



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

ANDRÉ LUÍZ ALVES DA SILVA

**CULTIVO DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER PARA FINS DE
GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E DE BIORREMEDIAÇÃO**

CAMPINA GRANDE

2019

ANDRÉ LUÍZ ALVES DA SILVA

**CULTIVO DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER PARA FINS DE
GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E DE BIORREMEDIAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito obrigatório à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586c: Silva, André Luiz Alves da.
Cultivo da microalga *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER para fins de geração de biocombustíveis e de biorremediação [manuscrito] / Andre Luiz Alves da Silva. - 2019.
46 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.
"Orientação : Profa. Dra. Weruska Brasileiro Ferreira, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."
1. Microalgas. 2. Biocombustível. 3. Biorremediação. I.
Título

21. ed. CDD 662.88

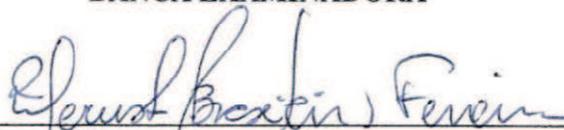
ANDRÉ LUÍZ ALVES DA SILVA

**CULTIVO DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER PARA FINS DE
GERAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS E DE BIORREMEDIAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito obrigatório à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Aprovado em: 12 / 06 / 2019

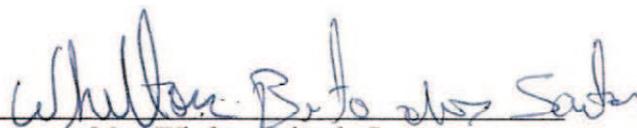
BANCA EXAMINADORA



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



Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Msc. Whelton Brito do Santos
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças recebidas, por sempre me conceder forças para seguir adiante e por colocar pessoas incríveis no meu caminho.

Aos meus pais e a minha avó Maria: - Essa conquista também é de vocês!

A minha professora e orientadora Weruska Brasileiro, por toda dedicação, disponibilidade e oportunidades concedidas durante a graduação.

A minha banca: Whelton Brito, por toda ajuda e aprendizado durante o desenvolvimento deste trabalho, e Hέλvia Walewska, pela disponibilidade e pelos ensinamentos transmitidos durante minha graduação.

Aos colegas de laboratório (LARTECA), em especial à equipe do Projeto Microalgas (CNPq) que, sem eles, não teria sido possível a realização das atividades experimentais.

Aos demais professores do curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos da graduação, em especial, Alzinete Amorim, Andreia Freitas, Estephania Jovino, Evelyn Miná, Evelyne Morgana, Gabriely Dias, Gustavo Klein, Josefa Alencar, Nayr Thays e Renan Rodrigues. Foram momentos únicos durante esses cinco anos de convivência dos quais guardarei com muito carinho.

Aos meus irmãos e amigos, que sempre estão do meu lado me dando forças e incentivo quando preciso.

A UEPB, por toda infraestrutura, que possibilitou a execução deste trabalho, e por seus programas de assistência estudantil, que foram essenciais à minha graduação.

A EXTRABES, por gentilmente fornecerem o efluente de UASB para a realização dos experimentos.

RESUMO

Com o avanço tecnológico mundial, torna-se imprescindível a busca por fontes de energia sustentáveis de modo a suprir a demanda energética e a exploração desenfreada dos recursos naturais. Nesse contexto, surgem as microalgas como alternativas para a produção de biocombustíveis devido à sua alta taxa de crescimento celular, produção de biomassa, de sobreviverem em ambientes extremos e de promoverem biorremediação e o sequestro de CO₂. Dentre as espécies de microalgas existentes, a *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER se destaca devido à sua elevada produtividade lipídica e de biomassa. Com o intuito de definir as condições que melhor favorecem seu desenvolvimento e uma maior produção de biomassa, é importante analisar os parâmetros que influenciam no seu crescimento. No presente estudo, foram realizados cultivos da *D. tertiolecta* em meio sintético F/2 com pH variando de 5,5 a 9,5, fornecimento de luz variando de 6h a 24h e proporção de efluente de reator tipo UASB no meio de cultura variando de 25 a 100%. Verificou-se que a condição mais favorável para o cultivo da respectiva microalga visando à produção de biocombustíveis foi em pH 7,28 e 12h de luz, que resultaram em maiores produtividades, com 0,107833 g.L⁻¹.d⁻¹, além de apresentar resultados satisfatórios de velocidade específica máxima e tempo de geração e por serem mais viáveis economicamente. Em relação aos cultivos com efluente de reator UASB, a microalga desenvolveu-se melhor no cultivo cuja proporção de efluente de reator tipo UASB no meio de cultura foi de 25%, apresentando melhores resultados cinéticos e a maior remoção de DQO (40,23%), revelando que, quanto maior era a proporção do efluente no meio de cultura, menos ela se desenvolvia. Além disso, foram realizadas análises estatísticas de Matriz de Correlação e Análise em Componentes Principais (ACP), percebendo-se que os parâmetros apresentaram correlações consideráveis, indicando a importância de se ter um bom planejamento experimental de modo a otimizar seu desenvolvimento.

Palavras-chave: Microalgas; Biocombustível; Biorremediação.

ABSTRACT

With the global technological advancement, it is essential the search for sustainable energy sources in order to supply the energy demand and the unbridled exploitation of natural resources. In this context, microalgae appear as an alternative for the production of biofuels due of its high rate of cell growth, production of biomass, to survive in extreme environments and to promote biorremediation and CO₂ sequestration. Among the existing species of microalgae, the *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER stands out due to its high lipid and biomass productivity. In order to define the conditions that best favor its development and greater production of biomass, it is important to analyze the parameters that influence its growth. In this study, cultures of *D. tertiolecta* were made in synthetic F/2 medium at pH ranging from 5.5 to 9.5, supply of light ranging from 6h to 24h and proportion of UASB reactor effluent in the culture medium varying from 25 to 100%. It was verified the most favorable conditions for the cultivation of its microalgae for the production of biofuels was at pH 7.28 and 12h of light, which resulted in the highest yields, with 0.107833 g.L⁻¹.d⁻¹, besides satisfactory results of specific maximum speed and generation time and to be more economically viable. In relation to the cultures with UASB reactor effluent, the microalgae developed in better crop whose proportion of UASB reactor effluent in the culture medium was 25%, showing better kinetic results and higher DQO removal (40.23%), revealing the larger was the proportion of the effluent in the culture medium, the less it developed. In addition, statistical analyzes of Matrix of Correlation and Principal Component Analysis (PCA) were performed, realizing the parameters showed significant correlations, indicating the importance of having a good experimental planning in order to optimize its development.

Keywords: Microalgae; Biofuel; Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curva de crescimento microbiano representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmicas (B)	16
Figura 2 – Fotomicrografia da microalga <i>D. tertiolecta</i>	23
Figura 3 – Aclimação dos cultivos da <i>D. tertiolecta</i>	24
Figura 4 – Processo de separação de biomassa (A); Representação das cápsulas na estufa (B)	27
Figura 5 – Curvas de crescimento da microalga <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de luminosidade.....	30
Figura 6 – Análise em Componentes Principais para a <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de luminosidade.....	32
Figura 7 – Curvas de crescimento da microalga <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura	32
Figura 8 – Análise em Componentes Principais para <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura.....	34
Figura 9 – Curvas de crescimento da microalga <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB.....	35
Figura 10 – Análise em Componentes Principais para <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fases de desenvolvimento do estudo.....	25
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e produtividade em biomassa dos cultivos de <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de luminosidade.....	30
Tabela 3 – Matriz de correlação para a <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de luminosidade	31
Tabela 4 – Parâmetros cinéticos e produtividade em biomassa dos cultivos de <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura.....	33
Tabela 5 – Matriz de correlação para a <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura	34
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos, produtividade em biomassa e remoção de DQO dos cultivos de <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB	36
Tabela 7 – Matriz de correlação para a <i>D. tertiolecta</i> em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
3.1	Biocombustíveis	13
3.2	Microalgas	13
3.2.1	<i>Microalga Dunaliella teriolecta BUTCHER</i>	15
3.3	Curva de crescimento microbiano	16
3.4	Métodos de separação da biomassa	17
3.5	Condicionantes ao cultivo de microalgas	18
3.5.1	<i>Agitação e aeração nos cultivos</i>	18
3.5.2	<i>Luminosidade</i>	18
3.5.3	<i>pH</i>	19
3.5.4	<i>Meio de cultura suplementado com efluente doméstico</i>	20
3.6	Análise estatística	21
3.6.1	<i>Correlações</i>	22
3.6.2	<i>Análise em Componentes Principais</i>	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Local de realização do estudo	23
4.2	Microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> BUTCHER	23
4.3	Meio de cultura e aclimação dos cultivos	23
4.4	Desenho experimental	24
4.5	Avaliação da cinética microalgal	25
4.5.1	<i>Velocidade específica máxima de crescimento</i>	26
4.5.2	<i>Tempo de geração</i>	26
4.6	Determinação da produtividade em biomassa microalgal	27
4.7	Determinação do potencial de biorremediação através da remoção de DQO	28
4.8	Análise dos dados	29

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Cultivo de <i>D. tertiolecta</i> sob variações de luminosidade	30
5.2	Cultivo de <i>D. tertiolecta</i> sob variações no pH do meio de cultura	32
5.3	Cultivo de <i>D. tertiolecta</i> com suplementação de efluente de reator tipo UASB.....	35
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Energia é um fator de extrema importância no planejamento estratégico, tático e operacional das nações. Questões ligadas à política de desenvolvimento econômico, operacionalização da sociedade e segurança nacional são decididas também com base na capacidade energética de cada país (DE ARAÚJO, 2013).

Contudo, a maior parte da energia consumida no mundo é derivada dos combustíveis fósseis, como o petróleo e o carvão mineral. Essa situação coloca grande parte dos países do mundo em situação de vulnerabilidade estratégica, pelo fato de os combustíveis fósseis não serem renováveis e estarem fadados ao esgotamento e à oscilação dos preços nos mercados internacionais. Além disso, promovem a emissão de gases poluentes como o CO₂, óxidos de nitrogênio e hidrocarbonetos, que provocam desequilíbrios ambientais e alterações climáticas (DE ARAÚJO, 2013; LOPES, 2017).

Desse modo, ante os problemas apontados acima, claramente contrários à dimensão social e ambiental da sustentabilidade, a busca por 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 se acelerou no final do século XX, de modo a contemplar o tripé da sustentabilidade (DE ARAÚJO, 2013).

O cultivo de microalgas aparece como uma opção em potencial para obtenção de biomassa visando à produção de biocombustíveis, devido à sua alta produtividade por unidade de área, uso de terras não aráveis e sequestro de CO₂, além da capacidade de sobreviver em ambientes extremos, adaptando o seu metabolismo de acordo com a alteração das condições ambientais (CHIRANJEEVI; MOHAN, 2016). Além disso, também existem estudos utilizando-se algas para tratar águas residuárias domésticas. Este processo de tratamento avançado tem inúmeros benefícios diferenciais em relação a outros processos de tratamento de esgoto, produção de combustível e cultivo de algas. (SUNDSTROM et. al, 2015).

Todavia, segundo a ótica de Pereira et al. (2012), além do perfil de crescimento de microalgas variar de espécie para espécie e até mesmo na mesma espécie, as possibilidades de uso desses microrganismos dependem das condições do cultivo, visto que não é fácil encontrar biomassa disponível em quantidade suficiente no ambiente natural a ser utilizada. Desse modo, sabendo-se que o crescimento das microalgas deriva de reações bioquímicas e biológicas, diversos fatores podem influenciar no desenvolvimento das microalgas, onde são

principalmente reportados em estudos sobre luz, pH e disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975).

Nesta perspectiva, este trabalho buscou avaliar o potencial da microalga de espécie *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER em meio sintético salino (F/2) e sob adição de efluente doméstico tratado sob variações na exposição luminosa e no pH do meio de cultura, por meio da cinética de crescimento (curva de crescimento, velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração), produtividade em biomassa e capacidade de biorremediação através da remoção de DQO.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cultivar a microalga *Dunaliella tertiolecta* em meio sintético F/2 em diferentes condições de luminosidade, pH e proporções de efluente doméstico tratado em reator do tipo UASB com a finalidade de avaliar a biorremediação e potencialidade de produção de lipídios.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar as cepas de *D. tertiolecta* em meio de cultura tradicional sob condições autotróficas;
- Cultivar cepas de *D. tertiolecta* ao cultivo mixotrófico através do efluente de reator do tipo UASB em meios de culturas tradicionais;
- Avaliar o desenvolvimento da microalga *D. tertiolecta* através das curvas e cinética de crescimento e da produtividade em biomassa frente ao meio de cultivo utilizado;
- Avaliar o potencial do efluente do reator tipo UASB como suplemento ao meio F/2 para otimizar a produção da microalga em estudo;
- Avaliar o potencial de biorremediação através da remoção de DQO para os cultivos com adição de efluente de reator tipo UASB;
- Realizar análise estatística para verificar o grau de correlação entre os parâmetros avaliados e realizar uma análise multivariada dos dados por meio do método da Análise em Componentes Principais (ACP).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biocombustíveis

Os biocombustíveis surgem como uma alternativa viável para produção de energia sustentável, visto que são originados de matéria-prima renovável, principalmente de origem vegetal, que captam o CO₂ da atmosfera para a fotossíntese transformando em carboidratos, triglicerídeos e outras substâncias orgânicas (MOTA; MONTEIRO, 2013).

Segundo Gomes e Sampaio (2017), é comum aludir-se a biocombustível de “primeira geração” como aquele que é produzido a partir de matéria-prima alimentar (via que se pretende abandonar), como, por exemplo, cana-de-açúcar, trigo, batata, beterraba, milho e/ou óleo vegetais como o girassol e soja. Por esta razão, há uma preocupação na produção de biocombustíveis originados por tais tipos de biomassa, por competirem com a produção alimentícia, causarem desmatamento da vegetação local, exigirem alta demanda de áreas agricultáveis e de água e poderem influenciar na economia, elevando o preço dos alimentos. Tais biocombustíveis podem ser o biodiesel, biogás, bioetanol e syngas.

Os biocombustíveis de segunda geração são etanóis considerados avançados originados a partir da lignocelulose possuindo duas rotas de conversão, sendo uma biológica - via hidrólise enzimática e a outra rota por tratamento termoquímico (GRASEL et al., 2017). 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. Sua produção pode ser maior que os de primeira geração, devido à maior oferta e por possuir maior potencial de não emissão de gases estufa em relação aos de primeira.

Quanto aos biocombustíveis de terceira geração, estes 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 (BARATA, 2016).

3.2 Microalgas

As microalgas são microrganismos de habitat aquático, podendo ser de água doce ou marinha. Na natureza são grandes responsáveis pelo balanço global da fotossíntese, e no mar

representam a base da cadeia alimentar como produtores primários, sendo assim fundamentais no equilíbrio dos ecossistemas costeiros e oceânicos (LOURENÇO, 2006). São seres muito diversificados, mas, como características gerais, são unicelulares, algumas são formadoras de colônias, fotoautotróficas e, por apresentarem pigmentos fotossintetizantes, são coloridas (OLAIZOLA, 2003).

Atualmente, muita atenção está sendo atraída para a cultura de massa efetiva de microalgas para aplicações comerciais, levando ao surgimento de uma área de pesquisa conhecida como "biotecnologia de microalgas" (CHEN et al., 2011). A tecnologia de microalgas é altamente promissora devido à diversidade de aplicações da biomassa em áreas relevantes, tais como produção de proteína unicelular, lipídios, carotenoides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbonetos e vitaminas (RICHMOND, 2004); produção de bioetanol, biodiesel (CHISTI, 2007; CHENG et al., 2011), biogás (MUSSGNUMG et al., 2010); tratamento de efluentes domésticos e industriais (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012); entre outros.

O interesse pelas microalgas para produção de biodiesel se intensificou com as primeiras crises do petróleo em 1970. Elas surgem como uma nova rota de produção de biocombustíveis: sendo seres clorofilados que convertem o CO₂ atmosférico em uma gama de metabólitos e produtos que incluem proteínas, polissacarídeos, hidrocarbonetos e lipídeos (NASCIMENTO et al., 2016), se fazem viáveis principalmente devido à sua estrutura simples, facilidade de cultivo, quantidade fornecida de lipídios (óleos) e fácil manipulação dos seus parâmetros de cultivo.

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

Lipídios e ácidos graxos são constituintes das células vegetais, atuando como componentes de membrana, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia. O teor médio de lipídios varia entre 1 e 40% e, sob determinadas condições de cultivo, pode atingir 85% do peso seco da biomassa microalgal (RICHMOND, 2004). Assim, quanto maior a produtividade em biomassa, maior será a quantidade de lipídios, importante para a produção de biocombustíveis.

Microalgas podem oferecer vários tipos de biocombustíveis renováveis. Estes incluem o metano ou biogás produzido pela digestão anaeróbica da biomassa, o biodiesel derivado de óleo de microalgas, biohidrogênio produzido pela lignina celulósica por meio da fermentação,

bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio de fermentação (BOROWITZKA, 1988; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011).

Com relação ao rendimento de óleo por hectare, das diversas matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção do biocombustível, as microalgas se sobressaem exibindo cerca de 80% a mais de rendimento quando comparadas à soja, canola e o milho (CHISTI, 2007). Além disso, chegam a tolerar condições marginais que normalmente seriam impróprias para o cultivo de plantas convencionais; possuem elevadas taxas de crescimento, chegando a duplicar sua biomassa em 24 horas (CHISTI, 2007; SOUZA, 2008); e requerem muito menos água que as plantas terrestres, pois, para produzir um litro de óleo as microalgas requerem apenas 1,5L contra 10.000L das plantas (AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011).

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

3.2.1 *Microalga Dunaliella teriolecta BUTCHER*

As microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na terra, representando uma grande variedade de espécies que vivem em condições externas. Segundo Neofotis et al. (2016), estima-se que existam entre 70.000 a um milhão de espécies, embora apenas 44.000 destas foram analisadas.

Dentre as microalgas, destaca-se a de espécie *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER, microalga marinha unicelular e fotossintética capaz de produzir simultaneamente grandes quantidades de carotenoides e lipídios em determinadas condições de estresse ambiental, como luminosidade e concentração salina do meio de cultivo (DA FRÉ; RECH; MARCÍLIO, 2014). Caracteriza-se por produzir altas concentrações de amido e glicogênio, possuindo assimilação eficiente de celulose, que são fatores essenciais para produção de biocombustíveis. Além disso, seu cultivo é simples, pois não se fixam em superfícies e são tolerantes a altas concentrações de sais, o que possibilita o seu cultivo em grande escala ao ar livre (ELENKOV et al., 1996).

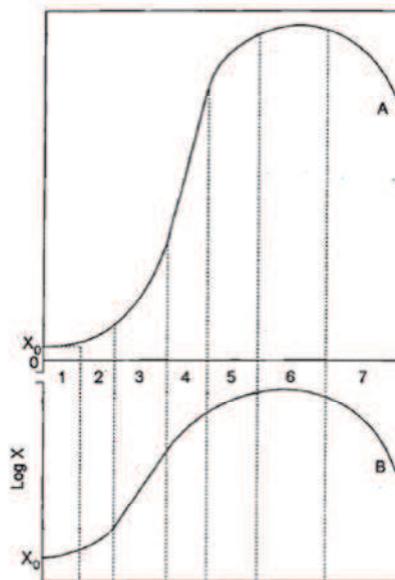
Estudos realizados por Takagi, Karseno e Yoshida (2006), analisando o efeito do stress salino no crescimento e no acúmulo de lipídios nas células da microalga *D. tertiolecta*, verificou-se que o aumento da concentração inicial de NaCl de 0,5M (semelhante à concentração de NaCl da água do mar) para 1M não diminuiu a densidade celular. Porém, testes

realizados anteriormente com concentrações iniciais de NaCl de 1,5 e 2,0 M inibiram significativamente o crescimento celular.

3.3 Curva de crescimento microbiano

Visando avaliar o desenvolvimento de cada cultivo microalgal, é necessário que se faça o estudo da curva de crescimento, cujo modelo é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – 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 1 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: Fase de transição, em que os microrganismos começam a se reproduzir;
- Fase 3: Fase exponencial, também conhecida como fase “log”. A velocidade de crescimento específica é proporcional à concentração de células, constante e máxima;
- Fase 4: Fase de crescimento linear, existe um decaimento na velocidade específica de crescimento devido a 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.

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. As principais técnicas de separação da biomassa empregadas atualmente são: filtração, floculação, flotação e centrifugação (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 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, $Al_2(SO_4)_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $FeCl_3$, 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 depressurização de um fluxo de água saturado com ar (UDUMAN et al., 2010), na flotação por ar disperso a produção das bolhas é feita pela combinação de um sistema de injeção de ar com um agitador mecânico de alta velocidade (RUBIO, SOUZA & SMITH, 2002) e na flotação eletrolítica microbolhas de gases são produzidas por eletrólise da água com a utilização de eletrodos de sacrifício (ALFAFARA et al., 2002).

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).

3.5 Condicionantes ao cultivo de microalgas

3.5.1 *Agitação e aeração nos cultivos*

O processo de agitação do meio de cultivo microalgal é um parâmetro essencial, pois permite a homogeneização das células, melhora a transferência dos gases, impede a estratificação térmica e auxilia na distribuição homogênea dos nutrientes. A agitação da cultura, em meio líquido, mantém as células em suspensão, evitando que algumas células fiquem depositadas no fundo, enquanto outras que permanecem na superfície recebam luz em excesso (BECKER; VENKATARMAN, 1981). Além disso, a agitação evita a foto-oxidação através da eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND, 2004).

Fast e Boyd (1992) afirmam que aeração mecânica se faz necessária, principalmente, nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas estão com alguma limitação de desenvolvimento (enfermas ou velhas), o que origina uma menor produção de oxigênio; durante a falta ou carência de luz, pois com pouca radiação (solar ou artificial), diminui substancialmente a produção de oxigênio que pode inibir o processo de fotossíntese.

Assim, a agitação da cultura torna-se muito importante, pois pode otimizar todos os fatores essenciais relacionados à produção de biomassa de microalgas (SOARES, 2010; PEQUENO, 2010).

3.5.2 *Luminosidade*

Por serem seres fotossintetizantes, a luz é um importante fator no cultivo de microalgas. A fotossíntese é uma reação redox catalisada pela energia luminosa que transforma gás carbônico e água em glicídios e gás oxigênio. Derner et al. (2006) ressaltam que a quantidade de luz recebida pelas células em cultivo está diretamente relacionada à fixação do carbono pelas microalgas (visto que muitas enzimas são ativadas pela luz) e, assim, influenciará na taxa de crescimento das culturas.

No cultivo de microalgas, a demanda por luz aumenta com o passar do tempo. Dessa forma, uma correta suplementação de luz é necessária para um crescimento adequado das microalgas (BARSANT; GUALTIERI, 2006). Com o aumento da intensidade luminosa, a fotossíntese torna-se mais eficiente, até atingir o valor de saturação. Sob prolongada saturação luminosa, em especial nos dias de verão, as taxas fotossintéticas têm tendência a diminuir, devido a um fenômeno conhecido como fotoinibição (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Outro fator limitante do crescimento em culturas densas é a fotolimitação, que consiste no sombreamento provocado pelas próprias células à medida que há o crescimento, impedindo que parte da cultura receba luz (FABREGAS et al., 2001).

De modo geral, muitos sistemas de cultivo de microalgas são planejados para utilizar a luz natural (crescimento autotrófico). A principal vantagem deste método é o decréscimo no custo de produção, no entanto, inconvenientes como a variação do fotoperíodo, da intensidade luminosa e, também, variações ambientais fazem com que os cultivos que utilizam luz natural não sejam estáveis (POLI et al., 2004).

Com relação ao tempo de exposição luminosa por dia, estudos realizados por Li (2005) com a microalga *Botryococcus braunii*, por exemplo, não mostraram diferença significativa entre cultivos com 12 e 24h de luz diárias, porém, fotoperíodos de 4h e 8h não sustentaram o crescimento das microalgas. Contudo, vale ressaltar que, dependendo da espécie de microalga que está sendo trabalhada, pode-se ter respostas diferentes para a mesma qualidade, intensidade de luz e fotoperíodo (HENRARD, 2009).

3.5.3 pH

O controle do pH é essencial para que os componentes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos. O pH é fundamentalmente influenciado pelas proporções entre as formas de carbono dissolvidas no meio de cultivo, interferindo na disponibilidade de CO₂ que afeta diretamente no crescimento das microalgas (LOURENÇO, 2006). A variação de pH no cultivo de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do CO₂ e à degradação de metabólicos originados (GRIMA et al., 1999).

A injeção de CO₂, por exemplo, ajuda a controlar o pH: uma maneira de regular as variações de pH é a aeração dos cultivos, com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO₂)

ou com ar enriquecido de CO₂, em concentração ideal para a espécie cultivada (LOURENÇO, 2006).

De modo geral, o melhor pH para o cultivo de diversas algas varia de neutro a alcalino; para microalgas verdes o pH ótimo está na faixa de 4,0 e 8,5 (MALIS-ARAD et al., 1980).

3.5.4 Meio de cultura suplementado com efluente doméstico

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm focado no desenvolvimento de métodos de cultivo de microalgas eficientes que diminuam os custos de produção. A utilização de águas residuárias surge como meio alternativo, agregando o conceito de reuso da água e produção de biomassa com valor de mercado aos sistemas de tratamento de efluentes (PITTMAN et al., 2011).

O tratamento de esgoto sanitário em países tropicais baseia-se em métodos biológicos como as lagoas aeradas, os reatores anaeróbicos e as lagoas de estabilização, devido à eficiência e relativa simplicidade desses sistemas (MENDONÇA, 2000). O Brasil é o país que mais investe em reatores anaeróbios; ele começou a explorar essa tecnologia na década de 80, em centros de pesquisa e universidades (LÉO; MATSUMOTO, 2001). O Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente de Manta de Lodo (UASB) exhibe a vantagem de remover grande parte da matéria orgânica do esgoto (cerca de 55 a 75%) com custos de implantação e operação relativamente baixos; contudo, não é eficiente na remoção de nutrientes e patógenos. Assim, é importante que se realize um pós-tratamento no efluente do reator UASB com a finalidade de completar a remoção desses materiais remanescentes (CHERNICHARO et al., 2001).

A biorremediação é uma tecnologia que consiste na utilização do metabolismo de microrganismos para eliminação ou redução, a níveis aceitáveis, de poluentes presentes no ambiente (COLLA et al, 2008). Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos em outros países e, em alguns casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção de contaminantes do que técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada em escala comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (JACQUES et al, 2007; BAMFORTH, SINGLETON, 2005).

De acordo com Silva (2014), a importância de introduzir o cultivo de microalgas no tratamento de águas residuárias é que esses organismos necessitam de nutrientes como nitrogênio e fósforo (substâncias responsáveis pela eutrofização) para seu crescimento; ao crescerem, as microalgas consomem esses nutrientes, promovendo, assim, o tratamento desse

efluente, facilitando o seu descarte adequado. Além disso, elas também têm capacidade de remover contaminantes orgânicos, metais pesados e patógenos de efluentes (MUNOZ; GUIEYSSE, 2006).

Rossi (2013) analisou o comportamento das microalgas de gênero *Scenedesmus* e *Desmodesmus* em meios mixotróficos com o efluente líquido doméstico de reator UASB. Os cultivos em meio sintético e no efluente de reator UASB foram otimizados a partir de sua metodologia sem decréscimo do conteúdo lipídico das microalgas. Houve também a elevação das produtividades de biomassa das duas cepas e por consequência, aumento da produção de lipídeos, aumentando assim a potencialidade das microalgas para a produção de biocombustíveis.

Assim sendo, a produtividade elevada da biomassa de microalgas a partir de águas residuárias sugere que este método de cultivo é viável para geração de biocombustível, avaliado como uma das muitas abordagens utilizadas para produção de energia sustentável e renovável (PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011).

3.6 Análise estatística

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 descritiva é o ramo da estatística que consiste na coleta, organização, descrição dos dados, cálculo e interpretação de coeficientes. 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; e cálculo de coeficientes (estatísticos), que permitem descrever resumidamente os fenômenos.

3.6.1 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.

Em geral, é adotado um intervalo de valores entre -1,0 e 1,0 para o coeficiente r . Quanto mais próximo 1,0, considerando-se seu valor em módulo, maior é a correlação entre os fatores. Quando o sinal se apresenta negativo, indica que uma variável diminui com o aumento da outra, já o sinal positivo representa que uma cresce quando a outra também o faz (NASSER JUNIOR, 2009). Segundo Hinkle, Wiersma e Jurs (2003), correlações entre 0 e 0,30 são consideradas muito fracas; entre 0,30 e 0,50 fracas; entre 0,50 e 0,7 moderadas; entre 0,7 e 0,9 fortes; e entre 0,9 e 1 muito fortes.

Para o estudo da interdependência entre os parâmetros analisados, utilizou-se a Matriz de Correlação, que consiste em uma matriz bidimensional composta por gráficos correlacionando as variáveis entre si, sendo útil para visualizar de forma imediata as potenciais correlações entre duas variáveis, entre todas as variáveis envolvidas (MINITAB, 2000).

3.6.2 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 ACP 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.

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.

4 METODOLOGIA

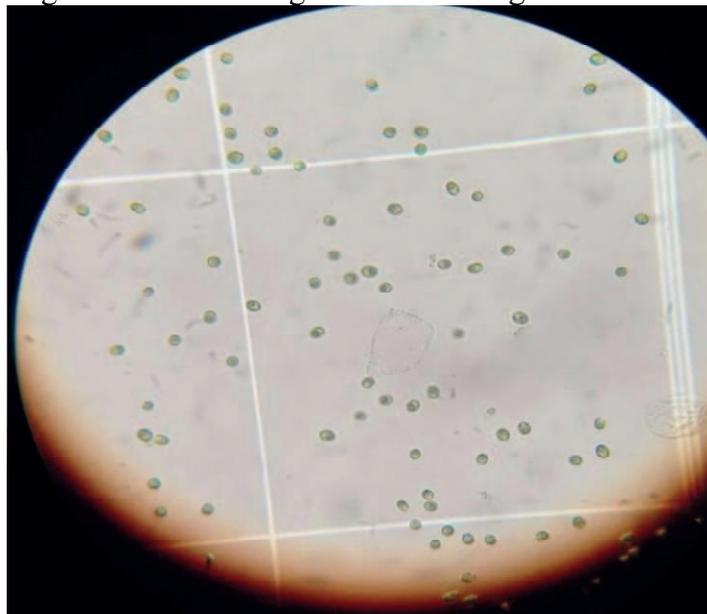
4.1 Local de realização do estudo

Os experimentos foram executados no Laboratório de Referência em Tecnologias de Águas (LARTECA), vinculado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT) do Campus I da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), localizado na cidade de Campina Grande, Paraíba.

4.2 Microalga *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER

Foram realizados estudos com a microalga de espécie *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER, cuja cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado na cidade de Recife, Pernambuco. A Figura 2 representa a fotomicrografia da *D. tertiolecta*.

Figura 2 – Fotomicrografia da microalga *D. tertiolecta*

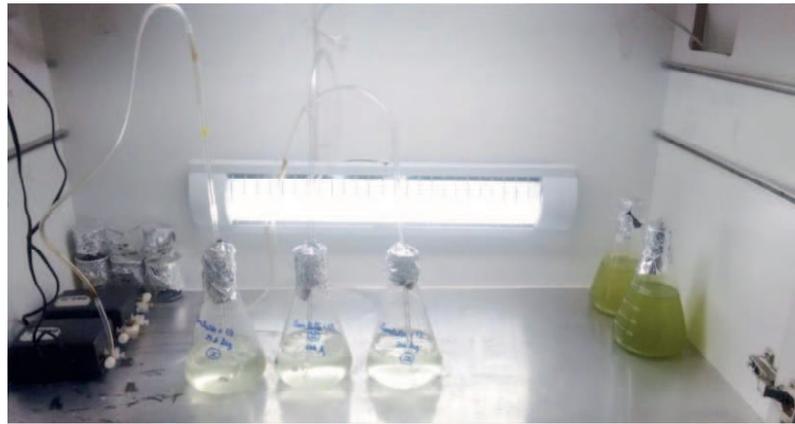


4.3 Meio de cultura e aclimação dos cultivos

As culturas eram mantidas em meio F/2, meio salino desenvolvido por Guillard (1975). Para os estudos com efluentes, o meio F/2 foi suplementado com efluente de reator tipo UASB, coletado da Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários da Universidade Estadual da Paraíba (EXTRABES/UEPB), localizada na cidade de Campina Grande, Paraíba, com pH em torno de 7-7,5 e DQO média de 345 mg O₂/L.

A aclimação dos cultivos foi estabelecida de modo a estabelecer um ambiente propício para a otimização do crescimento da *D. tertiolecta*. As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyres de 500 mL, utilizados como fotobiorreatores e mantidos a temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, com agitação de ar comprimido para garantir a homogeneização do meio, e à iluminação de 4.000 lux, proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W. A Figura 3 ilustra as condições de aclimação adotadas para o desenvolvimento microalgal.

Figura 3 – Aclimação dos cultivos da *D. tertiolecta*



4.4 Desenho experimental

A microalga *D. tertiolecta* foi cultivada em meio F/2 sob diferentes condições de luminosidade, pH e meio de cultura, em que buscou-se analisar a influência de tais fatores no desenvolvimento da espécie em estudo. Os experimentos foram realizados em triplicata e, para ser possível comparar os dados de modo a verificar a diferença no desenvolvimento entre eles, todos iniciaram com uma densidade celular próxima (entre $1,28$ e $1,64 \times 10^5$ células.mL⁻¹), sendo monitorados durante um período de 9 dias desde a inoculação.

As condições utilizadas nos cultivos de *D. tertiolecta* para este estudo foram as seguintes: os valores de luminosidade diária foram 6, 12, 18 e 24 horas; os valores de pH foram: 5,5; 6,5; 7,28; 8,5 e 9,5; as proporções do efluente de reator tipo UASB no meio de cultura foram 25, 50, 75 e 100%.

Inicialmente, desenvolveram-se cultivos de *D. tertiolecta* em meio F/2 sem alteração do pH do meio F/2 (7,28) visando analisar a influência da luminosidade diária, com o auxílio de um relógio controlador de luz, que desligava as lâmpadas automaticamente no período programado.

Em seguida, após adotado o período mais adequado de luminosidade diária, foram realizados cultivos ambos sob esta exposição, porém variando-se o pH do meio de cultura. Este era regulado da seguinte forma: para aumentar o pH utilizava-se uma solução de NaOH 0,1N; e, para diminuir, uma solução de H₂SO₄ 0,1N. O pH era sempre regulado antes da adição das microalgas, devido ao fato de que variações drásticas de pH podem causar o rompimento da membrana celular, inibir a atividade enzimática ou dos transportadores membranares de proteínas (SINOGAS; ALHO; BRITO, 2004).

Por fim, os efluentes provenientes do reator tipo UASB foram adicionados em diferentes proporções ao meio de cultura, sob as melhores condições de luz e pH decorrentes das duas etapas anteriores. Antes do inóculo, o efluente era filtrado em papel filtro qualitativo com porosidade de 14µm, gramatura de 80g/m² e espessura de 205µm no intuito de reter sólidos suspensos, e armazenado sob refrigeração. Além da avaliação cinética e da produtividade em biomassa, realizadas nas duas etapas anteriores, nesta etapa foi realizada também o potencial de biorremediação da microalga, medido em termos de remoção de DQO. A Tabela 1 resume as fases de desenvolvimento da pesquisa:

Tabela 1 – Fases de desenvolvimento do estudo

Etapas	Exposição diária a luminosidade (h)	pH do meio de cultura	Suplementação de efluente de reator tipo UASB
1ª fase	6h	Inalterado (7,28)	0%
	12h		
	18h		
	24h		
2ª fase	Inalterado (12h)	5,5	0%
		6,5	
		7,28	
		8,5	
		9,5	
3ª fase	Inalterado (12h)	Inalterado	25%
			50%
			75%
			100%

4.5 Avaliação da cinética microalgal

Com o auxílio da microscopia óptica (aumento de 400x), foi possível determinar o crescimento microalgal avaliando a densidade celular em função do tempo de cultivo em cada uma das unidades experimentais. As amostras eram retiradas ao início dos cultivos e depois 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 era realizada em triplicata e a densidade celular correspondia 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 com objetivo de representar as curvas de crescimento da *D. tertiolecta*, em que o eixo das abscissas corresponde ao tempo de cultivo e o eixo das ordenadas à densidade celular.

4.5.1 *Velocidade específica máxima de crescimento*

A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de microrganismos em um dado instante. A fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é dada por μ_x , que representa a velocidade específica de crescimento (h^{-1}). Na fase exponencial (log), a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo μ_x igual a $\mu_{m\acute{a}x}$. A velocidade de crescimento foi calculada da seguinte forma:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{m\acute{a}x} X \quad \text{Equação (01)}$$

Em que:

- X é a concentração de células;
- t é o tempo de cultivo.

Integrando-se a Equação (01), tem-se:

$$\int_{x_i}^x \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_{m\acute{a}x} \cdot dt \quad \text{Equação (02)}$$

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

$$\ln X = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t - t_i) + \ln X_i \quad \text{Equação (04)}$$

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

4.5.2 *Tempo de geração*

A fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração (t_g), tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular inicial ($X = 2X_i$). O tempo de geração foi calculado conforme as Equações de 05 a 07.

$$\ln 2X_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot (t - t_i) + \ln X_i \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (05)}$$

$$\ln \frac{2X_i}{X_i} = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t_g \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (06)}$$

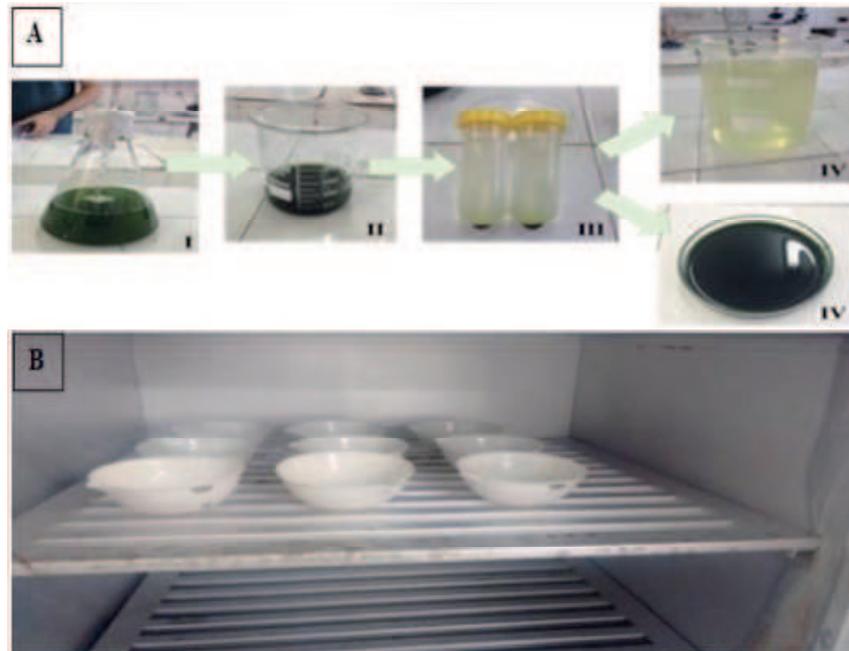
$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} = \frac{0,693}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o (07)}$$

4.6 Determina\c{c}\~{a}o da produtividade em biomassa microalgal

As an\~{a}lises de produtividade da biomassa foram realizadas em triplicata no in\~{i}cio e fim dos cultivos. A separa\c{c}\~{a}o da biomassa foi feita atrav\~{e}s da centrifuga\c{c}\~{a}o. O processo \~{e} ilustrado na Figura 4A: primeiramente parte do cultivo (I) \~{e} colocado em um B\~{e}quer de volume reduzido (II) para assegurar um manuseio seguro e sem perdas de biomassa. Posteriormente o cultivo \~{e} transferido para Tubos Falcon de 50 mL, as quais s\~{a}o levadas a uma centr\~{i}fuga de bancada e submetidas a uma rota\c{c}\~{a}o de 4.000 rpm durante 8 min; ao final do processo, a biomassa (IV) est\~{a} em sua totalidade no fundo das Tubos Falcon (III) e assim \~{e} separada do sobrenadante (IV). Ap\~{o}s a retirada do sobrenadante, a biomassa depositada foi centrifugada novamente utilizando uma solu\c{c}\~{a}o de HCl, pH 5-5,5, visando remover a salinidade resultante do meio com o intuito de n\~{a}o interferir na determina\c{c}\~{a}o da produtividade.

Posteriormente, a biomassa foi transferida para c\~{a}psulas de evapora\c{c}\~{a}o de porcelana previamente pesadas e secas em estufa a 105°C. As c\~{a}psulas com biomassa foram colocadas na estufa a 60°C para secar at\~{e} atingir peso constante. A Figura 4B ilustra o processo. Verificado o t\~{e}rmino da secagem, as mesmas foram acondicionadas no dessecador durante 15 minutos e depois pesadas em balan\c{c}a anal\~{i}tica.

Figura 4 – Processo de separa\c{c}\~{a}o de biomassa (A); Representa\c{c}\~{a}o das c\~{a}psulas na estufa (B)



Por fim, a produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi determinada por meio da Equação (08), em que 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.

$$\text{Produtividade} = \frac{\text{biomassa_seca}_{final} - \text{biomassa_seca}_{inicial}}{\text{tempo_de_cultura}_{final} - \text{tempo_de_cultura}_{inicial}} \quad \text{Equação (08)}$$

4.7 Determinação do potencial de biorremediação através da remoção de DQO

Para não haver interferência no cálculo da DQO devido a presença das células microalgais, as análises foram realizadas após centrifugação, no que se utilizava apenas o sobrenadante para a medição da DQO. Esta foi obtida através do método da refluxação fechada, de acordo com o *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 1998). As análises foram realizadas em triplicata no início e fim de cada um dos cultivos com adição do efluente. Assim, foi possível comparar os valores de DQO inicial e final, sendo possível analisar a eficiência na remoção de DQO promovida pela microalga através da Equação (09).

$$\% \text{ remoção} = \frac{DQO_{inicial} - DQO_{final}}{DQO_{inicial}} \times 100 \quad \text{Equação (09)}$$

4.8 Análise dos dados

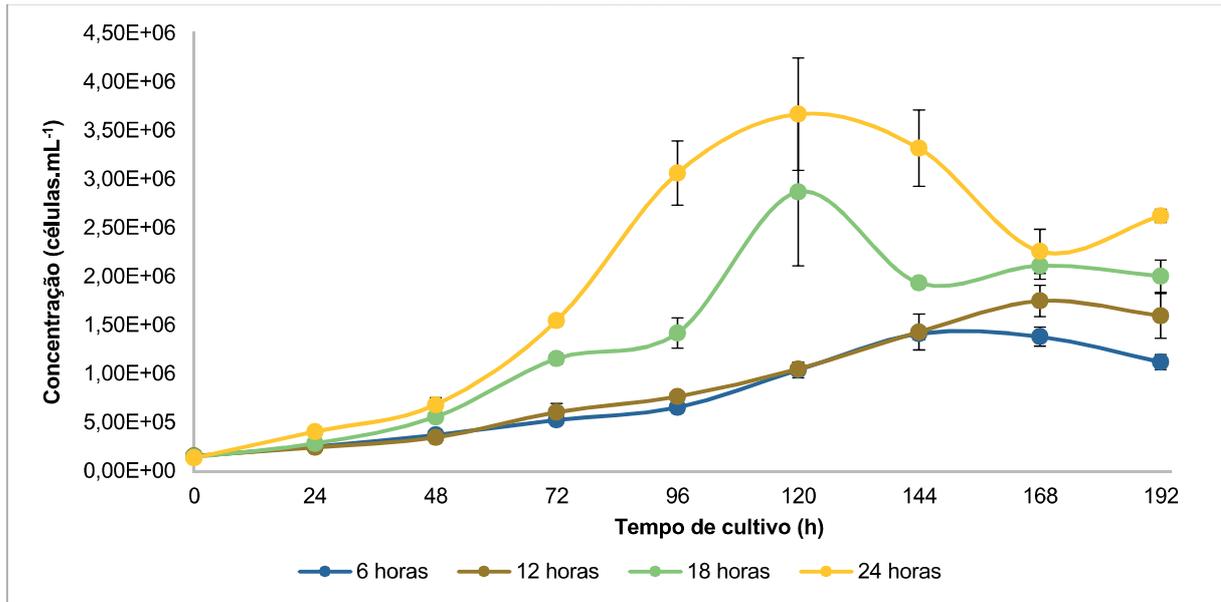
Através dos dados obtidos nas etapas descritas anteriormente, foi realizado um estudo estatístico a fim de corroborar com a escolha da melhor condição de luminosidade, pH e adição de efluente. Durante a realização deste trabalho, fez-se o estudo da Matriz de Correlação com o objetivo de verificar o nível de relação entre as variáveis analisadas. Além deste, foi efetuado um estudo estatístico multivariado dos dados por meio da Análise em Componentes Principais (ACP), a fim de analisar a formação dos grupos de variabilidades equivalentes. Para a realização dessas análises, utilizou-se do programa Microsoft Excel 2016

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo de *D. tertiolecta* sob variações de luminosidade

A Figura 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta as curvas de crescimento da microalga *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de luminosidade.

Figura 5 – Curvas de crescimento da microalga *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de luminosidade



Ao analisar a **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, tem-se que a densidade celular máxima aumenta à medida que aumenta a luminosidade diária, em que a maior encontrada foi a do cultivo exposto à 24h diárias de iluminação, alcançando $3,67 \times 10^6$ células.mL⁻¹ no sexto dia de cultivo, ou seja, passado-se 120 horas desde a inoculação. Os cultivos de 12 e 24h foram os que apresentaram as maiores fases log; contudo, o número de células do de 24h, diferentemente do de 12h, começou a decair a partir do sétimo dia de cultivo.

Para uma melhor análise da influência da incidência luminosa sobre a *D. tertiolecta*, a Tabela 2 apresenta os resultados cinéticos e de produtividade dos cultivos com 6, 12, 18 e 24h de iluminação diárias.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e produtividade em biomassa dos cultivos de *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de luminosidade

Horas de luz (h)	Velocidade específica máxima de crescimento (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)	R ² da curva de crescimento microbiano	Produtividade em biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
6	0,0153	45,30	0,9991	0,0505
12	0,0189	36,67	0,9812	0,10783
18	0,0292	23,74	0,9994	0,01775

24	0,0278	24,93	0,9835	0,02142
----	--------	-------	--------	---------

Os valores próximos de 1,0 do coeficiente de determinação (R^2), expressos na Tabela 2, indicam que houve um ajuste amostral satisfatório ao modelo de estudo utilizado. Observa-se que quanto maior a disponibilidade de luz, maior será a densidade celular; entretanto, o cultivo de 18h foi o que apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e, consequentemente, o menor tempo de geração, o que significa que o cultivo necessita de apenas 23,74h (menos de 1 dia) para dobrar a densidade inicial. Contudo, o cultivo de 12h foi o que apresentou maior produtividade; produtividade esta que está próxima da literatura, que é de $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009).

Os estudos de Chiranjeevi e Mohan (2016) revelaram uma maior produtividade de biomassa de microalgas em geral na presença de luz que na ausência, o que não ocorreu no presente estudo, mostrando a importância de se realizar estudos de influência da luminosidade: o fato de serem seres fotossintetizantes não implica dizer que elas sempre irão se desenvolver em maiores exposições de luminosidade.

Assim sendo, o tempo de fornecimento de luz de 12h diária foi suficiente para as necessidades microalgais e por apresentar maior produtividade. Além disso, em larga escala, pretende-se simular as condições externas do meio ambiente, fato da indicação do tempo de luminosidade de 12h para o cultivo de *D. tertiolecta*.

Com o intuito de verificar o nível de relação entre os parâmetros avaliados, descritos na Tabela 2, foi realizado o estudo da matriz de correlação (Tabela 3). Verifica-se que houve correlação muito forte da luminosidade diária com a velocidade específica máxima de crescimento e com o tempo de geração; por outro lado, a produtividade apresentou correlação moderada com as outras três variáveis.

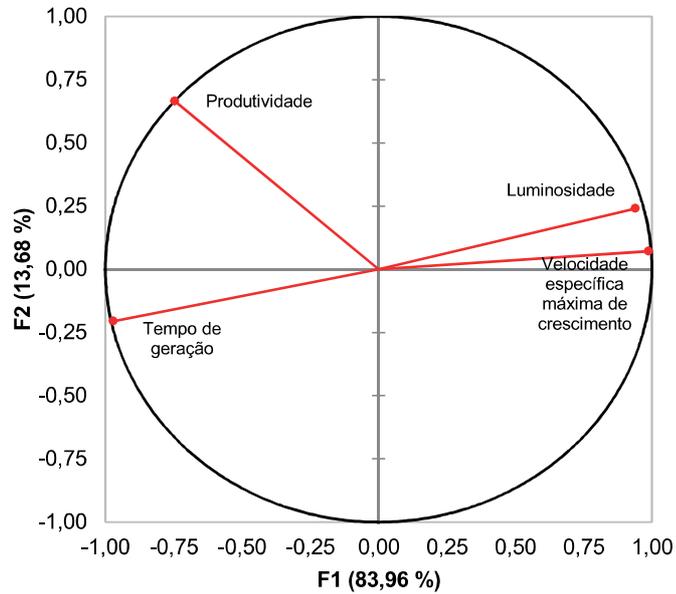
Tabela 3 – Matriz de correlação para a *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de luminosidade

	Luminosidade	Velocidade específica máxima de crescimento	Tempo de geração	Produtividade
Luminosidade	1			
Velocidade específica máxima de crescimento	0,9118	1		
Tempo de geração	-0,9325	-0,9907	1	
Produtividade	-0,5499	-0,6845	0,5834	1

Em relação à ACP (Figura 6), observa-se que a projeção de variação dos dados nos dois eixos principais, explicam aproximadamente 97,64% (Fator 1 + Fator 2) da variabilidade do processo, ou seja, tem-se uma boa correlação entre os dados. Verifica-se ainda a formação de

um grupo correlacionando mais intimamente: velocidade específica máxima de crescimento com luminosidade diária.

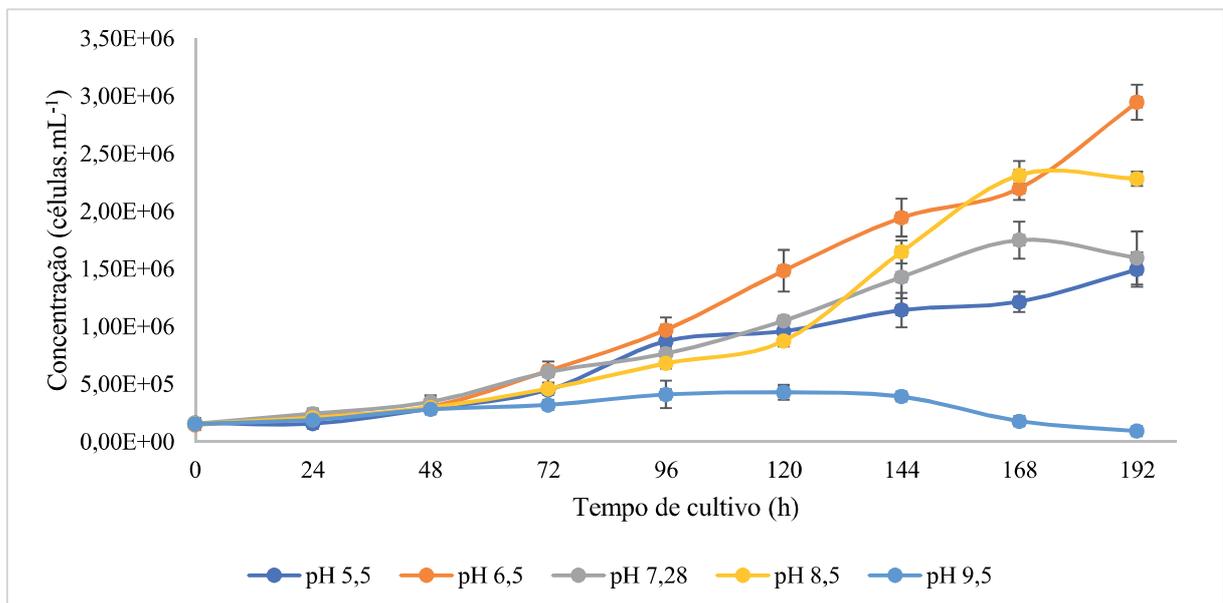
Figura 6 – Análise em Componentes Principais para a *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de luminosidade



5.2 Cultivo de *D. tertiolecta* sob variações no pH do meio de cultura

Em posse da melhor condição de luminosidade para o cultivo de *D. tertiolecta*, deu-se continuidade aos estudos realizando cultivos com 12h de iluminação diárias alterando o pH do meio de cultura, bem como mantendo o seu pH natural (7,28). As curvas de crescimento estão representadas na Figura 7.

Figura 7 – Curvas de crescimento da microalga *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura



Ao analisar a Figura 7, tem-se que o cultivo em pH 6,5 foi o que alcançou a maior densidade celular máxima, com $2,95 \times 10^6$ células.mL⁻¹, e o cultivado em pH 9,5 o que teve a menor densidade máxima ($4,29 \times 10^5$ células.mL⁻¹). Os cultivos em pH 6,5, 7,28 e 8,5 apresentaram as maiores fases log; o de pH 6,5, em especial, precisaria ser monitorado por mais dias para verificar sua fase de declínio.

Contudo, o cultivo em pH 9,5 apresentou dificuldades em seu desenvolvimento, entrando na fase de declínio a partir do sexto dia de cultivo e apresentando baixos valores de densidade celular em comparação com os demais cultivos. Os experimentos realizados por Malis-Arad et al. (1980) também chegaram no mesmo resultado: os valores de pH iguais ou superiores a 9,5 induziram a precipitação das células de *Chlorella vulgaris* no cultivo, por meio da agregação celular, reduzindo a produção de biomassa e aumentando o diâmetro celular.

Para uma melhor análise da influência do pH sobre a *D. tertiolecta*, a Tabela 4 apresenta os dados cinéticos e de produtividade em biomassa dos cultivos em pH 5,5; 6,5; 7,28; 8,5 e 9,5.

Tabela 4 – Parâmetros cinéticos e produtividade em biomassa dos cultivos de *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura

pH do meio de cultura	Velocidade específica máxima de crescimento (h ⁻¹)	Tempo de geração (h)	R ² da curva de crescimento microbiano	Produtividade em biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
5,5	0,022	31,51	0,9919	0,018
6,5	0,0217	31,94	0,9579	0,03483
7,28	0,0189	36,67	0,9812	0,10783
8,5	0,0166	41,76	0,9964	0,019
9,5	0,011	63,01	0,9192	0,01775

Os valores próximos de 1,0 do coeficiente de determinação (R²), expressos na Tabela 4, indicam que houve um ajuste amostral satisfatório ao modelo de estudo utilizado. O cultivo de pH 5,5 foi o que apresentou maior velocidade específica e, conseqüentemente, menor tempo de geração. No entanto, ele não apresentou produtividade satisfatória quando comparado com o cultivo de pH 7,28, que foi cerca de seis vezes maior. Verificou-se também que em pH maiores que 8,5, a microalga não se desenvolveu tão quanto os outros cultivos.

Fazendo uma analogia com os estudos realizados por Ying, Zimmerman e Gilmour (2014) sobre a influência do pH no crescimento de *Dunaliella salina*, eles detectaram que os diferentes níveis de pH apresentaram uma "tendência de parábola" com um valor ideal alcançado em torno de pH 7.

Assim, observando-se que o cultivo base (pH 7,28 - inalterado) proporcionou a melhor produtividade em biomassa e por apresentar cinética próxima aos cultivos sob pH mais baixo

(que foram os que apresentaram melhor crescimento), selecionou-se essa condição química para otimizar a produção de biocombustíveis, aliado também ao fato de não necessitar de reagentes químicos para ocasionar variação no pH.

Para verificar o nível de relação entre os parâmetros avaliados, foi realizado o estudo da matriz de correlação (Tabela 5). Verifica-se que houve correlação muito forte da velocidade específica máxima de crescimento com o pH do meio de cultura e com o tempo de geração; correlação forte entre tempo de geração e o pH do meio de cultura; por outro lado, a produtividade apresentou correlação muito fraca (ou nenhuma correlação) com as outras três variáveis.

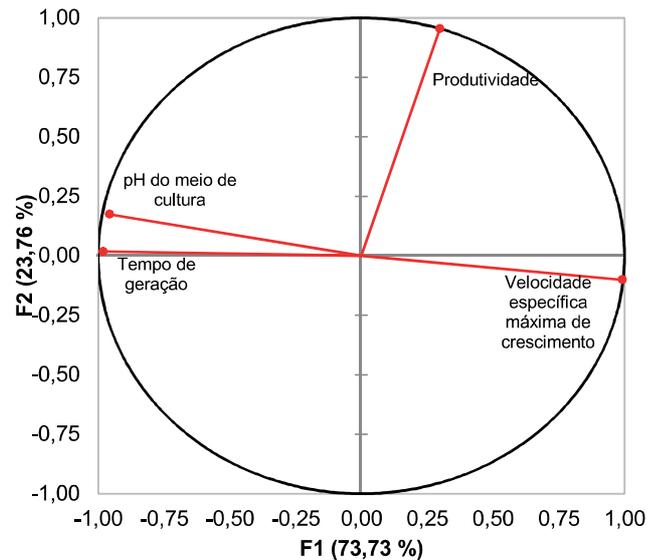
Tabela 5 – Matriz de correlação para a *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura

	pH do meio de cultura	Velocidade específica máxima de crescimento	Tempo de geração	Produtividade
pH do meio de cultura	1			
Velocidade específica máxima de crescimento	-0,9543	1		
Tempo de geração	0,8955	-0,9824	1	
Produtividade	-0,1273	0,1983	-0,2688	1

No que diz respeito à ACP (Figura 8), observa-se que a projeção de variação dos dados nos dois eixos principais, explicam aproximadamente 97,49% (Fator 1 + Fator 2) da variabilidade do processo, ou seja, tem-se uma boa correlação entre os dados. Verifica-se ainda a formação de um grupo correlacionando mais intimamente: pH d

o meio de cultura com o tempo de geração. E, assim como os experimentos sob variação de luminosidade, a produtividade não se correlaciona fortemente com os demais parâmetros, como já discutido no estudo da matriz de correlação.

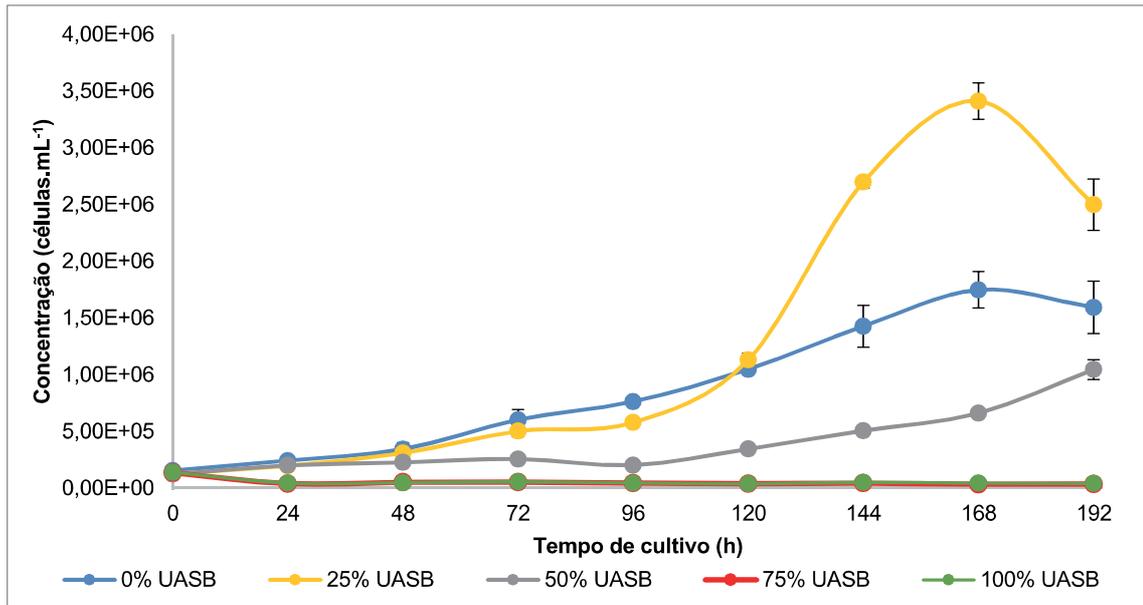
Figura 8 – Análise em Componentes Principais para *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações de pH do meio de cultura



5.3 Cultivo de *D. tertiolecta* com suplementação de efluente de reator tipo UASB

A Figura 9 apresenta as curvas de crescimento da *D. tertiolecta* em meio F/2 suplementado com efluente de reator tipo UASB. Pode-se observar que o cultivo suplementado com 25% de efluente de reator UASB (75% de meio F/2) foi o que obteve melhor desenvolvimento celular, alcançando, no penúltimo dia de cultivo, densidade máxima de $3,41 \times 10^6$ células.mL⁻¹, ou seja, cerca de 27 vezes superior à concentração inicial de $1,28 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e cerca de 2 vezes superior a densidade máxima obtida pelo cultivo sem suplementação de efluente de reator tipo UASB ($1,75 \times 10^6$ células.mL⁻¹). O cultivo suplementado com 50% de efluente apresentou longa fase de adaptação ao meio e ainda precisaria ser monitorado por mais dias para verificar sua fase de declínio. Nos teores de 75 e 100% de efluente de reator tipo UASB a microalga sofreu decaimento celular ao longo do tempo de análise.

Figura 9 – Curvas de crescimento da microalga *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB



Para uma melhor análise da influência da suplementação do efluente de reator tipo UASB sobre a *D. tertiolecta*, a Tabela 6 apresenta os dados cinéticos e de produtividade em biomassa, além dos resultados de remoção de DQO visando analisar o potencial de biorremediação, dos cultivos com 0, 25, 50, 75 e 100% de proporção do efluente no meio de cultura.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos, produtividade em biomassa e remoção de DQO dos cultivos de *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB

Proporção de efluente de reator tipo UASB no meio	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})	Tempo de geração (h)	R ² da curva de crescimento microbiano	Produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	Remoção de DQO (%)
0	0,0189	36,7	0,9812	0,10783	-
25	0,0194	35,73	0,9994	0,03408	40,23
50	0,0061	113,63	0,9699	0,01208	36,33
75	0,0057	121,6	0,8351	0,01217	19,35
100	0,0048	144,41	0,9841	0,00317	25,35

Os valores próximos de 1,0 do coeficiente de determinação (R^2), de modo geral, expressos na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, indicam que houve um ajuste a mostral satisfatório ao modelo de estudo utilizado. Verifica-se, na maior parte dos casos, que a *D. tertiolecta* reduziu seu desenvolvimento (densidade) celular à medida em que se aumentou a concentração do efluente no meio de cultura, através do decaimento da velocidade específica, bem como o aumento do tempo de geração e redução da produtividade em biomassa. Somado a isto, além de apresentar os melhores resultados cinéticos, o cultivo de 25% de suplementação de efluente também foi o que obteve a melhor remoção de DQO. Isso possa se justificar devido ao fato de a microalga ser de espécie salina e apresentar dificuldades em desenvolver-se em

meios cuja salinidade é mais reduzida e devido à presença de microrganismos presentes no efluente.

Comparando com os estudos realizados por Lúcio (2014), o efluente doméstico apresentou-se como meio alternativo para a *Chlorella vulgaris*, por haver um aumento significativo na densidade celular comparado ao meio sintético, devido a maior disponibilidade de nutrientes. A *Chlorella vulgaris* apresentou ganho de biomassa maior que o meio sintético e assimilaram 100% do ortofosfato, nitrato, nitrito e amônia melhorando as características químicas para o posterior reuso ou descarte do efluente. Em relação ao potencial biorremediador, 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 próximo aos alcançados nesse estudo.

Para verificar o nível de relação entre os parâmetros avaliados, descritos na Tabela 5, foi realizado o estudo da matriz de correlação (Tabela 7). Verifica-se que a remoção de DQO apresentou correlação moderada com os demais parâmetros; a produtividade se correlacionou de forma muito forte com os outros parâmetros (exceto remoção de DQO), ou seja, as correlações ocorreram de forma ainda mais acentuada se comparadas com as etapas anteriores. Além disso, ocorreu correlação muito forte entre o tempo de geração com a proporção do efluente e com a velocidade específica máxima; e correlação forte entre velocidade específica máxima e proporção do efluente no meio de cultura.

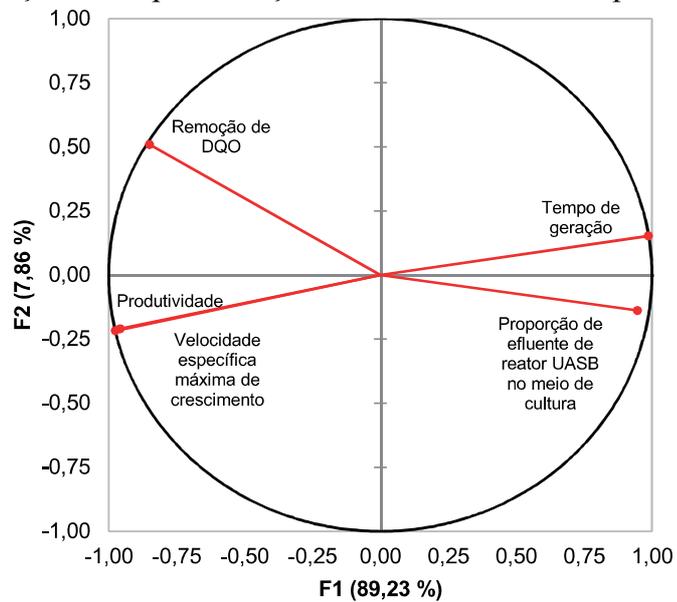
Tabela 7 – Matriz de correlação para a *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB

	Proporção de efluente de reator tipo UASB no meio de cultura	Velocidade específica máxima de crescimento	Tempo de geração	Remoção de DQO	Produtividade
Proporção de efluente de reator tipo UASB no meio de cultura	1				
Velocidade específica máxima de crescimento	-0,8205	1			
Tempo de geração	0,9127	-0,9798	1		
Remoção de DQO	-0,8343	0,7339	-0,7626	1	
Produtividade	-0,9085	0,9681	-0,9959	0,7094	1

Em relação à ACP (Figura 10), observa-se que a projeção de variação dos dados nos dois eixos principais, explicam aproximadamente 97,09% (Fator 1 + Fator 2) da variabilidade do processo, ou seja, tem-se uma boa correlação entre os dados. Observa-se ainda a formação de dois grupos correlacionando mais intimamente: tempo de geração com proporção do efluente no meio de cultura e produtividade com velocidade específica máxima. Assim, ao contrário do

que ocorreu nas duas etapas anteriores, a produtividade se correlacionou de forma mais íntima com os demais parâmetros; fato já discutido na matriz de correlação, em que a produtividade, de modo geral, vai decaindo com o aumento da suplementação do efluente do reator tipo UASB.

Figura 10 – Análise em Componentes Principais para *D. tertiolecta* em meio F/2 sob variações na suplementação de efluente de reator tipo UASB



6 CONCLUSÃO

Através do estudo dos cultivos da microalga *D. tertiolecta* visando a produção de biocombustíveis, pôde-se concluir que:

- O tempo de iluminação se apresentou como determinante fator para o desenvolvimento da microalga, e o tempo de 12h foi o mais apropriado pelo fato de ter apresentado maior produtividade e por evitar custos com iluminação artificial em larga escala se comparados com as demais exposições luminosas;
- A alteração do pH do meio F/2 sob a faixa 5,5-9,5 mostrou que, em pH a partir de 9,5, a *D. tertiolecta* não obteve êxito em comparação com os demais e, o cultivo sem alteração do pH natural do meio de cultura (7,28) foi indicado o mais apropriado, por ter apresentado maior produtividade, somado ao fato de diminuir os custos com utilização de produtos químicos para realizar a alteração do pH;
- A proporção de efluente de reator tipo UASB no meio de cultura mais favorável para a microalga em estudo foi de 25% e verificou-se de modo geral que quanto menor a proporção do meio salino no meio de cultura, menores serão as chances de se obter o desenvolvimento ótimo da microalga a fim de otimização para produção de biocombustíveis e para o potencial biorremediador;
- Com a auxílio das análises estatísticas, verificou-se que a maioria dos parâmetros apresentaram forte correlação. Além disso, através da ACP, observou-se a formação de grupos relacionados mais intimamente, mostrando a importância de se ter um bom planejamento experimental a fim de otimizar o desenvolvimento microalgal.

Com o intuito de aperfeiçoar este trabalho e torná-lo com ambições mais amplas, novos estudos devem ser realizados com a *D. tertiolecta*, merecendo destaque: potencial de biorremediação na presença de metais pesados e outros poluentes no meio de cultura; tempo de cultivo ideal para possibilitar o maior consumo de nutrientes; quantidade e caracterização dos lipídios gerados; qualidade da biomassa produzida; e viabilidade econômica, avaliando os custos de implementação desta tecnologia. Além disso, é indispensável a realização de pesquisas com relação a outras espécies de microalgas, visto que ainda são pouco exploradas, mas apresentam grande potencial para a produção de energia renovável.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAFARA, C. G.; NAKANO, K.; NOMURA, N.; IGARASHI, T.; MATSUMURA, M. Operating and scale-up factors for the electrolytic removal of algae from eutrophied lakewater. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 77, n. 8, p. 871-876, 2002.

AMARO, H. M.; GUEDES, A.C.; MALCATA, X.F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environmental Federation, 20° ed. Washington, 1998.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.

BARATA, Ana F. L. **Microalgas: produção económica e ambientalmente sustentável**. 99 p. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente) – Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa, 2016.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor e Francis Group, 2006. 320 p.

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

BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L.J. **Micro-algal biotechnology**. Cambridge University Press, 1988.

BOROWITZKA, M. Products from microalgae. **INFOFISH International**. Kuala Lumpur, n. 5, p. 21-26, 1993.

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

BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. **Limnetica**, v. 25, n. 3, p. 647-656, 2006.

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

CHEN, C. Y.; ZHAO, X. Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHENG, C. L.; LEE, D. J.; BAI, F. W.; CHANG, J. S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHEN, C-Y.; YEH, K-L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. C. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel: a critical review. **Bioresource technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011.

CHENG, C. H.; DU, T. B.; PI, H. C.; JANG, S. M.; LIN, Y. H.; LEE, H. T. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. **Bioresource Technology** v. 102, n. 21, p. 10151-10153, 2011.

CHERNICHARO, C. A. L. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. In: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. PROSAB, 2001.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. V. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, v. 98, p. 64-71, 2016.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, v.26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M. D., BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para Biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, 2008.

CRESPO, A. A. **Estatística Fácil**, 17 ed. São Paulo: Editora Saraiva, 2002.

DA FRÉ, N. C.; RECH, R.; MARCÍLIO, N. R. Influência da luminosidade e concentração salina na produção de lipídios e carotenoides pela microalga *Dunaliella tertiolecta* em fotobiorreator airlift. **Blucher Chem. Eng. Proc**, v. 1, n. 2, p. 1607-1614, 2014.

DE ARAUJO, G. J. F.; NAVARRO, L. F. S.; SANTOS, B. A. S. O etanol de segunda geração e sua importância estratégica ante o cenário energético internacional contemporâneo. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 5, 2013.

DERNER, R. B. OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. D; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n 6, p. 1959-1967, 2006.

ELENKOV, I.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S; POPOV, S. Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. **Phytochemistry**, v.42, n. 1, p. 39-44, 1996.

FABREGAS, J.; OTERO, A.; MASEDA, A.; DOMINGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 65-71, 2001.

FAST. A.; BOYD. C. Water circulation, aeration and other management practices. In FAST, A. e LESTER, J. (Eds.). **Marine Shrimp Culture: Principles and Practices**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. 1992. p. 457-495.

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.

GOMES. C. A.; SAMPAIO, J. S. Biocombustíveis: a caminho de uma “sociedade de reciclagem”. **e-Pública: Revista Eletrônica de Direito Público**, v. 4, n. 2, p. 389-418, 2017.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production, **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269-274, 2009.

GRASEL, F. S.; STIEHL, A. C. R.; BERNARDI, L. P.; HERPICH, T. L.; BEHRENS, M. C.; ANDRADE, J. B.; SCHULTZ, J.; MANGRICH, A. S. Inovação em biorrefinarias I. Produção de etanol de segunda geração a partir de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 4, 2017.

GRIMA, E. M.; FERNADEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. **Journal of Biotechnology**, v.70, p. 231-247, 1999.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animals**. Springer, Boston, MA, 1975. p. 29-60.

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. **Aquaculture Research**, v. 31, n. 8-9, p. 637-659, 2000.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

HINKLE, D. E.; WIERSMA, W.; JURIS, S. G. Applied Statistics for the Behavioral Sciences. 5th ed. Boston: Houghton Mifflin; 2003.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. D. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência rural**, Santa Maria. Vol. 37, n. 4 (jul./ago. 2007), p. 1192-1201, 2007.

LÉO, L. F. R.; MATSUMOTO, T. Avaliação da eficiência de um reator uasb em escala piloto com separador de fases em forma de "y" tratando efluente de curtume. **In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 21ª Feira Internacional de Tecnologias de Saneamento Ambiental, 4.** ABES, 2001. p. 1-9.

LI, Y.; QIN, J. G. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 6, p. 551-556, 2005.

LOPES, T. S. A. **Estudo da potencialidade de biorremediação e produção de biocombustíveis a partir das microalgas.** Campina Grande, 2017.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações.** São Carlos: RiMa, 2006.

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

MALIS-ARAD, S.; FRIEDLANDER, M.; BEM-ARIE, R.; RICHMOND, A. E. Alkalinity-induced aggregation in *Chlorella vulgaris* I. Changes in cell volume and cell-wall structure. **Plant and cell physiology**, v.21, n.1, p.27-35, 1980.

MALLICK, N.; MANDAL, S.; SINGH, A. K.; BISHAI, M.; DASH, A. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 137-145, 2012.

MENDONÇA, S. R. Sistemas de lagunas de estabilización: Cómo utilizar aguas residuales tratadas en sistemas de regadío. In: **Sistemas de lagunas de estabilización: como utilizar aguas residuales tratadas en sistemas de regadío**. McGraw-Hill, 2000.

MINITAB, I. N. C. MINITAB statistical software. **Minitab Release**, v. 13, 2000.

MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1483-1490, 2013.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. (2006). Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water research**, v. 40, n. 15, p. 2799-2815, 2006.

MUSSGNUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 51-56, 2010.

NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; SANTANA, H.; CEREIJO, C.; GARCIA, L. C.; DE SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. S. A. F. Avaliação do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma. In: **Embrapa Agroenergia-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 3., 2016, Brasília, DF. Embrapa, 2016.

NASSER JUNIOR, R. **Otimização das colunas de absorção da recuperação de acetona na produção de Filter Tow por meio de estudos fenomenológicos e análise estatística**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

NEOFOTIS, P.; HUANG, A.; SURY, K.; CHANG, W.; JOSEPH, F.; GABR, A.; TWARY, S.; QIU, W.; HOLGUIN, O.; POLLE, J. E. W. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. **Algal Research**, v. 15, p. 164-178, 2016.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular engineering**, v.20, n. 4-6, p.459-466, 2003.

PEQUENO, M. A. G. Avaliação do potencial produtivo de óleos obtidos a partir de microalgas por cromatografia gasosa. **Universidade Federal da Paraíba**, 2010.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F.; JACOB-LOPES, E.; NETO, P. C. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

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

POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDRATTA, E.; BELTRAME, E. A. Aquicultura: experiências brasileiras. **Florianópolis: Multitarefa**, p. 456, 2004.

REIS, E. Estatística multivariada aplicada. **Edições Sílabo**, 2001.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell 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**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RUBIO, J.; SOUZA, M. L.; SMITH, R. W. Overvie of flotation as a wastewater treatment technique. **Minerals engineering**, v. 15, n. 3, p. 139-155, 2002.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SILVA, D. A. Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SINOGAS, C.; ALHO, L.; BRITO, I. **Microbiologia: Textos de apoio e Manual Prático**. Departamento de Biologia: Universidade de Évora, 2004.

SOARES, D. Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p 107, 2010.

SOUZA, W. Artigo originalmente publicado no Monitor Mercantil, 25/08/2008. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/index.php/2008/08/28/microalgas-e-aproducao-de-biodiesel-artigo-de-wanderley-de-souza/>>. Acesso em 01 mar. 2019.

SUNDSTROM, E. et al. Avaliação de tratamento avançado de esgoto por algas como alternativa sustentável às tecnologias estabelecidas. In: 28º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2015, Rio de Janeiro. Anais Eletrônicos ABES, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Artmed. 3ª edição. Porto Alegre, 2006.

TAKAGI, M.; KARSENKO; YOSHIDA, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 3, p. 223-226, 2006.

UDUMAN, N.; UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of renewable and sustainable energy**, v. 2, n. 1, p. 012701, 2010.

YING, K.; ZIMMERMAN, W. B.; GILMOUR, D. J. Effects of CO and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 6, n. 3, p. 167-173, 2014.