

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA  
*SCENEDESMUS* SP. EM VINHAÇA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

*Nelzy Neyza Vargas Ramirez*

**Porto Alegre**

**2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA  
*SCENEDESMUS SP. EM VINHAÇA***

*Nelzy Neyza Vargas Ramirez*

Dissertação de Mestrado apresentada  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Engenharia

*Área de concentração:* Pesquisa e  
Desenvolvimento de Processos

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler**

**Prof. Dr. Marcelo Farenzena**

**Porto Alegre**

**2013**



## **Dedicatoria**

A minha mãe, Celia Ramirez, sei que foi difícil ter me deixado vir tão longe para atingir este alvo. Dedico a ti este trabalho em reconhecimento a teu apoio, teus cuidados, conselhos e amor. Obrigada por me ensinar a lutar pelo que quero.

Ao Ruddy Bazán, obrigada por estar perto de mim ainda na distancia, pela ajuda, ideias, apoio, amor e por ter me dado forças quando eu mais precisei.



# Agradecimentos

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho dentro de suas instalações e no programa de mestrado.

A CAPES, pela bolsa de mestrado e o apoio econômico.

A empresa COOPERCANA por ter fornecido a vinhaça usada neste trabalho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler e Prof. Dr. Marcelo Farenzena, pela orientação, dedicação e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Não me ensinaram só o caminho a percorrer, mas também me deixaram seguir minha própria experiência. Por confiar em mim. Obrigada.

Aos membros da comissão Examinadora pelas sugestões.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química que me receberam e ajudaram, especialmente a comissão do PPGEQ por me dar a oportunidade de realizar o mestrado em sua escola.

Agradeço a todos os amigos e colegas do PPGEQ, que formaram parte de esta experiência na universidade: Àgata, Ariane, Rafael, Bruno, Cassiano, César, Christiane, Cleiton, Dalciana, Fernanda, Frank, Juliana, Lara, Larissa, Leticia, Liège, Lucas, Luis Muniz, Marcelo Escobar, Matheus, Nataly, Odivan, Rodolfo, Rodrigo, Rubia, Sara e Yolice. Obrigada pela ajuda, paciência e amizade de todos vocês.

Agradecer com carinho ao Dr. Rodrigo Mejia, porque sem sua ajuda não teria nem conhecido este excelente time.

Aos encarregados de laboratório, Eduardo, Marcos e Tatiana.

Ao senhor Patrício pela paciência, os conselhos e a ajuda nos trâmites acadêmicos e legais.

Ao senhor Valdemir e a Tita que me ajudaram durante os experimentos.

Aos amigos de meu país: Dr. Benjamin Grossmann, Msc. Eng. Omar Salinas e Msc. Eng. Karen Cabero.

Emfim, todos os que formaram parte de esta experiência, muito obrigada.





## Resumo

A vinhaça é o resíduo mais abundante gerado no processo de produção de etanol, sendo que a cada litro de etanol são gerados de 10 a 18 litros de vinhaça. Sua disposição é tema de grande preocupação, por sua elevada carga de matéria orgânica e o pH ácido. Embora seja um resíduo poluente, contém macronutrientes que podem ser usados para o cultivo de micro-organismos úteis aos seres humanos como é o caso apresentado neste trabalho, onde a vinhaça foi utilizada para cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* As microalgas são apontadas como uma alternativa promissora para substituição dos combustíveis fósseis. Entretanto, seu custo ainda é elevado devido a vários fatores, dentre os quais os nutrientes que devem ser fornecidos para crescimento. Assim, o uso de rejeitos como fonte de nutrientes pode auxiliar a reduzir este balanço desfavorável. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade técnica de produção da *Scenedesmus sp.* para tratar vinhaça de etanol de cana de açúcar. Inicialmente, testou-se a viabilidade de crescimento da microalga nesses meios. Uma vez corroborado que é possível seu crescimento, foram realizados planejamentos experimentais que avaliaram os fatores que influenciam no crescimento. O planejamento fatorial demonstrou que é possível cultivar microalgas em concentrações de até 40% de vinhaça. O planejamento composto central rotacional demonstrou o seguinte: a intensidade luminosa e a porcentagem de vinhaça influenciam na quantidade de biomassa a ser produzida, e a temperatura, entre 20 e 35°C, não tem um efeito significativo quando se trabalha com porcentagens menores que 40% de vinhaça. Foram analisados parâmetros como o DBO, conteúdo de nitrogênio e fósforo, que demonstraram que fotobiorreatores com até 32% geram vinhaça tratada com valores de DBO menores que 106 mg/L, conseguindo remover até 96% de nitrogênio e 99,9% de fósforo. Como dado adicional se avaliou os métodos de espectrofotometria e espectroscopia de fluorescência, que se mostraram métodos adequados para acompanhar o crescimento microalgal em fotobiorreatores.

*Palavras-chave: vinhaça, microalga, Scenedesmus sp., fotobiorreator, tratamento.*



## Abstract

Vinasse is one of the most polluting wastes generated in the process of ethanol production, with each liter of ethanol are generated between 10 to 18 liters of vinasse. Its suitable disposal is an issue of great concern due to its high load of organic matter and acidity. Although this is a polluting waste, contains nutrients which can be used for cultivation of micro-organisms that may be useful to humans as is the case presented in this work, where vinasse was used for cultivation of the microalgae *Scenedesmus sp.* Microalgae are currently reported in the literature as a promising alternative to replace fossil fuels. However, its cost is still high due to several factors, such as the nutrients that must be supplied for growth. Thus, the use of waste as a source of nutrients may assist in reducing this unfavorable balance. This study aimed to evaluate the technical feasibility of production of microalgae *Scenedesmus sp.* to treat ethanol stillage. First, cultivations with different percentages of vinasse were done aiming to verify whether they are able to grow in medium supplemented with vinasse. The factorial design has shown that it is possible to cultivate microalgae at concentrations up to 40% of vinasse in the culture medium. The central composite design showed that light intensity and percentage of vinasse influence the amount of biomass to be produced. Additionally, the temperature between 20 and 35°C has not a significant effect when working with percentages smaller than 40% of vinasse. The analyzed parameters were BOD, nitrogen and phosphorus content demonstrated that photobioreactors with up to 32% vinasse generate vinasse treated with BOD values lower than 106 mg/L achieving a removal of 96% nitrogen and 99.9% phosphorus. Finally, it was also shown that spectrophotometry and 2D fluorescence spectroscopy are suitable methods for monitoring the microalgae growth.

*Keywords: vinasse, microalgae, Scenedesmus sp., photobioreactor, treatment.*



## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 – Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação .....	1
1.2 Estrutura da Dissertação .....	2
<b>Capítulo 2 – Revisão bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Processo de produção de etanol .....	3
2.2 Vinhaça .....	4
2.2.1 Composição da vinhaça .....	4
2.2.2 Disposição final da vinhaça .....	6
2.3 Microalgas .....	9
2.3.1 Uso de microalgas .....	10
2.3.2 Classificação das microalgas.....	12
2.3.3 Composição química das microalgas.....	12
2.3.4 Fatores que influem no crescimento de microalgas.....	14
2.3.5 Scenedesmus sp. ....	16
2.3.6 Medidas de crescimento de microalgas.....	20
2.4 Microalgas para o tratamento de vinhaça .....	22
<b>Capítulo 3 – Materiais e métodos .....</b>	<b>23</b>
3.1 Seleção e identificação de microalga .....	23
3.2 Preparação de inóculo.....	24
3.3 Material de laboratório .....	24
3.4 Meio de cultivo .....	24
3.5 Medida de biomassa produzida .....	25
3.5.1 Densidade ótica .....	25
3.5.2 Espectroscopia de Fluorescência .....	25
3.5.3 Peso seco .....	25
3.6 Fotobiorreatores .....	26
3.7 Planejamento experimental.....	27
3.7.1 DCCR 1: Fatores que influenciam o cultivo de Scenedesmus sp. ....	27
3.7.2 Determinação de crescimento de microalga em vinhaça.....	29
3.7.3 Fatores que influenciam o cultivo usando vinhaça.....	29
3.8 Análise de vinhaça pura.....	31
3.9 Análise de vinhaça tratada com microalgas.....	31
<b>Capítulo 4 – Resultados .....</b>	<b>33</b>
4.1 Curva de crescimento.....	33
4.2 Avaliação do crescimento de microalgas no meio Guillard Modificado sem suplementação de vinhaça .....	34
4.2.1 DCCR 1: avaliação de fatores que influenciam no crescimento .....	34
4.3 Avaliação do uso de vinhaça para crescimento da microalga .....	38
4.3.1 Crescimento de Scenedesmus sp. em vinhaça .....	38
4.3.2 Planejamento experimental para avaliar fatores que influenciam no cultivo com vinhaça.....	39

4.4	Análise de DBO e consumo de nitrogênio e fósforo em cultivos com vinhaça.....	45
4.4.1	DBO final na vinhaça tratada.....	45
4.4.2	Nitrogênio em vinhaça tratada .....	46
4.4.3	Fósforo em vinhaça tratada .....	48
4.5	Avaliação do crescimento de microalgas .....	49
4.5.1	Usando espectrofotometria .....	49
4.5.2	Usando Espectroscopia de Fluorescência .....	49
<b>Capítulo 5 –</b>	<b>Conclusões e Trabalhos Futuros .....</b>	<b>57</b>
5.1	Conclusões.....	57
5.1.1	Trabalhos futuros .....	58
<b>Referências .....</b>	<b>59</b>	
<b>Apêndice.....</b>	<b>67</b>	
Apêndice I –	Análise de vinhaça.....	69
Apêndice II –	Análise de vinhaça tratada com microalgas.....	71
Apêndice III –	Dados complementares .....	77
III. 1	Determinação de crescimento de microalgas usando espectroscopia de fluorescência .....	77
III. 2	Dados experimentais.....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Instalação de conversão de etanol a partir de matéria-prima celulósica: componentes, entradas e saídas.....	4
Figura 2.2. Esquema resumido da bioissorção de metais pesados em solução aquosa por biomassa.....	10
Figura 2.3. Efeito da energia luminosa (E) na taxa fotossintética (F) e a eficiência fotossintética (F/E). Ek é a constante de saturação .....	15
Figura 2.4. Espécies de <i>Scenedesmus</i> : (a) <i>S. quadricauda</i> (b) <i>S. obliquus</i> (c) <i>S. acutus</i> (d) <i>S. dimorphus</i> .....	17
Figura 2.5. Perfis de ácidos graxos C <sub>16</sub> /C <sub>18</sub> de <i>S. obliquus</i> CNW-N cultivada em três condições de meio: rico em nutrientes, deficiente em nitrogênio e deficiente em nutrientes. “Outros” indica a soma de ácidos graxos diferentes dos grupos C <sub>16</sub> e C <sub>18</sub> .....	20
Figura 3.1. Etapas de separação e purificação de microalgas (a) Método de diluição sucessiva e subcultivos repetidos (b) Método em meio sólido.....	23
Figura 3.2. Fotobiorreator <i>air-lift</i> a) vista frontal, b) vista lateral .....	26
Figura 3.3. Acessórios do fotobiorreator <i>air-lift</i> .....	27
Figura 4.1. Curva logarítmica de crescimento da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada em fotobiorreator <i>air-lift</i> .....	34
Figura 4.2. Curva de crescimento de <i>Scenedesmus sp.</i> cultivada em fotobiorreator <i>air-lift</i> .....	34
Figura 4.3. Batelada de fotobiorreatores <i>air-lift</i> com diferentes condições de cultivo de microalgas.....	35
Figura 4.4. Diagrama de pareto – DCCR 1.....	36
Figura 4.5. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de <i>Scenedesmus sp.</i> – DCCR 1 (a) nutrientes – intensidade luminosa – biomassa (b) nutrientes – temperatura – biomassa .....	37
Figura 4.6. Superfície de resposta para o modelo completo de produção de <i>Scenedesmus sp.</i> – DCCR 1 (a) nutrientes – intensidade luminosa – biomassa (b)nutrientes – temperatura – biomassa .....	37
Figura 4.7. Cultivo de microalgas em erlemeyers (a) antes de serem instalados no shaker (b) após o cultivo .....	38
Figura 4.8. Crescimento de microalgas, cultivadas em shaker, a diferentes porcentagens de vinhaça.....	39
Figura 4.9. Diagrama de Pareto – planejamento fatorial .....	40
Figura 4.10. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de <i>Scenedesmus sp.</i> usando vinhaça – planejamento fatorial (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa.....	41
Figura 4.11. Diagrama de pareto – DCCR 2.....	43
Figura 4.12. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de <i>Scenedesmus sp.</i> usando vinhaça – DCCR 2 (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa .....	43
Figura 4.13. Superfície de resposta para o modelo completo de produção de biomassa usando vinhaça – DCCR 2 (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa.....	44

Figura 4.14 Crescimento de microalgas, cultivadas em fotobiorreatores <i>air-lift</i> a diferentes porcentagens de vinhaça .....	45
Figura 4.15 Valores de DBO em diferentes porcentagens de vinhaça adicionada no cultivo de microalgas.....	45
Figura 4.16 Conteúdo de nitrogênio total no primeiro e ultimo dia de cultivo de cada fotobiorreator .....	47
Figura 4.17 Conteúdo de fósforo no primeiro e último dia de cultivo .....	48
Figura 4.18. Ajuste linear da relação de DO e peso seco a partir de amostras diárias de cultivo em dois fotobiorreatores <i>air-lift</i> .....	49
Figura 4.19. Modelos com 1 e 2 pares no reator 1 - Intensidade absoluta.....	50
Figura 4.20. (a) Intensidade absoluta no reator 1 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) medido e peso seco predito para modelos com 1 par..	50
Figura 4.21. Região dos melhores pares no reator 1 .....	51
Figura 4.22. Ajuste com modelos com 2 pares no reator 1 – Intensidade absoluta .....	51
Figura 4.23. (a) Intensidade relativa no reator 1 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) medido e PS predito para modelos de 1 par .....	52
Figura 4.24. Modelos com 2 pares no reator 1 – Intensidade relativa.....	53
Figura 4.25. Melhores pares do reator 1 para predizer peso seco no reator 2..	54
Figura 4.26. Predição do reator 2 utilizando modelos com maior $R^2$ do reator 1 – Intensidade absoluta .....	54
Figura 4.27. Predição do reator 2 utilizando modelos com maior $R^2$ do reator 1 – Intensidade relativa .....	54
Figura III.1. Modelos com 1 e 2 pares no reator 2 - Intensidade absoluta.....	77
Figura III.2. (a) Intensidade absoluta no reator 2 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) experimental e peso seco predito para modelos de 2 pares.....	78
Figura III.3. Modelos com 2 pares no reator 2 – Intensidade absoluta .....	79
Figura III.4. Modelos no reator 2 – Intensidade absoluta: (a) Modelos com 1 par (b) Modelos com 2 pares.....	79
Figura III. 5. Predição do reator 1 utilizando modelos do reator 2 – Intensidade absoluta .....	81
Figura III.6. Predição do reator 1 utilizando modelos do reator 2 – Intensidade relativa .....	81
Figura III.7. Curvas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores <i>air-lift</i> em meio Guillard Modificado.....	83
Figura III.8. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores <i>air-lift</i> segundo DCCR 1.....	84
Figura III.9. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores <i>air-lift</i> segundo DCCR2.....	86
Figura III.10. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores <i>air-lift</i> em diferentes porcentagens de vinhaça .....	87



## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Características da vinhaça segundo a matéria-prima utilizada .....	5
Tabela 2.2: Composição da vinhaça em usinas de São Paulo .....	6
Tabela 2.3: Estado de produções de microalgas em escala mundial .....	11
Tabela 2.4: Composição química de alguns alimentos humanos e diferentes microalgas.....	18
Tabela 2.5: Perfil de ácidos graxos de <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivadas em meio rico em nutrientes com alimentação de 10% de CO <sub>2</sub> .....	19
Tabela 3.1: Composição do meio Guillard Modificado.....	24
Tabela 3.2: Valores utilizados no DCCR 1 para cultivo de <i>Scenedesmus sp.</i> ....	28
Tabela 3.3: Valores codificados do DCCR para três fatores.....	28
Tabela 3.4: Porcentagens de vinhaça adicionada ao meio de cultivo de microalgas.....	29
Tabela 3.5: Valores utilizados no planejamento fatorial com vinhaça .....	30
Tabela 3.6: Matriz de níveis e valores de planejamento fatorial com vinhaça ..	30
Tabela 3.7: Níveis utilizados no DCCR 2 para cultivo com vinhaça.....	31
Tabela 4.1: Análise de variância - DCCR 1 .....	35
Tabela 4.2: Média de valores de biomassa produzida em diferentes porcentagens de vinhaça adicionada ao meio de cultivo .....	39
Tabela 4.3: Análise de variância – planejamento fatorial de cultivo de microalgas utilizando meio de cultivo com vinhaça .....	40
Tabela 4.4: Análise de variância - DCCR 2 .....	42
Tabela 4.5: DBO inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> com diferentes porcentagens de vinhaça.....	46
Tabela 4.6: Nitrogênio inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> com diferentes porcentagens de vinhaça .....	47
Tabela 4.7: Fósforo inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de <i>Scenedesmus sp.</i> com diferentes porcentagens de vinhaça .....	48
Tabela 4.8: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 1 – Intensidade Absoluta.....	51
Tabela 4.9: Pares selecionados para modelos com 2 Pares no reator 1 – Intensidade Absoluta.....	52
Tabela 4.10: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 1 – Intensidade Relativa .....	52
Tabela 4.11: Pares selecionados para modelos com 2 Pares no reator 1 – Intensidade Relativa .....	53
Tabela 4.12: Pares selecionados para modelos com 3 Pares no reator 1 – Intensidade Absoluta (Abs.) .....	53
Tabela 4.13: Coeficiente de determinação dos modelos utilizados para prever o peso seco no Reator 2 utilizando os modelos ajustados para o Reator 1 – Intensidade Absoluta (Abs.) e Intensidade Relativa (Rel.).....	55
Tabela III.1: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 2 – Intensidade Absoluta.....	78
Tabela III.2: Melhores pares selecionados para modelos com 2 pares – Intensidade Absoluta.....	78

Tabela III.3: Modelos e pares selecionados .....	80
Tabela III.4: Coeficiente de determinação dos modelos utilizados para prever o peso seco no Reator 1 utilizando os modelos ajustados para o Reator 2 – Intensidade Absoluta (Abs.) e Intensidade Relativa (Rel.) .....	82
Tabela III.5: Biomassa produzida em fotobiorreatores <i>air-lift</i> nos experimentos definidos no DCCR 1 .....	84
Tabela III.6: Biomassa produzida em fotobiorreatores <i>air-lift</i> segundo condições definidas no planejamento fatorial usando vinhaça.....	85
Tabela III.7: Biomassa produzida em fotobiorreatores <i>air-lift</i> nos experimentos definidos no DCCR 2 .....	86
Tabela III.8: Biomassa produzida em fotobiorreatores <i>air-lift</i> a diferentes porcentagens de vinhaça.....	87

# Capítulo 1 – Introdução

## 1.1 Motivação

O Brasil tem consumido etanol como combustível automotivo, em grande escala, por mais de 30 anos. O país é atualmente o segundo maior produtor mundial de etanol e é o único país onde os biocombustíveis apresentam competitividade aos derivados de petróleo (Walter, 2009). No entanto, sua elevada produção tem gerado resíduos ao longo dos anos. Um dos resíduos inerentes ao processo é a vinhaça, sendo que cada litro de etanol produzido gera entre 10 a 18 litros de vinhaça (Silva, Griebeler *et al.*, 2007).

Considerando, por exemplo, a safra de 2011/2012, quando foram produzidos aproximadamente 23 milhões de metros cúbicos de etanol (Unica, 2012), o que corresponde a no mínimo 230 milhões de metros cúbicos de vinhaça ou aproximadamente 0,6 milhões de piscinas de 25 m x 10 m x 1,5 m.

A vinhaça geralmente é usada como adubo para solos agrícolas, principalmente nas lavouras de cana, devido à presença de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio. Porém, apresenta características indesejáveis como pH ácido, alto DBO e odores desagradáveis ao ser despejado em áreas abertas. Pesquisas recentes indicaram que o despejo da vinhaça em lavouras pode levar à contaminação de águas subterrâneas por infiltração, limitando assim o seu uso (Prezotto, 2009; Lima, 2012). Outra opção de descarte é a disposição em poço profundo, mas o armazenamento subterrâneo é limitado. Instituições como a CETESB têm estabelecido normas para a descarga adequada deste resíduo (Cetesb, 2006). Outros métodos de eliminação foram estudados como a evaporação para produzir ração animal e incineração para recuperação de potássio, mas estes tratamentos implicam em um custo elevado (Graciano, 2007). Pela importância do etanol na economia nacional e pelas novas restrições ao uso da vinhaça, novas alternativas devem ser avaliadas. Nesse contexto, a biorremediação utilizando microalgas pode ser uma alternativa promissora.

As microalgas têm sido usadas em escala mundial para diferentes propósitos. Além do alto conteúdo de lipídios e carboidratos, as microalgas podem ser

consideradas como uma matéria-prima excelente por causa de outras vantagens, tais como o crescimento rápido, a não concorrência com os cultivos alimentares pelas superfícies da terra e alta eficiência na fixação de CO<sub>2</sub> (Zhao, Chen *et al.*, 2013). Em virtude da sua composição, elas podem ser usadas para a produção de biocombustíveis, obtenção de pigmentos e como suplemento alimentar (Barbato, 2009). Além disso, podem ser usadas para tratamento de efluentes industriais e esgoto (Órpez, Martínez *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de produzir microalgas usando a vinhaça como meio de cultivo, visando utilizar o cultivo das microalgas como método para biorremediação.

## **1.2 Estrutura da Dissertação**

A presente dissertação está dividida em cinco capítulos. No capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica referente às características tanto da vinhaça, como resíduo industrial que precisa de tratamento, como as microalgas, como alternativa para biorremediação deste resíduo.

No capítulo 3 é descrita a metodologia empregada para determinação tanto da produção de microalgas quanto da determinação dos principais fatores que influenciam na otimização de crescimento microalgal, em meio de cultivo sintético ou com o uso de vinhaça. Além disso, inclui-se o uso da espectroscopia de fluorescência como um método não invasivo para determinação de biomassa.

O capítulo 4 discute os resultados obtidos. O capítulo 5 apresenta as conclusões baseadas nos resultados obtidos dos experimentos desenvolvidos e algumas sugestões para trabalhos futuros.

Apresentam-se também três apêndices. O primeiro apresenta as análises de laboratório da vinhaça usada nos experimentos, o segundo apresenta as análises de laboratório da vinhaça tratada nos fotobiorreatores e o terceiro traz dados complementares.

## Capítulo 2 – Revisão bibliográfica

Para compreender a importância de tratar um resíduo industrial, neste caso vinhaça, considera-se necessário conhecer sua origem, sua composição e suas formas de tratamento e reutilização. Além disso, uma revisão sobre as microalgas e suas possibilidades de utilização será apresentada, objetivando corroborar o uso desse micro-organismo.

### 2.1 Processo de produção de etanol

Conforme ocorre o aumento da produção de álcool, também cresce a produção de vinhaça, um subproduto oriundo da sua fabricação. Para cada litro de álcool são produzidos de dez a dezoito litros de vinhaça, cuja composição é bastante variável dependendo principalmente da matéria-prima utilizada e da composição do vinho (Giachini e Ferraz, 2009).

A beterraba e a cana de açúcar são as matérias-primas mais comuns das culturas base para a produção de etanol. No caso da cana de açúcar primeiramente se realiza o corte da mesma, depois ela é transportada para a usina, onde é lavada e encaminhada para a moagem. Quando a cana é moída surge o mosto que, após a fermentação, é destilado para concentrar o etanol. Matérias-primas à base de amido incluem grãos, tais como trigo, arroz, cevada, e milho (sorgo), bem como culturas de raízes, tais como batata e mandioca. Além da moagem, a conversão de matérias-primas à base de amido requer um passo de hidrólise enzimática, denominado sacarificação, para converter o amido em açúcares fermentáveis (Wilkie, Riedesel *et al.*, 2000).

Um esquema pormenorizado dos passos do processo necessário para a produção de etanol a partir de matéria-prima celulósica está representado na Figura 2.1. Embora existam algumas diferenças no processamento de matérias-primas de amido, açúcar e lignocelulósico, muitos aspectos do processo de produção de etanol permanecem os mesmos. Para uma melhor utilização de vinhaça é necessária a compreensão de como a hidrólise, a fermentação e a destilação afetarão a vinhaça como subproduto.

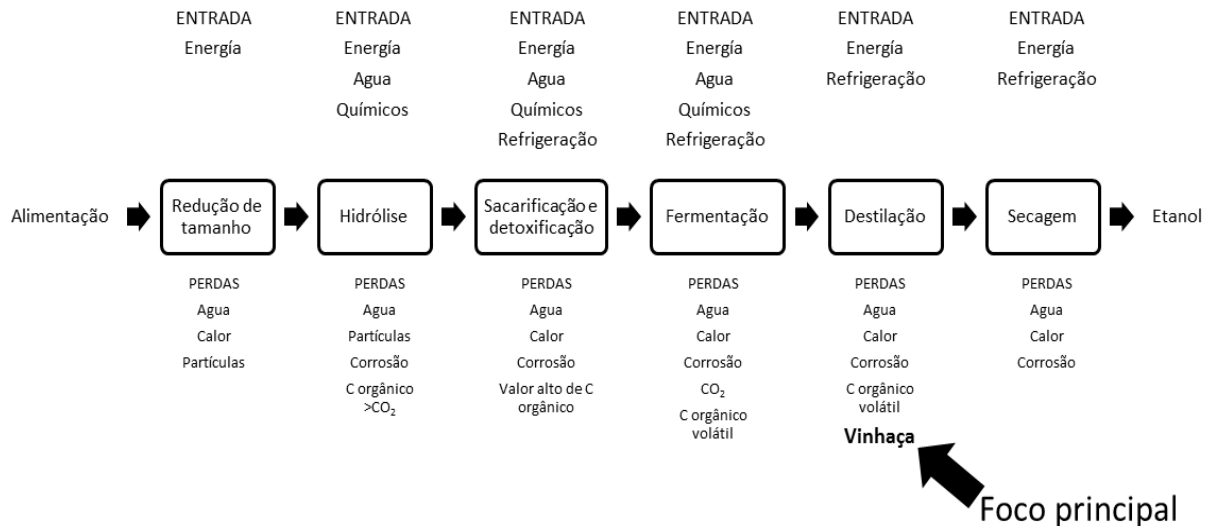


Figura 2.1. Instalação de conversão de etanol a partir de matéria-prima celulósica: componentes, entradas e saídas.

(Adaptado de: Wilkie, Riedesel *et al.*, 2000)

O efeito do pré-tratamento nas características da vinhaça é devido principalmente ao processo e os reagentes a serem usados. Pré-tratamento de uma matéria-prima pode incluir processos mecânicos (trituração e moagem), explosão a vapor (Bouchard, Nguyen *et al.*, 1990), explosão a vapor na presença de ácido (Clark e Mackie, 1987), explosão supercrítica pelo dióxido de carbono (Zheng, Lin *et al.*, 1998), AFEX (*ammonia freeze explosion*) e deslignificação com solvente (Kumar, Barrett *et al.*, 2009). Todos estes processos servem para facilitar a hidrólise.

O processo de fermentação é normalmente operado em batelada, mas pode também ser contínuo. O resíduo final da produção de álcool é a vinhaça. O volume da vinhaça que resulta após a destilação é inversamente proporcional à concentração de etanol no final da fermentação. Portanto, os esforços para assegurar alto teor de etanol podem reduzir o volume de vinhaça e melhorar o consumo de energia e capacidade de destilação.

## 2.2 Vinhaça

A vinhaça é um líquido derivado da destilação do vinho, que é resultante da fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço (Cetesb, 2006). Também é conhecida por vinhoto, garapão, mosto, restilo, tiborna e vinhote. Dependendo da região é rico em sais minerais, principalmente potássio, possui altos teores de matéria orgânica, com elevada acidez.

### 2.2.1 Composição da vinhaça

A composição da vinhaça é muito variável em função de diversos fatores. Um deles diz respeito à sua origem. Quando se utiliza o caldo de cana para a fermentação, a vinhaça resultante é sempre menos concentrada que a vinhaça proveniente do mosto de melaço ou de mosto misto (mistura de caldo e melaço)

como pode ser observado na Tabela 2.1. Além disso, a concentração de vinhaça varia de usina para usina, e dentro de cada usina, existem variações nos diversos dias da safra e mesmo num mesmo dia, em função da moagem de diferentes variedades, com diferentes índices de maturação, provenientes de diferentes solos e de diferentes níveis de fertilidades (Tamanini, 2008).

De acordo com Cortez *et al.* (1992), as principais características da vinhaça, em função da matéria-prima usada, estão apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Características da vinhaça segundo a matéria-prima utilizada (Cortez, Magalhaes *et al.*, 1992).

Parâmetro	Matéria-prima para o álcool		
	Melaço	Caldo	Mistura
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 – 100	80 - 100
DBO (mg O <sub>2</sub> /L)	25.000	6.000 – 16.500	19.800
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	65.000	15000 – 33.000	45.000
Sólidos Totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700
Material volátil (mg/L)	60.000	20.000	40.000
Material fixo (mg/L)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg/L)	450 – 1.600	150 – 700	480 - 710
Cálcio (mg/L CaO)	450 – 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
Carbono (mg/L C)	11.200 – 22.900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Relação C/N	16,00 – 16,27	19,70 – 21,07	16,40 – 16,43
Fósforo (mg/L P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Magnésio (mg/L MgO)	420 – 1.520	200 – 490	580 – 700
Material orgânico (mg/L)	63.400	19.500	38.000
Potássio (mg/L K <sub>2</sub> O)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340 – 4.600
Sulfato (mg/L SO <sub>4</sub> )	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
Outras substancias (mg/L)	9.500	7.900	8.300

Segundo dados publicados pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Unesp, 2007), a vinhaça apresenta as características mostradas na Tabela 2.2. Pode-se observar que o pH da vinhaça é baixo, por outro lado sua temperatura de descarga é alta o que representa um perigo no caso de sua descarga direta em corpos de água, e, além disso, a presença de sais, tais como nitrogênio e fósforo, que podem ser fonte de nutrientes para cultivo de alguns micro-organismos.

A grande preocupação com este efluente é basicamente sua composição química, que o torna um grande poluidor, em decorrência da elevada concentração de matéria orgânica, alto teor de potássio, cálcio, nitrogênio e fósforo e de suas características ácidas e corrosivas, se lançada sem um tratamento apropriado aos meios hídricos. Além do grande volume gerado, é conhecido o dado de que a vinhaça é até 100 vezes mais poluente que o esgoto doméstico em relação ao DBO (Freire e Cortêz, 2000; Rezende De Mello, 2007).

Tabela 2.2: Composição da vinhaça em usinas de São Paulo (Unesp, 2007)

Descrição	Concentrações		
	Mínima	Media	Máxima
pH	3,5	4,1	4,9
Temperatura (°C)	65	89	110,5
DBO (mg O <sub>2</sub> /L)	6680	16950	75330
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	9200	28450	97400
Sólidos totais (mg/L)	10780	25154	38680
Cálcio (mg/L)	71	515	1096
Cloreto (mg/L)	480	12189	2300
Ferro (mg/L)	2	25	200
Fósforo (mg/L)	18	60	188
Magnésio (mg/L)	97	225	456
Nitrogênio (mg/L)	90	356	885
Potássio (mg/L)	814	2035	3852
Sódio (mg/L)	8	51	220
Sulfato (mg/L)	790	1537	2800

Embora a composição da vinhaça seja em função da matéria-prima que se usa, das condições de solo e clima e o processo de obtenção de álcool, tal efluente não pode ser descartado em corpos de água sendo preciso realizar uma disposição adequada (Laime *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Disposição final da vinhaça

No início dos anos 50 a vinhaça era descartada diretamente nos rios, gerando impacto ambiental pela temperatura de descarga e pela alta carga orgânica que contém. Por isso, surgiu a necessidade de encontrar alternativas de disposição, as quais pudessem gerar menor custo para as empresas da indústria sucroalcooleira (Santos, 2010).

A vinhaça tem sido usada para compostagem de resíduos agroindustriais (Fernandes e Silva, 1997) ou como aditivo alternativo na alimentação de aves (Hidalgo, Rodríguez *et al.*, 2011). Também tem sido utilizada como fertilizante na lavoura de cana de açúcar pelo conteúdo de nutrientes presentes, trazendo benefícios econômicos na substituição total ou parcial da adubação mineral e com isso eliminando o problema imediato de poluição hídrica superficial. Pode-se dizer que o uso da vinhaça é uma alternativa orgânica para reduzir o uso de fertilizantes inorgânicos (química), principalmente devido ao alto teor nutricional de baixo custo e às condições químicas do solo (Jaramillo Chamba, 2010).

Os efeitos positivos atribuídos à adubação com vinhaça são: aumento do teor de matéria-orgânica, do teor de K e de alguns nutrientes como Zn, Fe, Mn e Cu e verifica-se também a melhora da estrutura do solo após três anos de aplicação. Muitos autores estudaram os efeitos da vinhaça nos solos e ao longo do tempo. De



maneira geral, a vinhaça apresenta elevadas concentrações de nitrato, potássio e matéria orgânica: sua utilização pode alterar as características do solo promovendo modificações em suas propriedades químicas, favorecendo o aumento da disponibilidade de alguns elementos para as plantas. Por outro lado, também pode ocasionar a elevação da capacidade de infiltração da água no solo e conseqüentemente o aumento da probabilidade de lixiviação de íons de forma a contaminar as águas subterrâneas quando em concentrações elevadas (Silva, Griebeler *et al.*, 2007).

Na região de Planalto, Monte Aprazível e União Paulista em São Paulo, presenciou-se a incidência de moscas dos estábulos. A CETESB verificou que a mosca utiliza diversos tipos de materiais para o seu desenvolvimento, onde pode se destacar resíduos da produção do etanol. A aplicação de vinhaça no solo, de forma inadequada pode favorecer o processo de proliferação de moscas. O excesso de vinhaça ou uma disposição inadequada de vinhaça pode gerar esse tipo de vetores (Ibape, 2009).

Além disso, a utilização contínua da vinhaça nos mesmos solos, mesmo que em dosagens baixas, ano após ano, pode gerar a saturação de cátions, principalmente de potássio na capacidade de troca catiônica dos solos, ocasionando problemas de lixiviação de seus constituintes para águas subterrâneas (Gariglio, 2008).

A lixiviação de K para a subsuperfície não é um problema ambiental, uma vez que o K não é poluente de águas. O problema é que a alta concentração de K favorece a formação de complexos químicos, que com carga neutra, são facilmente lixiviados. O complexo formado entre  $(K)^+$  e o  $(NO_3)^-$  é especialmente preocupante do ponto de vista ambiental porque o nitrato sim é grande poluidor de águas (Unesp, 2007).

A vinhaça deve ser vista, também, como agente do aumento da população e atividade microbiana no solo. O pH dos solos tratados com vinhaça aumenta principalmente em áreas cultivadas há mais tempo, embora nos primeiros dez dias após sua aplicação o pH sofre uma redução considerável para, posteriormente, elevar-se abruptamente, podendo alcançar valores superiores a sete; este efeito está ligado à ação dos micro-organismos (Giachini e Ferraz, 2009).

Outro método de tratamento consiste na concentração da vinhaça. Os primeiros registros sobre concentração de vinhaça aparecem em 1954, quando a empresa austríaca Vogelbusch instalou um primeiro concentrador usando evaporadores inclinados. Logo, a empresa desenvolveu o evaporador tipo "fallingfilm", ou película fina, no qual o líquido a evaporar escorre com alta velocidade pelas paredes internas dos tubos do trocador, reduzindo o seu tempo de permanência em contato com o vapor de aquecimento e diminuindo a tendência à incrustação. Esse tipo de evaporador se revelou logo como o mais indicado para lidar com líquidos com alto teor de sais incrustantes, como a vinhaça. No Brasil, as duas primeiras e únicas unidades de concentração de vinhaça de que se tem notícia foram instaladas em 1978. Uma delas, a da Usina

Tiúma, em Pernambuco, funcionava integrada à destilaria de álcool, a qual não obteve êxito devido aos problemas de incrustações e às frequentes paradas para limpeza, que atrapalhavam o funcionamento da destilaria. Em Sertãozinho, São Paulo, a Usina Santa Elisa, encomendou em 1976 da Conger S. A., então licenciada da Vogelbusch, um equipamento para concentração de vinhaça para uma usina com capacidade de produção de 120.000 litros de álcool por dia. Na época, utilizando melaço para fermentação, sem prever a utilização de caldo direto, o projeto do concentrador foi elaborado para alimentação de 70 m<sup>3</sup>/h de vinhaça com 6% de sólidos, concentrando-a até 60° Brix. Essa unidade ainda se encontra em operação, porém concentrando a vinhaça a um Brix mais reduzido, usando uma vazão maior do que a de projeto. A usina se beneficia com a redução no custo de transporte de vinhaça para as áreas mais afastadas e com a flexibilidade de poder dosar a concentração de cada aplicação de vinhaça conforme as características desejadas para determinado solo ou variedade (Biase, 2007).

Devido à complexidade do projeto e ao custo final de uma instalação de concentrador de vinhaça, principalmente para os parâmetros brasileiros, onde as destilarias são de grande capacidade e as vazões de vinhaça são muito grandes, não se pode deixar de levar em consideração alguns problemas que ainda exigirão soluções após uma decisão pela produção de vinhaça concentrada. Embora essa alternativa seja atraente, criativa e possa resolver grande parte dos problemas de transporte para aplicação no solo, abrindo ainda novas perspectivas de comercialização do concentrado para ração animal ou de geração de energia através da sua queima em caldeiras especiais, ainda se terá um grande volume de águas residuais com DBO e DQO elevados para disposição ou tratamento (Biase, 2007).

A fabricação de ração animal a partir da vinhaça também é uma possibilidade estudada. Primeiramente, o resíduo deve ser tratado para a redução de potássio, podendo ser utilizado como ração de bovinos, suínos e aves. Reporta-se que a ração assim produzida não interfere no sabor ou odor do leite e seus derivados, tem boa aceitação pelos animais e a taxa de conversão (ganho de peso com relação ao consumo de ração) é adequada. Há, porém, limitações de dosagem que devem ser obedecidas. Em ruminantes a ração feita da vinhaça não pode ultrapassar 10% da alimentação diária, em suínos não deve ultrapassar de 2 a 3% (Corazza e Salles Filho, 2000).

Tratar a vinhaça por biodigestão anaeróbica pode ser mais uma alternativa, mas é preciso o desenvolvimento de reatores de alta performance, onde os tempos de retenção hidráulica sejam bastantes reduzidos. O processo de biodigestão, se conduzido em reatores convencionais, é relativamente lento, com tempos de retenção hidráulica do resíduo dentro do reator de vários dias, ou mesmo semanas, para se completar o processo. O trabalho de Granato (2003) demonstra que esse é, sem dúvida, o principal obstáculo técnico para uma eventual aplicação do processo de digestão anaeróbica para a vinhaça. Tal problema pode ser superado utilizando o biodigestor UASB (*Upflow Anaerobic*

*Sludge Blanket Reactor*), onde se mantém elevada concentração de microorganismos no interior do reator, através da recirculação externa ou retenção interna dos microorganismos. A questão no uso da vinhaça é que as que são provenientes de caldo de cana e mistas apresentam concentrações de sulfato elevadas. O sulfeto produzido pelas bactérias reductoras de sulfato pode atingir concentrações superiores a 200 mg/L, trazendo sérios problemas de inibição das bactérias metanogênicas. Também o potássio existente em grandes concentrações na vinhaça pode causar algum nível de inibição ao processo.

### 2.3 Microalgas

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos que podem ser cultivados para biofixar o CO<sub>2</sub> proveniente do gás de combustão de combustíveis fósseis e contribuir para redução do aquecimento global (Radmann, Henrard *et al.*, 2011). Por cada quilograma de biomassa de alga seca consome-se aproximadamente 1,83 kg de CO<sub>2</sub> (Gris, 2011).

As microalgas podem crescer de maneira autotrófica (sintetiza as substâncias essenciais para seu metabolismo a partir de substâncias inorgânicas) ou heterotrófica (alimenta-se de substâncias orgânicas sintetizadas) ou mixotrófica (se nutre a partir de substâncias inorgânicas transformando-as em substâncias orgânicas por fotossíntese e, diretamente, de substâncias orgânicas). Geralmente é possível encontrar as microalgas nos corpos de água como lagoas, mares e rios, mas também podem estar presentes no solo. Encontram-se na biosfera, fazendo com que elas sejam adaptáveis em varias condições.

Além do dióxido de carbono, as microalgas precisam de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e outros nutrientes em menor quantidade como metais, os quais são essenciais para o seu metabolismo.

Existem materiais de origem biológica como os biosorventes que possuem a capacidade de adsorver e/ou absorver íons metálicos dissolvidos, óleos e corantes. Entre esses materiais estão os micro-organismos como o caso das microalgas (além das bactérias e fungos) que tem a características de biossorção. O mecanismo pelo qual atuam os biosorventes é muito similar ao do carvão ativado e troca iônica. Porém, na biossorção, a adsorção e a absorção de metais pesados ocorrem na biomassa de organismos tanto vivos como mortos, dentre os quais, micro-organismos (bactérias, microalgas, fungos, actinomicetes), macroalgas, macrofilos aquáticos, subprodutos agrícolas, incluindo muitos outros tipos de biopolímeros. A remoção do metal pode ocorrer via complexação, coordenação, quelação, troca iônica, adsorção e/ou precipitação inorgânica. Uma aproximação conceitual para remoção de metais pesados por intermédio da biossorção é apresentada na Figura 2.2. Esses metais, tóxicos ao meio ambiente, têm origem nos efluentes industriais (Tessele e Rubio, 2008).

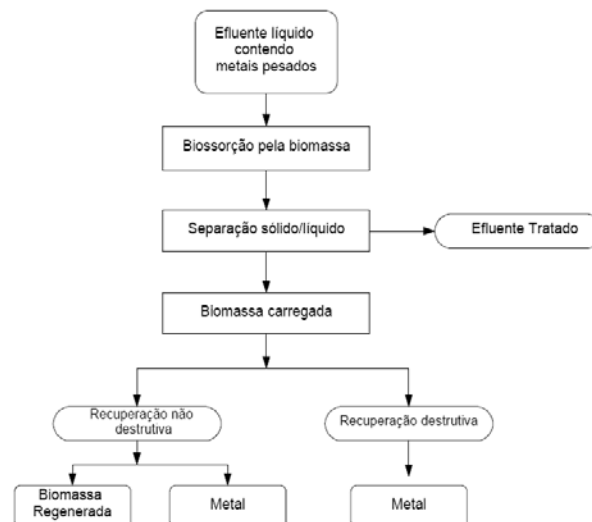


Figura 2.2. Esquema resumido da biossorção de metais pesados em solução aquosa por biomassa  
(Fonte: Tessele e Rubio, 2008)

A composição bioquímica da biomassa de microalgas pode variar segundo as condições de crescimento e espécie. O alto teor de lipídios, taxa de crescimento rápido, facilidade de colheita e a capacidade de adaptação a ambientes locais são alguns critérios essenciais (Chaichalerm, Pokethitiyook *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Uso de microalgas

As microalgas são adequadas para a absorção de CO<sub>2</sub> atmosférico, para a produção de biocombustíveis, e outros produtos de maior valor agregado, para a purificação de águas residuais municipais e para a produção de biomoléculas. Microalgas de várias espécies já são produzidas a uma escala comercial em vários países e utilizadas para a produção de suplementos alimentares, alimentos para animais, pigmentos, ácidos graxos  $\omega_3$ , biomassa para aquicultura e para o tratamento de águas residuais. O cultivo ocorre em tanques, lagoas, fotobiorreatores e fermentadores com diferentes técnicas e volumes de acordo com as espécies cultivadas e as aplicações específicas.

As microalgas apresentam muitas vantagens em relação às demais culturas terrestres, em se tratando da produção de combustíveis: crescem em água doce, água de mar e salobra. O sistema de cultivo pode ser construído em solo não arável sendo possível instalar o sistema de cultivo em regiões desérticas; a produção da biomassa de microalga pode ser combinada com fixação direta de CO<sub>2</sub>; produz o ano inteiro (não têm safra) e oferece maior rendimento por área ocupada (Soares, 2010).

Os nutrientes para o cultivo de microalgas podem estar presentes em águas residuais, é por isso que, além de proporcionar um meio de cultura, existe a possibilidade de tratar efluentes orgânicos na agroindústria. Muitos pesquisadores descobriram que as microalgas podem ser usadas para tratar esgoto e efluentes domésticos e do agronegócio, pois elas formam uma simbiose com bactérias, tão necessária para remover contaminantes orgânicos. Atualmente, existem trabalhos

relacionados ao tratamento de água com diferentes espécies de microalgas, por exemplo, cultivo de *Scenedesmus sp.* LX1 no efluente modificado de uma estação de tratamento de águas residuais de uma fábrica elétrica por fotobiorreator de membrana (Zhen-Feng, Xin *et al.*, 2011); a utilização de águas municipais residuais domésticas pós-cloradas de biomassa e produção de lipídios por *Chlorella sp.* sob condições em batelada (Mutanda, Karthikeyan *et al.*, 2011); biorremoção de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris* (Bertoldi, Sant'anna *et al.*, 2007); crescimento da microalga *Botryococcus braunii* para tratamento secundário de esgoto (Órpez, Martínez *et al.*, 2009); propriedades de acúmulo de lipídios e remoção de nutrientes de uma microalga de água doce recém-isolado, *Scenedesmus sp.* LX1, crescendo em efluente secundário (Xin, Hong-Ying e Jia, 2010).

As microalgas necessitam de luz e outros nutrientes para a fotossíntese, incluindo nitrogênio e fósforo. Tais compostos são comuns em águas residuais, os quais precisam ser removidos, assim, as microalgas e bactérias simbióticas são ideais para tratamento de resíduos agrícolas e industriais, pois eles têm um custo muito baixo em instalação e manutenção.

Na Tabela 2.3 são apresentados os mais importantes produtos e processos atualmente aplicados mundialmente ao nível da produção e pesquisa e dados de interesse relacionados às microalgas (Barbato, 2009).

Tabela 2.3: Estado de produções de microalgas em escala mundial  
(Adaptado de Barbato, 2009)

<b>Produtos e processos comerciais</b>		
<b>Produtos/Processos</b>	<b>Especies</b>	<b>Cultura</b>
Suplementos alimentar	<i>Arthospira</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Dunaliella</i> , <i>Haematococcus</i>	Lagoas, tanques raceway e circular, fotobiorreatores
Pigmentos	<i>Dunaliella</i> , <i>Arthospira</i> , <i>Haematococcus</i>	Lagoas, tanques raceway, fotobiorreatores
Ácidos graxos $\omega_3$	<i>Schyzochitrium</i> , <i>Cryptecodinium</i>	Fermentadores, 10- 100m <sup>3</sup>
Tratamento de aguas residuais	<i>Scenedesmus</i> <i>Culturas mistas</i>	Lagoas, Tanques raceway
Biomassa para a aquicultura	Varias especies	Tanques cilindricos, fotobiorreatores.

As microalgas têm sido usadas também para produção de polissacarídeos, biofertilizantes, medicamentos, biopesticidas, probióticos, biossensores, bioremediação de águas residuais com xenobióticos e metais, biofixação de CO<sub>2</sub> e produção de biodiesel e hidrogênio. Ainda está se trabalhando com culturas experimentais de espécies para a produção de biodiesel e hidrogênio, mas as pesquisas nesta direção são projetadas para atingir grandes volumes de rendimentos de produção previsíveis e programáveis, influenciado significativamente sobre a necessidade de combustível para aeronaves (Barbato, 2009).

### 2.3.2 *Classificação das microalgas*

Microalgas são organismos eucariotas fotossintéticos pequenos (1-10 µm). Tecnicamente, as microalgas não incluem as cianobactérias, que são organismos procariotas. No entanto, as cianobactérias de fato deram origem aos cloroplastos das algas eucarióticas (e plantas terrestres) e elas compartilham muitas características, tais como a capacidade de realizar fotossíntese e, assim, contribuir para a produção tanto de oxigênio atmosférico e para a redução do carbono orgânico (Larkum, Ross *et al.*, 2012).

As microalgas podem ser definidas como eucariotas/protistas fotossintéticas. As linhagens principais das algas são Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas), Glaucocystophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Heterokonta, Haptophyta, Cryptophyta, e dinoflagellates (dentro de Alveolata). Os grupos posteriores foram livremente nomeados como alga chromophyta, porque eles contêm clorofila *a* e *c* e várias xantofilas, as quais os fazem parecer amarelos ou marrons (Bhattacharya e Medlin, 1998).

### 2.3.3 *Composição química das microalgas*

A composição química das microalgas é muito variável, sendo afetada por fatores tais como espécie, nutrientes, temperatura, fotoperíodo, salinidade, fonte de carbono e intensidade de luz. Basicamente, as microalgas são compostas por proteínas, carboidratos e lipídios.

#### Proteínas

As proteínas estão no centro da ação dos processos biológicos. Elas funcionam como enzimas que catalisam um conjunto complexo de reações químicas, conhecidas coletivamente como vida. As proteínas servem como reguladores dessas reações tanto diretamente, como componentes de enzimas, quanto indiretamente, na forma de mensageiros químicos. A maioria das proteínas são compostas por duas ou mais cadeias polipeptídicas, referidas vagamente como subunidades, que se associam por meio de interações não-covalentes e, em alguns casos, por ligações dissulfeto. Todas as proteínas são sintetizadas a partir dos mesmos 20 tipos de aminoácidos. (Voet *et al.*, 2006). A qualidade nutricional de uma proteína é determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade dos seus aminoácidos (Becker, 2007).

As proteínas são de grande importância na maioria das microalgas, compreendendo até 50% ou mais do total de biomassa (*Servaites, Faeth et al.*, 2012). Como as bactérias, leveduras, plantas superiores, e outros, as microalgas podem ser manipuladas para a produção de proteínas recombinantes que têm um valor importante em aplicações industriais e farmacêuticas. (Gong, Hu *et al.*, 2011).

### Carboidratos

Os carboidratos são reservas de polissacarídeos e constituintes da parede celular. A composição de carboidratos em espécies de microalgas não foi muito estudada. Os monossacarídeos e oligossacarídeos constituem dos 45 – 90% da fração total de carboidratos. Os principais açúcares são glicose, galactose, manose e ribose, com outros açúcares em proporções variáveis (Takeda, 1996).

Algumas espécies de microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Spirulina* têm teores de carboidratos elevados (principalmente amido). Os carboidratos a partir de microalgas podem ser hidrolisados e convertidos em glicose, que é um substrato muito significativo para microrganismos heterotróficos (como leveduras, bactérias e fungos), para a produção de biocombustíveis (Zhao, Chen *et al.*, 2013). Por exemplo, no estudo de Choi *et al.* (2010), *Chlamydomonas* poderia conter cerca de 60% de hidratos de carbono (44% da qual era de amido) que foi hidrolisada e convertida em glicose. Em seguida, foi realizada a fermentação do etanol por *Saccharomyces cerevisiae* e, como resultado, foi produzido aproximadamente 235 mg de etanol a partir de 1 g de biomassa de algas por um método de hidrólise separada da fermentação.

### Lipídios

A ideia inicial de produção de lipídios a partir das microalgas para convertê-los em combustíveis alternativos ao petróleo foi substituída pela obtenção de ácidos graxos com algum propósito definido. Do ponto de vista comercial, os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) são geralmente importantes, mas em particular são importantes os ácidos graxos essenciais. Os ácidos graxos essenciais necessários para a nutrição animal (incluindo a nutrição humana) são linoléico, araquidônico,  $\gamma$ -linolênico e eicosapentaenóico. Com exceção do linoléico, estes ácidos graxos são raros em animais e plantas superiores, estando presente em quantidades substanciais em apenas algumas espécies de microalgas (Fernández, 1995).

A grande parte dos lipídios das microalgas são ésteres de glicerol e ácidos graxos. A composição dos lipídios pode variar por diversos fatores como a combinação entre luz, nutrientes, nitrogênio (nitratos) e temperatura. No estudo de Jiang, Yoshida *et al.* (2012) constatou-se que as deficiências de nitratos e fosfatos afetam diretamente o conteúdo deste componente.

Microalgas eucarióticas contêm uma composição diversa de lipídios e seus ácidos graxos. Estes lipídios são os principais componentes da membrana celular e, por isso, são essenciais para a função das microalgas. A limitação de nutrientes e o

estresse de metais são conhecidos por afetar o metabolismo lipídico, que incluem alterações qualitativas e quantitativas na classe lipídica, inibição de vias biossintéticas e uma redução em ácidos graxos insaturados, devido à peroxidação de metal reforçado. Sob condições de limitação de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e estresse de metais, os dados da literatura mostram que microalgas conduzem suas vias biossintéticas lipídicas para a síntese de lipídios neutros, principalmente sob a forma de triacilgliceróis. Um aumento em ácidos graxos saturados e ácidos graxos monoinsaturados, e uma diminuição em PUFA foram também obtidos pela limitação de ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e estresse de metais nas microalgas (Chia, Lombardi *et al.*, 2013).

### Pigmentos

Uma grande variedade de pigmentos fotossintéticos é encontrada em algas. Todas as espécies fotossintéticas são dotadas de clorofila *a*, pigmento mais importante para a fotossíntese e que apresenta papel central no arranjo dos fotosistemas para a captação de energia luminosa (Lourenço, 2006). A molécula de clorofila tem a capacidade única de converter energia do sol em energia química (fotossíntese). Nas células, as moléculas de clorofila estão localizadas nos cloroplastos. A clorofila é usada principalmente como agente corante, em alimentos, medicamentos e cosméticos. É usada em aplicações externas no tratamento de ferimentos e úlceras. Não há provas de que ela acelere a cicatrização de tecidos, porém sabe-se que possui ação desodorante (Miranda, 2002).

Nos cloroplastos, juntamente com a clorofila, é encontrada outra classe de pigmentos, os carotenoides. Estes são pigmentos solúveis em solvente orgânicos e dotados de coloração amarela, laranja, vermelha, marrom ou variações dessas cores. Os carotenoides são divididos em dois grupos, os carotenos, que são moléculas dotadas apenas de carbono e hidrogênio, e as xantofilas, que são moléculas com oxigênio em sua estrutura além de carbono e hidrogênio (Lourenço, 2006).

#### *2.3.4 Fatores que influem no crescimento de microalgas*

No cultivo de microalgas deve se considerar o impacto de vários fatores que influenciam o crescimento desses micro-organismos. Num sistema de cultivo pode se avaliar a importância de fatores como intensidade luminosa, nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), temperatura, pH, além de considerar a agitação do meio, o tipo de agitação, a penetração de luz no sistema e evitar a contaminação do sistema por outros micro-organismos.

### Intensidade luminosa

Um fator importante de cultivos de organismos fotoautótrofos em geral está relacionado com o aproveitamento da energia radiante durante a fotossíntese. A taxa fotossintética celular (*F*) (i. e. a capacidade de captura de fótons) é função da energia luminosa (*E*) que recebem as células. Em níveis baixos de energia



luminosa, a taxa fotossintética aumenta com a intensidade de luz, mas em níveis de energia incidente superiores a certo valor ( $E_k$ ) existem poucas variações em  $F$  (Richmond, 2000), como pode ser observado na Figura 2.3.

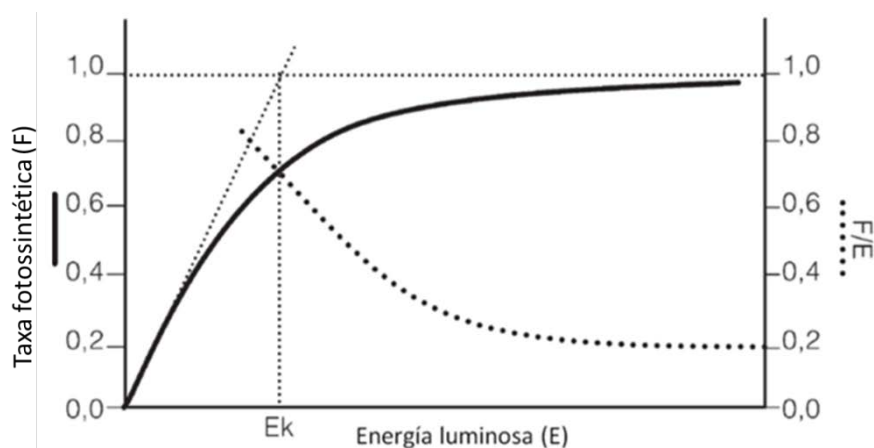


Figura 2.3. Efeito da energia luminosa (E) na taxa fotossintética (F) e a eficiência fotossintética (F/E).  $E_k$  é a constante de saturação (Richmond, 2000)

A constante específica ( $E_k$ ), característica de cada organismo, corresponde ao nível de energia luminosa em que ocorre a saturação da taxa fotossintética. A energia incidente pode chegar a níveis que causam inibição do sistema, o qual deteriora o cultivo, inclusive podendo causar dano irreversível. A relação  $F/E$  (i.e. a fração de energia luminosa incidente convertida em energia química) diminui rapidamente com o aumento de fluxo de fótons e é mínima quando a energia incidente atinge valores substancialmente maiores do que  $E_k$ .

Esse tipo de curvas dose-resposta é útil em cultivos onde as células recebem a mesma quantidade de energia luminosa, como no caso de uma capa celular fina ou em culturas de baixa densidade celular. Tal curva, por outro lado, não descreve a realidade na maioria das culturas em grande escala, em especial se o cultivo tem alta densidade celular (>3 g/L; Javanmardian e Palsson, 1991). Cultivos com alta densidade celular são capazes de usar a luz incidente com mais eficiência em comparação com cultivos convencionais diluídos. A fotoinibição (a redução da eficiência fotossintética devido ao excesso de exposição à luz por um organismo fotossintetizante) pode não estar presente em cultivos expostos a intensidades de luz altas, isto devido em grande parte à diluição da luz, pelo sombreamento, mais notável conforme aumenta a densidade celular.

### Temperatura

A temperatura constitui outro fator que influencia profundamente o crescimento microbiano, tal como acontece para todos os outros organismos. Ela influencia de forma decisiva o crescimento microbiano uma vez que interfere na velocidade das reações enzimáticas. A taxa de cada reação aumenta à medida que aumenta a temperatura, desse modo o metabolismo como um todo é mais ativo a altas temperaturas e o micro-organismo cresce mais depressa. A partir de determinados valores o crescimento acaba por ser menor, sendo que

temperaturas altas podem até mesmo ser letais. Essas temperaturas provocam a desnaturação das enzimas, dos transportadores de membrana e outras proteínas. Temperaturas muito elevadas provocam a ruptura das membranas celulares uma vez que a dupla camada lipídica se altera por ação do calor (Sinogas, Alho *et al.*, 2003/2004).

### pH

O pH constitui outro dos fatores que influenciam o crescimento microbiano. Cada espécie cresce num intervalo definido de pH e tem um pH ótimo para o seu desenvolvimento. Os micro-organismos acidófilos têm o seu ótimo de crescimento entre 0 e 5,5. Os neutrófilos entre 5,5 e 8 e os alcalófilos entre 8,5 e 11,5. Os alcalófilos extremos têm o seu ótimo de crescimento a valores de pH superiores a 10. De um modo geral, cada tipo de micro-organismos tem preferência por uma faixa característica de pH. A maioria das bactérias e protozoários é neutrófila. A maioria dos fungos prefere ambientes ligeiramente ácidos, entre pH 4 e 6. As algas também parecem preferir condições ligeiramente ácidas. Embora os micro-organismos possam crescer numa gama relativamente grande de pH, existem limites de tolerância. Variações drásticas no pH podem causar o rompimento da membrana celular, inibir a atividade enzimática ou dos transportadores membranares de proteínas (Sinogas, Alho *et al.*, 2003/2004).

#### 2.3.5 *Scenedesmus sp.*

A *Scenedesmus sp.* é uma microalga aquática, dominante em lagos de água doce e rios (Kim, Park *et al.*, 2007). Pertencem ao grupo das algas verdes do domínio *eukarya*, *Chlorophyta* da classe *Euhlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* da família *Scenedesmaceae* (Ramos, Silva *et al.*, 2007). Apresentam colônias formadas por células elipsoidais, fusiformes ou ovoides, arranjadas lado a lado. As células da extremidade podem ou não apresentar dois espinhos cada uma (Figura 2.4). 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 (D'Aquino e Schroeder, 2009). O tamanho das microalgas *Scenedesmus sp.* pode variar entre 3 a 31  $\mu\text{m}$  segundo a espécie (Godinho, González *et al.*, 2010). São pequenas e não móveis, com colônias constituídas por células alinhadas em uma placa plana. As colônias são geralmente compostas de 4-8 células (Chaichalerm, Pokethitiyook *et al.*, 2012).

A Figura 2.4 mostra diferentes espécies de *Scenedesmus*, sendo as mais conhecidas: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus acutus* e *Scenedesmus dimorphus*.

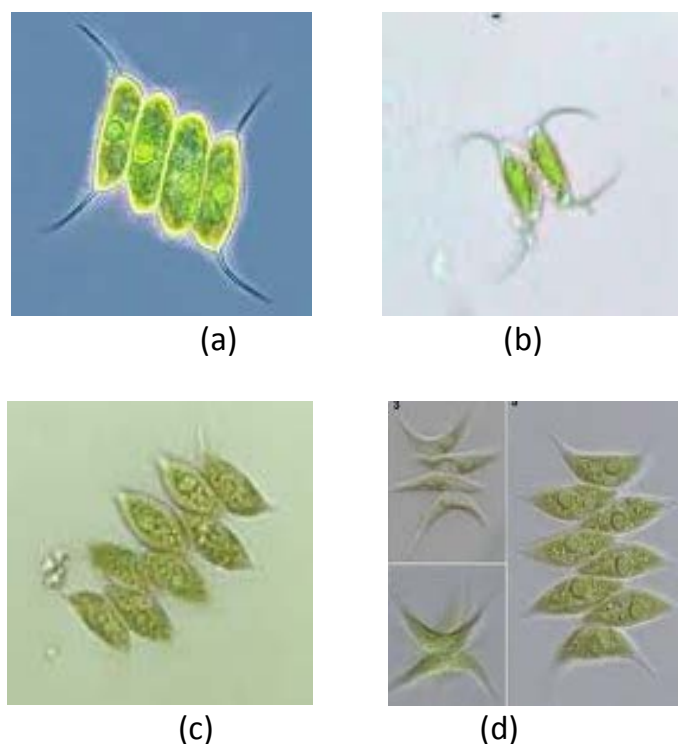


Figura 2.4. Espécies de *Scenedesmus*: (a) *S. quadricauda* (b) *S. obliquus* (c) *S. acutus* (d) *S. dimorphus*

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi uma das primeiras a serem cultivadas *in vitro* devido ao seu rápido crescimento, utilização de diferentes fontes de nitrogênio como nitrato, nitrito e amônia e capacidade de sobrevivência num vasto intervalo de temperaturas (15 a 40 °C) (Miranda, 2011). Radmann e Costa (2008) relatam que a microalga *Scenedesmus* suporta temperaturas entre 20 e 38°C, sendo ótimo de 35°C para o crescimento.

Segundo Xin, Hong-Ying *et al.* (2011) a *Scenedesmus sp.* LX1 pode crescer em uma gama extensiva de temperatura (10 a 30 °C), sendo 20 °C o valor ótimo para produzir biomassa microalgal e lipídios. Em cultivos com temperatura relativamente baixa ( $\leq 25$  °C) os ácidos graxos de *Scenedesmus sp.* LX1 foram principalmente compostos de ácidos graxos poliinsaturados. Em cultivos de alta temperatura (30 °C) os ácidos graxos estão principalmente compostos de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. O perfil de ácidos graxos de *Scenedesmus sp.* LX1 sob diferentes temperaturas faz as células microalgais (estruturas da célula que contém lipídios) adaptáveis à temperatura.

#### Uso da *Scenedesmus sp.*

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 (Miranda, 2011). 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 (Miranda, 2011). A Tabela

2.4 mostra uma comparação da composição química de alimentos humanos e de diferentes microalgas.

Tabela 2.4: Composição química de alguns alimentos humanos e diferentes microalgas.  
(Becker, 1993)

<b>Produto</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Carboidratos</b>	<b>Lípidios</b>
Fermento	39	38	1
Ovo	47	4	41
Leite	26	38	28
Carne desossada	43	1	34
Soja	37	30	20
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50 – 56	10 – 17	12 – 14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1- 9
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8 – 18	21 – 52	16 – 40
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina platensis</i>	46 – 63	8 – 14	4 – 9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
<i>Anabaena cylindrica</i>	43 – 56	25 – 30	4 – 7

Segundo dados da Tabela 2.4 pode-se observar que a *Scenedesmus sp.* apresenta até 40% de conteúdo lipídico, 56% em proteínas e 52% em carboidratos.

Recentemente, os biocombustíveis líquidos receberam ampla atenção porque são feitos de recursos não tóxicos, biodegradáveis e renováveis, e o uso pode conduzir a uma diminuição na emissão de poluentes no ar. Os biocombustíveis líquidos mais comuns são o biodiesel e bioetanol que são principalmente produzidos a partir de cultivos alimentares (por exemplo, colza, soja e cana-de-açúcar). Porém, ao se produzir elevada quantidade de biocombustíveis líquidos proveniente destas fontes a fim de satisfazer a demanda existente, pode-se gerar um impacto sério na provisão de comida, florestas tropicais, ou terra cultivável, e assim há uma necessidade urgente para achar novos recursos. Hoje, muitas pesquisas são orientadas às microalgas, pois estas apresentam várias características favoráveis como alta produtividade de biocombustível, o alto crescimento celular e tolerância a mudanças de estação. Além disso, elas têm alta eficiência fotossintética para fixar CO<sub>2</sub> e podem acumular quantidades efetivamente grandes de lipídios (para biodiesel) e carboidratos (para bioetanol), junto com outros produtos valiosos (Ho, Chen *et al.*, 2012).

Estudos feitos por Ho, Chen *et al.* (2010) mostram que a *Scenedesmus obliquus* é um candidato em potencial para a mitigação das emissões de CO<sub>2</sub> e a produção de biodiesel. Análises realizadas no referido artigo mostram que as principais composições de ácidos graxos de *Scenedesmus Obliquus* CNW-N cultivadas em

meio enriquecido em nutrientes com 10% CO<sub>2</sub> foram de 15 – 16% de ácido palmítico (C16:0), 2 – 3% de ácido palmitoleico (C16:1), 17 – 18% de ácido serático (C18:0), 15 – 16% de ácido oléico (C18:1), 13 – 14% de ácido linoléico (C18:2), 3 – 4% de ácido linolênico (C18:3) e vários componentes menores de ácidos graxos com um número menor de carbonos que C<sub>16</sub> e maiores que C<sub>18</sub> (ver Tabela 2.5). Porém, aproximadamente 25% de ácidos graxos totais não puderam ser identificados claramente (denotado como “outros”). Não obstante, grupos do C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub> responderam por aproximadamente 65–70% dos ácidos graxos totais. Então, o lipídio produzido de *S. obliquus* CNW-N é satisfatório para produzir biodiesel se o conteúdo de lipídio e produtividade puder ser melhorado a um nível satisfatório.

Tabela 2.5: Perfil de ácidos graxos de *Scenedesmus obliquus* cultivadas em meio rico em nutrientes com alimentação de 10% de CO<sub>2</sub>  
(Ho, Chen *et al.*, 2010)

<b>Tipo de ácidos graxos</b>	<b>% de ácidos graxos totais</b>
Ácido palmítico	15,06
Ácido palmitoleico	2,30
Ácido serático	17,16
Ácido oléico	15,55
Ácido linoléico	13,39
Ácido linolênico	3,97
Ácido laurico	0,99
Ácido tridecanoico	1,43
Ácido mirístico	0,91
Ácido Miristoleico	0,36
Ácido heptadecanoico	2,36
Ácido cis-10-heptadecanoico	0,37
Ácido cis-11-eicosenoico	0,75
Ácido behênico	0,33
Outros	25,07

A Figura 2.5 mostra que os componentes principais de biodiesel, grupos de ácidos graxos de C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub>, ocupou até 86% do total de ácidos graxos quando cultivado em meio deficiente em nutrientes. Este conteúdo de C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub> é notadamente mais alto que isso obtido em condições de cultivo em meio rico em nutrientes (67%) e deficiente em nitrogênio (78%).

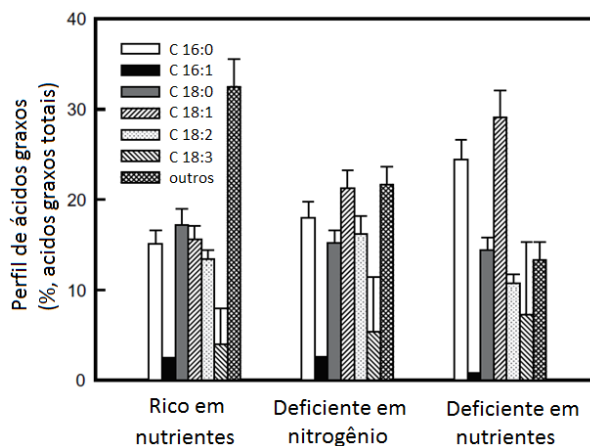


Figura 2.5. Perfis de ácidos graxos C<sub>16</sub>/C<sub>18</sub> de *S. obliquus* CNW-N cultivada em três condições de meio: rico em nutrientes, deficiente em nitrogênio e deficiente em nutrientes. “Outros” indica a soma de ácidos graxos diferentes dos grupos C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub>

(Adaptado de: Ho, Chen *et al.*, 2010).

Segundo estudo feito por Takeda (1996), os componentes de açúcar das paredes rígidas de espécies de *Scenedesmus* são glicose (principalmente), galactose e manose. Na parede de *S. acutiformis*, *S. falcatus*, *S. obliquus* e *S. wisconsinensis*, manose foi o açúcar principal; em *S. acuminatus*, *S. armatus* e *S. producto-capitatus*, glicose foi dominante. Uma proporção mais alta de galactose foi descoberta dentro de *S. subcapitatus*.

Por ser também um micro-organismo que sintetiza açúcares, considera-se a microalga *Scenedesmus obliquus* como uma espécie apropriada para estudar a produção de bioetanol como descrito por Miranda (2011). O crescimento da microalga em fotobiorreatores, sob diferentes condições de iluminação, mostrou que a produção de biomassa é mais eficiente com um ciclo dia/noite, tendo-se atingido concentrações de 0,68 g/L em biomassa no fotobiorreator de coluna de bolhas e 0,40 g/L na lagoa fotossintética. Extraíram-se açúcares na ordem de 30% (m/m). Foi detectada nos extratos de microalga a presença de galactose, xilose, arabinose, manose e glicose, sendo esta última o composto dominante cuja concentração corresponde a cerca de 60 - 65 % do total. Com os resultados obtidos, a produção de etanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou uma produtividade de 288 L/ha.

### 2.3.6 Medidas de crescimento de microalgas

Microalgas podem crescer rapidamente em cultivo e, à medida que se desenvolvem, diversos processos metabólicos ocorrem e podem acarretar alterações nas propriedades químicas das microalgas ou mesmo em suas características morfológicas. Para avaliar o desenvolvimento de microalgas é essencial que o crescimento das populações seja acompanhado para determinar o momento ótimo para colheita e utilização da biomassa formada (Lourenço, 2006).

### Contagem direta por microscopia

Realiza-se a contagem do número de células presentes em determinada unidade de volume. Para microalgas, um microscópio óptico completo é essencial para proceder à contagem. A densidade de indivíduos é expressa em números de células por mililitro de cultivo.

Este método consiste no uso de um hemocítmetro. Por mais controlada que seja a manipulação dos materiais envolvidos a contagem de células envolve algumas fontes de erros inevitáveis. Uma delas é o próprio número de células contadas, que pode ser reduzida substancialmente quanto mais indivíduos são contados (Lourenço, 2006).

### Fluorescência

Sensores de fluorescência são instrumentos que utilizam cabos de fibras óticas para conduzir feixes de luz do equipamento até ao meio reacional e vice-versa, interfaceados através do vidro de escotilhas de reatores. Assim sendo, trata-se de um método de medida não-invasivo e em tempo real (Scheper, Hitzmann *et al.*, 1999; Hantelmann, Kollecker *et al.*, 2006).

A espectroscopia de fluorescência, também conhecida como espectrofluorometria, analisa a fluorescência de uma amostra como resultado de um processo emissão/re-emissão de luz de baixa energia, normalmente luz no comprimento do ultravioleta. O princípio dos espectrofluorômetros se baseia na re-emissão de luz com mudança espectral, que algumas espécies químicas sofrem. A luz re-emitida é proporcional a concentração de espécies químicas do meio analisado e possui comprimento de onda igual ou superior ao de emissão, caracterizando a geração de um espectro diagonal inferior (Hitzmann, Pekeler *et al.*, 1998; Solle, Geissler *et al.*, 2003).

### Densidade ótica

O uso de densidade ótica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física da luz pelas células. Quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz (absorbância) e menor será a passagem de luz pela amostra (transmitância). Utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições. Uma vez que microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, convém selecionar comprimentos de onda que não correspondam ao pico de absorção máxima de luz pelos pigmentos, por exemplo 570 nm, que se situa numa faixa distante da absorção máxima de luz pelas clorofilas (no caso da clorofila *a* os picos de absorção de luz são 430 e 664 nm, enquanto no caso da clorofila *b* são 435 e 645 nm). Assim, a absorbância registrada será pouco influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, sendo atribuída, fundamentalmente, à obstrução física da passagem de luz pelas células em suspensão. Embora seja uma alternativa prática acompanhar o desenvolvimento de células em cultura, é necessário

estabelecer correlações entre contagens de células e medidas de absorvância para cada espécie testada (Lourenço, 2006).

### Peso seco

Pode-se avaliar o desenvolvimento de microalgas em cultura por meio da determinação de sua massa em peso seco. Normalmente, as pesagens com material seco são mais adequadas (Lourenço, 2006), consistindo basicamente em recolher uma alíquota do cultivo, concentrar por filtração, secar numa estufa e depois pesar e determinar a diferença de pesos.

## **2.4 Microalgas para o tratamento de vinhaça**

Como já mencionado no presente capítulo, as microalgas são usadas para diferentes objetivos. Durante vários anos, têm-se feito várias pesquisas para determinar as condições ótimas para o crescimento de espécies específicas de microalgas em meio sintético (Xin, Hong-Ying *et al.*, 2011; Ho, Chen *et al.*, 2012).

A vinhaça pode ser usada como substrato para o crescimento das microalgas devido à elevada carga de nutrientes e à grande quantidade gerada durante a produção de álcool. O dióxido de carbono, oriundo da fermentação, poderia complementar a produção das microalgas, que têm a capacidade de absorver esse gás, favorecendo assim o seu crescimento. Sendo assim, a reutilização da vinhaça e o CO<sub>2</sub>, subprodutos da geração de açúcar e álcool, representa uma solução teóricamente viável.

O número de trabalhos na literatura que avaliam o uso de vinhaça é bastante restrito. O trabalho feito por Barrocal (2010) mostra que a adição de vinhaça apresenta um efeito positivo sobre o crescimento das microalgas como fonte alternativa de nutrientes. O uso de vinhaça como fonte de nutrientes pode gerar um alto valor por produtos, como proteína, e contribuir à resolução do problema de lidar com subprodutos de destilarias. Em reações em batelada, foi mostrado que o meio de cultivo constituído de vinhaça diluída alcalina pode substituir o meio sintético, provendo os nutrientes requeridos. Em reações contínuas, foi usada com sucesso a vinhaça junto com meio sintético. Em estudos adicionais, a operação com vinhaça diluída alcalina em fotobiorreactor contínuo deve ser analisada, sendo necessário otimizar as condições operacionais para aumentar a produtividade de microalga.



## Capítulo 3 – Materiais e métodos

Antes de apresentar os resultados deste trabalho, é importante conhecer os materiais, os métodos analíticos e estatísticos e o equipamento que foram utilizados.

### 3.1 Seleção e identificação de microalga

Para o cultivo de microalgas foi usado o meio Guillard Modificado (detalhado na seção 3.4). Inicialmente, a seleção foi feita em meio líquido por diluições sucessivas (Ver Figura 3.1a) através de várias repicagens até separar a *Scenedesmus sp.* de outros microorganismos presentes. Posteriormente foi usado o método de repicagem por meio sólido (Ver Figura 3.1b) utilizando Agar-Agar com 1% em volume de meio Guillard em placas Petri em condições de 25°C e 4800 lux.

Para a manutenção das microalgas utilizaram-se cultivos que foram repicados na fase exponencial de crescimento, sendo necessário obter inicialmente a curva de crescimento desta microalga. Os inóculos foram mantidos numa incubadora com controlador de temperatura a 25°C, controlador de fotoperíodo de 12h/12h e 3910 lux (intensidade que varia segundo a posição dos recipientes dentro da incubadora).

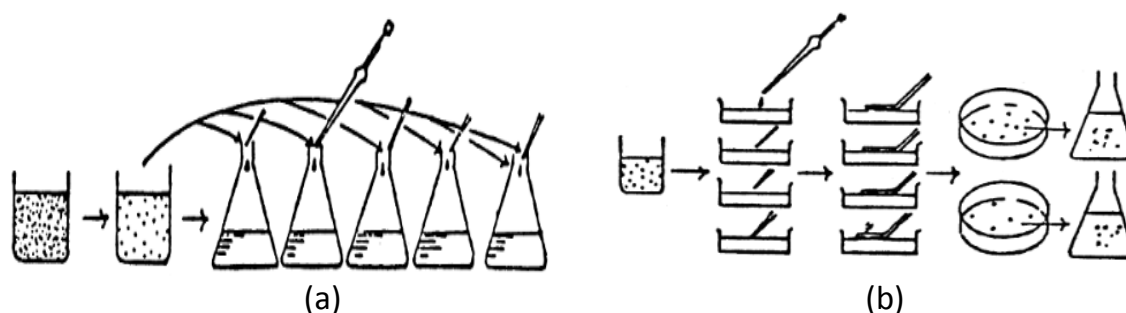


Figura 3.1. Etapas de separação e purificação de microalgas (a) Método de diluição sucessiva e subcultivos repetidos (b) Método em meio sólido (Fa, 1989)

### 3.2 Preparação de inóculo

Para o preparo do inóculo usado em cada experimento, utilizou-se a *Scenedesmus sp.* em meio Guillard Modificado. Após a esterilização (realizada em autoclave a 121°C por 30 minutos) de um erlenmeyer com capacidade de 6 litros, iniciou-se a inoculação com 3 litros de cultura a 25°C, 6200 lux, fotoperíodo de 12h/12h e alimentação de ar filtrado com fluxo de 0,25 v.v.m. (volume de ar por volume de líquido por minuto, equivalente a vazão de ar de 750 ml/min).

### 3.3 Material de laboratório

Todo o material de vidro utilizado para o cultivo da *Scenedesmus sp.* foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. As repicagens foram realizadas numa capela de gases de fluxo laminar. Os fotobiorreatores, por serem de acrílico, não podem ser autoclavados, mas foi feita a assepsia usando hipoclorito de sódio, com a adição de 1 mL de hipoclorito por litro de água. Após uma hora, foi adicionado 1 mL, por litro de água, de uma solução de 50 g/L de tiosulfato de sódio, com a finalidade de neutralizar o cloro residual.

### 3.4 Meio de cultivo

O meio Guillard Modificado, cuja composição pode ser vista na Tabela 3.1, foi usado para o crescimento de cultivo puro da *Scenedesmus sp.* Embora o meio Guillard tenha vitaminas na composição original (Stein, 1979), elas não foram adicionadas no meio modificado que foi usado no cultivo porque experimentos anteriores mostraram que essa adição causava inibição no crescimento das microalgas.

Tabela 3.1: Composição do meio Guillard Modificado  
(Stein, 1979)

<b>Macronutrientes</b>	<b>g/L</b>
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	36,76
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	36,97
NaHCO <sub>3</sub>	12,6
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,71
NaNO <sub>3</sub>	85,01
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> *9 H <sub>2</sub> O	28,42
<b>Micronutrientes</b>	<b>g/L</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	4,36
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O	3,15
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,01
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,022
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,01
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	0,18
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,006

A partir das soluções preparadas de macronutrientes e micronutrientes, segundo a Tabela 3.1, foram usadas diferentes doses nos meios de cultivo nos experimentos.

### **3.5 Medida de biomassa produzida**

Para conhecer a biomassa produzida foram usados os seguintes métodos: peso seco, densidade ótica e fluorescência. A espectrofotometria e a espectroscopia de fluorescência são métodos que foram selecionados para realizar o seguimento da quantidade de biomassa produzida diariamente nos fotobiorreatores. A relação peso seco e densidade ótica foi obtida a partir de dados de peso seco e medida de absorvância em triplicata em fotobiorreatores *air-lift*. Também foram realizadas diariamente medidas de fluorescência em duplicata em fotobiorreatores *air-lift* as quais foram comparadas com os valores de peso seco correspondente.

Nos experimentos posteriores utilizou-se o método de peso seco para todos os fotobiorreatores ao final de cada batelada.

#### *3.5.1 Densidade ótica*

A lei de Beer- Lambert estipula que a absorvância é diretamente proporcional à concentração de espécies absorventes. A absorvância também é chamada de densidade ótica (DO) (Harris, 2005). Comparando os dados de absorvância com os dados de peso seco é possível criar uma reta de calibração que permita a conversão dos valores de absorvância em concentração de microalgas. Desta forma, a concentração de microalgas foi determinada pela medida de absorvância no comprimento de onda de 570 nm (como explicado na seção 2.3.6, este comprimento de onda situa-se numa faixa distante da absorção máxima de luz pela clorofila). As leituras de absorvância foram realizadas em Espectrofotômetro UV-1600 Pró-Análise. A absorvância deve ficar entre 0,1 a 1, desta forma, foi necessário diluir as amostras que apresentavam valores de absorvância maiores que 1.

#### *3.5.2 Espectroscopia de Fluorescência*

As leituras de fluorescência foram realizadas em espectrofluorômetro FluoroMax-4 Horiba. Os parâmetros ajustados foram os seguintes: comprimento de onda de excitação entre 220 e 800 nm e emissão entre 285 nm e 850 nm (com incremento de 5 nm).

#### *3.5.3 Peso seco*

Para a determinação de peso seco, foram filtrados volumes determinados de amostras de cultivo de cada fotobiorreator usando filtros de 0,7  $\mu\text{m}$  previamente pesados. Esses filtros foram levados à estufa para secagem por 24 h a uma temperatura de 100 °C. Após a secagem, foram levados ao dessecador e, uma vez acondicionados, foram pesados novamente.

### 3.6 Fotobiorreatores

Os reatores usados neste projeto são os fotobiorreatores *air-lift*, feitos de acrílico com dimensões de 35 cm de altura, 17 cm de largura e 6 cm de profundidade (detalhado na Figura 3.2) com uma placa central de 27cm x 17 cm. O volume de cultivo é aproximadamente de 3 litros.

A planta usada para realizar os experimentos tem capacidade para a instalação de doze fotobiorreatores. A planta permite controlar variáveis como: vazão de corrente de aeração e CO<sub>2</sub>, intensidade luminosa, controle de três valores de temperatura diferentes e fotoperíodo (uma descrição mais detalhada da planta pode ser obtida no trabalho de Gris, 2011).

Para a aeração foram utilizados compressores de ar, sendo que a taxa de alimentação em cada fotobiorreator foi setada por rotâmetros. O ar que entra em cada fotobiorreator passa por duas pedras porosas situadas na parte inferior.

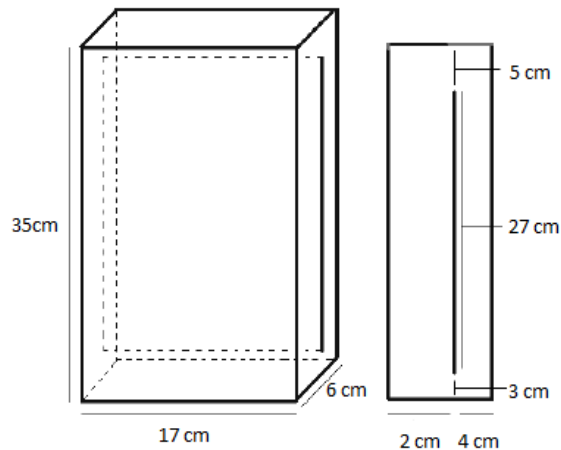


Figura 3.2. Fotobiorreator *air-lift* a) vista frontal, b) vista lateral (Gris, 2011)

As medidas de intensidade luminosa foram realizadas na superfície de cada fotobiorreator usando um luxímetro. A temperatura dos fluidos do sistema de refrigeração foi controlada por controladores digitais de temperatura Fullgauge TIC-17RGTi. A troca térmica dentro de cada fotobiorreator ocorre através de uma corrente de água que circula em tubos de aço inox 316 de ¼.

Para evitar a perda de meio de cultivo por evaporação foi adicionado um balão, na tampa do fotobiorreator, que permite a condensação do líquido evaporado. O orifício de coleta de amostras é coberto com tampas de silicone para evitar evaporação (ver Figura 3.3).

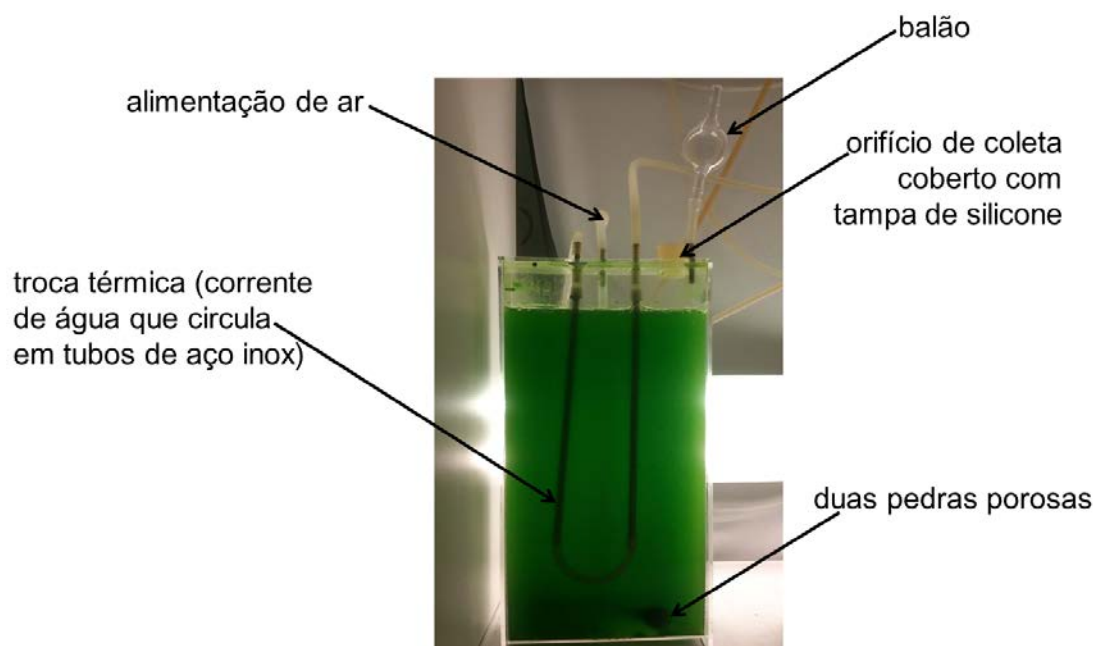


Figura 3.3. Acessórios do fotobiorreator *air-lift*

### 3.7 Planejamento experimental

É preciso planejar um procedimento experimental para avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas num processo. O uso de planejamento experimental em muitos casos reduz ensaios, custos e melhora a qualidade de informações. A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar e do conhecimento inicial que se tem sobre o processo (Rodrigues e lemma, 2009). Dessa forma, o primeiro planejamento foi um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 1) para avaliar o crescimento de microalgas em meio de cultivo Guillard Modificado. Depois de confirmar que é possível cultivar microalgas em vinhaça foram realizados dois planejamentos experimentais usando vinhaça no meio de cultivo Guillard Modificado: um Planejamento Fatorial e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2).

#### 3.7.1 DCCR 1: Fatores que influenciam o cultivo de *Scenedesmus sp.*

Inicialmente, as variáveis de interesse analisadas foram: temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes, avaliadas para a determinação das condições que levem ao ponto ótimo de produção de biomassa de *Scenedesmus sp.*, além de conhecer quais variáveis poderiam ser significativas. É importante mencionar que os primeiros experimentos foram realizados sem a suplementação de vinhaça.

Com este fim, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) cujos níveis são apresentados na Tabela 3.2. Este planejamento foi realizado com fotoperíodos de 12h/12h (12 horas luz e 12 horas escuro) e 0,25 v.v.m.

Tabela 3.2: Valores utilizados no DCCR 1 para cultivo de *Scenedesmus sp.*

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura [°C]	x <sub>1</sub>	15	19,1	25,0	31,0	35
Nutrientes [mL/L]	x <sub>2</sub>	10	16,1	25,0	33,9	40
Intensidade luminosa [Lux]	x <sub>3</sub>	2400	3940,5	6200	8459,5	10000

Considerando a análise de três variáveis e o uso de duas bateladas, devido à capacidade da planta de biorreatores, foram realizados 19 experimentos ( $2^3 + 6$  pontos axiais + 3 repetições no ponto central na primeira batela + 2 repetições no ponto central na segunda batelada). Os valores codificados do planejamento DCCR estão descritos na Tabela 3.3 (Os valores experimentais do DCCR 1 estão apresentados na Tabela III.5 no apêndice III).

Tabela 3.3: Valores codificados do DCCR para três fatores

Experimentos	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0

### 3.7.2 Determinação de crescimento de microalga em vinhaça

Os experimentos foram realizados utilizando vinhaça fornecida pela empresa COOPERCANA - Cooperativa dos Produtores de Cana Porto Xavier Ltda localizada em Porto Xavier, Rio Grande do Sul.

Devido às características inerentes à vinhaça, foi necessário avaliar o crescimento da *Scenedesmus sp.* em sua presença. O pH ácido da vinhaça pode ser prejudicial ao crescimento algal, pois este tipo de microorganismo cresce melhor em pH neutro. Outra característica indesejável é a presença de sólidos suspensos: isto otorga uma cor escura no meio, de maneira a bloquear a transferência de luz necessária para a microalga realizar fotossíntese. Por esses motivos foi preciso variar as porcentagens da concentração de vinhaça a ser adicionada ao meio de cultivo, e assim, considerou-se razoável avaliar o cultivo com até 50% de vinhaça.

Foram instalados 15 erlenmeyers com capacidade de 250 mL usando uma incubadora shaker refrigerada modelo CT-712RN que possui agitação orbital e temperatura controlada. A agitação foi de 125 RPM, temperatura de 27,5°C e intensidade luminosa de 6200 lux (dados do ponto central obtidos do planejamento experimental que será apresentado e justificado na seção 3.7.3). Os erlenmeyers foram instalados em triplicata com proporções de 0%, 12,5%, 25%, 37,5% e 50% de vinhaça e o restante com meio Guillard Modificado. A Tabela 3.4 apresenta as quantidades fornecidas de meio Guillard Modificado e a quantidade de vinhaça adicionada. Em todos os casos foram adicionados 20 mL de inóculo.

Tabela 3.4: Porcentagens de vinhaça adicionada ao meio de cultivo de microalgas

Proporção [%]	Vinhaça [%]	Meio Guillard Modificado [%]
0	0	100
12,5	12,5	87,5
25	25	75
37,5	37,5	62,5
50	50	50

### 3.7.3 Fatores que influenciam o cultivo usando vinhaça

#### Planejamento fatorial

Neste caso foi considerado como primeira tentativa a avaliação usando planejamento fatorial. Este método foi usado porque permite o uso de menor número de reatores e tempo a ser usado para esta avaliação que tem por finalidade conhecer os limites de concentração de vinhaça para o crescimento de microalgas. Além disso, permite saber se pode ser necessário mudar a faixa de estudo de cada variável.

Na Tabela 3.5, apresenta-se os níveis e variáveis que foram avaliados. Neste caso as variáveis a considerar foram temperatura, intensidade luminosa e a porcentagem de vinhaça que poderia ser adicionada ao meio de cultivo.

Tabela 3.5: Valores utilizados no planejamento fatorial com vinhaça

Variáveis	Código	-1	0	1
Temperatura [°C]	$x_1$	20	27,5	35
Vinhaça [%]	$x_2$	0	25	50
Intensidade luminosa [Lux]	$x_3$	2400	6200	10000

A nova matriz de níveis para realizar o planejamento fatorial pode ser vista na Tabela 3.6, e os valores experimentais na Tabela III.6 do Apêndice III.

Tabela 3.6: Matriz de níveis e valores de planejamento fatorial com vinhaça

Experimentos	Níveis		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

O ponto central de este planejamento é a 27,5°C com 25% de vinhaça e a 6200 lux. Esses dados foram usados para os experimentos com vinhaça e o acondicionamento de futuros inóculos.

### Planejamento DCCR 2

No segundo planejamento experimental, para cultivo usando vinhaça, as variáveis de interesse são temperatura, porcentagem de vinhaça e intensidade luminosa. Neste caso foi usado o DCCR mudando a faixa de porcentagem de vinhaça a ser utilizada (entre 0 e 40% de vinhaça). Os ensaios experimentais seguirão os mesmos valores codificados na Tabela 3.3. Os níveis a utilizar estão apresentados na Tabela 3.7.



Tabela 3.7: Níveis utilizados no DCCR 2 para cultivo com vinhaça

Variáveis	Código	-1,68	-1	0	1	1,68
Temperatura [°C]	x1	20	23	27,5	32	35
Vinhaça [%]	x2	0	8,1	20	31,9	40
Intensidade Luminosa [Lux]	x3	2400	3940,5	6200	8459,5	10000

Os valores experimentais utilizados no DCCR 2 estão definidos na Tabela III.7 no Apêndice III. Neste caso também foram realizados 19 ensaios em fotoperíodo 12h/12h e vazão de ar de 0,25 v.v.m.

### 3.8 Análise de vinhaça pura

Com a finalidade de conhecer o conteúdo de nutrientes presentes na vinhaça foram necessárias análises de laboratório realizadas pelo Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais – LAPAM da Universidade de Caxias do Sul UCS. Os resultados estão anexados no Apêndice I.

### 3.9 Análise de vinhaça tratada com microalgas

Para complementar o presente trabalho foram instalados três fotobiorreatores *air-lift*, nas melhores condições segundo os resultados obtidos no DCCR 2, com proporções de 8,1%, 20% e 31,9% de vinhaça no meio de cultivo. Depois de 10 dias de cultivo o conteúdo foi filtrado e o líquido obtido da filtração de cada fotobiorreator foi enviado ao laboratório. Foram realizadas as análises de: Nitrogênio total, Fósforo total e DBO no mesmo laboratório onde foi feita a análise de vinhaça (resultados anexados no Apêndice II).



## Capítulo 4 – Resultados

O presente capítulo é segmentado como segue. Inicialmente, na seção 4.1, foi determinada a curva de crescimento da *Scenedesmus sp.* em meio Guillard Modificado. Em seguida, na seção 4.2, foi feito um planejamento experimental para avaliar as variáveis que influenciam no crescimento da referida microalga e a determinação das melhores condições de produção de biomassa, sem suplementação de vinhaça. Posteriormente, na seção 4.3, foi avaliado o crescimento das microalgas em meio suplementado com vinhaça e finalmente se avaliaram as variáveis que mais afetam na produção de biomassa, bem como as melhores condições de crescimento em vinhaça. Na seção 4.4 será apresentado o impacto do cultivo sobre as principais variáveis da vinhaça: DBO, nitrogênio e fósforo. Por fim, na seção 4.5, serão avaliados os métodos para medição de biomassa, como alternativa à determinação de peso seco, através do uso de espectrofotometria e espectroscopia de fluorescência.

### 4.1 Curva de crescimento

Primeiramente, nesta seção vai ser avaliado o crescimento das microalgas durante o tempo de cultivo. Foi determinado o tempo em que as microalgas conseguem chegar ao ponto máximo de crescimento, o que possibilita determinar o tempo oportuno de repicagem.

Para construir a curva de crescimento da microalga foi medida a absorbância diariamente durante 16 dias em dois fotobiorreatores instalados nas mesmas condições de 25°C, 6200 lux fotoperíodo 12h/12 h e alimentação de ar de 0,25 v.v.m. Na Figura 4.1. verifica-se que o fim da fase logarítmica ocorre aproximadamente no 10º dia (tempo determinado segundo análise no anexo III. 2). A maior produção de biomassa foi de 1,94 g/L, no segundo fotobiorreator, no último dia. (ver Figura 4.2).

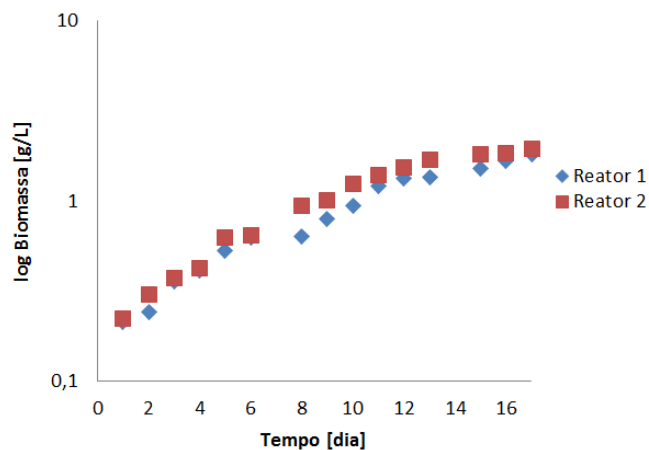


Figura 4.1. Curva logarítmica de crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em fotobiorreator *air-lift*

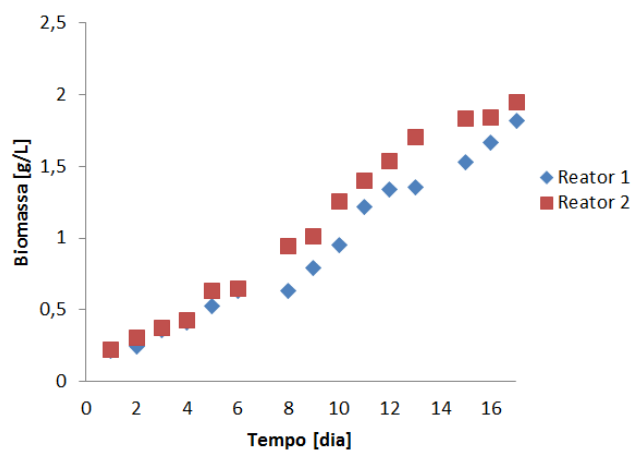


Figura 4.2. Curva de crescimento de *Scenedesmus sp.* cultivada em fotobiorreator *air-lift*

## 4.2 Avaliação do crescimento de microalgas no meio Guillard Modificado sem suplementação de vinhaça

Esta seção apresenta os resultados da avaliação dos fatores que influem no crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada no meio Guillard Modificado. Para isto foi necessário realizar um planejamento experimental através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), nas condições especificadas na Tabela 3.2.

### 4.2.1 DCCR 1: avaliação de fatores que influenciam no crescimento

O primeiro planejamento considerou como fatores a serem estudados a temperatura, dose de nutrientes e a intensidade luminosa, avaliando o efeito na produção de biomassa. O peso seco de cada fotobiorreator foi determinado no último dia de cultivo. A Figura 4.3 ilustra a planta durante esses cultivos.

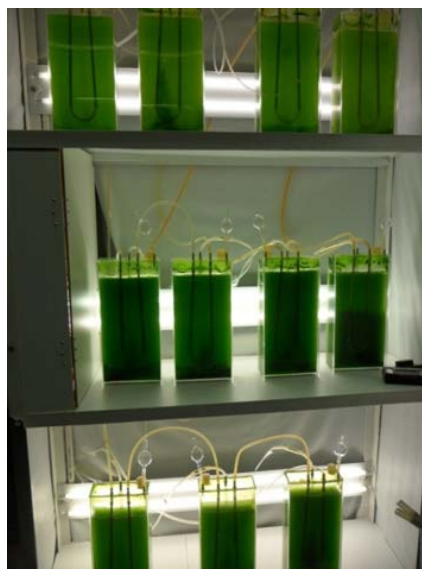


Figura 4.3. Batelada de fotobiorreatores *air-lift* com diferentes condições de cultivo de microalgas

Os dados de biomassa foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) em um intervalo de confiança de 95%, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.1. Os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com a letra Q. Os termos em negrito denotam os termos significativos.

Tabela 4.1: Análise de variância - DCCR 1

Fatores	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
<b>Modelo completo</b>					
Blocos	0,274794	1	0,274794	6,84881	0,079204
<b>(1)Temperatura (°C)(L)</b>	<b>0,702746</b>	<b>1</b>	<b>0,702746</b>	<b>17,51484</b>	<b>0,024865</b>
Temperatura (°C)(Q)	0,000003	1	0,000003	0,00008	0,993337
<b>(2)Nutrientes [mL](L)</b>	<b>2,103068</b>	<b>1</b>	<b>2,103068</b>	<b>52,41569</b>	<b>0,005435</b>
Nutrientes [mL](Q)	0,002042	1	0,002042	0,05089	0,836023
<b>(3)Intensidade luminosa [lux](L)</b>	<b>3,616520</b>	<b>1</b>	<b>3,616520</b>	<b>90,13612</b>	<b>0,002478</b>
Intensidade luminosa [lux](Q)	0,047939	1	0,047939	1,19482	0,354277
1L e 2L	0,068191	1	0,068191	1,69956	0,283365
1L e 3L	0,064980	1	0,064980	1,61953	0,292833
2L e 3L	0,234544	1	0,234544	5,84564	0,094357
Falta de ajuste	0,564384	5	0,112877	2,81328	0,211919
Error Puro	0,120369	3	0,040123		
Total SS	7,797239	18			$R^2=91,218\%$
<b>Modelo reduzido</b>					
Falta de ajuste	0,987235	11	0,089749	2,23684	0,275705
Error Puro	0,120369	3	0,040123		
Total SS	7,797239	18			$R^2=85,795\%$

Como mostrado na Tabela 4.1, os fatores são considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Através da análise de variância dos dados obtidos nas diferentes condições, nos intervalos estabelecidos na Tabela 3.2 e a matriz codificada da Tabela 3.3, verificou-se que a intensidade luminosa foi a variável mais significativa ( $p < 0,003$ ), depois os nutrientes ( $p < 0,005$ ) e a temperatura ( $p < 0,025$ ), mostrando

que essas variáveis independentemente têm efeitos que influenciam na produção de biomassa. Entretanto as interações não foram significativas ( $p > 0,05$ ). Além disso, a variância associada aos blocos e a falta de ajuste não se mostram significativas.

Para verificar que o modelo representa bem os dados experimentais, foi aplicado o teste F (para verificar a significância do modelo frente ao erro). O F calculado (8,31) para o modelo completo (modelo que considera todos os fatores) foi superior ao tabelado (3,35) e para o modelo reduzido (modelo que considera só fatores significativos) o F calculado (21,139) foi sete vezes superior ao tabelado (3,11), logo se verifica que tanto o modelo completo como o reduzido se mostraram representativos. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados experimentais. Segundo o teste, os dados experimentais seguem uma distribuição normal quando o coeficiente W é maior que 0,05 (De Sá, 2003). O  $W = 0,96$  (maior a 0,05) demonstra a distribuição normal dos dados.

Na Figura 4.4 tem-se o diagrama de Pareto que permite visualizar os fatores, segundo sua importância, ordenados de maneira decrescente começando pelos mais significativos, ilustrando os dados da tabela ANOVA. É possível ver que as variáveis (temperatura, dose de nutrientes e intensidade luminosa) são significativas e influenciam na produção de biomassa.

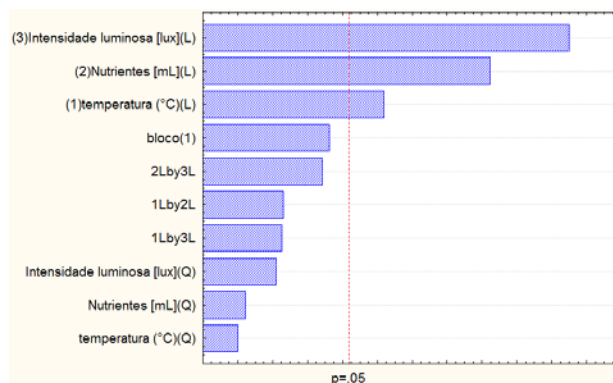


Figura 4.4. Diagrama de Pareto – DCCR 1

Considerando apenas os efeitos significativos o  $R^2$  é igual a 85,8% e o modelo reduzido para as variáveis codificadas, que representa a biomassa em g/L em função da temperatura ( $x_1$ ), nutrientes ( $x_2$ ) e intensidade luminosa ( $x_3$ ) na faixa estudada, tem a forma:

$$\text{Biomassa [g/L]} = 1,758 + 0,227 x_1 + 0,392 x_2 + 0,5146 x_3 \quad (1)$$

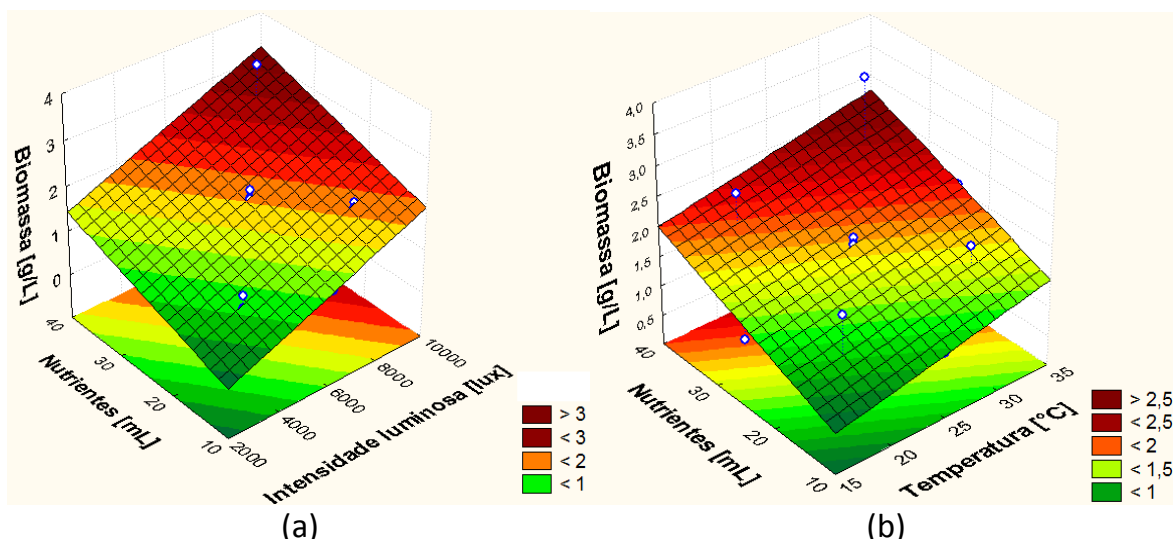


Figura 4.5. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de *Scenedesmus sp.* – DCCR 1 (a) nutrientes – intensidade luminosa – biomassa (b) nutrientes – temperatura – biomassa

A superfície de resposta da Figura 4.5 baseada no modelo da equação (1) apresenta o comportamento linear da intensidade luminosa, da temperatura e dos nutrientes que à medida que aumentam afetam de maneira positiva na produção da biomassa. Por outro lado, observa-se que o ponto máximo de biomassa produzida foi de 3,6 g/L em condições de 33,9 mL de nutrientes por litro de cultivo, 30,9 °C e 8459 lux.

Para a superfície de resposta da Figura 4.6 vê-se o efeito notável das variáveis nos extremos máximos das faixas estabelecidas neste planejamento (mencionados na Tabela 3.2).

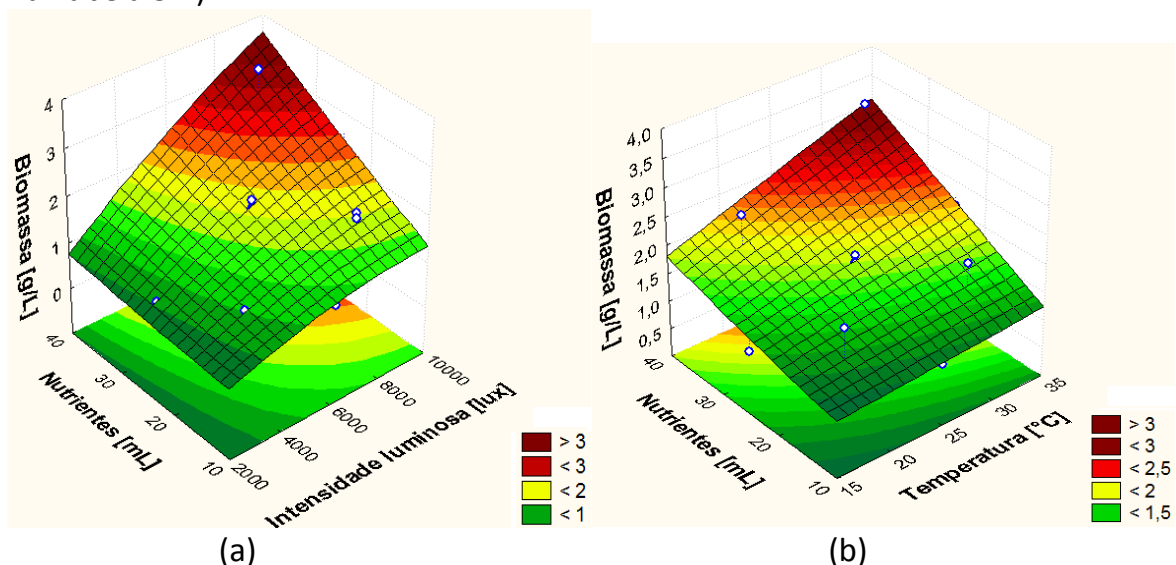


Figura 4.6. Superfície de resposta para o modelo completo de produção de *Scenedesmus sp.* – DCCR 1 (a) nutrientes – intensidade luminosa – biomassa (b) nutrientes – temperatura – biomassa

Na Figura 4.6 pode-se observar que o ponto máximo de inflexão quanto à produção de biomassa não foi atingido. Para atingir esta inflexão, seria necessário aumentar a quantidade de nutrientes no cultivo, pois, assim, se atingiria o

momento em que as microalgas cessam o consumo destes. Por outro lado, poder-se-ia aumentar a intensidade luminosa, o que no momento não é possível, devido à capacidade da planta de fotobiorreatores. Assim, optou-se pela diminuição de nutrientes para encontrar o ponto máximo de produção de microalgas, mantendo a faixa de intensidade luminosa. A temperatura, ainda que seja uma variável significativa, apresenta uma variação pequena quando se realizam experimentos com concentrações menores de nutrientes. Devido às condições climáticas do laboratório, onde a manutenção de temperaturas abaixo de 20°C não é possível, e considerando que a baixas temperaturas se teria pouca produção de biomassa, mudou-se a faixa de temperaturas, trabalhando-se nas seguintes seções com temperaturas entre 20°C e 35°C.

### 4.3 Avaliação do uso de vinhaça para crescimento da microalga

Esta seção apresenta os resultados da avaliação de crescimento da microalga usando vinhaça na composição do meio de cultivo. Inicialmente, a viabilidade técnica foi avaliada em misturador orbital. Posteriormente, as condições de cultivo foram otimizadas para as variáveis de temperatura, intensidade luminosa e porcentagem de vinhaça, utilizando fotobiorreatores *air-lift*.

#### 4.3.1 Crescimento de *Scenedesmus sp.* em vinhaça

Inicialmente, foi avaliada a aptidão das microalgas em meio de cultivo suplementado com porcentagens de 0 a 50% de vinhaça (Figura 4.7). Observou-se o crescimento de microalgas em todas as diferentes porcentagens de vinhaça avaliadas. Os erlenmeyers utilizados foram mantidos a 27,5°C e uma intensidade luminosa média de 6200 lux e colocados no shaker por 7 dias para depois serem filtrados.



Figura 4.7. Cultivo de microalgas em erlenmeyers (a) antes de serem instalados no shaker (b) após o cultivo

A Figura 4.8 mostra que as microalgas conseguiram crescer em meios de cultivo misturados até 50% de vinhaça.



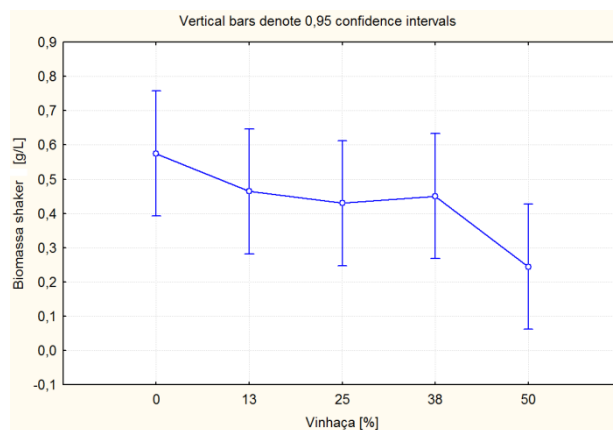


Figura 4.8. Crescimento de microalgas, cultivadas em shaker, a diferentes porcentagens de vinhaça

A Tabela 4.2 mostra os dados de biomassa para diferentes concentrações de vinhaça. Constatase que é possível cultivar microalgas em vinhaça, porém com crescimento inferior ao caso que apenas meio de cultivo sem suplementação é utilizado. Além disso, pode-se observar que na concentração de 50% de vinhaça, o crescimento foi baixo. Provavelmente a vinhaça, devido sua coloração marrom causada pela presença de material particulado, dificulta a penetração de luz, inibindo o crescimento das microalgas.

Tabela 4.2: Média de valores de biomassa produzida em diferentes porcentagens de vinhaça adicionada ao meio de cultivo

Vinhaça [%]	Biomassa shaker [g/L] Media
0	0,5750
12,5	0,4640
25	0,4299
37,5	0,4507
50	0,2447

Estatisticamente, segundo o Teste de Tukey (análise com nível de significância de 95%), a diferença entre as médias dos experimentos relativos às concentrações de 0%, 12,5%, 25% e 37,5% não é significativa. Apenas há diferença para os experimentos relativos a 0% e 40% de vinhaça, o que justifica a exclusão de tal ponto para os experimentos subsequentes.

#### 4.3.2 Planejamento experimental para avaliar fatores que influenciam no cultivo com vinhaça

Uma vez comprovado que as microalgas conseguem crescer em meio de cultivo suplementado com vinhaça, procedeu-se à otimização das condições de cultivo.

### Planejamento fatorial

Este planejamento foi realizado em uma batelada com 11 fotobiorreatores segundo dados estabelecidos na Tabela 3.6. Os cultivos foram mantidos até o 10º dia. A partir dos dados obtidos, foi realizada a análise ANOVA, com um intervalo de confiança de 95%. As respectivas tabelas, para modelo completo e o reduzido, são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Análise de variância – planejamento fatorial de cultivo de microalgas utilizando meio de cultivo com vinhaça

Fatores	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
<b>Modelo completo</b>					
Temperatura [°C] (1)	<b>0,156157</b>	<b>1</b>	<b>0,156157</b>	<b>76,7626</b>	<b>0,012778</b>
Vinhaça [%](2)	<b>0,203448</b>	<b>1</b>	<b>0,203448</b>	<b>100,0096</b>	<b>0,009852</b>
Intensidade luminosa [lux] (3)	<b>0,196262</b>	<b>1</b>	<b>0,196262</b>	<b>96,4772</b>	<b>0,010207</b>
<b>1 e 2</b>	<b>0,045346</b>	<b>1</b>	<b>0,045346</b>	<b>22,2908</b>	<b>0,042052</b>
1 e 3	0,018193	1	0,018193	8,9431	0,095989
<b>2 e 3</b>	<b>0,094692</b>	<b>1</b>	<b>0,094692</b>	<b>46,5483</b>	<b>0,020815</b>
Falta de ajuste	0,004965	2	0,002482	1,2202	0,450401
Error Puro	0,004069	2	0,002034		
Total SS	0,723130	10			R <sup>2</sup> = 98,75%
<b>Modelo reduzido</b>					
Falta de ajuste	0,023157	3	0,007719	3,7945	0,215560
Error Puro	0,004069	2	0,002034		
Total SS	0,723130	10			R <sup>2</sup> = 96,24%

Pela avaliação de variância ANOVA (Tabela 4.3) e o diagrama de Pareto (Figura 4.9), verificou-se que a porcentagem de vinhaça foi o fator mais significativo, seguido pela intensidade luminosa e depois a temperatura. As interações intensidade luminosa-vinhaça (2 e 3) e temperatura-vinhaça (1 e 2) também foram significativas. A falta de ajuste não se mostra significativa para um intervalo de confiança de 95%. A interação intensidade luminosa-vinhaça (2 e 3) pode ser justificada pelo fato de que o aumento da concentração de vinhaça prejudica a penetração de luz no meio. Esse efeito poderia ser reduzido se a luminosidade aumentasse proporcionalmente com o aumento da concentração de vinhaça.

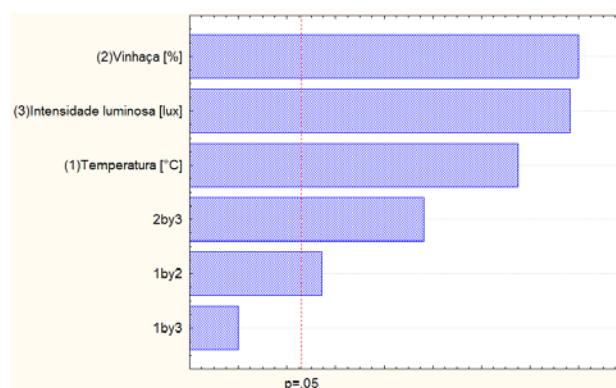


Figura 4.9. Diagrama de Pareto – planejamento fatorial

O modelo completo, que foi ajustado utilizando todos os parâmetros, apresentou  $R^2$  igual a 98,8%. O modelo reduzido, ajustado apenas com os parâmetros significativos, apresenta um  $R^2$  igual a 96,2%.

Segundo o teste de Shapiro-Wilk, o  $W$  foi igual a 0,566 (maior a 0,05) o que mostra a distribuição normal dos dados. Posteriormente, objetivando verificar se o modelo representa bem os dados experimentais, calculou-se o  $F$  (52,7) para o modelo completo, o qual foi superior ao tabelado (6,16) e para o modelo reduzido o  $F$  calculado (25,56) foi também superior ao tabelado (5,05). Logo se verifica que tanto o modelo completo como o reduzido se mostraram significativos.

O modelo codificado para a biomassa em g/L em função da temperatura ( $x_1$ ), vinhaça ( $x_2$ ) e intensidade luminosa ( $x_3$ ) na faixa estabelecida na Tabela 3.5, é dado por:

$$\text{Biomassa [g/L]} = 0,488 + 0,1397x_1 - 0,159x_2 + 0,157x_3 + 0,075x_1x_2 + 0,156x_1x_3 \quad (2)$$

A Figura 4.10 apresenta a superfície de resposta do modelo reduzido. Pode-se observar que a intensidade luminosa e a temperatura contribuem na produção de biomassa de maneira positiva. Entretanto, ao aumentar a porcentagem de vinhaça no meio de cultivo se observa que a produção de biomassa diminuiu, o que indica que maiores porcentagem de vinhaça geram quantidades menores de biomassa.

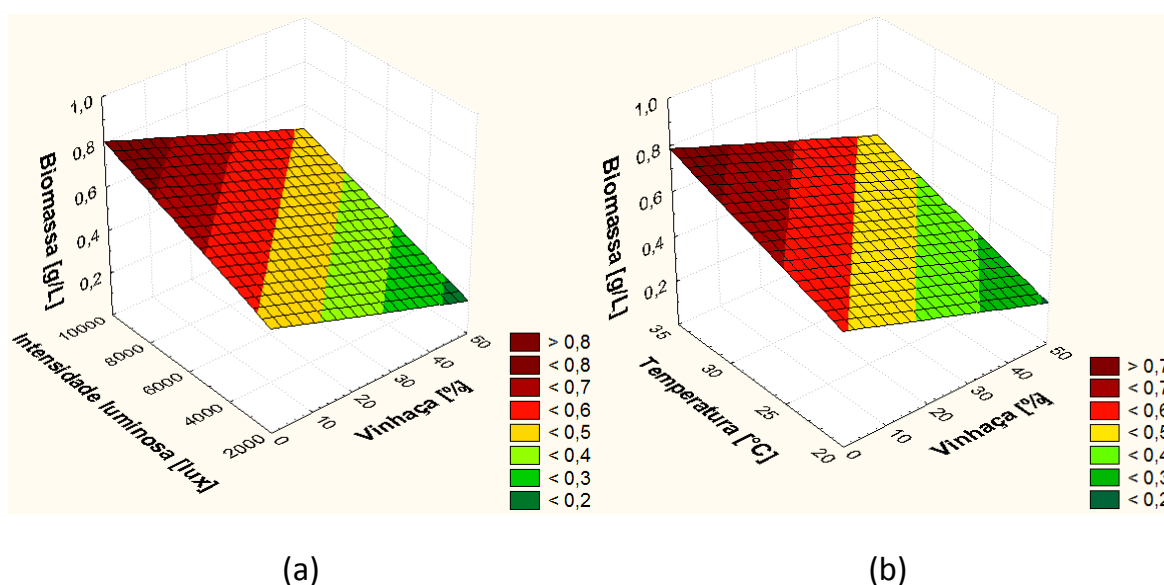


Figura 4.10. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de *Scenedesmus sp.* usando vinhaça – planejamento fatorial (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa

Mostra-se na Figura 4.10a que a maiores valores de intensidade luminosa é possível produzir mais biomassa, comparável a uma produção de biomassa a baixa intensidade luminosa, mas sem vinhaça. Também pode se observar que a 10.000 lux (ponto máximo do intervalo de estudo) é possível obter uma boa produção em cultivos com porcentagens de até 40% de vinhaça. Verifica-se que a qualquer temperatura para cultivos com porcentagens baixas de vinhaça (entre 0 e 20%) tem-se valores máximos de biomassa. A partir dessas observações optou-se por

usar um planejamento DCCR para avaliar melhor os fatores, reduzindo o intervalo de porcentagem de vinhaça, que foi definido entre 0 a 40%.

### DCCR 2

Foram inoculados fotobiorreatores *air-lift* na planta em duas bateladas segundo os dados do planejamento da Tabela III.7. O cultivo teve duração de 10 dias e os inóculos foram adaptados às diferentes porcentagens de vinhaça a serem avaliadas no DCCR.

Através da avaliação de variância (ANOVA), obtiveram-se os resultados do modelo completo e o modelo reduzido, os quais são apresentados na Tabela 4.4. Verificou-se que a intensidade luminosa e a porcentagem de vinhaça foram consideradas estatisticamente significativas, enquanto que o fator temperatura não apresentou efeito significativo, dentro do intervalo estudado. A variância associada aos blocos e a falta de ajuste não se mostram significativas para um intervalo de confiança de 95%.

O modelo completo, que foi ajustado utilizando todos os parâmetros, apresentou  $R^2$  igual a 90,9%. O modelo reduzido, que foi ajustado apenas com os parâmetros significativos, apresentou  $R^2$  igual a 86,8%.

Tabela 4.4: Análise de variância - DCCR 2

Fatores	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
<b>Modelo completo</b>					
Blocos	0,013122	1	0,013122	9,06401	0,057182
<b>(1) Vinhaça [%](L)</b>	<b>0,124128</b>	<b>1</b>	<b>0,124128</b>	<b>85,74348</b>	<b>0,002665</b>
Vinhaça [%](Q)	0,000595	1	0,000595	0,41095	0,567097
(2)Temperatura [°C](L)	0,000071	1	0,000071	0,04935	0,838468
Temperatura [°C](Q)	0,000720	1	0,000720	0,49741	0,531470
<b>(3)Intensidade luminosa [lux](L)</b>	<b>0,114447</b>	<b>1</b>	<b>0,114447</b>	<b>79,05674</b>	<b>0,003000</b>
Intensidade luminosa [lux](Q)	0,000642	1	0,000642	0,44328	0,553161
1L e 2L	0,006882	1	0,006882	4,75354	0,117320
1L e 3L	0,002790	1	0,002790	1,92721	0,259191
2L e 3L	0,000652	1	0,000652	0,45051	0,550152
Falta de ajuste	0,022189	5	0,004438	3,06548	0,192722
Error Puro	0,004343	3	0,001448		
Total SS	0,290351	18			$R^2 = 90,862\%$
<b>Modelo reduzido</b>					
Falta de ajuste	0,034097	11	0,002841	1,96278	0,316808
Error Puro	0,004343	3	0,001448		
Total SS	0,290351	18			$R^2 = 86,761\%$

No diagrama de Pareto (

Figura 4.11) verifica-se que a porcentagem linear de vinhaça e a intensidade de luz linear têm um efeito significativo na produção de biomassa. Porém, os termos linear e quadrático associados à temperatura não são significativos.

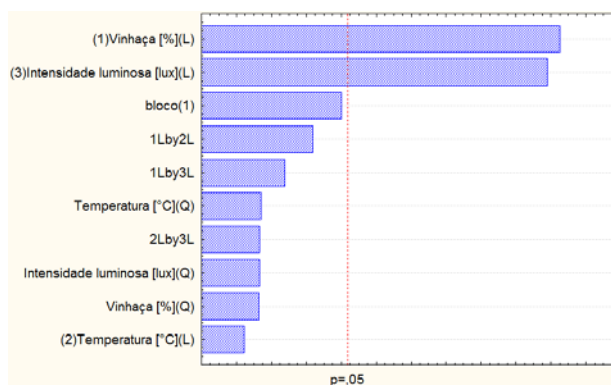


Figura 4.11. Diagrama de pareto – DCCR 2

No diagrama de Pareto é possível observar os efeitos dos fatores que influenciaram na variável resposta (biomassa). Verifica-se que a intensidade luminosa (efeito linear) mostra ter um efeito positivo, o que contribui para o aumento da produção de biomassa. Porém, vê-se que o fator linear da porcentagem de vinhaça, ainda que significativo, apresenta efeito negativo, corroborando os resultados do planejamento anterior.

O modelo codificado para a determinação de biomassa em g/L em função da vinhaça ( $x_1$ ) e intensidade luminosa ( $x_3$ ) na faixa estabelecida na Tabela 3.7, é dado por:

$$\text{Biomassa [g/L]} = 0,3912 - 0,0953 x_1 + 0,0915 x_3 \quad (3)$$

A Figura 4.12 apresenta a superfície de resposta do modelo reduzido, baseada no modelo da equação (3). Pode-se observar que, à medida que aumenta a intensidade luminosa, a produção de biomassa aumenta. Por outro lado o aumento de vinhaça no cultivo tem efeito negativo.

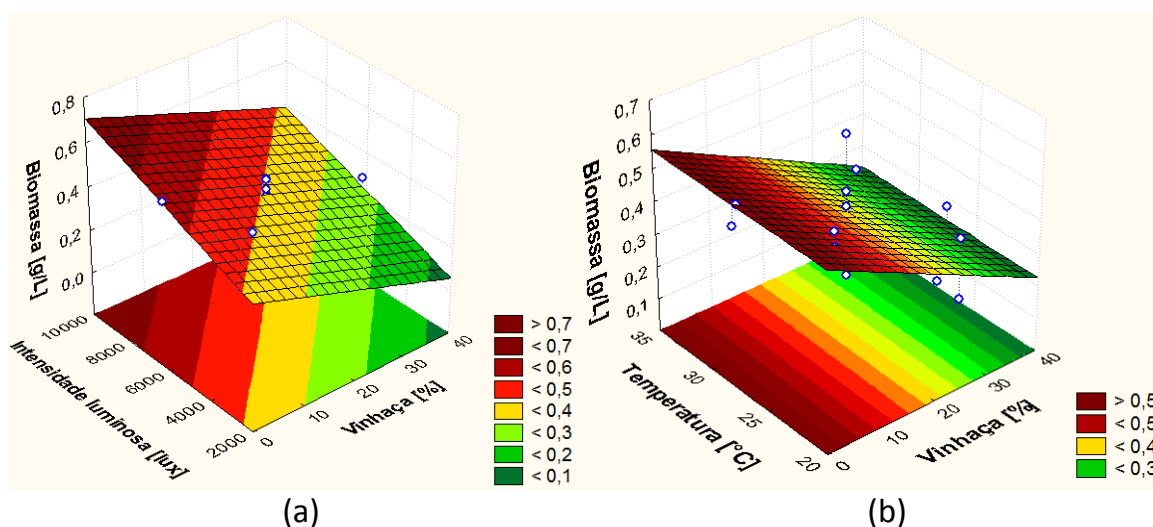


Figura 4.12. Superfície de resposta para o modelo reduzido de produção de *Scenedesmus sp.* usando vinhaça – DCCR 2 (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa

Para o modelo completo tem-se a superfície de resposta na Figura 4.13. Na Figura 4.13a verificou-se que o efeito da intensidade luminosa é significativo na produção de biomassa, inclusive é possível perceber que a maiores valores de intensidade luminosa é possível produzir biomassa com maior adição de vinhaça. Como mostrado na Figura 4.13b, a faixa de temperatura de maior produção de biomassa foi entre os 20 e 35°C para porcentagens menores de 15% de vinhaça a uma intensidade luminosa de 6200 lux.

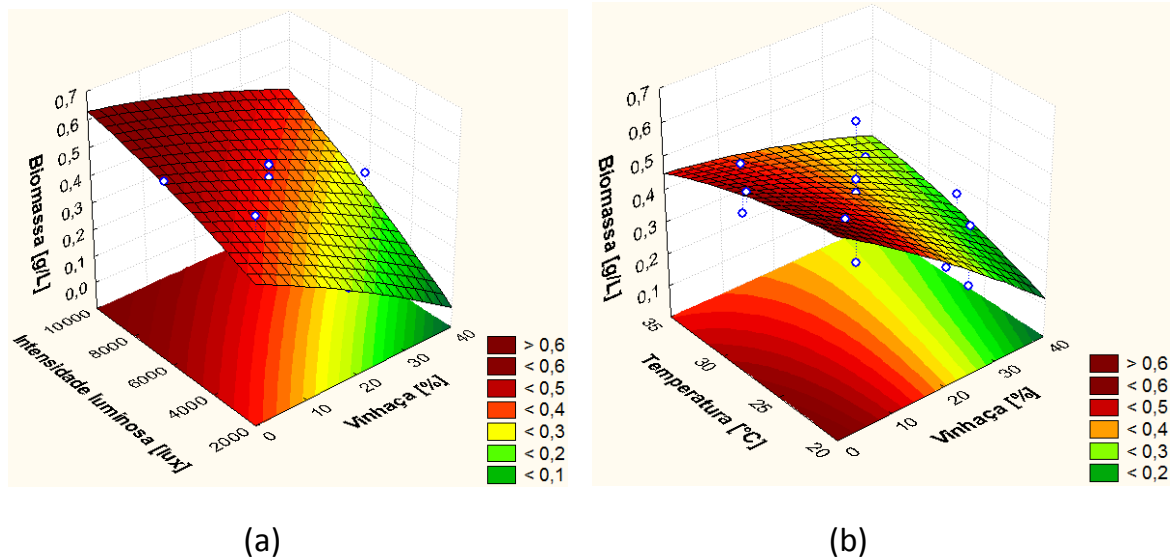


Figura 4.13. Superfície de resposta para o modelo completo de produção de biomassa usando vinhaça – DCCR 2 (a) vinhaça – intensidade luminosa – biomassa (b) vinhaça – temperatura – biomassa

O planejamento foi utilizado para avaliar e selecionar os fatores significativos estatisticamente, além de identificar os efeitos que podem influenciar na produção de biomassa. A partir de essas observações, foi possível excluir a variável temperatura o que demonstra que é possível cultivar a *Scenedesmus sp.* dentro do intervalo de temperatura estabelecido devido à baixa significância estatística. O aumento de vinhaça isoladamente impacta negativamente no crescimento. Entretanto, caso se deseje concentrações crescentes desse efluente, a intensidade luminosa deve ser proporcionalmente aumentada a fim de se manter a mesma concentração de biomassa.

Outros pontos positivos da suplementação de vinhaça foram observados ao longo dos experimentos: o pH aumentou para valores entre 7 e 8 em todos os fotobiorreatores, o qual é um fator positivo considerando que o pH da vinhaça é igual a 4. Além disso, entre o 1° e 3° dia de cultivo verificou-se a formação de flocos, indicando que tais micro-organismos poderiam concentrar a vinhaça, atuando como floculantes.

#### 4.4 Análise de DBO e consumo de nitrogênio e fósforo em cultivos com vinhaça

Após a análise da superfície de resposta (ver a Figura 4.13), foram realizados experimentos com os fotobiorreatores *air-lift*, nas condições de 27,5 °C, por ser um valor usado no ponto central do DCCR 2, e 10000 lux (intensidade máxima do intervalo de estudo). Os fotobiorreatores foram inoculados com proporções de 8,1%, 20% e 31,9% de vinhaça. Após 10 dias de cultivo, o conteúdo foi filtrado. O material filtrado foi usado para a determinação de peso seco final, e o líquido filtrado de cada fotobiorreator foi enviado a laboratório para analisar nitrogênio total, fósforo total e DBO. Essas análises permitem saber se as microalgas consumiram o nitrogênio e o fósforo do meio de cultivo misturado com vinhaça e se o efluente final diminuiu o DBO.

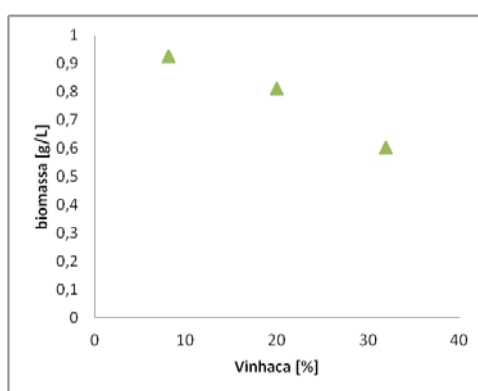


Figura 4.14 Crescimento de microalgas, cultivadas em fotobiorreatores *air-lift* a diferentes porcentagens de vinhaça

Na Figura 4.14 são apresentados os resultados experimentais de biomassa obtida por determinação de peso seco. As condições em todos os fotobiorreatores foram 10000 lux e 27,5°C, variando unicamente a porcentagem de vinhaça.

##### 4.4.1 DBO final na vinhaça tratada

Depois de ser filtrado o conteúdo dos fotobiorreatores *air-lift*, com diferentes porcentagens de vinhaça, foi realizada a análise de DBO. Na Figura 4.15, têm-se os valores de DBO segundo as diferentes porcentagens de vinhaça tratada.

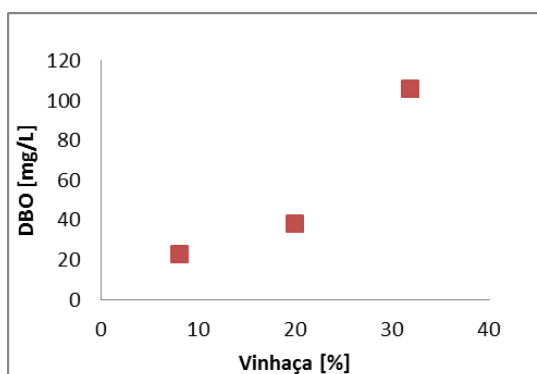


Figura 4.15 Valores de DBO em diferentes porcentagens de vinhaça adicionada no cultivo de microalgas

Observa-se, na Figura 4.15, que valores de DBO, entre 23 e 106 mg/L, representam valores muito baixos se comparados com o DBO inicial (Ver Tabela 4.5). Isto demonstra que o uso de microalgas em vinhaça pode reduzir consideravelmente o DBO de dito resíduo.

Para o lançamento em corpos receptores, os efluentes de quaisquer fontes de poluição, incluindo sucro-alcooleiras, devem atender aos padrões de emissão e de qualidade de águas, estabelecidos nas legislações estaduais e federais. Segundo a resolução Conama 430/2011, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente num corpo receptor, desde que obedeçam às condições e aos padrões previstos. No caso da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C), a eficiência mínima do processo de tratamento na remoção deve ser maior a 60% de DBO. A Tabela 4.5 fornece os dados de DBO inicial (calculada), DBO final (resultados de análise de laboratório são mostrados no Apêndice II) e a eficiência de remoção.

Tabela 4.5: DBO inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de *Scenedesmus sp.* com diferentes porcentagens de vinhaça

Porcentagem de Vinhaça [%]	DBO inicial [mg/L]	DBO final [mg/L]	Eficiência de remoção [%]
8,1	601	23	96,2
20	1484	38	97,4
31,9	2364	106	95,5

Como observado na Tabela 4.5, a eficiência de remoção varia entre 95 e 98%, o que significa uma remoção maior do que o estabelecido na normativa. As avaliações de cumprimento aos padrões de lançamento são normalmente baseadas na DBO (Fraceto, Moschini-Carlos *et al.*, 2012), sendo assim, os efluentes de vinhaça que foram tratados com microalga poderiam ser descartados por apresentarem uma remoção maior a 60%.

#### 4.4.2 Nitrogênio em vinhaça tratada

O nitrogênio é um nutriente fundamental no cultivo da *Scenedesmus sp.* por dois motivos: é essencial para o crescimento da microalga e tem uma estreita relação com a capacidade de sintetizar lipídios. A *Scenedesmus* pode utilizar nitrato, nitrito, amoníaco ou ureia como fonte de nitrogênio para o crescimento, sendo preferido o nitrato para o cultivo (Olivares, 2010).

Como mencionado anteriormente, o 10° dia é o ponto máximo em que a curva de crescimento termina a fase exponencial. Na Figura 4.16, pode-se observar que o nitrogênio foi consumido nesse intervalo de tempo.

Não foi feita a análise do consumo de nitrogênio diariamente porque isto implicaria custos adicionais. Mas, com base nestes resultados, poder-se-iam realizar estudos futuros baseados no acompanhamento diário da quantidade de



nitrogênio consumido pela *Scenedesmus sp.*, em cultivos com diferentes proporções de vinhaça no meio.

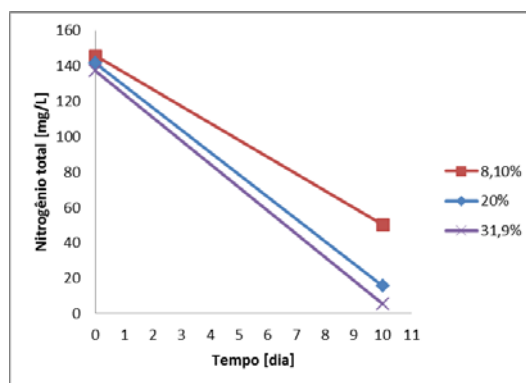


Figura 4.16 Conteúdo de nitrogênio total no primeiro e último dia de cultivo de cada fotobiorreator

A Tabela 4.6 apresenta os dados de nitrogênio inicial e final nos fotobiorreatores. A eficiência de remoção de Nitrogênio foi de 65,5% para o fotobiorreator de 8,1% de vinhaça, 89% para o de 20% de vinhaça e 96% de remoção para o fotobiorreator de 31,9%.

Tabela 4.6: Nitrogênio inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de *Scenedesmus sp.* com diferentes porcentagens de vinhaça

Porcentagem de Vinhaça [%]	N da vinhaça [mg/L]	N do meio Guillard Modificado [mg/L]	N total inicial [mg/L]	N total final [mg/L]	Eficiência de remoção [%]
8,1	9,06	136,69	145,75	50,25	65,5
20	22,36	118,99	141,35	15,55	89
31,9	35,66	101,29	136,95	5,44	96

Observa-se que o nitrogênio foi consumido em 96% no cultivo de 31,9% de vinhaça, mostrando a capacidade da microalga na remoção desse elemento. Ainda que a quantidade de biomassa produzida a 31,9% foi menor que a dos outros fotobiorreatores, o consumo de nitrogênio foi maior. Para explicar esse fenômeno, pode-se levantar a hipótese de que a menor quantidade de luz disponível, provocada pela maior quantidade de vinhaça, levou a uma menor absorção de luz das microalgas, assim elas geram comparativamente menos biomassa, entretanto acumulam mais nitrogênio produzindo mais lipídios. Entretanto essa hipótese terá que ser verificada posteriormente através da análise do teor de lipídios, ficando como sugestão para trabalhos futuros.

Méndez *et al.* (2010) trabalharam com cultivos de *Scenedesmus quadricauda* usando efluente de águas residuais domésticas como meio de cultivo, em um intervalo de tempo de 12 dias, e demonstraram que a microalga pode remover o nitrogênio em até 94%. Dessa forma, pode-se observar tanto pelo estudo de Méndez *et al.* (2010), como pelos resultados obtidos no laboratório, a capacidade de remoção de nitrogênio desta microalga.

#### 4.4.3 Fósforo em vinhaça tratada

As análises de laboratório demonstram que praticamente todo o fósforo foi consumido (ver Figura 4.17). O fato de todo o fósforo ser removido, poderia demonstrar o motivo pelo qual as microalgas chegam ao final da fase exponencial no 11º dia, não produzindo mais biomassa.

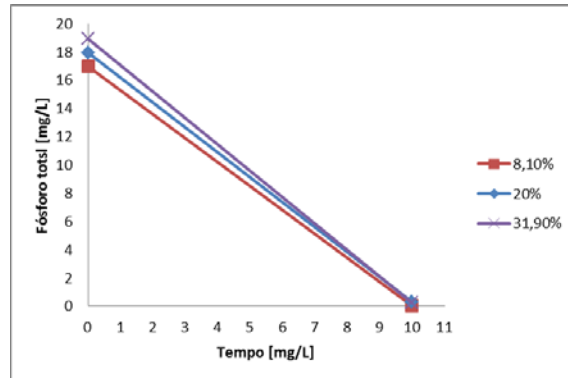


Figura 4.17 Conteúdo de fósforo no primeiro e último dia de cultivo

Tabela 4.7: Fósforo inicial e final nos fotobiorreatores de cultivos de *Scenedesmus sp.* com diferentes porcentagens de vinhaça

Porcentagem de Vinhaça [%]	P da vinhaça [mg/L]	P do meio Guillard Modificado [mg/L]	P total inicial [mg/L]	P total final [mg/L]	Eficiência de remoção [%]
8,1	1,98	14,97	16,95	0,02	99,9
20	4,90	13,03	17,93	0,288	98,4
31,9	7,81	11,10	18,91	0,218	98,8

Na Tabela 4.7 observa-se o consumo do fósforo nos fotobiorreatores. A eficiência de remoção do fósforo foi entre 98,4 e 99,9%, o que poderia significar que ele foi um limitante no crescimento de microalgas. O estudo de Xin *et al.* (2010) concluiu que o nitrogênio num cultivo poderia não ser totalmente removido se existisse limitação de fósforo, motivo pelo qual o nitrogênio não foi totalmente removido nos fotobiorreatores de 8,1 e 20% de vinhaça. Sendo assim, poder-se-ia diminuir o conteúdo de nitrogênio no meio de cultivo inicial ou aumentar o conteúdo de fósforo. Diminuir o conteúdo de nitrogênio poderia diminuir a quantidade de biomassa produzida, mas permitiria a remoção de nitrogênio e fósforo da vinhaça. Por outro lado, o aumento de fósforo poderia permitir o consumo total do nitrogênio existente no meio e maior produção de biomassa.

Entretanto, a resolução Conama 357/2005 estabelece que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente num corpo receptor desde que a quantidade de fosforo final seja no máximo de 0,02 mg/L, o que mostra que efluente tratado com microalgas em meio de cultivo ao 8,1% em vinhaça pode ser descartado e cumprir a normativa vigente.

## 4.5 Avaliação do crescimento de microalgas

### 4.5.1 Usando espectrofotometria

Avaliaram-se os dados obtidos pelo método de determinação de peso seco e comparou-se com os valores obtidos por espectrofotometria. Foram comparados os dados obtidos de densidade ótica a 570 nm com os outros obtidos pela determinação de peso seco. Os valores de absorbância acima de 0,8 foram alcançados a partir da diluição em 6 vezes da amostra coletada. As medidas de absorbância foram proporcionais aos valores experimentais obtidos por cálculo de peso seco, embora seja necessário ter muito cuidado no momento de realizar as diluições.

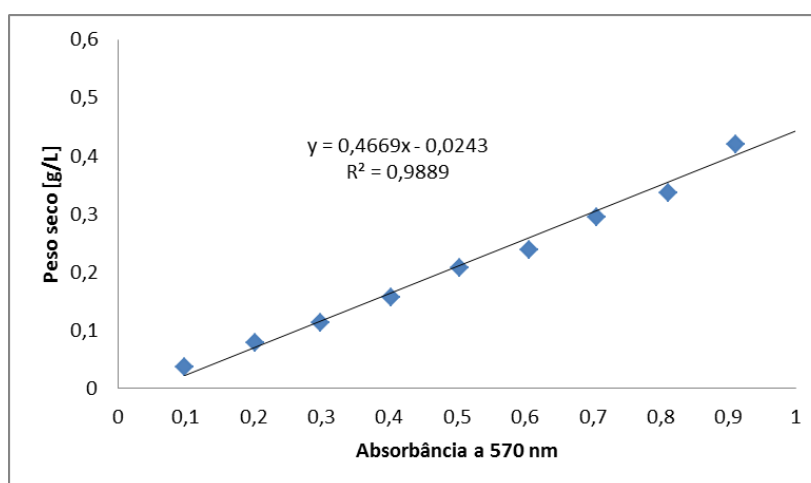


Figura 4.18. Ajuste linear da relação de DO e peso seco a partir de amostras diárias de cultivo em dois fotobiorreatores *air-lift*

Como apresentado na Figura 4.18, verifica-se um comportamento linear entre a densidade ótica (DO) e o peso seco. A relação linear obtida entre biomassa em g/L e DO a 570 nm é apresentada na equação (4).

$$\text{Biomassa [g/L]} = 0,4669 \cdot \text{DO}_{570\text{nm}} - 0,0243 \quad R^2 = 0,9889 \quad (4)$$

A partir da equação (4), podem ser calculadas as concentrações de biomassa produzida ao longo dos cultivos.

### 4.5.2 Usando Espectroscopia de Fluorescência

Como um diferencial neste trabalho, tentou-se avaliar o método de medição por espectrofluorometria para determinar as concentrações de biomassa, além da espectrofotometria, que é comumente usada. No caso de ser possível usar este método, poder-se-ia registrar as concentrações num reator em tempo real.

Foram usados os dados experimentais da Figura 4.2, os quais se obtiveram a partir do crescimento da *Scenedesmus sp.* em meio Guillard Modificado sem vinhaça e realizou-se a análise dos dados de fluorescência. Inicialmente foram estimados modelos de 1, 2 e 3 pares de excitação/emissão para cada um dos fotobiorreatores utilizando as intensidades de fluorescência absolutas. Em seguida,

foi repetido o mesmo estudo, porém utilizando as intensidades relativas, isto é, do segundo até o décimo sétimo dia as intensidades foram subtraídas da intensidade do primeiro dia (que corresponde ao dia 0 em que foram instalados os reatores). Essa diferença visa compensar mudanças no meio. Os modelos com 1 par são cúbicos e os com 2 e 3 pares são quadráticos com termos de interação entre os pares.

### Intensidade absoluta Reator 1

A Figura 4.19 mostra o resultado do ajuste dos modelos com o maior coeficiente de determinação para 1 e 2 pares de fluorescência. O coeficiente de determinação é igual a 0,9324 no modelo de 1 par e 0,9913 no modelo de 2 pares. Com esses modelos pode-se observar o comportamento da curva de crescimento ao longo do tempo.

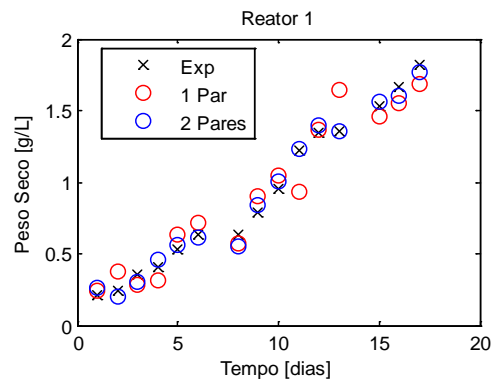


Figura 4.19. Modelos com 1 e 2 pares no reator 1 - Intensidade absoluta

Avaliando os resultados de intensidade absoluta no reator 1, verifica-se na Figura 4.20 o comportamento dos 4 melhores pares identificados com o ajuste de apenas 1 par e o resultado dos ajustes, incluindo a identificação dos respectivos pares.

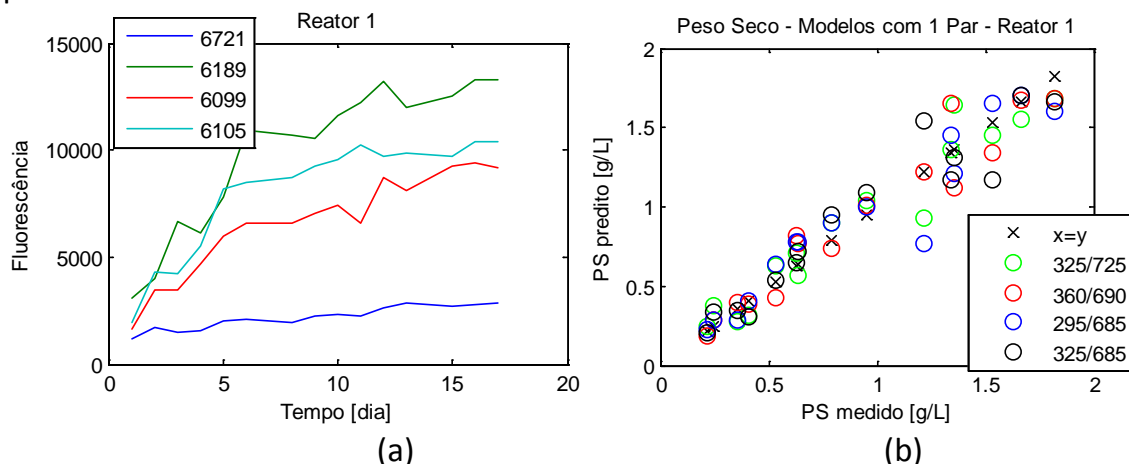


Figura 4.20. (a) Intensidade absoluta no reator 1 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) medido e peso seco predito para modelos com 1 par

A partir da Figura 4.20 pode-se ver que o par excitação/emissão 325/725 apresentou o melhor ajuste. Na Tabela 4.8 têm-se os 4 melhores pares com os respectivos coeficientes de determinação e os parâmetros (ou seja os coeficientes)

do modelo. Outros pares também foram detectados na análise, não entanto decidiu-se apresentar apenas os 4 mais relevantes.

Tabela 4.8: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 1 – Intensidade Absoluta

Par	Ex/Em	R <sup>2</sup>	P1	P2	P3	P4
6721	325/725	0,9324	-2,829e-10	2,129e-06	-0,004083	2,5588
6189	360/690	0,9315	3,535e-12	-6,815e-08	0,00045988	-0,6871
6099	295/685	0,9097	3,922e-13	2,1048e-08	-8,2783e-05	0,3012
6105	325/685	0,9096	9,0047e-12	-1,3041e-07	0,0005934	-0,51549

Na Figura 4.21, pode-se identificar a região onde estão os melhores pares do reator 1.

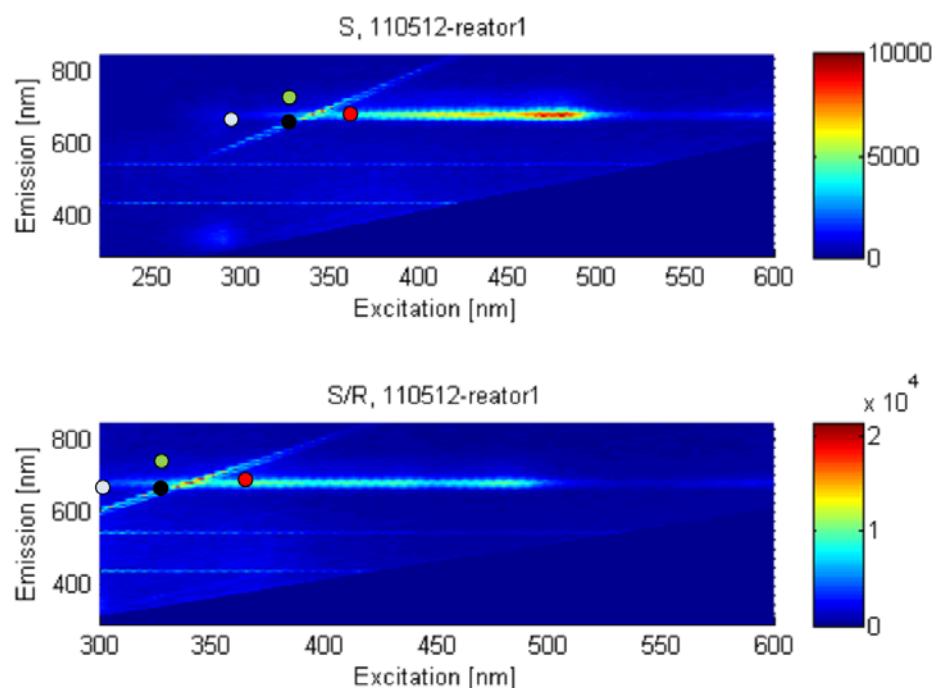


Figura 4.21. Região dos melhores pares no reator 1

Os resultados dos ajustes utilizando modelos com 2 pares são mostrados na Figura 4.22.

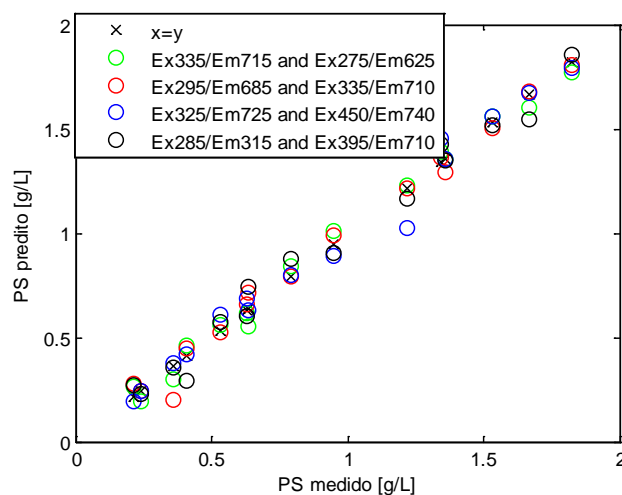


Figura 4.22. Ajuste com modelos com 2 pares no reator 1 – Intensidade absoluta

Os modelos com 2 pares apresentaram melhores resultado com  $R^2$  entre 0,9835 a 0,9913. Na Tabela 4.9 observa-se os 4 melhores pares obtidos a partir de um número maior de pares analisados.

Tabela 4.9: Pares selecionados para modelos com 2 Pares no reator 1 – Intensidade Absoluta

Par 1	Par 2	$R^2$	P1	P2	P3	P4	P5	P6
335/715	275/625	0,9913	-2,725E-07	3,728E-07	-5,040E-08	-1,772E-04	-2,927E-04	0,8287
295/685	335/710	0,9888	1,433E-08	-6,382E-08	3,760E-07	2,448E-04	-1,803E-03	1,7015
325/725	450/740	0,9837	-2,165E-06	8,320E-06	-6,923E-06	2,708E-04	-1,074E-03	0,1353
285/315	395/710	0,9835	6,316E-08	-3,590E-07	7,675E-07	-1,183E-06	-7,781E-04	0,8144

### Intensidade relativa Reator 1

Na Figura 4.23 é apresentado o comportamento dos 4 melhores pares identificados com o ajuste de apenas 1 par.

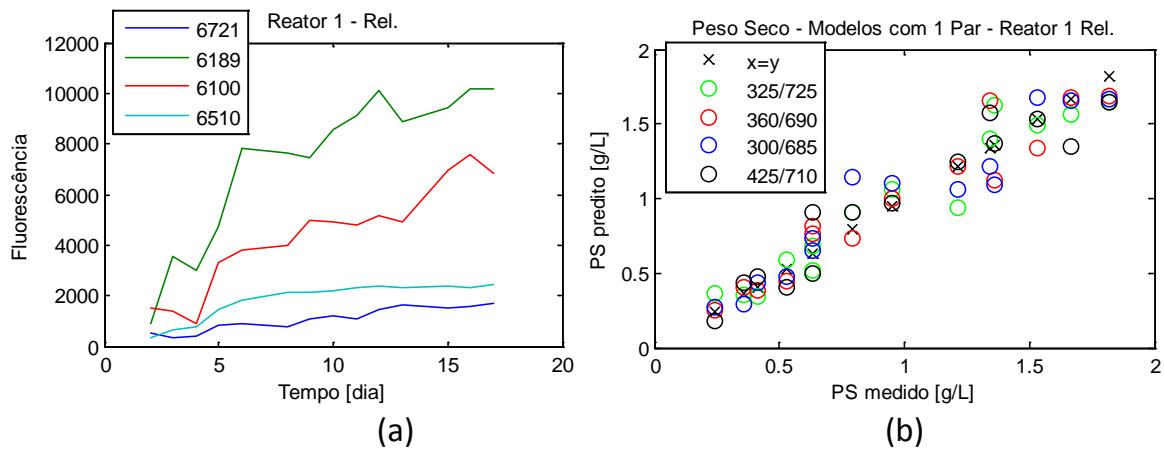


Figura 4.23. (a) Intensidade relativa no reator 1 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) medido e PS predito para modelos de 1 par

Em modelos com 1 par, o melhor par de excitação/emissão foi 325/725 que apresentou um  $R^2$  de 0,9275 (ver Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 1 – Intensidade Relativa

Par	Ex/Em	$R^2$	P1	P2	P3	P4
6721	325/725	0,9275	-9,146E-10	3,159E-06	-2,220E-03	7,883E-01
6189	360/690	0,9221	3,947E-12	-4,330E-08	1,864E-04	1,129E-01
6100	300/685	0,9106	-2,048E-11	2,809E-07	-8,661E-04	1,012E+00
6510	425/710	0,9092	7,784E-10	-2,791E-06	3,125E-03	-6,313E-01

Pode-se observar na Figura 4.24, que os modelos com 2 pares apresentaram melhores resultados em relação às demais análises, com  $R^2$  entre 0,9960 a 0,9880 (ver Tabela 4.11).

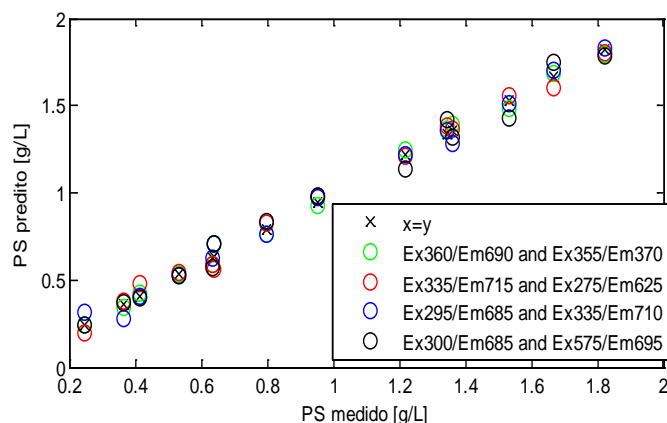


Figura 4.24. Modelos com 2 pares no reator 1 – Intensidade relativa

Tabela 4.11: Pares selecionados para modelos com 2 Pares no reator 1 – Intensidade Relativa

Par 1	Par 2	R <sup>2</sup>	P1	P2	P3	P4	P5	P6
360/690	355/370	0,9960	7,830E-09	-2,004E-07	-1,104E-07	2,030E-04	1,452E-03	-1,1595
335/715	275/625	0,9935	-2,615E-07	4,014E-07	-4,651E-08	1,082E-04	-1,943E-04	0,4749
295/685	335/710	0,9927	2,476E-08	-4,985E-08	3,308E-07	4,249E-05	-7,457E-04	0,5202
300/685	575/695	0,9880	1,546E-09	2,866E-07	-3,028E-07	-1,984E-04	5,745E-05	0,5061

Observa-se que foram possíveis ajustar os dados com modelos de 1 e 2 pares que ofereceram melhores coeficientes de determinação, usando intensidades de fluorescência absoluta. Além desses modelos, foram avaliados modelos com 3 pares.

Na Tabela 4.12, estão descritos os primeiros melhores pares excitação/emissão para os modelos com 3 pares de fluorescência absoluta no reator 1.

Tabela 4.12: Pares selecionados para modelos com 3 Pares no reator 1 – Intensidade Absoluta (Abs.)

Abs.	Par1	Excitação	Emissão	Par2	Excitação	Emissão	Par3	Excitação	Emissão
1	473	270	320	6306	560	695	1806	390	405
2	6435	435	705	399	285	315	709	295	335
3	399	285	315	6982	475	740	6255	305	695
4	7005	590	740	6905	475	735	6022	295	680
5	6569	335	715	5171	275	625	6212	475	690
15	6181	320	690	6907	485	735	709	295	335
20	5557	280	650	6905	475	735	6676	485	720

### Modelos ajustados do reator 1 para prever o peso seco do reator 2

Uma vez estimados os parâmetros dos modelos do reator 1, esses foram utilizados para prever o comportamento do reator 2. No apêndice III. 1, serão usados os modelos do reator 2 para prever o peso seco do reator 1. Isso com a

finalidade de verificar se os modelos podem ser usados para medições em reatores que tenham as mesmas condições de cultivo.

A Figura 4.25a apresenta os melhores modelos de 1, 2 e 3 pares do reator 1 usados para prever o peso seco no reator 2 utilizando dados absolutos e a Figura 4.25b usando dados relativos.

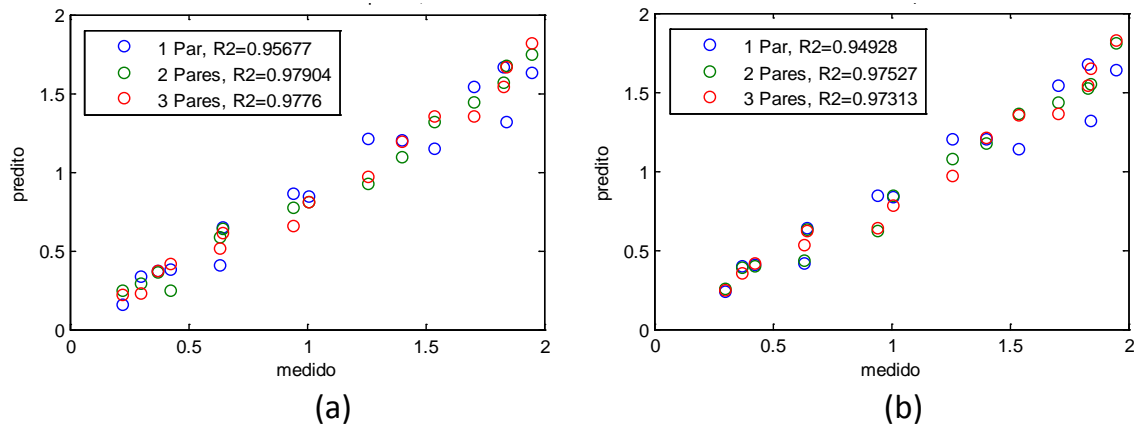


Figura 4.25. Melhores pares do reator 1 para prever peso seco no reator 2  
(a) Intensidade absoluta (b) Intensidade relativa

Procedeu-se a usar os pares do reator 1 para prever o comportamento do reator 2. Pode-se observar na Figura 4.26 o comportamento quando são usados valores de fluorescência absolutos, e na Figura 4.27, o comportamento do reator 2 através de modelos com valores relativos.

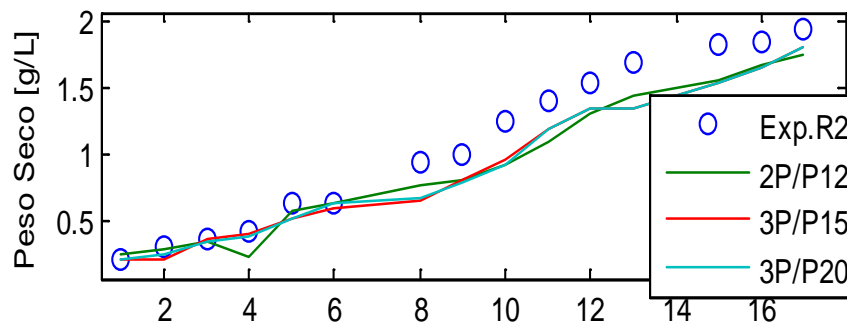


Figura 4.26. Predição do reator 2 utilizando modelos com maior  $R^2$  do reator 1 – Intensidade absoluta

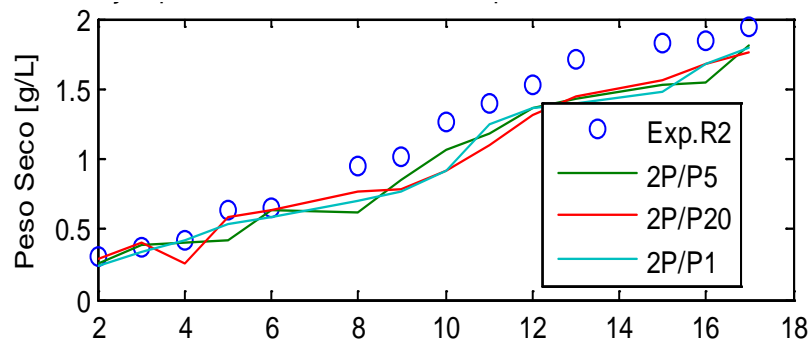


Figura 4.27. Predição do reator 2 utilizando modelos com maior  $R^2$  do reator 1 – Intensidade relativa



Os melhores modelos para o fotobiorreator 1, i.e., apresentaram maiores  $R^2$ , foram usados na predição do fotobiorreator 2 e os resultados são mostrados na Figura 4.26 (para intensidade absoluta), Figura 4.27 (para intensidade relativa) e na Tabela 4.13. Por exemplo, observa-se na Figura 4.27 que um dos melhores ajustes está na curva '2P/P1'. Isto quer dizer que o melhor modelo foi o par da 1ª linha da Tabela 4.13 na coluna de modelos de 2 pares (2P), o que significa que os pares de excitação/emissão foram 360/690 e 355/670.

Tabela 4.13: Coeficiente de determinação dos modelos utilizados para prever o peso seco no Reator 2 utilizando os modelos ajustados para o Reator 1 – Intensidade Absoluta (Abs.) e Intensidade Relativa (Rel.)

Abs.	1 Par (1P) $R^2$	2 Pares (2P) $R^2$	3 Pares (3P) $R^2$	Rel.	1 Par (1P) $R^2$	2 Pares (2P) $R^2$	3 Pares (3P) $R^2$
1	0,940152	0,969525	0,974793	1	0,933252	0,974464	0,970946
2	0,899765	0,969517	0,97479	2	0,882491	0,964942	0,969896
3	0,90827	0,95371	0,971878	3	0,915892	0,965845	0,970433
4	0,906023	0,970832	0,975397	4	0,937378	0,966376	0,970702
5	0,94358	0,975343	0,975606	5	0,947323	0,975273	0,96933
6	0,956774	0,961138	0,974145	6	0,898246	0,965143	0,973132
7	0,890764	0,97128	0,971877	7	0,851509	0,96083	0,971417
8	0,906203	0,955809	0,974431	8	0,850953	0,970153	0,969946
9	0,932661	0,963282	0,971961	9	0,887482	0,948407	0,971513
10	0,895309	0,965717	0,974601	10	0,897099	0,957467	0,971228
11	0,880973	0,975826	0,973418	11	0,949277	0,969015	0,971291
12	0,873842	0,979037	0,974955	12	0,878347	0,953448	0,968245
13	0,86442	0,971169	0,974888	13	0,883327	0,959108	0,969443
14	0,855427	0,960144	0,971971	14	0,860443	0,928272	0,971645
15	0,902259	0,971247	0,9776	15	0,897301	0,972042	0,969277
16	0,857745	0,959177	0,973584	16	0,907507	0,947027	0,971343
17	0,926581	0,959145	0,97307	17	0,919882	0,948294	0,964377
18	0,863273	0,956833	0,974076	18	0,920495	0,96984	0,968633
19	0,849842	0,959597	0,972017	19	0,865384	0,964041	0,97217
20	0,843979	0,960944	0,976679	20	0,905553	0,974947	0,969543

Segundo as comparações dos modelos avaliados com intensidade absoluta e intensidade relativa, pode-se observar que não existe diferença significativa entre elas. Modelos com 2 pares já fornecem parâmetros que podem prever adequadamente o comportamento entre fotobiorreatores. Os resultados mostram que os melhores valores de medida de emissão estão entre 600 nm a 800 nm e de excitação entre 300 a 400 nm, o que contribui a reduzir o tempo de medição no equipamento.

A espectroscopia de fluorescência demonstra ser útil para a determinação da concentração de biomassa nos fotobiorreatores.

O método de espectroscopia de fluorescência se torna interessante pelo fato de registrar dados de um plano espectral, o que não é possível no método de espectrofotometria que só permite determinar a biomassa num certo comprimento de onda. Isto torna o método mais robusto e útil para obter informação de outras substâncias presentes nas amostras medidas. Outro diferencial é o fato de não precisar diluir a amostra para que seja medida no espectrofluorômetro. Isto abre a possibilidade de usar um sensor de fibra ótica dentro dum fotobiorreator e obter os dados em tempo real, o qual permite menos manipulação do cultivo e reduz a possibilidade de contaminação por fatores externos.

## Capítulo 5 – Conclusões e Trabalhos Futuros

### 5.1 Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que é possível utilizar a microalga *Scenedesmus sp.* no tratamento de vinhaça de etanol, pela utilização de macronutrientes presentes neste efluente para produção de biomassa. Comprovou-se que a *Scenedesmus sp.* consegue se adaptar em meio de cultivo misturado com vinhaça e é capaz de reduzir o DBO entre 95 e 98%, o nitrogênio entre 65,5 e 96% e o fósforo entre 98,4 e 99,9%. Nos cultivos que continham vinhaça até um 31,9%, houve remoção praticamente total do fósforo (98,8%) e do nitrogênio (96%) existentes.

Na primeira fase deste projeto, observou-se que o ponto máximo da fase exponencial se atinge entre o 5° e 10° dia, ponto onde pode ser possível realizar repicagens para novos cultivos.

Para o planejamento experimental DCCR 1, concluiu-se que as variáveis temperatura, nutrientes e intensidade luminosa são fatores significativos que influem no crescimento da *Scenedesmus sp.* em meio Guillard Modificado.

Para os experimentos com adição de vinhaça no meio de cultivo, concluiu-se que as microalgas conseguem viver em meio de cultivo misturado com vinhaça. O planejamento fatorial demonstrou que o uso de 50% de vinhaça no meio de cultivo produz uma quantidade menor que 0,5 g/L de microalgas em 10 dias.

O DCCR 2 utilizando vinhaça demonstrou que os fatores significativos foram a intensidade de nutrientes e a dose de vinhaça, observando-se que é possível cultivar microalgas com doses de vinhaça de até 40%.

Foi avaliado o consumo de nitrogênio e fósforo em cultivos com intensidade luminosa de 10000 lux em doses entre 8,1% e 31,9% de vinhaça, observando-se

que o nitrogênio foi consumido em quase 100% em cultivos que contém 20 a 31,9% de vinhaça. O fósforo foi consumido em todos os casos, o que poderia significar que ele foi um limitante no crescimento de microalgas. Isto demonstra que por um lado a vinhaça pode ser usada como uma excelente fonte de nutrientes para a produção de microalgas e que por outro as microalgas podem ser consideradas uma excelente forma de remover nitrogênio e fósforo da vinhaça.

Os resultados obtidos pelas medidas de fluorescência mostram que os melhores valores de medida de emissão estão entre 600 nm a 800 nm e de excitação entre 300 a 400 nm, o que contribui a reduzir o tempo de medição no equipamento. Também se pode concluir neste estudo que não existe diferença significativa entre as intensidades absolutas e relativas. Os melhores pares para prever o comportamento do crescimento microalgal foram: Ex335/Em715 e Ex275/Em625, Ex295/Em685 e Ex335/Em710, tanto para intensidades absolutas como relativas. Uma vez obtidos os parâmetros dos modelos em cada fotobiorreator foi possível prever o comportamento do crescimento das microalgas, tornando a fluorescência um método útil para realizar medições.

Comparando o método de espectrofotometria e o de espectroscopia de fluorescência, é possível concluir que ambos mostraram serem métodos adequados, precisaram de pequenas alíquotas de amostras para serem medidas e tiveram boas correlações com os valores obtidos de peso seco. A espectrofotometria permite obter os valores de biomassa num determinado comprimento de onda, mas a espectroscopia de fluorescência, além da determinação da biomassa, permite registrar mais informação de outras substâncias presentes nas amostras medidas.

### 5.1.1 Trabalhos futuros

Para otimizar a produção de microalgas e ao mesmo tempo tratar doses maiores de vinhaça, poder-se-ia avaliar se o que influi no crescimento de microalgas é a presença de sólidos presentes na vinhaça, que dificultaria a passagem da luz e não permitiria a absorção de luz nas microalgas. Ao mesmo tempo poder-se-ia comprovar a hipótese de que por esse mesmo motivo elas tendem a acumular nitrogênio para produzir lipídios. Com base nestes resultados, fica como indicativo para um estudo futuro o acompanhamento do consumo de nitrogênio pela *Scenedesmus sp.* determinando o tempo exato de consumo total de nitrogênio em função da porcentagem adicionada de vinhaça no meio.

Há muitos aspectos que devem ser considerados para poder implementar este trabalho, como por exemplo qual vai ser a disposição da vinhaça tratada e qual vai ser a disposição das microalgas produzidas. Análises posteriores poderiam demonstrar que a biomassa produzida pode ser uma excelente fonte de nutrientes para ser usada como adubo ou para alimentação animal. No caso do efluente, pode ser usado para fertirrigação ou também para lavagem de equipamento e áreas verdes dentro da empresa.

## Referências

BARBATO, F. Tecniche di Coltura di Microalghe. **Italian National Agency for New Technologies, Energy and Sustainable Economic Development**, 2009.

BARROCAL, V. M. et al. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 851-856, // 2010.

BECKER, E. W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. In: ON, C.-P. (Ed.). 1. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Germany, 1993. p.304. ISBN 9780521350204.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 3// 2007. ISSN 0734-9750.

BERTOLDI, F. C. et al. **Biorremocão de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris***. SC Brasil: UNOESC, Brasil. 7 2007.

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, A. L. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 9-15, 1998.

BIASE, L. P. D. **Aspectos Gerais da concentração das vinhaças**. SP Brasil: Workshop de gestão de energia e resíduos na agroindústria scroalcooleira 2007.

BOUCHARD, J. et al. Analytical methodology for biomass pretreatment - part 1: Solid residues. **Biomass**, v. 23, n. 4, p. 243-261, // 1990.

CETESB. **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola** 2006.

CHAICHALERM, S. et al. Culture of microalgal strains isolated from natural habitats in Thailand in various enriched media. **Applied Energy**, v. 89, n. 1, p. 296-302, // 2012.

CHIA, M. A. et al. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 128–129, n. 0, p. 171-182, 3/15/ 2013. ISSN 0166-445X.

CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5330-5336, // 2010.

CLARK, T. A.; MACKIE, K. L. Steam explosion of the softwood *pinus-radiata* with sulfur-dioxide addition. 1.Process optimization. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 7, n. 3, p. 373-403, 1987. ISSN 0277-3813. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987L499100007 >.

CORAZZA, R. I.; SALLES FILHO, S. L. M. **Opções produtivas mais limpas: uma perspectiva evolucionista a partir de um estudo de trajetória tecnológica na agroindústria canvieira**. XXI Simpósio de Gestão da Inovação da Tecnológica. São Paulo, Brasil 2000.

CORTEZ, L.; MAGALHAES, P.; HAPPI, J. Principais subprodutos da agroindústria canvieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, n. 2, 1992.

DE SÁ, J. P. M. **Applied Statistic: Using Spss, Statistica and Matlab**: Springer Verlag 2003.

D'AQUINO, C. A.; SCHROEDER, L. **Proposta de sistema de baixo custo para cultivo de microalgas**. 2009. Departamento acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.

FAO. **La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura**. Project reports (not in a Series). NATIONS, F. A. A. O. O. T. U. 1989.

FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. D. **Compostagem de resíduos agroindustriais utilizando tecnologia de compostagem de baixo custo**. Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19Feira Internacional de Tecnologias de Saneamento Ambiental, 2 - FITABES'97; 14-19 set. 1997. AMBIENTAL, A. B. D. E. S. E. Foz do Iguaçu 1997.

FERNÁNDEZ, J. M. **Optimización del cultivo a la intemperie y producción de exopolisacárido por el alga verde-azulada (cianobacteria) *anabaena sp.* ATCC 33047**. 1995. Facultad de biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V.; ROSA, A. H. **Meio Ambiente E Sustentabilidade** 2012.

FREIRE, W. J.; CORTÊZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**: Agropecuaria: 203 p. 2000.

GARIGLIO, H. A. D. A. **Alterações físicas e químicas e mobilidade de solutos em solos submetidos à aplicação de vinhaça proveniente da fabricação de álcool carburante**. 2008. (Mestrado). Engenharia agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais Brasil.

GIACHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. **Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar**. São Paulo - Brasil 2009.

GODINHO, L. R.; GONZÁLEZ, A. A. C.; BICUDO, C. E. D. M. **Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae)**. Hoehnea: Instituto de Botânica. 37 2010.

GONG, Y. et al. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: Progress and prospects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1879-1890, // 2011.

GRACIANO, W. P. **Delineamento das condições biológicas e físico-químicas para biodigestão de vinhaça**. 2007. (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental). Centro de ciências exatas, naturais e tecnológicas, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

GRANATO, E. F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbica da vinhaça**. 2003. (Mestrado Engenharia Industrial). Universidade Estadual Paulista, SP, Brasil.

GRIS, L. R. S. **Produção da microalga *Nannochloropsis oculata* em fotobiorreator airlift**. 2011. (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de engenharia química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS Brasil.

HANTELMAANN, K. et al. Two-dimensional fluorescence spectroscopy: A novel approach for controlling fed-batch cultivations. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 410-417, 2/10/ 2006. ISSN 0168-1656.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6th. Ed. Ltc, 2005. ISBN 9788521620426.

HIDALGO, K. et al. **Vinhaça de destilaria como aditivo alternativo na alimentação de aves**. XXII Congresso Latino-Americano de aves. Buenos Aires Argentina 2011.

HITZMANN, B. et al. **Chemometric models for the on-line estimation of bioprocess variables from 2-D fluorescence spectra. 7th International Conference on Computer Applications in Biotechnology.** Osaka, Japan: 415 - 456 p. 1998.

HO, S.-H.; CHEN, W.-M.; CHANG, J.-S. Scenedesmus obliquus CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8725-8730, 11// 2010. ISSN 0960-8524.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, // 2012.

IBAPE. **Trabalho de perícia.** XV COBREAP - Congresso brasileiro de engenharia de avaliações e perícias. SP Brasil, p.53. 2009

JARAMILLO CHAMBA, R. A. **Efecto de la vinaza, en el rendimiento de una mezcla forrajera establecida en un andisol.** 2010. Facultad de ingeniería química y agroindustrial, Escuela Politécnica Nacional Quito Perú.

JAVANMARDIAN, M.; PALSSON, B. **High-density photoautotrophic algal cultures: design, construction, and operation of a novel photobioreactor system.** 1991.

JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, n. 0, p. 70-77, 5// 2012. ISSN 0981-9428.

KIM, M. K. et al. Enhanced production of Scenedesmus spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2220-2228, 8// 2007. ISSN 0960-8524.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, // 2009.

LAIME, E. M. O. et al. **Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão:** Revista Trópica - Ciencia Agrarias e Biológicas. 5: 16 p. 2011.

LARKUM, A. W. D. et al. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198-205, 4// 2012. ISSN 0167-7799.

LIMA, D. J. D. **Elementos tecnológicos para aproveitamento da vinhaça. Tecnología em biocombustíveis** Araçatuba, SP Brasil: Faculdade de Tecnologia de Araçatuba 2012.



LOURENÇO, S. D. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. 2006. 606 ISBN 9788576561132.

MIRANDA, J. R. P. D. C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. (Mestrado em Energia e Bioenergia). Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

MIRANDA, M. Z. **Que a clorofila pode fazer por você?**: EMBRAPA. 15 2002.

MUTANDA, T.; KARTHIKEYAN, S.; BUX, F. The utilization of post-chlorinated municipal domestic wastewater for biomass and lipid production by *Chlorella* spp. under batch conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, p. 1126-1138, // 2011.

MÉNDEZ, L. S. et al. **Crecimiento de *scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de trelew, chubut, argentina**. 2010. Facultad de Ciencias Naturales – UNPSJB

OLIVARES, R. E. **Producción de Aceite para Usos Industriales a partir de la Microalga *Scenedesmus Obliquus***. 2010. Universidad de El Salvador

PREZOTTO, P. **Biodegradação do carbono orgânico, mineralização do nitrogênio e alterações química em solos tratados com vinhaça**. 2009. (Mestrado em agricultura Tropical e Subtropical). Gestão de recursos agroambientais, Instituto agrônômico, SP Brasil.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, p. 1609-1612, 2008. ISSN 0100-4042.

RADMANN, E. M. et al. **Cultivo de microalgas para a biofixação de CO<sub>2</sub> e obtenção de biocombustíveis**. 2011. Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande RS.

RAMOS, L. M. P.; SILVA, I. M.; CAMARA, F. M. **Análise ecológica da comunidade fitoplanctônica da lagoa Nova Brasília. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**. João Pessoa - PB 2007.

REZENDE DE MELLO, E. J. **Tratamento de esgoto sanitário: Avaliação da estação de tratamento do esgoto do bairro Novo Horizonte na cidade de Araguari - MG**. 2007. (Pós-graduação lato sensu). Engenharia Sanitária, Uniminas, Uberlandia.

RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 441-451, 2000/10/01 2000. ISSN 0921-8971.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos 2**. SP Brasil: 2009.

SANTOS, J. D. D. **Utilização da vinhaça como componente de solução nutritiva para hidroponia**. 2010. 78 (Mestrado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná

SCHEPER, T. et al. Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 1–3, p. 121-134, 11/22/ 1999. ISSN 0003-2670.

SERVAITES, J. C.; FAETH, J. L.; SIDHU, S. S. A dye binding method for measurement of total protein in microalgae. **Analytical Biochemistry**, v. 421, n. 1, p. 75-80, // 2012.

SILVA, M. A. S. D.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, p. 108-114, 2007. ISSN 1415-4366.

SINOGAS, C.; ALHO, L.; BRITO, I. **Microbiologia: Textos de apoio e Manual Prático**. Departamento de Biologia: Universidade de Évora 2003/2004.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídios de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. 2010. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

SOLLE, D. et al. Chemometric modelling based on 2D-flourescence spectra without a calibration measurement. **Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 173-177, // 2003.

STEIN, J. R. **Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge University, 1979.

TAKEDA, H. Cell wall sugars of some Scenedesmus species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 673-675, 6// 1996. ISSN 0031-9422.

TAMANINI, E. A. **Movimentação de ions provenientes de vinhaça em canais condutores, área de sacrificio e área de lavoura em diferentes profundidades**. Engenharia agrícola. Paraná, Brasil: Universidade Estadual de Maringá. Graduação 2008.

TESSELE, F.; RUBIO, J. **Tratamento de efluentes líquidos no setor mineiro-metalúrgico**. UFMG, B. H. Belo horizonte MG Brasil: p. 211-223 p. 2008.

UNESP. **Vinhaça**. Termo de referência para o workshop tecnológico. SP Brasil: Universidade estadual Paulista 2007.

UNICA. Moagem de cana de açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2011/2012. 2012.

VOET, D. et al. **Bioquímica**. Artmed, 2006. ISBN 85363068079788536306803.

WALTER, A. Bio-Ethanol Development(s) in Brazil. In: SOETAERT, W. e VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biofuels**. Bélgica: Ghen University, 2009. cap. Chapter 4,

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63-102, // 2000.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 7// 2010. ISSN 0960-8524.

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, n. 3, p. 3098-3102, 2// 2011. ISSN 0960-8524.

ZHAO, G. et al. Ultrasound assisted extraction of carbohydrates from microalgae as feedstock for yeast fermentation. **Bioresource Technology**, v. 128, n. 0, p. 337-344, 1// 2013. ISSN 0960-8524.

ZHEN-FENG, S. et al. Culture of *Scenedesmus* sp. LX1 in the modified effluent of a wastewater treatment plant of an electric factory by photo-membrane bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7627-7632, // 2011.

ZHENG, Y.; LIN, H. M.; TSAO, G. T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 6, p. 890-896, // 1998.

ÓRPEZ, R. et al. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, v. 246, n. 1-3, p. 625-630, // 2009.



# **Apêndice**



## **Apêndice I – Análises de laboratório de vinhaça**





## RELATÓRIO DE ENSAIO N° 1130/12

Cliente: JORGE OTÁVIO TRIERWEILER - CNPq

Endereço: Rua Engenheiro Luiz Englert – Prédio 12204 – Porto Alegre/RS

Pg.: 01/01


Data da emissão do relatório: 03/12/2012  
 Número da amostra: 1130/12  
 Identificação da amostra: Vinhaçado processo de produção do etanol de COOPERCANA  
 Procedência da amostra: COOPERCANA - Porto Xavier  
 Data de coleta da amostra: 10/11/2012 Horário de coleta: Não informado  
 Data de recebimento: 20/11/2012 Horário de recebimento: 10h00min  
 Responsável pela coleta: Não informado  
 Período de execução dos ensaios: 20/11/2012 á 03/12/2012

Ensaio	Resultado	Metodologia utilizada	Limite de detecção
Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)	7410	SMEWW - Método 5210 B	1
Nitrogênio total (mg N/L)	111,8	SMEWW - Método 4500 N	5,00
Nitrato ( NO <sub>3</sub> mg/L)*	245,51	ABNT NBR 12620-1992	0,01
Fósforo total (mg P/L)*	24,486	SMEWW - Método 4500-P E	0,010
Sulfatos (mg SO <sub>4</sub> /L)	250	SMEWW - Método 4500 SO <sub>4</sub> - E	1
Cobre Total(mg Cu/L)*	0,102	SMEWW - Método 3030E e 3111B	0,023
Ferro (mg/L)*	29,180	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,064
Cálcio (mg/L)	89,28	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,01
Magnésio (mg/L)	69,05	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,01
Manganês (mg/L)*	11,94	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,04
Sódio (mg/L)	2,30	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,01
Zinco (mg/L)*	1,195	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,034
Potássio (mg/L)	557,57	SMEWW - Método 3030 E e 3111 B	0,01

### NOTA:

- 1.SMEWW: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2012), 22ª edição.
2. ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas.
3. O Laboratório está cadastrado junto à FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob CINTER sob n° 00088/2011-DL.
4. A incerteza das medições não foi solicitada pelo Cliente.
- 5.Os parâmetros analisados foram exclusivamente os solicitados pelo Cliente, sendo executado com sua autorização mesmo fora do prazo de execução e preservação.
6. Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada que foi coletada na data especificada no presente documento, não sendo permitida a reprodução parcial deste documento.
- 7.A amostragem é de responsabilidade do cliente.
8. \* Ensaios reconhecidos pela Rede Metrológica - RS, de acordo com o Certificado de Reconhecimento N° 3415.
- 9.As amostras serão descartadas 07 dias após a emissão deste Relatório.

### LEGENDA:

  
 Kátia Maria Bisol Ramon  
 Responsável Técnico  
 Eng°. Químico - CRQ 5ª R 05301514



**Apêndice II – Análise de vinhaça  
tratada com microalgas**



## RELATÓRIO DE ENSAIO N° 0011/13

Cliente: JORGE OTÁVIO TRIERWEILER - CNPq

Endereço: Rua Engenheiro Luiz Englert – Prédio 12204 – Porto Alegre/RS

Pg.: 01/01

Data da emissão do relatório: 29/01/2013  
Número da amostra: 0011/13  
Identificação da amostra: P 2-1: vinhaça tratada (cultivo de microalgas com 8,1% de vinhaça)  
Procedência da amostra: DEQUI - UFRGS  
Data de coleta da amostra: 21/01/2013 Horário de coleta: Não informado  
Data de recebimento: 23/01/2013 Horário de recebimento: 14h00min  
Responsável pela coleta: Nelzy Neyza Vargas Ramirez  
Período de execução dos ensaios: 23/01/2013 a 29/01/2013

Ensaio	Resultado	Metodologia utilizada	Limite de detecção
Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> / L)	23	SMEWW - Método 5210 B	1
Nitrogênio total (mg N/L)	50,25	SMEWW - Método 4500 N	-
Fósforo total (mg P/L)*	0,020	SMEWW - Método 4500-P E	0,010

### NOTA:

1. SMEWW: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2012), 22ª edição.
2. O Laboratório está cadastrado junto à FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob CINTER sob n° 00088/2011-DL.
3. A incerteza das medições não foi solicitada pelo Cliente.
4. Os parâmetros analisados foram exclusivamente os solicitados pelo Cliente, sendo executado com sua autorização mesmo fora do prazo de execução e preservação.
5. Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada que foi coletada na data especificada no presente documento, não sendo permitida a reprodução parcial deste documento.
6. A amostragem é de responsabilidade do cliente.
7. \* Ensaio reconhecido pela Rede Metrológica - RS, de acordo com o Certificado de Reconhecimento N° 3415.
8. As amostras serão descartadas 07 dias após a emissão deste Relatório.

### LEGENDA:

Raquel Andreola Valente  
Responsável Técnico Substituto  
Eng°. Químico - CRQ 5ª R 05302539



## RELATÓRIO DE ENSAIO Nº 0008/13

Cliente: JORGE OTÁVIO TRIERWEILER - CNPq

Endereço: Rua Engenheiro Luiz Englert – Prédio 12204 – Porto Alegre/RS

Pg.: 01/01

Data da emissão do relatório: 29/01/2013  
Número da amostra: 0008/13  
Identificação da amostra: P 1-2: vinhaça tratada (cultivo de microalgas com 20% de vinhaça)  
Procedência da amostra: DEQUI - UFRGS  
Data de coleta da amostra: 21/01/2013 Horário de coleta: Não informado  
Data de recebimento: 23/01/2013 Horário de recebimento: 14h00min  
Responsável pela coleta: Nelzy Neyza Vargas Ramirez  
Período de execução dos ensaios: 23/01/2013 a 29/01/2013

Ensaio	Resultado	Metodologia utilizada	Limite de detecção
Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> / L)	38	SMEWW - Método 5210 B	1
Nitrogênio total (mg N/L)	15,55	SMEWW - Método 4500 N	-
Fósforo total (mg P/L)*	0,288	SMEWW - Método 4500-P E	0,010

### NOTA:

1. SMEWW: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2012), 22ª edição.
2. O Laboratório está cadastrado junto à FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob CINTER sob nº 00088/2011-DL.
3. A incerteza das medições não foi solicitada pelo Cliente.
4. Os parâmetros analisados foram exclusivamente os solicitados pelo Cliente, sendo executado com sua autorização mesmo fora do prazo de execução e preservação.
5. Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada que foi coletada na data especificada no presente documento, não sendo permitida a reprodução parcial deste documento.
6. A amostragem é de responsabilidade do cliente.
7. \* Ensaios reconhecidos pela Rede Metrológica - RS, de acordo com o Certificado de Reconhecimento Nº 3415.
8. As amostras serão descartadas 07 dias após a emissão deste Relatório.

### LEGENDA:

-

Raquel Andreola Valente  
Responsável Técnico Substituto  
Engº. Químico - CRQ 5ª R 05302539





## RELATÓRIO DE ENSAIO N° 0009/13

Cliente: JORGE OTÁVIO TRIERWEILER - CNPq

Endereço: Rua Engenheiro Luiz Englert – Prédio 12204 – Porto Alegre/RS

Pg.: 01/01

Data da emissão do relatório: 29/01/2013  
Número da amostra: 0009/13  
Identificação da amostra: P 1-4: vinhaça tratada (cultivo de microalgas com 31,9% de vinhaça)  
Procedência da amostra: DEQUI - UFRGS  
Data de coleta da amostra: 21/01/2013 Horário de coleta: Não informado  
Data de recebimento: 23/01/2013 Horário de recebimento: 14h00min  
Responsável pela coleta: Nelzy Neyza Vargas Ramirez  
Período de execução dos ensaios: 23/01/2013 a 29/01/2013

Ensaio	Resultado	Metodologia utilizada	Limite de detecção
Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> / L)	106	SMEWW - Método 5210 B	1
Nitrogênio total (mg N/L)	5,44	SMEWW - Método 4500 N	-
Fósforo total (mg P/L)*	0,218	SMEWW - Método 4500-P E	0,010

### NOTA:

1. SMEWW: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2012), 22ª edição.
2. O Laboratório está cadastrado junto à FEPAM como Laboratório de Análises Ambientais sob CINTER sob n° 00088/2011-DL.
3. A incerteza das medições não foi solicitada pelo Cliente.
4. Os parâmetros analisados foram exclusivamente os solicitados pelo Cliente, sendo executado com sua autorização mesmo fora do prazo de execução e preservação.
5. Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada que foi coletada na data especificada no presente documento, não sendo permitida a reprodução parcial deste documento.
6. A amostragem é de responsabilidade do cliente.
7. \* Ensaio reconhecidos pela Rede Metrológica - RS, de acordo com o Certificado de Reconhecimento N° 3415.
8. As amostras serão descartadas 07 dias após a emissão deste Relatório.

### LEGENDA:

-

Raquel Andreola Valente  
Responsável Técnico Substituto  
Engº. Químico - CRQ 5ª R 05302539



## Apêndice III – Dados complementares

### III.1 Determinação de crescimento de microalgas usando espectroscopia de fluorescência

Como foi mencionado na seção 4.5, segue a análise dos dados de fluorescência no reator 2 da Figura 4.3. Primeriamente serão avaliados modelos com dados de intensidade absoluta e depois com intensidade relativa. Finalmente, se usará os modelos ajustados para prever o peso seco do reator 1, que já foi analisado na seção 4.5.

#### Intensidade absoluta Reator 2

Igualmente foi avaliado o ajuste de modelos de 1 e 2 pares para o reator 2. A Figura III.1 mostra o resultado do ajuste dos modelos com o maior coeficiente de determinação para 1 e 2 pares.

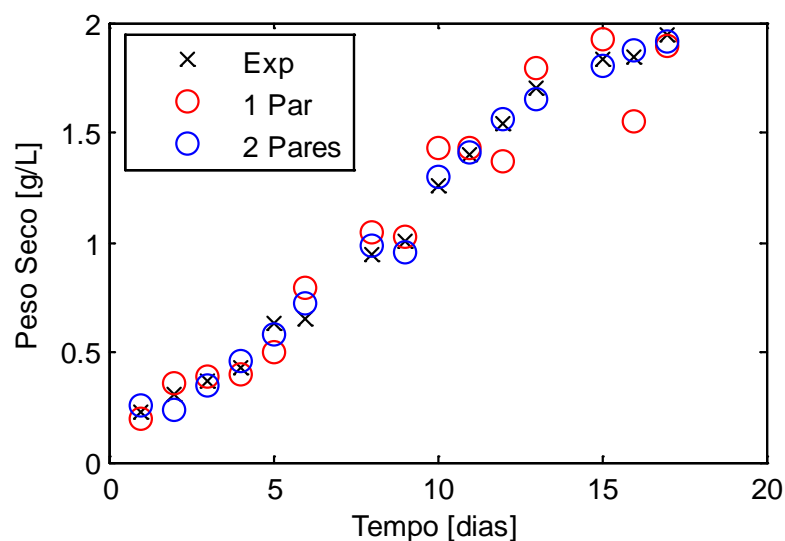


Figura III.1. Modelos com 1 e 2 pares no reator 2 - Intensidade absoluta

O comportamento dos 4 melhores pares identificados com o ajuste de apenas 1 par e o resultado dos ajustes incluindo a identificação dos respectivos pares são mostrados na Figura III.2.

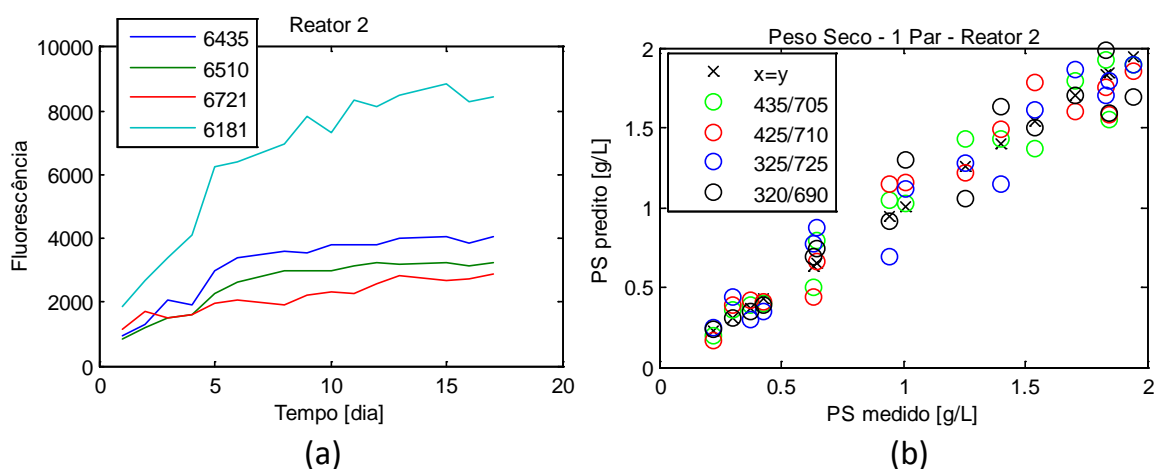


Figura III.2. (a) Intensidade absoluta no reator 2 ao longo do tempo, (b) Relação de peso seco (PS) experimental e peso seco predito para modelos de 2 pares

O melhor par de excitação/emissão para modelos de 1 par foi 435/705 que apresentou um  $R^2$  de 0,9589 (ver Tabela III.1).

Tabela III.1: Pares selecionados para modelos com 1 Par no reator 2 – Intensidade Absoluta

Par	Ex/Em	$R^2$	P1	P2	P3	P4
6435	435/705	0,9589	2,022E-10	-1,231E-06	2,433E-03	-1,1661
6510	425/710	0,9476	4,287E-10	-2,211E-06	3,727E-03	-1,6425
6721	325/725	0,9447	-5,141E-10	3,462E-06	-6,350E-03	3,7623
6181	320/690	0,9358	8,329E-12	-8,559E-08	3,484E-04	-0,1708

Utilizando o ajuste para modelos com 2 pares tem se que os melhores pares foram 295/685 e 365/700 (ver Figura III.3) com um  $R^2$  de 0,9947 (Tabela III.2).

Tabela III.2: Melhores pares selecionados para modelos com 2 pares – Intensidade Absoluta

Par 1	Par 2	$R^2$	p1	p2	p3	p4	p5	p6
295/685	365/700	0,9947	2,228E-07	-4,749E-07	3,095E-07	-1,388E-04	-1,293E-04	0,5447
365/700	285/315	0,9913	1,529E-07	-1,263E-07	4,654E-08	-3,679E-04	1,116E-07	0,6857
295/685	460/715	0,9898	6,715E-08	-3,572E-07	9,464E-07	-1,826E-06	-8,746E-04	0,6153
325/685	440/725	0,9893	-2,537E-08	3,867E-07	5,082E-07	1,048E-04	-4,884E-03	2,9068

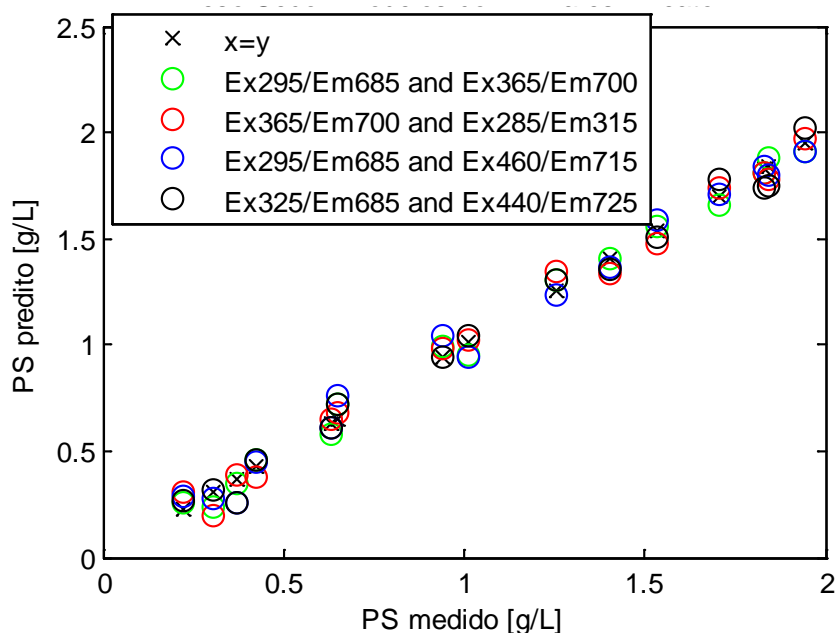


Figura III.3. Modelos com 2 pares no reator 2 – Intensidade absoluta

#### Intensidade relativa Reator 2

Foram avaliadas da mesma forma as intensidades relativas no reator 2. Na Figura III.4 se observa os melhores pares para modelos com 1 e 2 pares.

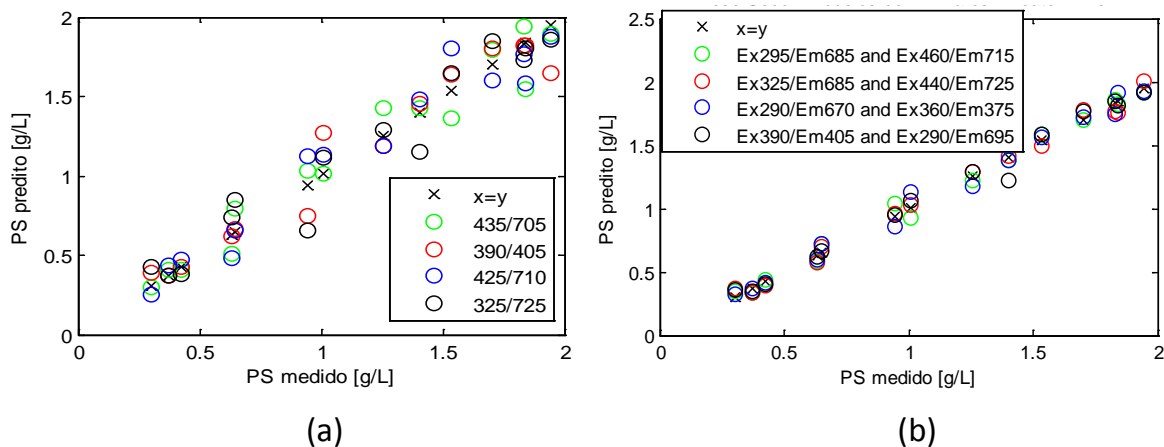


Figura III.4. Modelos no reator 2 – Intensidade absoluta: (a) Modelos com 1 par (b) Modelos com 2 pares

O melhor par de excitação/emissão para modelos de 1 par foi 435/705 (Figura III.4a) que apresentou um  $R^2$  de 0,9589. Para modelos com 2 pares tem-se que os melhores pares foram 295/685 e 460/715 (ver Figura III.4b) com um  $R^2$  de 0,9922.

#### Comparação entre modelos e pares seleccionados

Na Tabela III.3 tem-se a comparação de pares seleccionados para conhecer quais poderiam ser os melhores valores de excitação e emissão em cada reator. Observa-se que existem pares em comum entre intensidades de fluorescência absoluta e relativa, além de valores comuns entre os dois reatores, o que permite

verificar se é possível prever o peso seco de um reator com o modelo do outro reator.

Tabela III.3: Modelos e pares selecionados

	Reator 1				Reator 2			
	Absoluto		Relativo		Absoluto		Relativo	
	Par	R <sup>2</sup>	Par	R <sup>2</sup>	Par	R <sup>2</sup>	Par	R <sup>2</sup>
<b>1 Par</b>	325/725	0,9324	325/725	0,9275	435/705	0,9589	435/705	0,953
	360/690	0,9315	360/690	0,9221	425/710	0,9476	390/405	0,9483
	295/685	0,9097	300/685	0,9106	325/725	0,9447	425/710	0,9453
	325/685	0,9096	425/710	0,9092	320/690	0,9358	325/725	0,9383
<b>2 Pares</b>	335/715 275/625	0,9913	360/390 355/370	0,9960	295/685 365/700	0,9947	295/685 460/715	0,9922
	295/685 335/710	0,9888	335/715 275/625	0,9935	365/700 285/315	0,9913	325/685 440/725	0,992
	325/725 450/740	0,9837	295/685 335/710	0,9927	295/685 460/715	0,9898	290/670 360/375	0,9893
	285/315 395/710	0,9835	300/685 575/695	0,9880	325/685 440/725	0,9893	390/405 290/695	0,9891

### Modelos ajustados do reator 2 para prever o peso seco do reator 1

De modo similar, foram usados modelos do reator 2 para prever o comportamento do reator 1

Na Figura III.5 têm-se os melhores modelos de 1, 2 e 3 pares usados para prever o peso seco no Reator 1 utilizando os modelos ajustados do reator 2 com intensidades absolutas (Figura III.5a) e intensidades relativas (Figura III.5b).

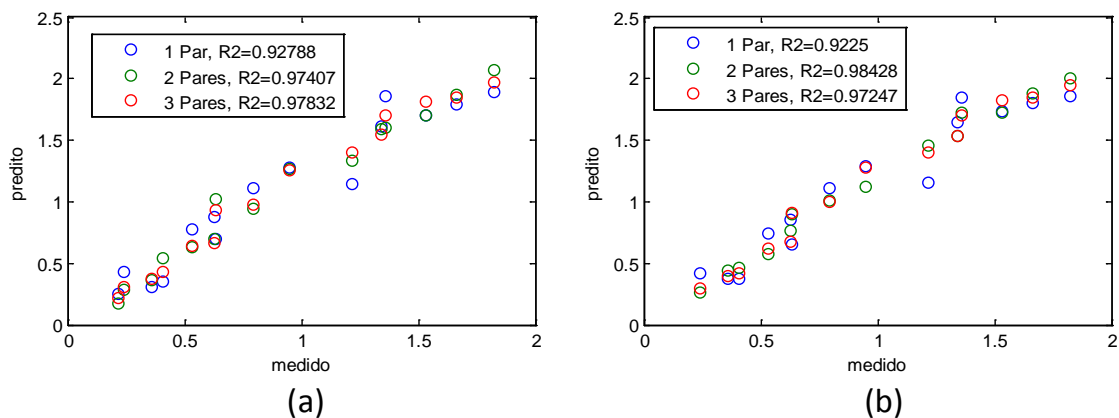


Figura III.5. Melhores pares do reator 2 usados para prever peso seco no reator 1 (a) Intensidade absoluta (b) Intensidade relativa

Assim, na Figura III. 5 observam-se os melhores pares usados para determinar o peso seco no reator 1, especificando quais foram os melhores modelos de pares com dados absolutos. Na Figura III.6, tem-se a predição de peso seco utilizando os dados relativos.

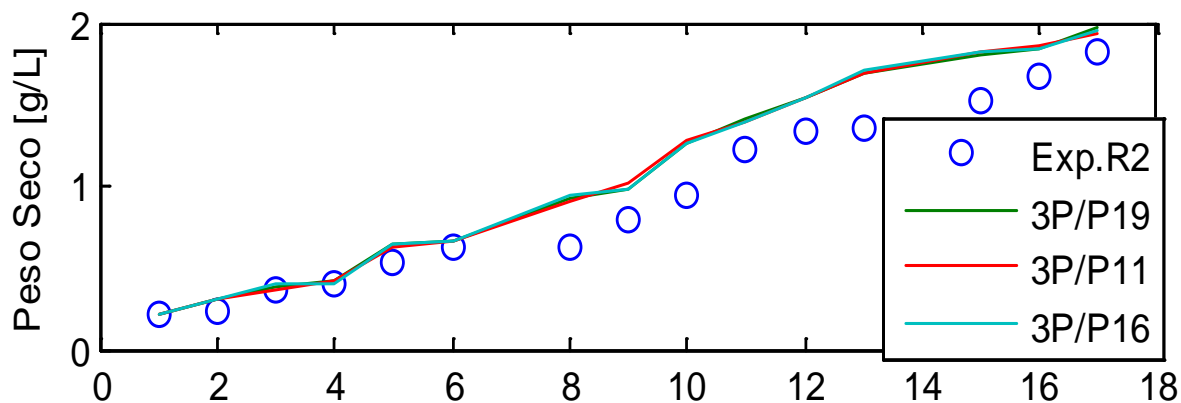


Figura III. 5. Predição do reator 1 utilizando modelos do reator 2 – Intensidade absoluta

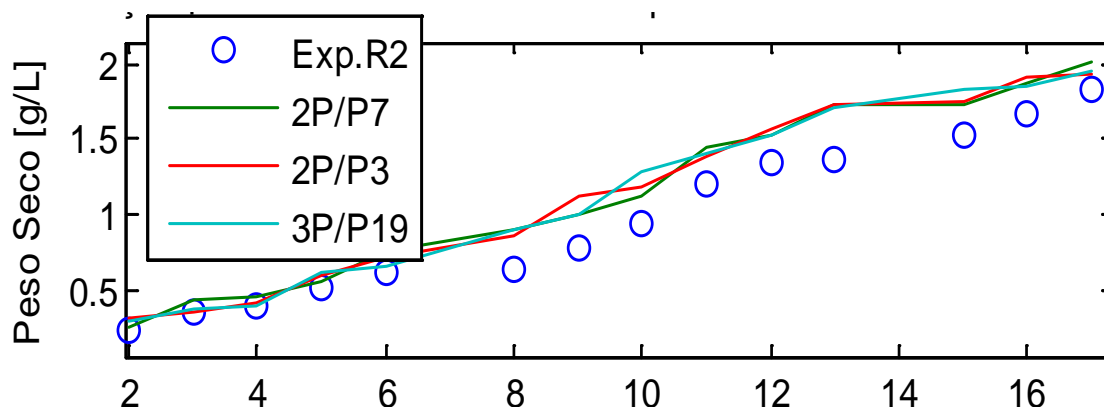


Figura III.6. Predição do reator 1 utilizando modelos do reator 2 – Intensidade relativa

A Tabela III.4 mostra os valores que ajustaram melhor os modelos do reator 2 para prever o peso seco no reator 1, calculados com intensidades absolutas (Figura III. 5) e intensidade relativa (Figura III.6) .

Tabela III.4: Coeficiente de determinação dos modelos utilizados para prever o peso seco no Reator 1 utilizando os modelos ajustados para o Reator 2 – Intensidade Absoluta (Abs.) e Intensidade Relativa (Rel.)

Abs.	1 Par R <sup>2</sup>	2 Pares R <sup>2</sup>	3 Pares R <sup>2</sup>	Rel.	1 Par R <sup>2</sup>	2 Pares R <sup>2</sup>	3 Pares R <sup>2</sup>
1	0,90115	0,97065	0,97497	1	0,889975	0,959502	0,969999
2	0,900548	0,956446	0,97354	2	0,906355	0,957189	0,970088
3	0,927881	0,958935	0,973669	3	0,901559	0,972777	0,969608
4	0,891564	0,959987	0,973881	4	0,922497	0,947274	0,969257
5	0,868033	0,951541	0,974581	5	0,874959	0,947878	0,97042
6	0,875803	0,945219	0,973319	6	0,901989	0,950029	0,969447
7	0,863115	0,956822	0,974318	7	0,879937	0,984284	0,966989
8	0,832306	0,955273	0,97174	8	0,847963	0,953353	0,970693
9	0,901873	0,941273	0,975326	9	0,865196	0,95729	0,971704
10	0,844391	0,950957	0,974043	10	0,856595	0,964358	0,970689
11	0,829008	0,969157	0,976463	11	0,850501	0,942673	0,96904
12	0,890184	0,949764	0,972561	12	0,866685	0,945889	0,971554
13	0,90299	0,974007	0,971924	13	0,81544	0,929712	0,971843
14	0,920023	0,955141	0,972742	14	0,857356	0,938059	0,971739
15	0,859396	0,949641	0,971744	15	0,881227	0,970685	0,968785
16	0,865559	0,974066	0,975612	16	0,891186	0,949651	0,969681
17	0,884873	0,970798	0,971304	17	0,821324	0,970582	0,967205
18	0,815385	0,956736	0,971541	18	0,886076	0,926914	0,970724
19	0,852825	0,937255	0,978321	19	0,875062	0,951292	0,972474
20	0,824122	0,958232	0,972686	20	0,809873	0,950005	0,969

Como pode ser observado, os modelos do reator 2 puderam ser usados para prever o comportamento do reator 1, demonstrando que é possível usar o método de espectroscopia de fluorescência como método alternativo para o seguimento do crescimento de microalgas em fotobiorreatores.



### III. 2 Dados experimentais

*Tempo máximo de crescimento e taxa específica de crescimento:*

A taxa de crescimento torna-se maior e aproximadamente constante durante a fase exponencial de crescimento das microalgas (fase em que as microalgas se multiplicam rapidamente). Ao atingir o tempo máximo de crescimento se verifica o decrescimento relativo da taxa de crescimento, ponto em que a curva passa da fase exponencial à fase estacionária (Lourenço, 2006).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (5)$$

Em que:

$dX/dt$ : variação da concentração de biomassa em [g/dia];

X: Concentração de biomassa [g/L];

$\mu$ : Taxa específica de crescimento [ $\text{dia}^{-1}$ ];

t: Tempo [dia]

A partir da equação 5, pode-se integrar entre  $X_0$  e  $X_t$ , obtendo-se a equação 6, que permite determinar o período de duração da fase de crescimento exponencial.

$$\ln \frac{X_t}{X_0} = \mu t \quad (6)$$

Em que,

$X_t$ : Concentração de biomassa no tempo t [g/L];

$X_0$  – Concentração de biomassa no tempo inicial [g/L];

t – Tempo [dia].

Assim, o tempo máximo da fase de crescimento exponencial calculado a partir da equação 6, pode ser observado na Figura III.7. O tempo máximo de crescimento é no 10º dia e a taxa específica de crescimento é de 0,17 [ $\text{dia}^{-1}$ ] para cultivos nas condições de 25°C, 6200 lux fotoperíodo 12h/12h e alimentação de ar de 0,25 v.v.m.

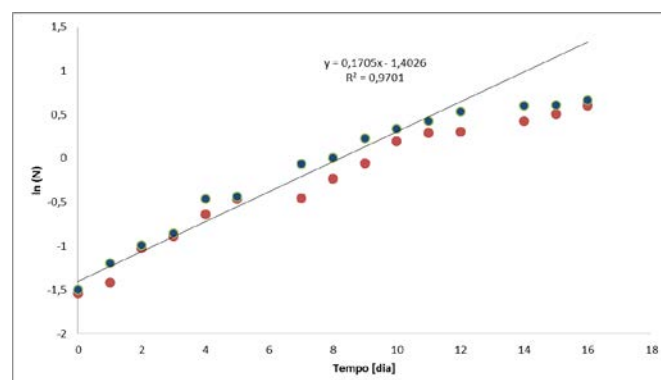


Figura III.7. Curvas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores *air-lift* em meio Guillard Modificado

Tabela III.5: Biomassa produzida em fotobiorreatores *air-lift* nos experimentos definidos no DCCR 1

Experimentos	Temperatura [°C]	Nutrientes [mL/L]	Intensidade luminosa [Lux]	Biomassa [g/L]
1	19,1	16,1	3940,5	0,7966
2	30,9	16,1	3940,5	1,0716
3	19,1	33,9	3940,5	1,4040
4	30,9	33,9	3940,5	1,5346
5	30,9	16,1	8459,5	1,9492
6	19,1	16,1	8459,5	1,8274
7	30,9	33,9	8459,5	3,6108
8	19,1	33,9	8459,5	2,6060
9	15	25	6200	1,1448
10	35	25	6200	2,0758
11	25	10	6200	1,0970
12	25	40	6200	2,1962
13	25	25	2400	0,8952
14	25	25	10000	1,9900
15	25	25	6200	1,8776
16	25	25	6200	1,7506
17	25	25	6200	1,4126
18	25	25	6200	1,7810
19	25	25	6200	1,8550

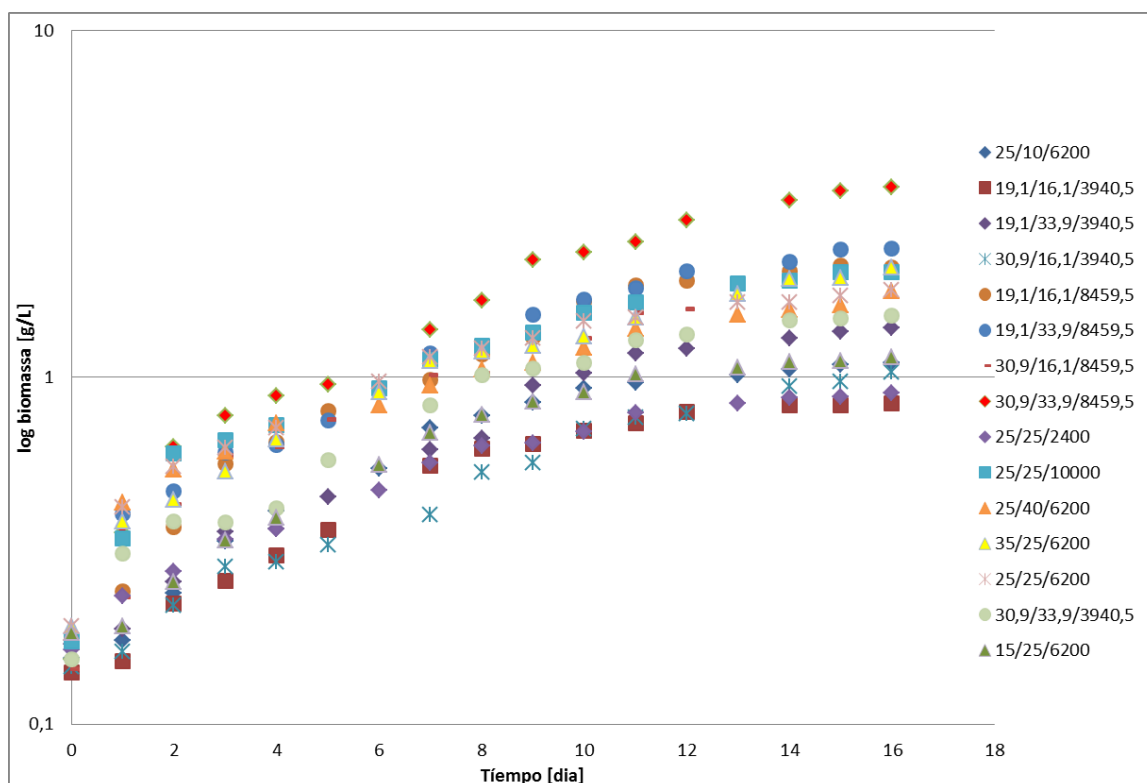
Figura III.8. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores *air-lift* segundo DCCR 1

Tabela III.6: Biomassa produzida em fotobiorreatores air-lift segundo condições definidas no planejamento fatorial usando vinhaça

<b>Experimentos</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Vinhaça [%]</b>	<b>Intensidade luminosa [Lux]</b>	<b>Biomassa [g/L]</b>
1	20	0	2400	0,3499
2	35	0	2400	0,3880
3	20	50	2400	0,1026
4	35	50	2400	0,4326
5	20	0	10000	0,7900
6	35	0	10000	1,0096
7	20	50	10000	0,0983
8	35	50	10000	0,6283
9	27,5	25	6200	0,5218
10	27,5	25	6200	0,4776
11	27,5	25	6200	0,5678

Tabela III.7: Biomassa produzida em fotobiorreatores *air-lift* nos experimentos definidos no DCCR 2

Experimentos	Temperatura [°C]	Vinhaça [%]	Intensidade luminosa [Lux]	Biomassa [g/L]
1	23	8,1	3940,5	0,4824
2	23	31,9	3940,5	0,1478
3	32	8,1	3940,5	0,3385
4	32	31,9	3940,5	0,1896
5	23	31,9	8459,5	0,3351
6	23	8,1	8459,5	0,5266
7	32	31,9	8459,5	0,3446
8	32	8,1	8459,5	0,4872
9	27,5	0	6200	0,5612
10	27,5	40	6200	0,2730
11	20	20	6200	0,3667
12	35	20	6200	0,4638
13	27,5	20	2400	0,2038
14	27,5	20	10000	0,6290
15	27,5	20	6200	0,4589
16	27,5	20	6200	0,3876
17	27,5	20	6200	0,3556
18	27,5	20	6200	0,3848
19	27,5	20	6200	0,4156

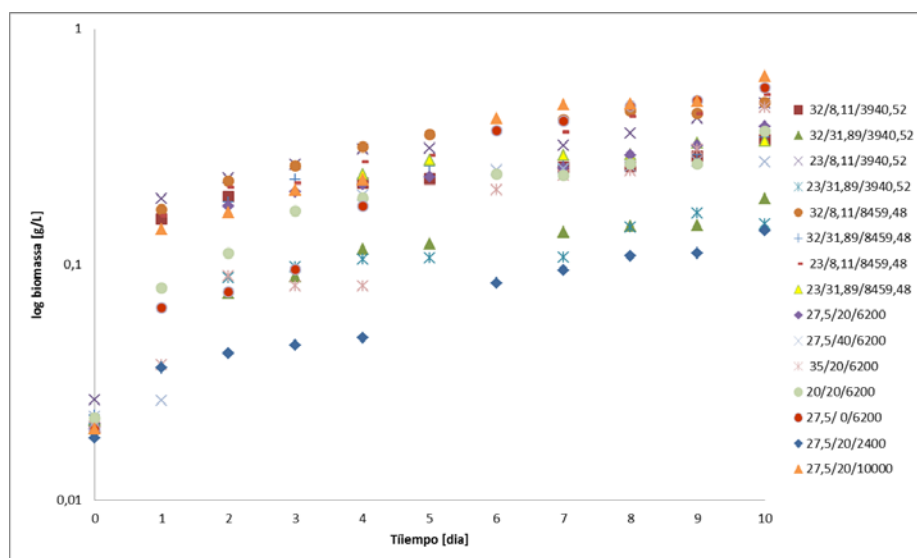
Figura III.9. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores *air-lift* segundo DCCR2

Tabela III.8: Biomassa produzida em fotobiorreatores *air-lift* a diferentes porcentagens de vinhaça

Código de fotobiorreator	Vinhaça [%]	Temperatura [°C]	Intensidade luminosa [Lux]	Biomassa [g/L]
P1-1	8,1	27,5	10000	0,9273
P2-2	20	27,5	10000	0,8117
P2-3	31,9	27,5	10000	0,6021

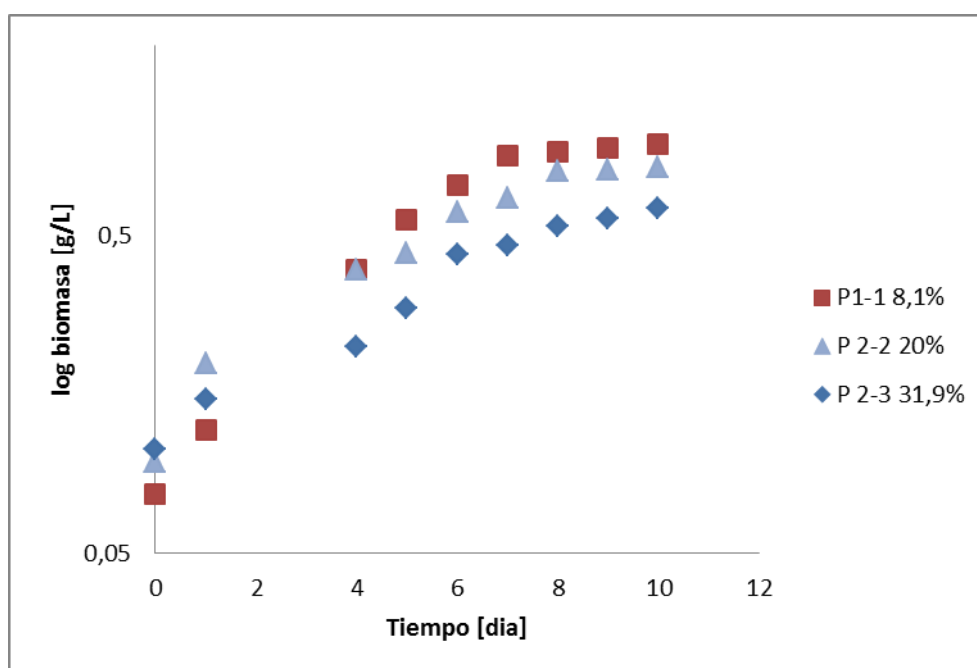


Figura III.10. Curvas logarítmicas de crescimento de microalgas cultivadas em fotobiorreatores *air-lift* em diferentes porcentagens de vinhaça