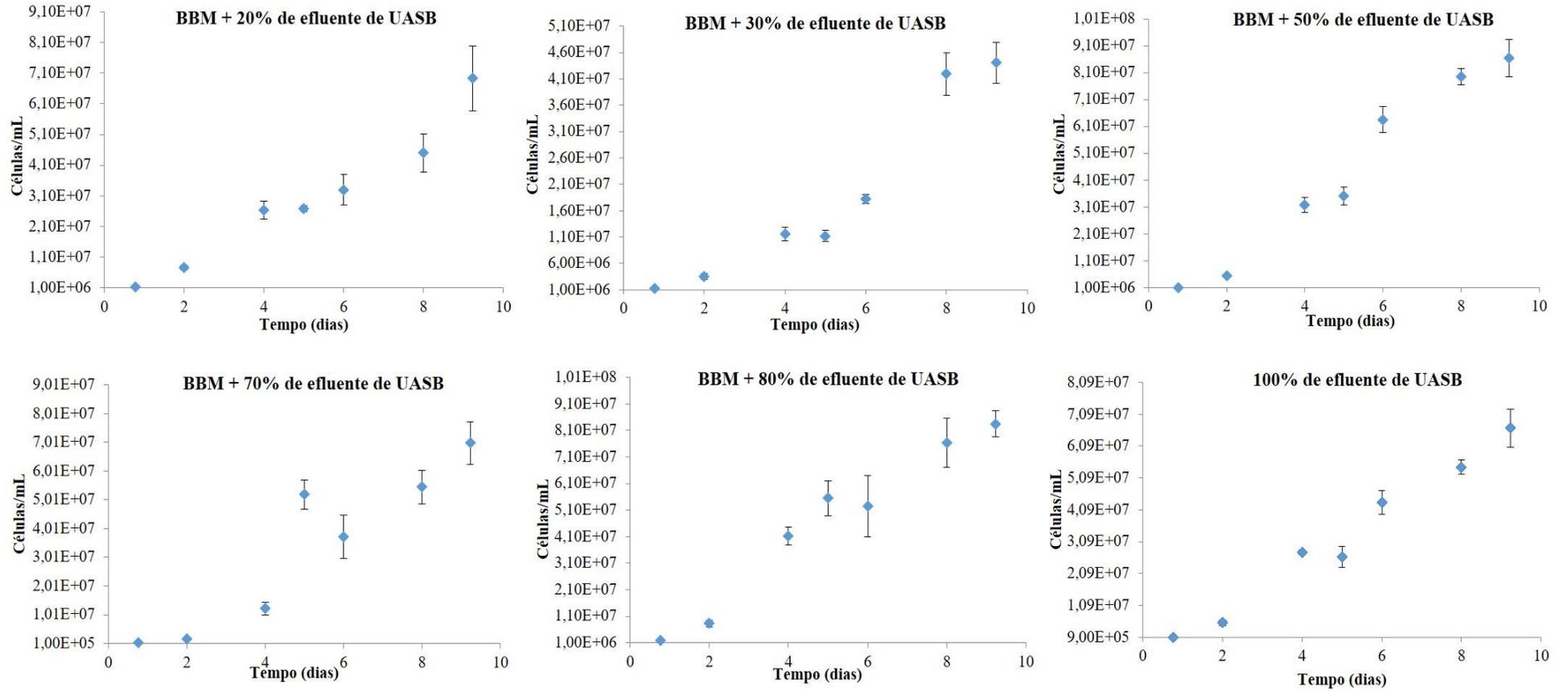
Para tanto, buscou-se o aproveitamento de efluentes de sistemas de tratamento anaeróbio de esgotos domésticos provenientes de reator tipo UASB e assim foram realizados cultivos de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. com suplementação desse efluente nas proporções de 20%, 30%, 50%, 70%, 80% e 100%, objetivando estudar a cinética de crescimento celular em função das diferentes concentrações e formulações do meio de cultura utilizado.

4.2.1 *Chlorella* sp. cultivada em meio BBM suplementado com efluente de UASB

Para estudar a cinética de crescimento celular em função das diferentes concentrações oferecidas aos cultivos, foram plotadas curvas de crescimento para cada experimento (Figura 20) e assim foram avaliados os parâmetros cinéticos (densidade celular, velocidades específicas máximas de crescimento e tempos de geração), produtividades de biomassa, remoção da demanda química de oxigênio de cada cultivo com o objetivo de identificar as condições que melhor promoveram o desenvolvimento da microalga em estudo.

A partir das curvas ilustradas na Figura 20 observou-se que todas as concentrações favoreceram a um excelente desenvolvimento celular da *Chlorella* sp., em que todos atingiram a ordem de 10^7 cel.mL⁻¹ ao final dos cultivos. Esse fato é comprovado por Lúcio (2014) que realizou estudos com a microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em efluente doméstico como meio de cultura alternativo e obteve uma densidade celular máxima de $5,2 \times 10^7$ cel.mL⁻¹.

Figura 20 - Curvas de crescimento da *Chlorella* sp. em meio BBM suplementado com diferentes proporções de efluente de UASB



Fonte: Autora (2016).

Os dados experimentais da *Chlorella* sp. em meio de cultivo BBM contendo 20% do efluente de UASB, mostram um elevado crescimento da microalga em 9 dias de cultivo em que iniciou com $1,36 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e terminou com $6,93 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Vieira et al., (2014) avaliaram o crescimento da *Chlorella* sp. em efluentes agroindustriais (suplementados na mesma proporção) e perceberam dificuldade na adaptação celular assim como crescimento tardio das microalgas em estudo, apresentando densidade máxima celular já no quarto dia ($6,95 \times 10^6$ cel.mL⁻¹) com posterior declínio nos dias seguintes. Assim verifica-se que, com efluentes domésticos essa concentração é mais facilmente adaptada pela *Chlorella* sp.

Os resultados experimentais da *Chlorella* sp. em meio de cultivo BBM contendo 30% de efluente de UASB, evidenciam ótimo crescimento no período de 9 dias. O cultivo iniciou com $1,26 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e foi finalizado com $4,41 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Estudo realizado por Cunha (2014) nesta mesma proporção de efluente de UASB obteve densidade celular máxima de $8,33 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, tendo este iniciado com $3,73 \times 10^5$ cel.mL⁻¹, mostrando-se assim resultados similares com o presente estudo.

Os dados experimentais da microalga em estudo, cultivada em BBM com adição de 50% de efluente de UASB foram os mais expressivos. Esse cultivo partiu de uma população de $1,06 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e atingiu a maior densidade celular dentre todos os cultivos ($8,66 \times 10^7$ células.mL⁻¹) demonstrando que os nutrientes presentes no efluente de UASB favoreceram satisfatoriamente ao crescimento das microalgas. Em contrapartida aos cultivos suplementados com 20 e 30% de efluente de UASB, o cultivo em questão apresentou uma adaptação mais rápida no início dos cultivos, fato esse comprovado nas fases lag de cada cultivo mencionado, e por isso foi beneficiado com um desenvolvimento mais eficiente quando comparado aos demais.

O cultivo da *Chlorella* sp. em meio BBM contendo 70% de efluente de UASB, no tempo de 9 dias iniciou com $2,61 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e terminou com $6,98 \times 10^7$ células.mL⁻¹, também apresentando excelente crescimento celular, visto que começou com uma concentração inferior de células (na ordem de 10^5 células.mL⁻¹) quando comparado com os demais cultivos (que iniciaram na ordem de 10^6 células.mL⁻¹).

Os resultados experimentais da *Chlorella* sp. em meio de cultivo BBM contendo 80% de efluente de UASB revelam que o efluente de UASB não é tóxico para as microalgas, pelo contrário, favorece o seu crescimento podendo ser utilizado em altas concentrações no meio de cultivo e assim reduzir custos ao substituir parcialmente o meio sintético. O cultivo iniciou com $2,04 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e terminou com $8,35 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Cunha (2014) realizou

estudo com a *Chlorella* sp. nestas mesmas condições e obteve densidade celular máxima de $2,28 \times 10^7 \text{cel.mL}^{-1}$, valor inferior ao encontrado no presente estudo.

O cultivo da *Chlorella* sp. em 100% de efluente de UASB, ou seja, sem o meio sintético BBM exprimiram excelente e constante crescimento das microalgas, mostrando que apenas os nutrientes presentes no efluente de UASB são suficientes para o seu desenvolvimento. O cultivo durou 9 dias e iniciou com $9,23 \times 10^5 \text{células.mL}^{-1}$, ao seu término contou com $6,66 \times 10^7 \text{células.mL}^{-1}$. Salienta-se que o descarte do meio sintético viabiliza o cultivo da *Chlorella* sp para a produção de biocombustíveis ao mesmo tempo em que essa microalga, ao utilizar os nutrientes do efluente, está promovendo o tratamento do mesmo.

Corroborando o presente estudo Cho et al. (2011), observaram o crescimento gradativo de *Chlorella* sp., cultivada em efluente de tratamento de esgoto sanitário com diferentes tipos de pré-tratamentos, e concluiu que o efluente apresenta componentes disponíveis necessários para o crescimento de microalgas, sem adição externa de nutrientes.

Cunha (2014) também cultivou a microalga em estudo apenas com o efluente de UASB, e este atingiu densidade populacional máxima de $2,28 \times 10^7 \text{cel.mL}^{-1}$, valor próximo ao encontrado no presente estudo.

Já Fernandez (2013) cultivou a *Chlorella* sp. em 100% do concentrado da dessalinização de osmose inversa e observou a dificuldade no crescimento celular devido a alteração do meio por alguns nutrientes, pois, pode ocorrer o déficit de nutrientes causando o declínio celular, embora tenha ocorrido discreto desenvolvimento das microalgas.

As microalgas, em sua diversidade, são organismos muito flexíveis quanto ao habitat, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada. Esta capacidade proporciona vantagens consideráveis em comparação com os cultivos convencionais utilizados para a produção de biocombustíveis, com potencial de minimizar o uso e os impactos ambientais adversos nos recursos naturais solo e água (FRANCO et al., 2013). Prova disso é a adaptação da *Chlorella* sp. em efluentes do reator tipo UASB, sem uso algum de meio sintético e também em efluentes industriais desde que em menores proporções.

Para avaliação mais efetiva dos cultivos realizados a Tabela 12 expõe uma síntese dos parâmetros cinéticos, das produtividades de biomassa e da remoção da demanda química de oxigênio dos cultivos de *Chlorella* sp. sob diversas condições de suplementação orgânica com efluente de UASB. A condição de 0% de efluente indica o cultivo da microalga apenas em meio BBM e a condição de 100% indica o cultivo apenas em efluente de UASB. As demais

condições correspondem à utilização do meio BBM e do efluente de UASB em conjunto, sob diferentes proporções.

Tabela 12 - Parâmetros avaliados nos cultivos de *Chlorella* sp. suplementados com efluente de UASB

Efluente de UASB (%)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Remoção de DQO (%)
0	0,0517	13,41	0,112	-
20	0,0371	18,68	0,171	29,22
30	0,0282	24,58	0,084	25,87
50	0,0433	16,01	0,125	62,95
70	0,0491	14,12	0,106	59,00
80	0,0383	18,10	0,133	47,54
100	0,0428	16,20	0,180	23,11

Fonte: Autora (2016).

O cultivo realizado com efluente de UASB na proporção de 70% apresentou a melhor velocidade específica de crescimento e o melhor tempo de geração dentre as demais proporções, valores esses bem próximos do cultivo isento do efluente, indicando que essa concentração de efluente de UASB foi a que promoveu o melhor desenvolvimento da microalga. Por outro lado, os cultivos de 50% e 100% também obtiveram excelentes resultados de velocidade específica e de tempo de geração, uma vez que foram obtidos valores próximos para os parâmetros cinéticos supracitados, podendo qualquer uma, dessas três concentrações, ser adotada para a produção de biocombustíveis.

Antônio et al. (2013) cultivaram a microalga *Chlorella vulgaris* em meio WC modificando intensidade de luz, concentração celular inicial e concentração inicial de nitrato, em Erlenmeyers de 500mL contendo 300mL de suspensão celular, a 25°C, e obtiveram uma velocidade específica máxima de 0,0138 h^{-1} . No entanto, Melo (2015), cultivou a *Chlorella* sp. em meio BBM suplementado com vinhaça, obtendo velocidade específica máxima de 0,0200 h^{-1} e tempo de geração de 34,657 h.

Quando avaliados a produtividade de biomassa de cada cultivo percebe-se que a *Chlorella* sp. alcançou maior valor de biomassa quando cultivada em 100% de efluente de UASB, chegando a uma concentração de 0,180 $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Porém, esse alto valor pode ter ocorrido pelo incremento dos sais do efluente à biomassa seca, mascarando o real valor de sua produtividade. Entre os demais cultivos destaca-se o de 20% de efluente de UASB, com uma

produtividade em biomassa de $0,171 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, cujo valor é justificado pela predominância do meio sintético específico da microalga, onde a mesma está adaptada e desenvolve-se melhor.

Lúcio (2013) estudou o cultivo da *Chlorella vulgaris* em efluente doméstico como meio alternativo e este obteve uma velocidade específica de crescimento de $0,0154 \text{ h}^{-1}$ e produtividade em biomassa de $0,118 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Redaelli (2011) realizou cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura f1/2 com intensidade de 17.000lux e observou na fase exponencial do crescimento a velocidade específica máxima de $0,0254 \text{ h}^{-1}$ semelhante a obtido no cultivo com 30% de efluente de UASB.

Buscando-se a viabilidade econômica dos cultivos, destacam-se as proporções de 50% e 80%, com produtividades de $0,125$ e $0,133 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente. Dentre esses, o cultivo de 50% mostrou-se superior em relação ao número final de células, velocidade específica de crescimento e tempo de geração.

A Tabela 12 também mostra dados de remoção de DQO, obtidos por meio de análises realizadas no início e no fim de todos os cultivos. Pode-se observar que nas concentrações de 50% e 70% de efluente de UASB a microalga reduziu a DQO em 62,95% e 59,00%, respectivamente, sendo esses os melhores resultados e proporções para promover o tratamento do efluente. Percebe-se também que, ao se aumentar a concentração do efluente, a redução de DQO diminui. Isso acontece devido ao fato do efluente de UASB possuir muita carga orgânica de difícil assimilação por microrganismos, uma vez que a parte mais assimilável já foi consumida durante o tratamento anaeróbio do esgoto sanitário.

Torres et al. (2014) ao cultivar *Chlorella* sp. em efluente de UASB autoclavado obtiveram 36,8% de remoção de DQO como melhor resultado, valor menor que o alcançado neste estudo. Isso indica que a desinfecção prévia do efluente, além de não promover aumento na geração de lipídios, também não melhorou a remoção de DQO, podendo ser descartada para minimizar os custos energéticos.

Melo (2015), ao cultivar *Chlorella* sp. em meio BBM suplementado com vinhaça, conseguiu uma remoção de DQO de 87,57%, reduzindo a DQO do meio de $1528,33 \text{ mg.L}^{-1}$ para $190,00 \text{ mg.L}^{-1}$, destacando a resistência dessa microalga e também a sua eficácia no tratamento de efluentes agroindustriais.

De modo geral, as concentrações de 50% e 70% se destacaram na maioria das análises. Dentre elas, a mais recomendada para a produção de biocombustíveis é a de 50%, por ser o cultivo em que a *Chlorella* sp. melhor se adaptou, desenvolvendo a melhor cinética de crescimento microalgal, a maior produtividade em biomassa e por promover excelente

redução na DQO. Tais fatos foram determinantes para que essa fosse a concentração de efluente de UASB adotada para a determinação dos lipídios totais.

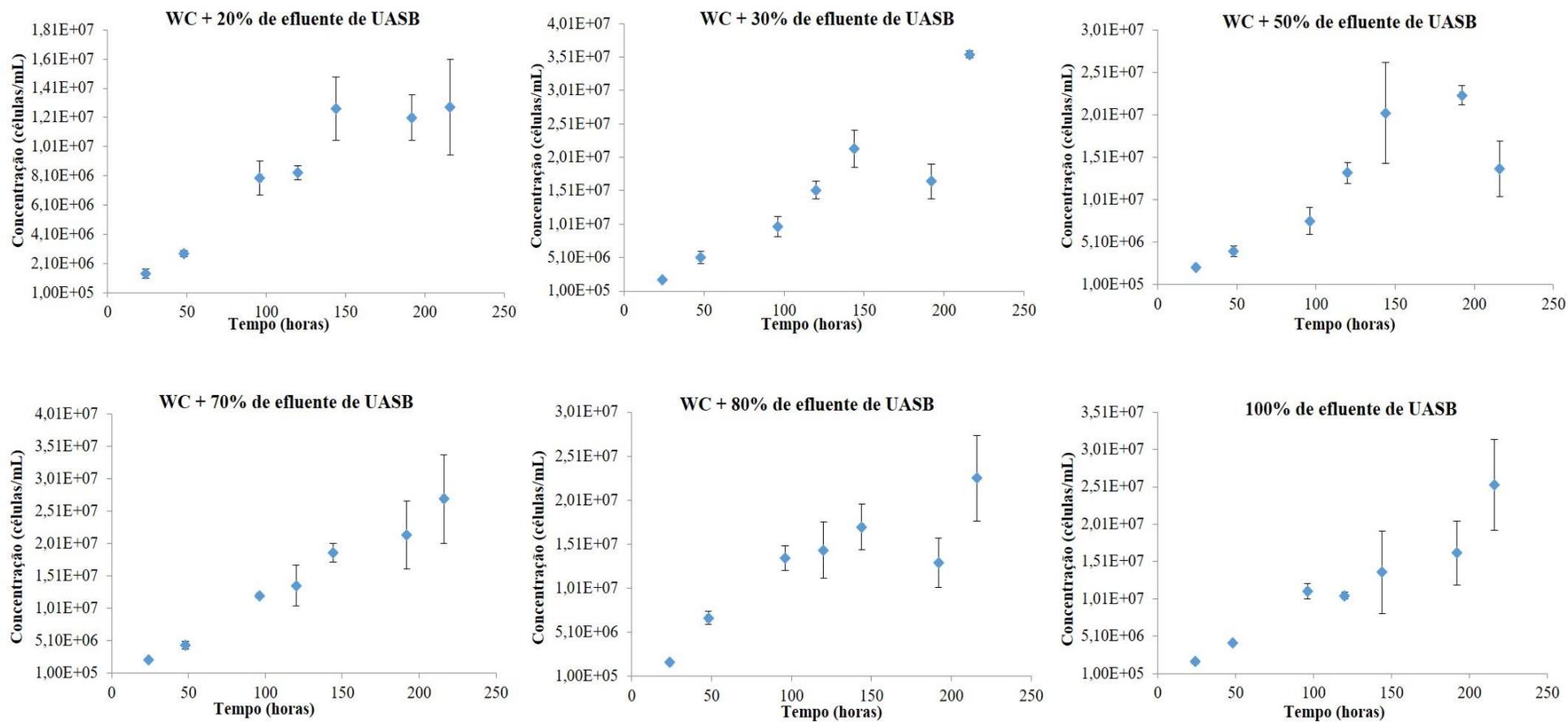
Os dados obtidos no presente estudo destacam a importância das microalgas como alternativa para o saneamento, pois promovem a biorremediação dos efluentes, geram biomassa que pode ser utilizada como fonte de energia e promovem a redução dos impactos ambientais que seriam causados com o lançamento inadequado de efluentes, ricos em nutrientes, em corpos hídricos.

4.2.2 *Scenedesmus* sp. cultivada em meio WC suplementado com efluente de UASB

Para estudar a cinética de crescimento celular em função das diferentes concentrações oferecidas aos cultivos, foram plotadas curvas de crescimento para cada experimento (Figura 21) e assim foram avaliados os parâmetros cinéticos (densidade celular, velocidades específicas máximas de crescimento e tempos de geração), produtividades de biomassa, remoção da demanda química de oxigênio de cada cultivo com o objetivo de identificar as condições que melhor promoveram o desenvolvimento da microalga em estudo.

A partir das curvas ilustradas na Figura 21 observou-se que todas as concentrações favoreceram a um excelente desenvolvimento celular da *Scenedesmus* sp., em que todos os cultivos atingiram densidade celular na ordem de 10^7 células.mL⁻¹ ao final dos cultivos. Oliveira (2013) também realizou estudos com a microalga *Scenedesmus* sp., todavia, esta foi cultivada em meio sintético Chu adicionado com efluente de bovinocultura biodigerido em diferentes concentrações (10 a 30%), e este apresentou grande eficiência na cinética de crescimento celular da microalga em estudo.

Figura 21 - Curvas de crescimento da *Scenedesmus* sp. em meio WC suplementado com diferentes proporções de efluente de UASB



Fonte: Autora (2016).

A curva de crescimento da *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo WC contendo 20% de efluente de UASB, apresenta pequena fase lag, que indicou boa adaptação da microalga nessa proporção do efluente. O cultivo iniciou com $1,39 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e finalizou com $1,28 \times 10^7$ células.mL⁻¹, e teve duração de 9 dias.

Os resultados experimentais da *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo WC contendo 30% de efluente de UASB, evidenciaram crescimento mais lento que o cultivo anterior, no entanto, foi o que atingiu a maior densidade celular ($3,55 \times 10^7$ células.mL⁻¹) dentre os demais cultivos.

O cultivo da *Scenedesmus* sp. em WC com adição de 50% de efluente de UASB foi o único a iniciar a fase de declínio no nono dia. Tal cultivo iniciou com densidade celular de $2,17 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e alcançou a concentração máxima $2,24 \times 10^7$ células.mL⁻¹ no oitavo dia. Rossi (2013) em estudos com a *Scenedesmus* sp. concluiu que as maiores densidades celulares ao final do período de cultivo (16º dia) foram obtidas na concentração de 50% do efluente doméstico de reator UASB.

O cultivo da microalga reportada no estudo em meio WC contendo 70% de efluente de UASB apresentou crescimento contínuo, com rápida adaptação e acelerado desenvolvimento microalgal. O cultivo iniciou com $2,15 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e alcançou uma concentração máxima de $2,70 \times 10^7$ células.mL⁻¹ após nove dias.

Os dados experimentais da microalga em estudo, cultivada em WC com adição de 80% de efluente de UASB foram bastante expressivos, provando que o efluente de UASB não é tóxico para as microalgas em estudo e que favorece o seu crescimento, podendo ser utilizado em altas concentrações no meio de cultivo e ainda reduzir os custos ao substituir parcialmente o meio sintético. O cultivo iniciou com $1,67 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e finalizou com $2,26 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

Assim como o cultivo anterior, os dados experimentais da *Scenedesmus* sp. cultivada em 100% de efluente de UASB, ou seja, sem o meio sintético WC exprimiram excelente e constante crescimento das microalgas, mostrando que apenas os nutrientes presentes no efluente de UASB são suficientes para o seu desenvolvimento. O cultivo durou 9 dias e iniciou com $1,68 \times 10^6$ células.mL⁻¹, ao seu término contou com $2,54 \times 10^7$ células.mL⁻¹. Salienta-se que assim como a *Chlorella* sp. o descarte do meio sintético viabiliza o cultivo da *Scenedesmus* sp. para a produção de biocombustíveis ao mesmo tempo em que essa microalga, ao utilizar os nutrientes do efluente, está promovendo o tratamento do mesmo.

Para avaliação mais aprofundada dos cultivos realizados a Tabela 13 exhibe um resumo dos parâmetros cinéticos, das produtividades de biomassa e da remoção da demanda química

de oxigênio dos cultivos de *Scenedesmus* sp. sob diversas condições de suplementação orgânica com efluente de UASB. A condição de 0% de efluente indica o cultivo da microalga apenas em meio WC e a condição de 100% indica o cultivo apenas em efluente de UASB. As demais condições correspondem à utilização do meio WC e do efluente de UASB em conjunto, sob diferentes proporções.

Tabela 13 - Parâmetros avaliados nos cultivos de *Scenedesmus* sp. suplementados com efluente de UASB

Efluente de UASB (%)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	Remoção de DQO (%)
0	0,0360	19,25	0,0956	-
20	0,0239	29,00	0,09215	15,3
30	0,0225	30,81	0,09689	13,9
50	0,0168	41,26	0,08348	15,6
70	0,0235	29,50	0,08385	25,3
80	0,0270	25,67	0,09607	32,8
100	0,0254	27,29	0,08444	30,1

Fonte: Autora (2016).

O cultivo realizado com efluente de UASB na proporção de 80% apresentou a melhor velocidade específica de crescimento e, conseqüentemente, o melhor tempo de geração dentre as demais proporções, valores esses que demonstram pequena distância quando comparado aos valores com cultivo isento do efluente. Destaca-se que os parâmetros cinéticos obtidos a partir do cultivo com 100% de efluente apresentou grande semelhança com o de 80%, indicando que essas concentrações de efluente de UASB promoveram o melhor desenvolvimento da microalga.

Quando avaliou-se a produtividade de biomassa de cada cultivo percebe-se que a *Scenedesmus* sp. alcançou maior valor de biomassa quando cultivada em 30% de efluente de UASB, chegando a uma produtividade de $0,0969 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, esse valor é justificado pela predominância do meio sintético específico da microalga, em que a mesma está adaptada e desenvolve-se melhor.

Oliveira (2013) estudou a produtividade de biomassa seca da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em meio Chu e obteve valores de $0,0618 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Dzuman (2013) também cultivou a microalga *Scenedesmus* sp. em meio Chu padrão e reciclado, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação com fotoperíodo de 12 horas de luz, realizada com lâmpadas fluorescentes brancas de 40 Volts, e aeração efetuada por compressor conectado a um

borbulhado contínuo com vazão de $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar, alcançando, após 10 dias, uma produtividade de biomassa de $0,068\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

Rossi (2013) cultivou em batelada simples na condição otimizada em efluente (50%) cepas de *Scenedesmus* sp. e esta apresentou produtividade de biomassa de $0,034\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Já Baugartner et al. (2013) cultivaram a microalga *Scenedesmus acuminatus* em diferentes meios de cultura, sendo eles meio MC, DM, NPK (10:10:10) e NPK (20:5:10), em que o cultivo utilizando o meio MC apresentou a melhor produtividade de biomassa algácea em função do tempo ($0,0811\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Em comparação com o atual estudo, verifica-se que as produtividades encontradas em todos os cultivos foram superiores as referências citadas, revelando que tais cultivos apresentaram excelente cinética de crescimento à microalga *Scenedesmus* sp.

A Tabela 13 também mostra dados de remoção de DQO, obtidos por meio de análises realizadas no início e no fim de todos os cultivos. Pode-se observar que nas concentrações de 80% e 100% de efluente de UASB a microalga reduziu a DQO em 32,8% e 30,1%, respectivamente, sendo esses os melhores resultados e proporções para promover o tratamento do efluente. Esses valores podem induzir baixa remoção da DQO, contudo, o reator UASB ao qual era gerado o efluente estava sendo operado com um alto tempo de detenção hidráulica (12h), além de receber uma microaeração, operando assim com eficiência em torno de 74%, logo a parte mais assimilável já havia sido consumida durante o tratamento do esgoto sanitário, resultando assim apenas compostos complexos de difícil assimilação pela microalga.

Silva (2014) utilizou esgoto sanitário biodigerido para cultivar a microalga *Scenedesmus* sp. em reatores tipo *airlift*, e atingiu uma remoção de DQO de 36%, valor bem próximo ao alcançado nesse estudo.

De modo geral, as concentrações de 80% e 100% se destacaram na maioria das análises. Ambas apresentaram as melhores cinética de crescimento microalgal e os melhores valores de redução na DQO. Buscando a viabilidade econômica para a produção de biocombustíveis optou-se pela concentração de 100%, pois assim os gastos decorrentes do meio sintético serão ausentes.

É importante ressaltar que todas as concentrações de efluente de UASB promoveram o crescimento das duas microalgas em estudo, podendo qualquer uma ser utilizada em larga escala para a produção de biocombustíveis. O que influenciará na escolha da proporção ideal é o objetivo que se pretende alcançar, seja ele focar na produção de biocombustíveis, seja focar na redução de custos, seja focar na biorremediação do efluente.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES LIPÍDICOS DAS MICROALGAS

4.3.1 Lipídios na *Chlorella* sp.

A partir da concentração ótima (50% de efluente de UASB) obtida por meio dos estudos realizados na seção anterior foi realizado um cultivo em maior escala (fotobioreator de 6L) para assim quantificar o teor de lipídios contido na biomassa microalgal.

Conforme descrito na subseção 3.6.3, foi empregada a metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957) na extração dos lipídios e assim foi possível determinar que, para uma concentração de 50% de efluente de UASB, a *Chlorella* sp. apresentou um teor de lipídios de 18,14%.

Melo (2015) avaliou a produção lipídica da *Chlorella* sp em meio BBM modificado e em meio BBM modificado suplementado com vinhaça, obtendo teores de lipídios de 14,7% e 11,5%, respectivamente. Matos et al. (2015) cultivaram a microalga *Chlorella* sp. utilizando meio BBM suplementado com concentrado de dessalinização em fotobiorreatores cônicos de 4,0 L, em que as microalgas apresentaram teor de lipídios entre 8,5-11,4%.

Viêgas (2010) estudou a extração de lipídios da *Chlorella pyrenoidosa* por meio da mesma metodologia utilizada nesse estudo e obteve teor de 12,29% de lipídios. Torres et al. (2014) cultivaram a *Chlorella* sp. em efluente de UASB autoclavado, com pH 10,0 e DQO de 162,7 mg.L⁻¹, obtendo um teor de lipídios de 13,2%. Corroborando com o presente estudo, pode-se dizer que a desinfecção do efluente antes do cultivo não melhorou a produtividade lipídica, pelo contrário, enfatizou a capacidade de crescimento e de geração de lipídios da *Chlorella* sp. em efluente não autoclavado, tornando essa espécie de microalga interessante para produção de biocombustíveis em larga escala, uma vez que a mesma dispensa custos com possíveis desinfecções do efluente.

Desse modo, o efluente de UASB se destacou ao permitir condições favoráveis o suficiente para que a *Chlorella* sp. alcançasse o teor de 18,14%, valor superior a todas referências supracitadas tornando-o atrativo para o cultivo de microalgas visando a produção de biocombustíveis.

4.3.2 Lipídios na *Scenedesmus* sp.

A partir da concentração ótima (100% de efluente de UASB) obtida por meio dos estudos realizados na seção anterior (4.2) foi realizado um cultivo em maior escala (fotobioreator de 6L) para assim quantificar o teor de lipídios contido na biomassa microalgal.

Para essa quantificação foi empregada a metodologia descrita por Folch, Less e Sloane Stanley (1957) na extração dos lipídios (conforme descrito na subseção 3.6.3) e assim foi possível determinar que, para uma concentração de 100% de efluente de UASB, a *Scenedesmus* sp. apresentou um teor de lipídios de 10,42%.

Oliveira (2013) realizou estudos com a microalga *Scenedesmus* sp. e observou que a maior porcentagem de lipídios na biomassa microalgal (14,91%) foi encontrada no cultivo suplementado com 10% de efluente de bovinocultura biodigerido quando comparada ao meio *Chu* que apresentou 12,41%. Já para o cultivo com 15% e 20% de efluente, o valor obtido foi inferior ao meio *Chu* (12,03% e 11,56%).

Radmann e Costa (2008) por meio da metodologia proposta por Folch e Less realizaram a quantificação de lipídios totais da microalga *Scenedesmus obliquus* e obteve teor lipídico de 6,18%. Baumgartner (2011) realizou extração de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. pelo método de Bligh e Dyer (1959) e obteve 8,3% de lipídios totais. Chng et al. (2016) realizou estudos de extração da microalga *Scenedesmus dimorphus* utilizando a metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959) e alcançou teor de 14%.

No intuito de investigar e otimizar a melhor condição para a quantificação dos lipídios foi realizado um estudo da influência do banho ultrassônico na extração dos mesmos. Foram efetuados três cultivos em meio WC, da microalga *Scenedesmus* sp. em fotobioreatores de 6L afim de alcançar biomassa suficiente para extração.

As biomassas foram submetidas a diferentes situações: a primeira não passou por banho ultrassônico, a segunda recebeu vinte minutos de banho e a terceira recebeu quarenta minutos de banho ultrassônico. A partir desse estudo foi construída a Tabela 14 que expõe o tempo de banho ultrassônico com os respectivos teores lipídicos e assim foi possível avaliar sua influência no rompimento celular das microalgas.

Tabela 14 - Influência do banho ultrassônico na extração de lipídios

Cultivo	Lipídios (%)		
	Sem Banho Ultrassônico	Com Banho Ultrassônico de 25Hz por 20min	Com Banho Ultrassônico de 25Hz por 40min
Meio WC	7,23	11,79	12,14

Fonte: Autora (2016).

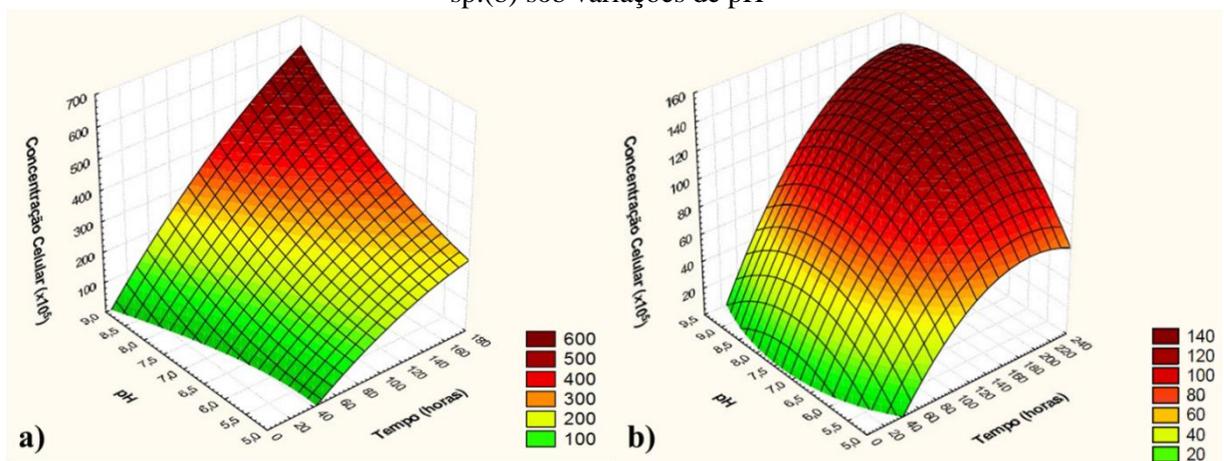
De acordo com a Tabela 14 observa-se aumento significativo no teor de lipídios ao submeter a amostra a banho ultrassônico revelando que o processo favorece a uma maior remoção intracelular dos lipídios proporcionado assim rompimento mais eficiente das células. Destaca-se que o valor lipídico da microalga não aumentou proporcionalmente com o tempo de sonicação, resultado bastante importante pois assim os gastos decorrentes a energia elétrica requerida será em menor escala. Em suma, tal estudo foi adotado com base para as extrações realizadas no presente trabalho.

4.4 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS MICROALGAS

Avaliando-se os parâmetros cinéticos, a produtividade, a remoção da carga poluidora e a quantidade de lipídios de cada microalga constata-se que ambas as microalgas estão aptas a produção de biocombustíveis, todavia, a espécie *Chlorella* sp. apresenta-se como a mais viável devido a mesma ter atingido as maiores concentrações celulares em todos os cultivos realizados, ter requerido baixos tempos de geração ocasionando ganhos econômicos, além de oferecer elevada produtividade e proporcionar maior remoção de carga poluidora.

A Figura 22 ilustra o comportamento celular das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. quando cultivadas em diferentes pH. Percebe-se que ambas as microalgas obtiveram as maiores densidades celulares em meio alcalino, com destaque para a *Chlorella* sp. que atingiu densidade celular máxima de $4,79 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ enquanto que a *Scenedesmus* sp. obteve $1,76 \times 10^7$ cel.mL⁻¹.

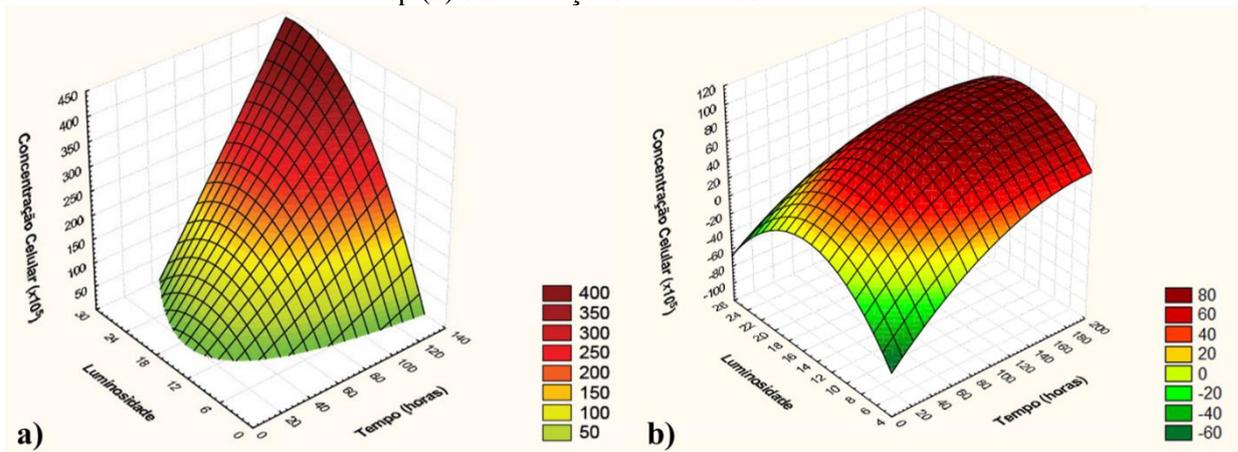
Figura 22 - Comportamento da concentração celular das microalgas *Chlorella* sp. (a) e *Scenedesmus* sp.(b) sob variações de pH



Fonte: Autora (2016).

A Figura 23 apresenta o comportamento celular das microalgas estudadas quando cultivadas em diferentes luminosidades. Consta-se que ambas as microalgas obtiveram as maiores densidades celulares quando expostas por mais tempo a luz, com destaque novamente para a *Chlorella* sp. que atingiu densidade celular máxima de $3,30 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ enquanto que a *Scenedesmus* sp. obteve $6,26 \times 10^6$ cel.mL⁻¹.

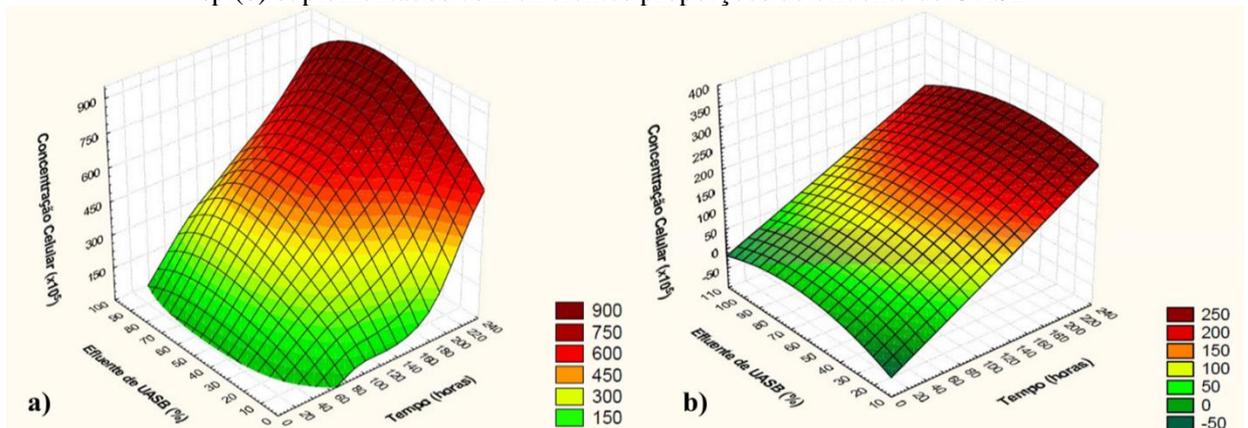
Figura 23 - Comportamento da concentração celular das microalgas *Chlorella* sp. (a) e *Scenedesmus* sp.(b) sob variações de luminosidade



Fonte: Autora (2016).

Na Figura 24 observa-se o comportamento celular das microalgas em questão quando cultivadas em diferentes proporções de efluentes de UASB. Verifica-se que a *Chlorella* sp. apresentou as maiores densidades celulares a partir da adição de 40% do efluente, chegando a atingir $8,66 \times 10^7$ células.mL⁻¹ com 50% de efluente de UASB adicionado ao meio de cultura. Já a *Scenedesmus* sp. não revelou grandes alterações nas densidades celulares à medida que foi aumentando a proporção de efluente adicionado ao meio.

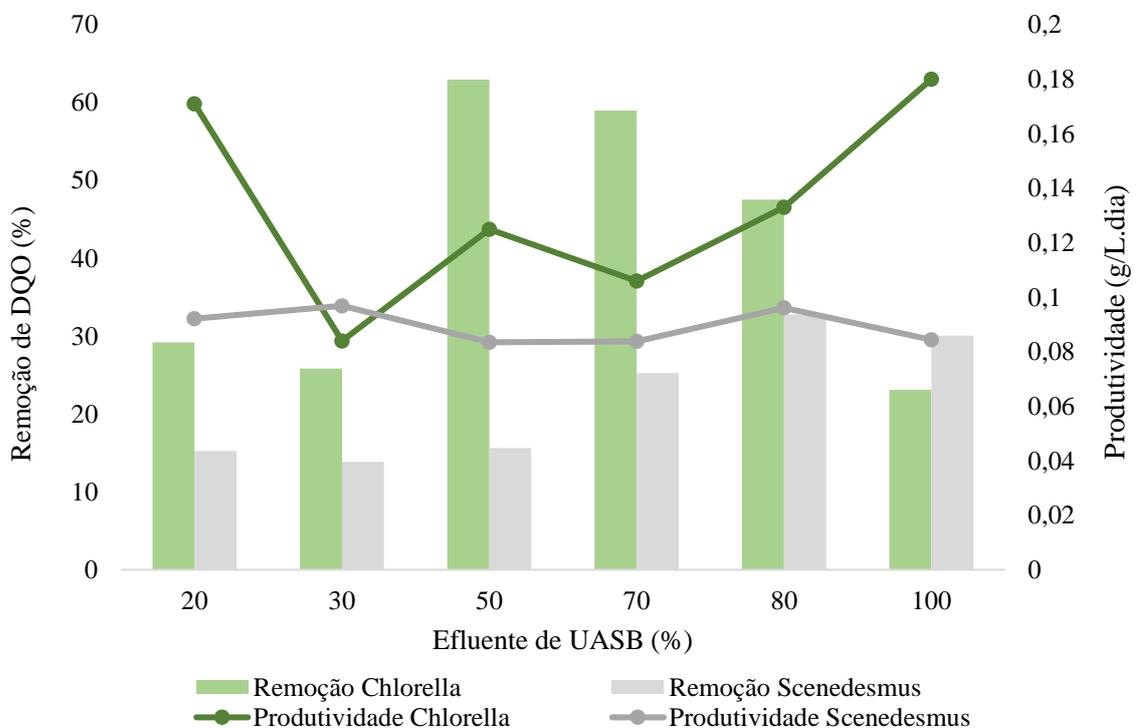
Figura 24 - Comportamento da concentração celular das microalgas *Chlorella* sp. (a) e *Scenedesmus* sp.(b) suplementados com diferentes proporções de efluente de UASB



Fonte: Autora (2016).

Na Figura 25 foi realizado o comparativo entre as microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. por meio dos resultados obtidos nas análises da DQO e de produtividade. A partir da Figura 25 constata-se que a *Chlorella* sp. mostrou-se mais eficiente que a *Scenedesmus* sp., em termos de remoção de DQO e produtividade, em grande parte dos cultivos com exceção apenas para o cultivo com 100% de efluente (em que a *Scenedesmus* sp. apresentou maior remoção) e para o cultivo com 30% de efluente (em que a *Scenedesmus* sp. apresentou maior produtividade).

Figura 25 - Comparativo dos resultados da remoção de DQO e da produtividade entre as microalgas estudadas



Fonte: Autora (2016).

Para melhor comparação e entendimento dos parâmetros estudados de cada microalga foi elaborada a Tabela 15, a qual exhibe o resumo de todos os resultados encontrados no presente estudo.

Tabela 15 - Resultado comparativo entre as microalgas estudadas

Comparativo entre as Microalgas								
Cultivos	<i>Chlorella</i> sp.				<i>Scenedesmus</i> sp.			
	Velocidade esp. (μ_{\max}) - (h ⁻¹)	Tempo de geração(h)	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Remoção de DQO(%)	Velocidade esp. (μ_{\max}) - (h ⁻¹)	Tempo de geração(h)	Produtividade (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Remoção de DQO(%)
BBM WC	0,0517	13,41	0,1123	-	0,0360	19,25	0,0956	-
pH 5,5	0,0293	23,66	0,0439	-	0,0329	21,07	0,0530	-
pH 6,5	0,0381	18,19	0,0942	-	0,0214	32,39	0,0791	-
pH 7,5	0,0470	14,75	0,0787	-	0,0303	22,88	0,0845	-
pH 8,5	0,0526	13,18	0,1008	-	0,0374	18,53	0,0753	-
6h	0,0227	30,54	0,0038	-	0,0165	42,01	0,0522	-
12h	0,0517	13,41	0,1123	-	0,0360	19,25	0,0956	-
18h	0,0436	15,90	0,1344	-	0,0291	23,82	0,0952	-
24h	0,0464	14,94	0,1492	-	0,0420	16,50	0,1311	-
20% UASB	0,0371	18,68	0,1710	29,22	0,0239	29,00	0,0921	15,3
30% UASB	0,0282	24,58	0,0840	25,87	0,0225	30,81	0,0969	13,9
50% UASB	0,0433	16,01	0,1250	62,95	0,0168	41,26	0,0835	15,6
70% UASB	0,0491	14,12	0,1060	59,00	0,0235	29,50	0,0839	25,3
80% UASB	0,0383	18,10	0,1330	47,54	0,0270	25,67	0,0961	32,8
100% UASB	0,0428	16,20	0,1800	23,11	0,0254	27,29	0,0844	30,1
Lipídios	50% UASB (18,14%) BBM (14,70%)				100% UASB (10,42%) WC (11,79%)			

Fonte: Autora (2016).

Para verificar o nível de relação entre os parâmetros descritos na Tabela 15 foi realizado o estudo da matriz de correlação dos mesmos para cada microalga.

A Tabela 16 apresenta a Matriz de correlação entre os parâmetros avaliados para a *Chlorella* sp. De maneira geral, observa-se que existe parâmetros que se correlacionam entre si, com correlações que chegam à ordem de +/- 0,98. Consta-se que a velocidade específica de crescimento é um fator importante que se relaciona com diversos parâmetros. Com o aumento dessa velocidade, ocorre uma redução no tempo de geração e um aumento na remoção de DQO.

A concentração de efluente de UASB apresentou correlação com a velocidade específica de crescimento e com o tempo de geração. Essas correlações indicam que um aumento nas concentrações de efluente de UASB acarreta aumento na velocidade e redução do tempo de geração. Não foram observadas correlações significativas da produtividade com os demais parâmetros.

Tabela 16 - Matriz de correlação para a *Chlorella* sp.

Variáveis	Efluente de UASB	Velocidade específica	Tempo de geração	Remoção de DQO	Produtividade
Efluente de UASB	1				
Velocidade específica	0,55615654	1			
Tempo de geração	-0,565270798	-0,98322455	1		
Remoção de DQO	0,113207637	0,623969061	-0,59085917	1	
Produtividade	0,28990958	0,249556685	-0,38727823	-0,3728228	1

Fonte: Autora (2016).

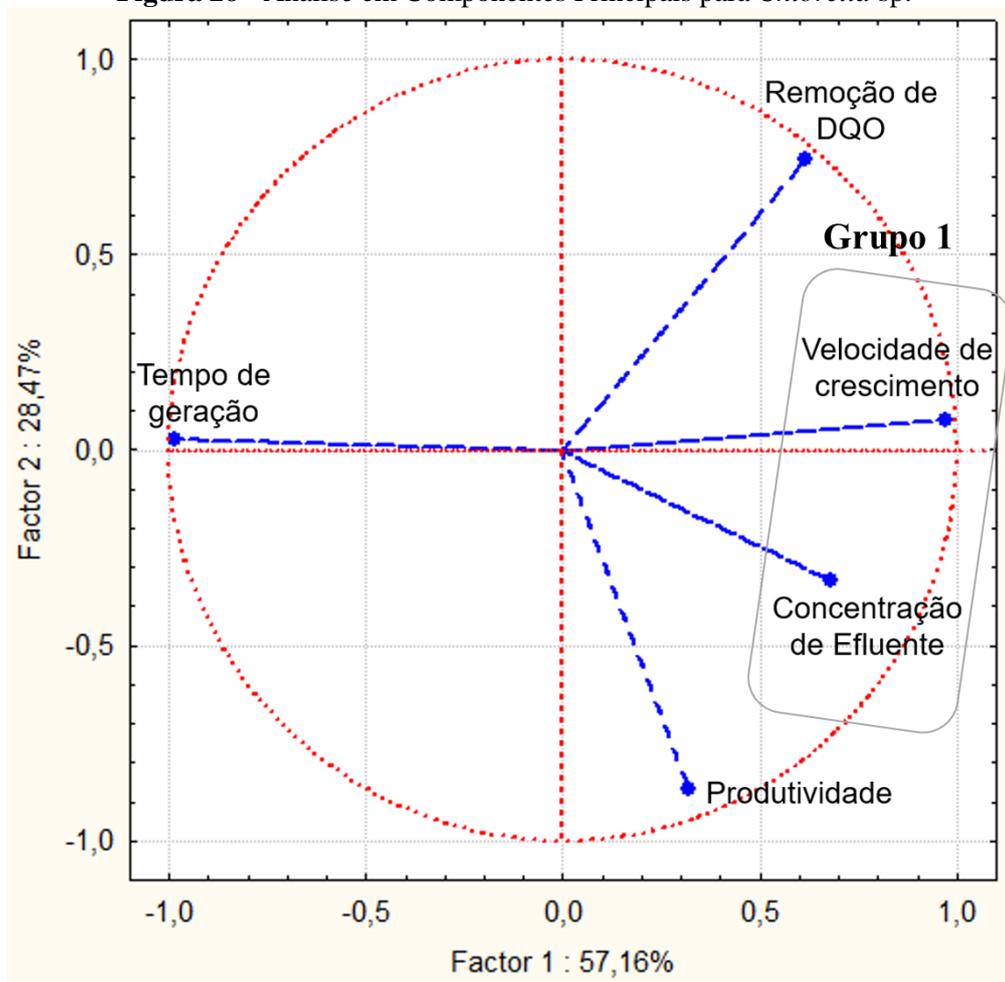
Uma maneira de identificar a formação de grupos com afinidades equivalentes é por meio da Análise em Componentes Principais (ACP). Nesse âmbito a Figura 26 apresenta os parâmetros que se relacionam e são semelhantes entre si.

Observa-se que a projeção de variação dos dados nos dois eixos principais, explicam aproximadamente 85% (Fator 1 + Fator 2) da variabilidade do processo, representando uma boa correlação entre os dados. Analisando a Figura 26, percebe-se que os resultados obtidos corroboram com a matriz de correlação, mostrando a distribuição de elementos com dispersão semelhante.

A ACP da Figura 26 mostra a formação de 1 grupo correlacionado mais intimamente. Esse grupo é composto pela concentração de efluente juntamente com a velocidade específica de crescimento, revelando que ocorre aumento na velocidade de crescimento à medida que aumenta a concentração de efluente no meio.

Foram observadas correlações negativas, notando-se que à medida que a velocidade específica aumenta existe uma diminuição no tempo de geração, conforme já discutido na matriz de correlação. Destaca-se que a produtividade apresenta-se atuando de forma isolada dos demais parâmetros.

Figura 26 - Análise em Componentes Principais para *Chlorella* sp.



Fonte: Autora (2016).

A Tabela 17 apresenta a Matriz de correlação entre os parâmetros avaliados para a *Scenedesmus* sp. Constata-se de modo geral, grande número de parâmetros que se correlacionam entre si, com correlações que chegam à ordem de +/- 0,99. Salienta-se que estas correlações ocorreram de forma mais expressiva quando comparada com a *Chlorella* sp.

Para essa microalga a remoção de DQO apresentou-se como fator importante para determinados parâmetros, como exemplo tem-se a concentração de efluente de UASB, revelando correlação bastante expressiva como também correlação com a velocidade específica e com o tempo de geração, essas correlações indicam que reduções eficientes de DQO acontecerão em concentrações elevadas de efluente de UASB com altas velocidades específica e baixos tempo de geração.

Assim como na análise com a *Chlorella* sp. observa-se que a velocidade específica de crescimento revela forte correlação com alguns parâmetros. Com o aumento dessa velocidade, ocorre uma drástica redução no tempo de geração e um aumento na remoção de DQO. Também não foram observadas correlações significativas da produtividade com os demais parâmetros.

Tabela 17 - Matriz de correlação para a *Scenedesmus* sp.

Variáveis	Efluente de UASB	Velocidade específica	Tempo de geração	Remoção de DQO	Produtividade
Efluente de UASB	1				
Velocidade específica	0,41772212	1			
Tempo de geração	-0,34416729	-0,99043752	1		
Remoção de DQO	0,90592681	0,69795016	-0,61999838	1	
Produtividade	-0,40947501	0,42932937	-0,43816232	-0,1078896	1

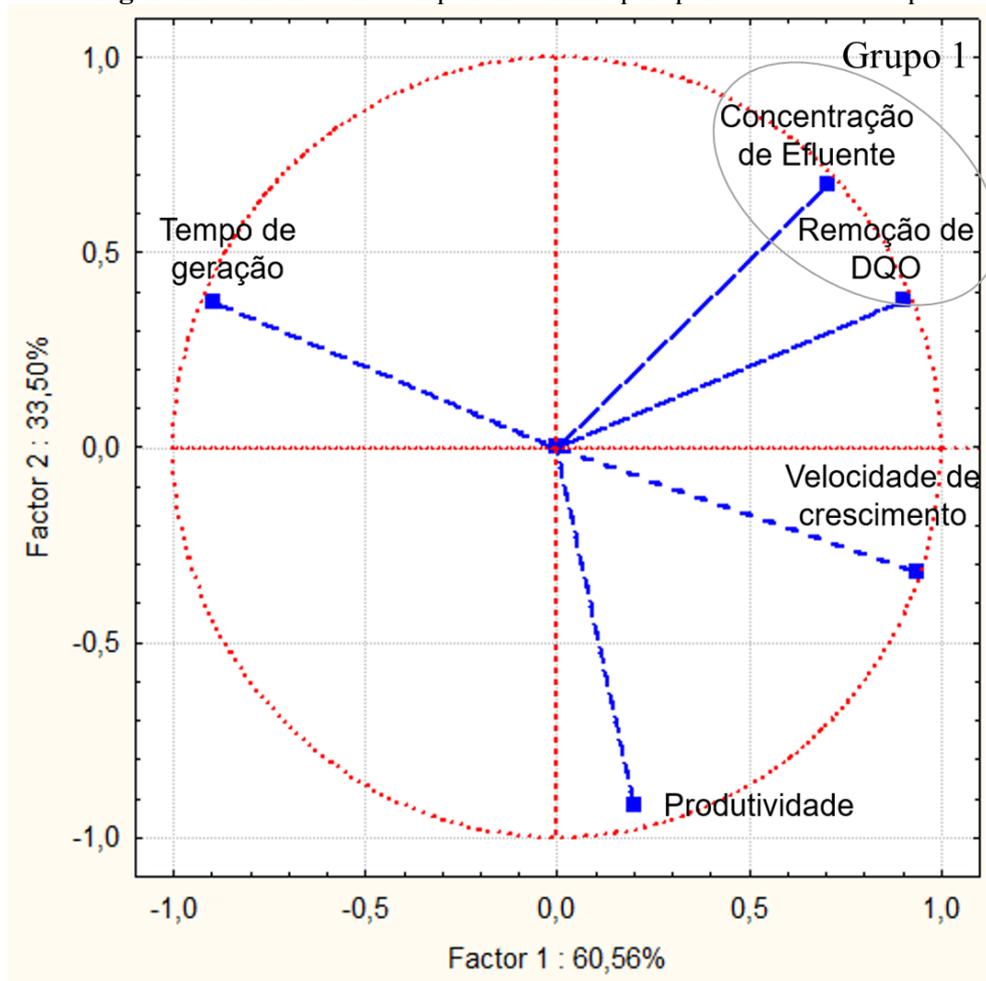
Fonte: Autora (2016).

Em relação a ACP, observa-se que a projeção de variação dos dados nos dois eixos principais, explicam aproximadamente 95% (Fator 1 + Fator 2) da variabilidade do processo, representando uma ótima correlação entre os dados.

A ACP para *Scenedesmus* sp. apresentada na Figura 27 mostra a formação de 1 grupo correlacionado mais intimamente e as demais variáveis apareceram de forma isolada. Os resultados obtidos corroboram com a matriz de correlação para esta microalga, expondo a formação de elementos com dispersão semelhante.

Verifica-se que no grupo 1 há uma estreita correlação entre a concentração de efluente com a remoção de DQO, conforme já discutido na matriz de correlação. Assim como a ACP da *Chlorella* sp. também ocorreram correlações negativas para essa análise de ACP, verificando inverso de proporcionalidade entre a velocidade específica e o tempo de geração.

Figura 27 - Análise em Componentes Principais para *Scenedesmus* sp.



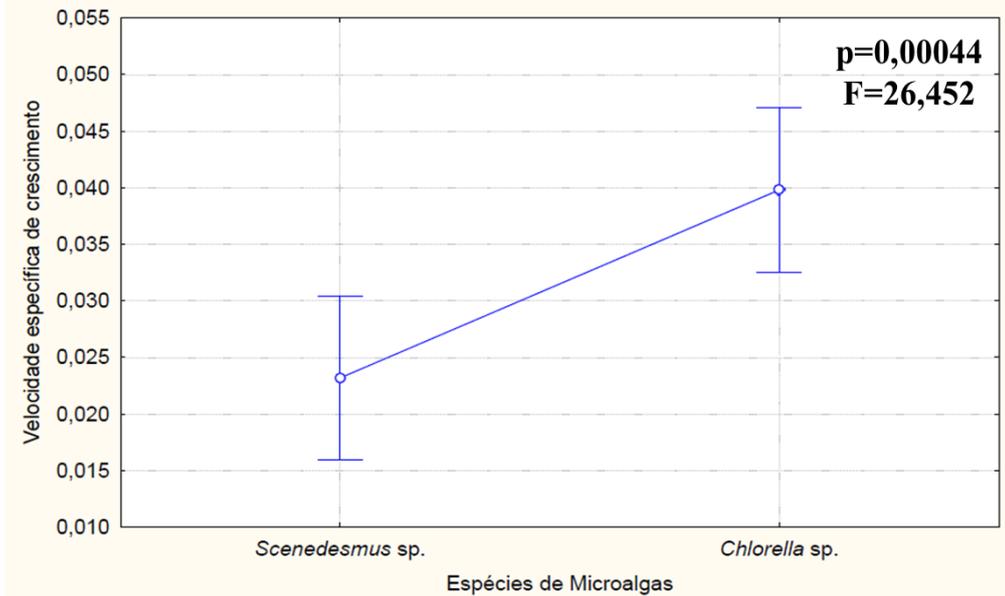
Fonte: Autora (2016).

No intuito de comparar as médias dos parâmetros avaliados para cada microalga foi realizado o teste de hipótese por meio da análise de variância (ANOVA). Esse procedimento fornece um valor calculado do nível de significância (representado pelo *p-valor*), que deve ser comparado com o adotado para o teste, se este for inferior, a hipótese nula de igualdade entre as médias é rejeitada, todavia se for superior, a hipótese nula é aceita. Além do *p-valor*, a ANOVA produz um valor chamado F que indica o tamanho da diferença entre os grupos e significa que os quadrados médios do modelo são maiores que os quadrados médios residuais e assim quanto maior o F, mais significativo o *p-valor* para a ANOVA.

Por meio da Figura 28, verifica-se que as velocidades específicas de crescimento das microalgas estudadas apresentaram diferença estatisticamente significativa devido ao alto valor de F (26,452) encontrado e ao *p-valor* bem abaixo do nível de significância adotado que foi de 0,01; devido a esses fatores a hipótese de igualdade de médias é rejeitada. A partir da

Figura 28 também observa-se superioridade de média de velocidade da microalga *Chlorella* sp. revelando assim como a mais habilidosa para esse parâmetro.

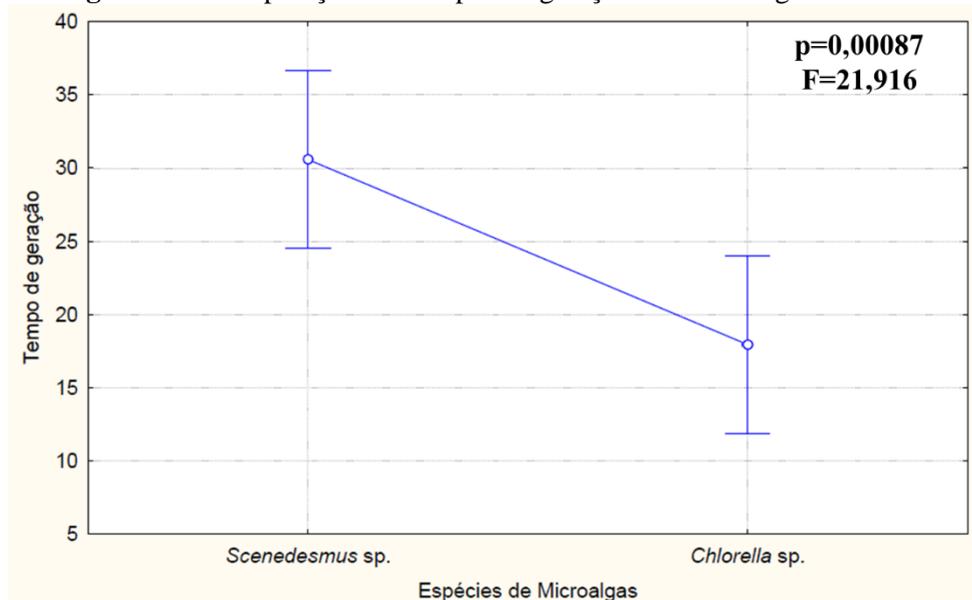
Figura 28 - Comparação das velocidades específicas de crescimento das microalgas em estudo



Fonte: Autora (2016).

A Figura 29 expressa o resultado da análise de variância, em que a partir do *p-valor* (novamente bem abaixo do nível de significância adotado -0,01-) e do valor F (21,916) a hipótese nula é rejeitada e assim apresenta diferença significativa nos valores das médias dos tempos de geração.

Figura 29 - Comparação dos tempos de geração das microalgas em estudo



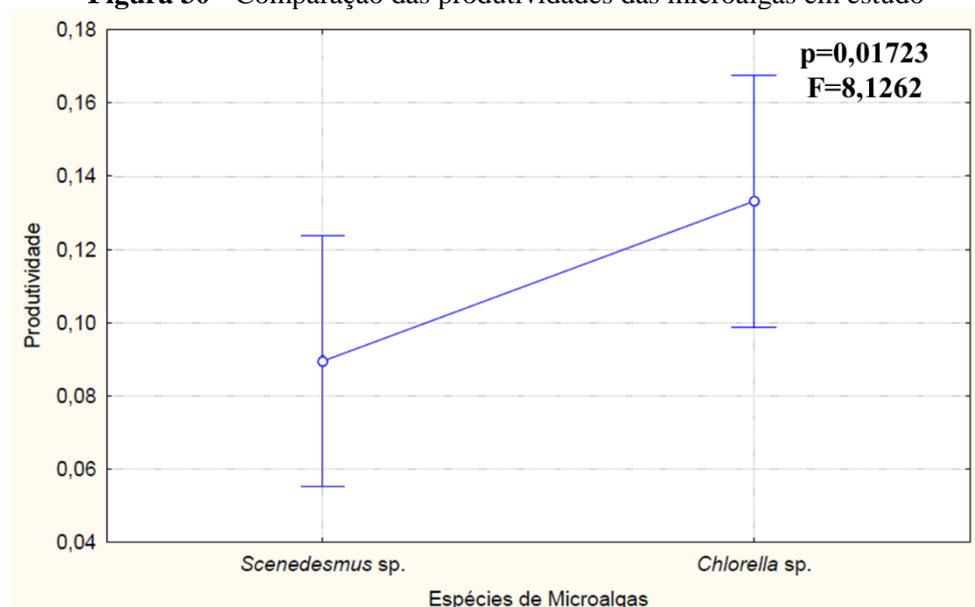
Fonte: Autora (2016).

A Figura 29 apresenta superioridade de média de tempo de geração para a microalga *Scenedesmus* sp., revelando-se como a menos indicada (quando comparada a *Chlorella* sp.) para produção de biocombustível.

Como mencionado no estudo de correlação os parâmetros velocidades específicas de crescimento e tempo de geração estão intimamente correlacionados, sendo inversamente proporcionais. Neste âmbito vemos que a *Chlorella* sp. desponta como a mais viável para a produção de biocombustível devido a mesma apresentar os melhores valores de velocidade específica de crescimento e conseqüentemente os menores tempos de geração. Esse fato deve-se a melhor capacidade de assimilação e adaptação da referida microalga em meios alternativos.

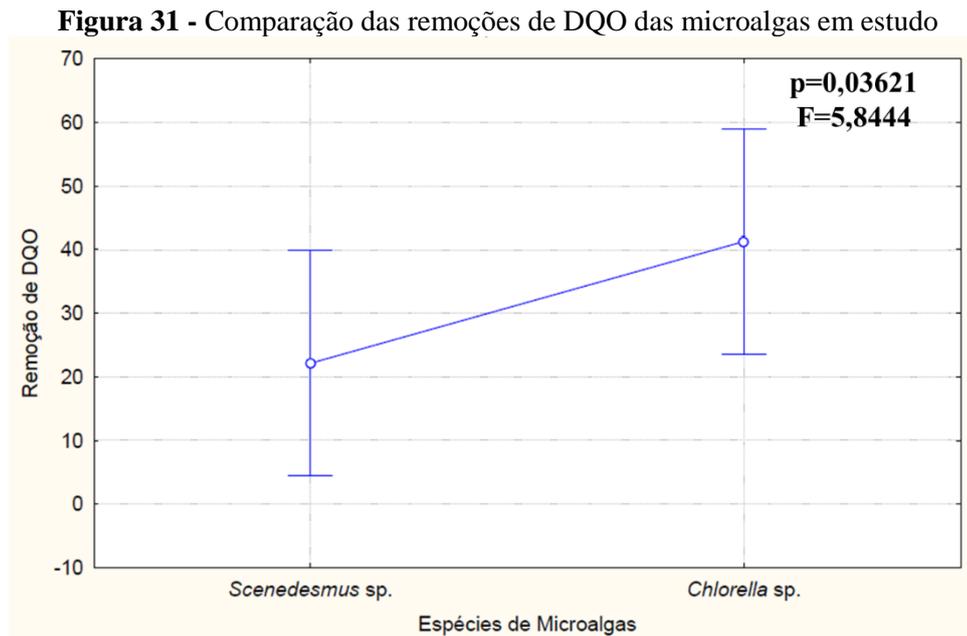
A Figura 30 expõe os resultados da análise estatística referente aos dados de produtividade das microalgas. Constata-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre as mesmas devido ao baixo valor do F (8,1262) e ao *p*-valor ser superior (mesmo que com diferença quase nula) ao adotado ($p_{cal} = 0,01723$; $p_{adot} = 0,01$), aceitando assim a hipótese nula. Esse fato pode ser justificado em função da presença dos sais do cultivo que ficam agregados na biomassa e não corresponde de fato a biomassa puramente das microalgas, além disso também se alicerça na matriz de correlação que afirma que a produtividade para ambas as microalgas não apresenta correlação significativa com os demais parâmetros avaliados.

Figura 30 - Comparação das produtividades das microalgas em estudo



Fonte: Autora (2016).

A Figura 31 exibe os valores da análise de variância realizada. Por meio dela entende-se que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores, fato esse corroborado quando avaliado o *p-valor* calculado que mostrou-se superior ao *p-valor* adotado e assim a hipótese nula é mais uma vez aceitável, além disso produziu um valor para F (5,844) bem abaixo dos encontrados para os parâmetros anteriores.



Fonte: Autora (2016).

5.0 CONCLUSÃO

Mediante a avaliação do potencial biotecnológico das microalgas *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. foi possível concluir:

- As melhores condições de desenvolvimento celular para ambas as microalgas são em meios alcalinos e com tempos elevados de luminosidade.
- A proporção de efluente resultante do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico mais favorável para a *Chlorella* sp. foi de 50%, enquanto que para a *Scenedesmus* sp. foi de 100%, evidenciando assim a grande viabilidade da inserção desse efluente no cultivo das microalgas.
- Os valores referentes a velocidade específica de crescimento, tempo de geração e a produtividade celular para a microalga *Chlorella* sp. foram mais expressivos quando comparados aos valores da *Scenedesmus* sp. em todas as proporções de efluente resultante do tratamento anaeróbico de esgoto doméstico.
- A microalga *Chlorella* sp. apresentou as melhores porcentagens de remoção da demanda química de oxigênio, DQO, alcançando 62,95% de remoção no meio suplementado com 50% de efluente.
- O cultivo da microalga *Chlorella* sp. apresentou maior produtividade lipídica (18,14%) quando comparado ao cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. (10,42%).
- A ACP para a *Chlorella* sp. apresentou afinidade entre o grupo formado pela velocidade específica de crescimento e a concentração de efluente enquanto que para a *Scenedesmus* sp. esse grupo foi composto pela concentração de efluente e a remoção de DQO.
- A partir da matriz de correlação e da ACP para ambas as microalgas foi observado que a produtividade não se correlacionou com os outros parâmetros avaliados.
- Por meio da ANOVA verificou-se que os parâmetros velocidade específica de crescimento e tempo de geração apresentaram-se como determinantes na avaliação da viabilidade de produção de biocombustíveis das microalgas estudadas.

REFERÊNCIAS

ABOU-SHANAB, Reda AI et al. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3300-3306, 2011.

ABURAI, Nobuhiro; SUMIDA, Daichi; ABE, Katsuya. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp.(Chlorophyceae). **Algal Research**, v. 8, p. 30-36, 2015.

AISSE, M.; BONA, A.; JURGENSEN, D. **Filtração rápida de efluentes de processo físico-químico com flotação**. [S.l.: s.n.], 2006.

ALFAFARA, C. G.; NAKANO, K.; NOMURA, N.; IGARASHI, T.; MATSUMURA, M. Operating and scale-up factors for the electrolytic removal of algae from eutrophied. 2002.

ALVES, Rex Nazaré. **Agenda Rumos da Política Brasileira 2011 – 2012: Panorama Energético Internacional**. Rio de Janeiro: Senado Federal, 2011.

ANDRADE, Michele da Rosa; COSTA, Jorge Alberto Vieira. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

ANTONIO, Priscila Rodrigues; TEIXEIRA, Claudia Maria Luz Lapa; DE OLIVEIRA, M. C. R. **Avaliação das diferentes condições de cultivo da microalga *Chlorella Vulgaris* visando o aumento da produtividade em biomassa**. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos. 2013.

ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects. **Current Opinion Biotechnology**, v. 21, n.3, 358–364, 2010.

ARAÚJO, F. P. D. et al. Estudo da Viabilidade de Microalgas para Produção de Biodiesel. **VII Connepi**, 2012.

ARREGONDO-VEJA, B.O. **Crecimiento autotrófico y mixtrófico de la microalga maria *Porphyridium cruentum***. 1995. Tese de Doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

BAUMGARTNER, TRS. **Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel.** 124 p. 2011. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá-PEQ/UEM, Paraná.

BECKER, E. Wolfgang. **Microalgae: biotechnology and microbiology.** Cambridge University Press, 1994.

BECKER, Wolfgang. Microalgae in Human and Animal Nutrition. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, p. 312, 2004.

BENEMANN, J.R. **Microalgal Biofuels: A Brief Introduction.** Benemann Associates. 2009.

BERTOLDI, F. C. SANT'ANNA, E., OLIVEIRA, J. L. B. **Revisão: Biotecnologia de Microalgas.** B. CEPPA, Curitiba, 2008, Vol. 26, n. 1, p. 9-20.

BIOFUEL. Third Generation Biofuel. **Biofuels the fuel of the future**, 2010. Disponível em: <http://biofuel.org.uk/third-generation-biofuels.html>. Acesso em: 11/08/2016.

BOLETIM MENSAL DE BIODIESEL. ANP, Superintendência de refino e processamento de gás natural (SRP), 2010. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em: 02/08/2016.

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.

BRASIL. Lei n. 12.490, de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a política e a fiscalização das atividades relativas ao abastecimento nacional de combustíveis. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 de setembro de 2011; 190º da Independência e 123º da República.

BRUM, Aelson Aloir Santana et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CHEN, C. -Y.; ZHAO, X. -Q; YEN, H. -W; HO, S. -H.; CHENG, C. -L. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**. In Press. doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006, 2013.

CHEN, C-Y.; YEH, K-L.; AISYAH, R.; LEE, D-J.; CHANG, J-C. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel. 2011.

CHERNICHARO, C.A.L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias**. Belo Horizonte: Segrac, 1997.

CHIARAMONTI, D.; OASMAA, A.; SOLANTAUSTA, Y. Power generation using fast pyrolysis liquids from biomass. **Renew Sustain Energy Reviews**, v. 11, p.1056-1086, 2007.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. Venkata. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, 2016.

CHNG, Lee Muei; CHAN, Derek JC; LEE, Keat Teong. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **Journal of Cleaner Production**, v. 130, p. 68-73, 2016.

CHO, S.; LUONG, T.T.; LEE, D.; OH, Y-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**. 2011. v.102, p.8639-8645.

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.

CLARENS, A. F.; RESURRECCION, E. P.; WHITE, M. A.; COLOSI, L. M. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. **Environmental Science and Technology**, v. 44, p. 1813-1819, 2010.

CONNON, R. Culturing of *Chlorella vulgaris*-Standard Operating Procedure. **Daphnia Research group (University of Reading)**, 2007.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução. 430/2011-Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes. **Publicação DOU**, n. 92, 2014.

COSTA J. A.; RADMANN E. M.; CERQUEIRA V. S.; SANTOS G. C.; CALHEIROS M.N. **Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições.** Alim. Nutr., Araraquara. v.17, n.4, p.429-436, 2006.

CRESPO, A. A. **Estatística Fácil.** São Paulo, Saraiva, 2002.

CUNHA, T.H.C. da Silva. **Avaliação do crescimento de microalgas para produção de biocombustível utilizando efluente industriais e doméstico.** Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

DANCEY, C; REIDY, J. **Estatística Sem Matemática para Psicologia: Usando SPSS para Windows.** Porto Alegre, Artmed, 2006.

DE ALVA, Manuel Sacristán et al. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 146, p. 744-748, 2013.

DERNER, Roberto Bianchini et al. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DZUMAN, M. J. **Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel.** 2013.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA - EPE. **Balço Energético Nacional 2015 – Relatório Síntese ano base 2014.** 2015.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 2ª ed. Inteligência, Rio de Janeiro, Brasil, 602 pp, 1998.

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, L. D. A. **Estatística IV - apostila 1: estatística descritiva.** Universidade Federal da Bahia Instituto De Matemática – UFBA. Departamento de Estatística. 2001. Disponível em: <http://www.est.ufba.br/mat027/mat027apostila1.pdf>. Acesso em: 09/10/2016.

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.

FONTELLES, M. J. **Bioestatística Aplicada à Pesquisa Experimental.** 1. ed. São Paulo: Livraria da Física, 2012. 408 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Renewable biological systems for alternative sustainable energy production.** Oil production. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/w7241e/w7241e0h.htm>, acesso em 04/08/2016.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, 2013. ISSN 0100-4042.

GRANZOTTO, A. J. **Resumão - Estatística Básica.** 34p. 2002. Disponível em: http://www.crd2000.com.br/zip_personalizados/estatistica.pdf. Acesso em: 90/10/16.

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.

GRIMA, E. Molina et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology advances**, v. 20, n. 7, 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).

GUILLARD, Robert RL; LORENZEN, Carl J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C1, 2. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1972.

HAN, Fei et al. Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. **Energy Conversion and Management**, v. 90, p. 315-322, 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.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994.

HO, S. -H.; LU, W. -B.; CHANG, J. -S. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 106-113, 2012.

HOEK, C.V. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, 1995.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. (2008). Microalgal triacylglycerol as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, p. 621-639.

IBAÑEZ, E; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 70-709, 2013.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY – IEA. **Key World Energy Statistics**. OECD/IEA, 2012.

KIM, S. K.; KANG, K. H. Medicinal effects of peptides from marine microalgae. **Advances in Food Nutrition Research**, v. 64, p. 313-323, 2011.

LARSON, E. D. **Biofuel Production Technologies: Status and Prospects**. Princeton Environmental Institute. Geneva. 2007.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Paulo: Rima, 2006. 606 p.

LUCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MARINHO, Y. et al. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria prima do biodiesel. **Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão-JEPEX**, 2009.

MARTINS, O. S. **Aproveitamento de Biomassa para geração de energia elétrica**. Centro Nacional de Referência em Biomassa- CENBIO. Brasília. 2004.

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. et al. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 364-370, 2015.

MCTI. **Embrapa avalia o cultivo de microalgas em vinhaça**. MCTI, 2015.

MELO, Débora Jamila Nóbrega. **Utilização de vinhaça no cultivo de *Chlorella* sp.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, 77f, 2015.

MENEZES, F. D. et al. **Isolamento de *Scenedesmus capitaus* para aplicação em ensaios ecotoxicológicos nos ecossistemas aquáticos da bacia do rio cocó**. In: IV CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE E NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA. *Anais do VI CONNEPI*. Belém: Pará, 2009.

MORAIS, K.C.C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – UFPR – Curitiba, 2011.

MORAIS, Luciano Cardoso de. **Estudo sobre o panorama da energia elétrica no Brasil e Tendências futuras**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica), UNESP, Faculdade de Engenharia, Bauru, 2015.

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção**. ABES: Rio De Janeiro, Brasil, v2, 2009.

MULBRY, Walter et al. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8137-8142, 2008.

NUVOLARI, Ariovaldo et al. **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. 2.ed. São Paulo: Blucher, 2011.

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

OLIVEIRA, A.C.DE. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

OLIVEIRA, C. D. J. D. et al. Produção de biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, p. 202-221, 2014.

Organização Mundial de Saúde. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done**. Genebra: OMS; 2009.

PÉREZ, Homero EB. Biodiesel de microalgas. **Parte I. Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares-IPEN**. São Paulo, p. 1-19, 2007.

PITTMAN, Jon K.; DEAN, Andrew P.; OSUNDEKO, Olumayowa. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 17-25, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; VIEIRA, J. A. **Cultivo Mixotrófico da Microalga *Spirulina* sp. LEB-18 com Adição Noturna de Diferentes Fontes de Carbono Orgânico**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal-RN, 2009.

RADMANN, Elisângela Martha; COSTA, Jorge Alberto Vieira. **Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO**. 2008.

RAMIREZ, N. N. V. **Estudo do Crescimento da Microalga *Scenedesmus* sp. Vinhaça**. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

REDAELLI, Cristiane et al. **Influência da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em *Chlorella minutíssima***. Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

REIS, E. **Estatística Multivariada Aplicada**. 2 ed. Lisboa: Edições Silabo, Abril de 2001.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwll Science, 2004.

ROSSI, R. A. **Seleção de microalgas dos gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel**. Tese (Doutorado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC-USP), São Carlos, 2013.

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

RUSSO, David Alexandre Martins Tavares. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Universidade Nova de Lisboa – Lisboa, 2011.

SILVA, Débora Andreatta da. **Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel**. 2014.

SILVA, Josiany Mata; KONRADT-MORAES, Leila Cristina. Vantagens e desvantagens dos biocombustíveis e dos combustíveis fósseis. **ANAIS DO SEMEX**, v. 5, n. 5, 2015.

SIMS, R. et al. **From 1st to 2nd Generation Biofuel Technologies**. IEA Bioenergy. France. 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87–96, 2006.

SUNGRANT. Biofuel. **SunGrant BioWeb an online resource for bioenergy and bioproducts**, 2007. Disponível em: <http://bioweb.sungrant.org/Glossary/B/Biofuels.htm>
Acesso em: 11/08/2016.

SUTHERLAND, Donna L. et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water research**, v. 70, p. 9-26, 2015.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 145-151, 2000.

TANAMATI, Augusto et al. Comparative study of total lipids in beef using chlorinated solvent and low-toxicity solvent methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 6, p. 393-397, 2005.

TEIXEIRA, P. C. N. et al. **Potencial de geração de biocombustíveis a partir de microalgas**. CONAE – Conferência Internacional de Agroenergia, Londrina, 2006.

TOLMASQUIM, Mauricio Tiomno. **Fontes renováveis de energia no Brasil**. CENERGIA, COPPE-Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação em Engenharia, UFRJ-Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

TORRES, Helenice Silva de Jesus; CASSINI, Servio Tulio Alves; GONÇALVES, Ricardo Franci. **Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis**. In: IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. 2014.

TRIPATHI, Ritu; SINGH, Jyoti; THAKUR, Indu Shekhar. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774-781, 2015.

TSUKAHARA, K.; SAWAYAMA, S. Liquid fuel production using microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, v. 48, p. 251-259, 2005.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresourcetechnology**, v. 135, p. 142-149, 2013.

VARGAS, José V. C. **Editorial de Engenharia Térmica**, v. 12, n. 1, 2013. Disponível em: http://demec.ufpr.br/reterm/ed_ant/20/editorial.htm, acesso em 10/08/2016.

VIÊGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando à produção de ésteres graxos**. 2010. Tese de Doutorado. Dissertação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande.

VIEIRA, Tamires de Queiroz et al. **Estudo da viabilidade do uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella* sp. visando a produção de biocombustíveis.** Revista Monografias Ambientais, v. 13, n. 4, p. 3477-3490, 2014.

VIEIRA, Tamires de Queiroz. **Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella* sp, com potencial para produção de biocombustíveis.** 2013. 61p. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

VONSHAK, A. **Spirulina: growth, physiology and biochemistry.** In *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. Vonshak, A. (Ed.), Taylor & Francis, London, 1997, p.43-65.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 4. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2014.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. **Applied Microbiology and Biotechnolgy**, v. 79, p. 707-718, 2008.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3098-3102. 2011.