

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOENERGIA – MESTRADO**

**CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* EM ÁGUA DE MACERAÇÃO DO
MILHO E EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS**

CRISTIANE TOMAS

**TOLEDO- PR- BRASIL
2016**

CRISTIANE TOMAS

CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* EM ÁGUA DE MACERAÇÃO DO MILHO E EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção de título de Mestre em Bioenergia, área de concentração em **Biocombustíveis**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

TOLEDO – PR – BRASIL

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T655c

Tomas, Cristiane

Cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em água de maceração do milho e extração e quantificação de lipídeos./Cristiane Tomas. Toledo, 2016. 139 f.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo. Centro de Engenharias e Ciências Exatas, 2016
Programa de Pós-Graduação em Bioenergia

1. Biodiesel. 2. *Scenedesmus*. 3. Água de maceração. 4. Lipídeos. 5. Bligh Dyer. I. Silva, Edson Antonio da. II. Sebastien, Nyamien Yahaut . III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 633.15

662.88

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9ª/965

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por CRISTIANE TOMAS a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Bioenergia em 29 de agosto de 2016.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Edson Antonio da Silva
Orientador



Profª. Drª. Karina Graziella Fiametti Colombo
Membro



Profª. Drª. Tatiana Rodrigues da Silva Baumgartner
Membro

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por ser meu exemplo de conduta e postura, pela infinita paciência, por sempre acreditar no meu potencial e por ser minha amiga e confidente de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte da minha força e fé;

Ao meu orientador, prof. Dr. Edson Antonio da Silva, pela paciência, pela oportunidade concedida e por mostrar os caminhos do conhecimento com tanto entusiasmo;

Aos professores Nyamien Sebastien e Tatiana Baumgartner, pelos valiosos conselhos e orientações;

A Rafael Canevesi, por toda a consultoria e auxílio na análise estatística;

A Jezuino, pela construção das estantes e a Dirceu, pela ajuda no planejamento das viagens;

Aos meus colegas do mestrado, pelo companheirismo, pelas dicas, por me inspirar cada um com sua estória de esforço e dedicação;

Às equipes do Laboratório Ambiental e Laboratório Químico da Itaipu Binacional (Isalina, Reinaldo, Olícia, Renê, Mires e Roseli) por compartilhar comigo seu espaço de trabalho, por me auxiliar direta ou indiretamente nas análises e em todos os procedimentos laboratoriais, pela paciência e carinho com que fui acolhida no ambiente laboratorial...

Aos profissionais da área de Coordenação da Itaipu Binacional, em especial à Silvana Vitorassi e Simone Benassi, pelo apoio na realização das pesquisas;

À Superintendência da Engenharia da Itaipu Binacional, pela compreensão e apoio, em especial a Jorge Habib Hanna El Khouri, Antonio Carlos Fonseca e Eli Marcos Finco;

À minha família, pelos valores transmitidos e pelo apoio para que essa jornada fosse completada;

A Massakiti, pelo amor e compreensão.

EPIGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo” (Martin Luther King).

CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* EM ÁGUA DE MACERAÇÃO DO MILHO E EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS

AUTOR: CRISTIANE TOMAS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-Graduação em Bioenergia; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil, agosto de 2016, 139 p.

RESUMO

A busca por fontes renováveis de energia é uma preocupação das novas gerações em face da possível escassez dos combustíveis fósseis e das alterações climáticas causadas pelas emissões dos gases do efeito estufa. Comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas; também reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre. O objetivo desta pesquisa foi investigar o cultivo de microalgas *Scenedesmus acuminatus* em substrato composto por água de maceração do milho para fins de produção de biodiesel. Inicialmente realizou-se um teste preliminar para verificar a viabilidade de crescimento dessa microalga no efluente; posteriormente foi realizado um delineamento composto central rotacional para estudar a influência da concentração de efluente no meio e percentual inicial de células (inóculo) sobre a densidade celular, acúmulo de biomassa, DQO e velocidade máxima de crescimento (μ_{max}) do cultivo. A análise estatística indicou que os percentuais de inóculo e efluente tiveram influência sobre a densidade celular, DQO e velocidade máxima específica de crescimento e que as condições ótimas do cultivo seriam alcançadas com a utilização de 53,5% de efluente e 5,2% de inóculo. O modelo proposto foi validado através de

um cultivo nas condições propostas, cujo rendimento em biomassa seca foi de 0,30g/L ao sétimo dia. O cultivo, aliado ao procedimento de coagulação, foi eficiente para remoção de matéria orgânica do meio de cultura, observada através da redução dos valores de DQO e pH, que atingiram nível adequado ao padrão exigido pela legislação vigente. A metodologia HARA & RADIN (1978) foi a mais eficiente para extração de lipídeos totais à temperatura de 45°C: obteve um rendimento de $44,50 \pm 2,12$ mg/L. A temperatura de extração teve influência sobre o rendimento em lipídeos: o procedimento realizado a 45°C foi capaz de extrair maior quantidade de lipídeos para ambos os métodos.

Palavras-chaves: Biodiesel. *Scenedesmus*. Água de maceração. Lipídeos. Bligh Dyer.

CULTURE OF *Scenedesmus acuminatus* IN CORN STEEP LIQUOR AND EXTRACTION AND LIPID QUANTIFICATION

AUTHOR: CRISTIANE TOMAS

SUPERVISOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA

Master Thesis; Post Graduate Program in Bioenergy; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil, August of 2016, 139 p.

ABSTRACT

The search for renewable energy sources is a concern of the new generations in face of possible fossil fuel scarcity and climate change caused by greenhouse gas emissions. When compared with diesel derived from petroleum, the biodiesel can reduce 78% carbon dioxide emissions, considering plants reabsorption; also, it can reduce by 90% emissions of smoke and virtually eliminates sulfur oxide. The purpose of this research was to investigate the cultivation of microalgae *Scenedesmus acuminatus* in the substrate composed by corn steep liquor for biodiesel production purposes. Initially a preliminary test was carried out to verify the viability of growing the microalgae in the effluent; further, a central composite design was carried to study the influence of the effluent and inoculum concentration on the cell density biomass, production of biomass, chemical oxygen demand (COD) and maximum growth rate (μ_{max}) of microalgae culture. Statistical analysis indicated that the percentage of inoculum and effluent had an influence on the cell density, COD and maximum specific growth rate and that the optimal cultivation conditions would be achieved with the use of 53.5 % of effluent and 5.2% of inoculum. The proposed model was validated through cultivation under the proposed conditions, achieving 0.30 g/L of dry biomass on the seventh day. The cultivation, together with the coagulation procedure, was efficient for the removal of organic matter, verified through the COD and pH reduction, reaching

the appropriate level according the standard required by current legislation. HARA & RADIN (1978) was more efficient for extraction at 45°C: achieved a yield of $44,50 \pm 2,12$ mg / L total lipids. The extraction temperature had influence on the yield of lipids: the procedure performed at 45 ° C was able to extract more lipids in both methods.

Key-words: Biodiesel. *Scenedesmus*. Corn steep liquor. Lipids. Bligh Dyer.

NOMENCLATURA

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

DQO – Demanda Química de Oxigênio

PN - ponto de névoa

PEFF - ponto de entupimento do filtro a frio

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

μ_{max} – velocidade máxima específica de crescimento do Modelo de Monod

pH – potencial hidrogeniônico

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional

PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel

CIB – Conselho de Informações sobre Biotecnologia

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

CPAA - Centro de Pesquisas em Aquicultura Ambiental

UIM - Unidade Industrial de Mandioca e Milho da Cooperativa Agroindustrial LAR

μ_x - velocidade específica de crescimento celular

K_s - constante de Monod

t - tempo

k_D - constante de morte celular

$Y_{X/S}$ - coeficiente estequiométrico (fator de conversão de substrato em células)

F - Função objetivo

N_{dad} - número de dados experimentais utilizados no ajuste;

GERPEL - Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia

CECE - Centro de Engenharia e Ciências Exatas

CEMA - Conselho Estadual do Meio Ambiente

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

R^2 - coeficiente de regressão

ANOVA - análise de variância

(L) – Linear

(Q) – Quadrático

F_{tab} - F Tabelado (teste de Fisher)

F_{calc} - F Calculado (teste de Fisher)

PE - percentual de efluente

PI - percentual de inóculo

E - eficiência do tratamento

$DQO(i)$ - valor de DQO inicial do meio de cultura

$DQO(f)$ – valor de DQO do meio de cultura após tratamento

RALF ou UASB - Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado

BBM - Bold's Basal Medium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis.....	06
Figura 2 – Equação geral da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo	11
Figura 3 – Reação de esterificação.....	12
Figura 4 – Etapas da hidroesterificação.....	13
Figura 5 – <i>Scenedesmus acuminatus</i>	14
Figura 6 – Curva de crescimento de uma cultura de microalgas.....	15
Figura 7 – Estrutura do grão do milho.....	18
Figura 8 – Fluxograma da moagem do milho – moagem a seco.....	20
Figura 9 – Fluxograma da moagem do milho – via úmida.....	21
Figura 10 – Fluxograma da produção de amido de milho.....	44
Figura 11 – Saída do efluente bruto (água de maceração) da Unidade Industrial de Mandioca e Milho da Cooperativa Agroindustrial Lar (UIM).....	44
Figura 12 – Parte das amostras de água de maceração armazenadas em congelador.....	45
Figura 13 – Esquema geral do experimento.....	46
Figura 14 – Aspecto do Cultivo I.....	48
Figura 15 – Estante utilizada no cultivo do DCCR – Cultivo II.....	50
Figura 16 - Preparo e esterilização dos erlemeyers.....	57
Figura 17 – Tubos contendo reagentes para análise de DQO.....	57
Figura 18 – Análise de DQO.....	59
Figura 19- Aspecto do efluente bruto e do biodigerido.....	61
Figura 20 – Biorreatores do Cultivo I.....	65
Figura 21 – Aspecto dos reatores no Cultivo II.....	69
Figura 22 – Cultivo de validação do experimento.....	91

Figura 23 – Recuperação da biomassa do Cultivo III.....	95
Figura 24 – Extração via método BLIGH & DYER (1959)	95
Figura 25 – Extração via método HARA & RADIN (1978).....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da água de maceração.....	22
Tabela 2 - Vantagens e limitações dos sistemas de cultivo de algas.....	27
Tabela 3 - Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas.....	39
Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos de <i>Scenedesmus acuminatus</i>	41
Tabela 5 – Condições dos meios nos biodigestores do Cultivo I	48
Tabela 6 - Diluições utilizadas para análise de DQO dos meios utilizados para cultura no cultivo II	58
Tabela 7 - Caracterização da água de maceração do milho	61
Tabela 8 – Resultado da Produção de Biomassa - Cultivo I	65
Tabela 9 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	68
Tabela 10 – Resultados do Delineamento Composto Central Rotacional considerando como variável resposta a Densidade Celular.....	70
Tabela 11 - Análise de variância do DCCR - Densidade Celular	72
Tabela 12 – Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para Densidade Celular (valores não codificados)	74
Tabela 13 - Resultados do Delineamento Composto Central Rotacional considerando como variável resposta a concentração de biomassa seca.....	76
Tabela 14 - Resultados do Delineamento Composto Central Rotacional considerando como variável resposta a DQO	79
Tabela 15 - Análise de variância do DCCR – DQO.....	81
Tabela 16 – Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para DQO (valores não codificados)	82
Tabela 17 – Resultados do DCCR considerando como variável resposta a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max})	85
Tabela 18 - Análise de variância do DCCR - Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}).....	86

Tabela 19 – Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para μ_{max} (valores não codificados)	88
Tabela 20 – Valor previsto e valor experimental – Densidade celular.....	90
Tabela 21 - Valor previsto pelo modelo e experimental – DQO	92
Tabela 22 - Valor previsto pelo modelo e experimental – Biomassa.....	93
Tabela 23 - Comparativa entre quantidade de biomassa obtida no cultivo de <i>Scenedesmus acuminatus</i> em outros estudos-94	
Tabela 24 – Comparativo entre quantidade de biomassa obtida no cultivo de microalgas em efluentes distintos	94
Tabela 25 – Rendimento em lipídeos totais obtidos nas extrações - Cultivo III – Validação do modelo.....	96
Tabela 26 – Comparativa do teor de lipídeos totais obtidos de <i>Scenedesmus acuminatus</i> em outros estudos.....	98
Tabela 27 - Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.....	98

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Produtividade lipídica de diferentes culturas vegetais	25
Gráfico 2 – Distribuição dos ácidos graxos em <i>Scenedesmus acuminatus</i>	40
Gráfico 3 – Curva de crescimento celular – Cultivo I - Testes preliminares	63
Gráfico 4 – Variação do pH – Teste preliminar.....	66
Gráfico 5 – Curva de crescimento dos ensaios do DCCR.....	71
Gráfico 6 – Gráfico de Pareto para densidade celular.....	72
Gráfico 7 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para a densidade celular	74
Gráfico 8 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a densidade celular	75
Gráfico 9 – Gráfico de Pareto para a concentração de biomassa seca	77
Gráfico 10 – Gráfico de Pareto da DQO.....	80
Gráfico 11 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para a DQO	81
Gráfico 12 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a Demanda Química de Oxigênio (DQO)	83
Gráfico 13 - Variação do pH no DCCR.....	84
Gráfico 14 – Gráfico de Pareto do μ_{max}	86
Gráfico 15 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para μ_{max}	87
Gráfico 16 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}).....	89
Gráfico 17 – Curva de crescimento – Cultivo III – Validação do modelo.....	90
Gráfico 18 - Variação do pH nos cinco biorreatores do Cultivo III - validação do modelo	92

Gráfico 19 – Teor de lipídeos extraídos através do método HARA & RADIN (hexano e isopropanol) e BLIGH & DYER (clorofórmio e metanol) 97

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVO GERAL	4
2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1.BIOCOMBUSTÍVEIS	5
3.2.BIODIESEL	6
3.2.1.Regulamentação	7
3.2.2.Matéria prima	7
3.2.3.Lipídeos.....	8
3.2.4.Processos para produção do biodiesel.....	10
3.2.4.1.Transesterificação	10
3.2.4.2.Esterificação.....	12
3.2.4.3.Hidroesterificação.....	12
3.2.4.4.Transesterificação “in situ”	13
3.3.MICROALGAS	13
3.3.1.Scenedesmus acuminatus	14
3.3.2.Ciclo de vida.....	15
3.4.CULTIVO EM EFLUENTE	16
3.4.1.Biodegradação	16
3.4.2.DQO – Demanda Química de Oxigênio	17
3.5.MILHO	18
3.6.CADEIA PRODUTIVA DO MILHO	19
3.6.1.Segmento de Moagem do Milho.....	19
3.6.1.1.Moagem úmida.....	20
3.6.2.Água de maceração	22
3.7.PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS.....	23
3.8.CULTIVO DE MICROALGAS	24
3.8.1.Sistemas de cultivo	26
3.8.2.Nutrição.....	27
3.8.3.Condições do cultivo	29
3.8.3.1.Assepsia.....	30

3.8.3.2.Aeração	30
3.8.3.3.Temperatura	30
3.8.3.4.Luminosidade	31
3.8.3.5.pH – Potencial Hidrogeniônico	32
3.8.4.Crescimento celular	32
3.9.EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS	33
3.9.1.Recuperação da biomassa	33
3.9.1.1.Centrifugação	34
3.9.1.2.Filtração	34
3.9.1.3.Floculação	34
3.9.2.Secagem da biomassa e armazenamento	35
3.9.3.Extração dos lipídeos totais	35
3.9.3.1.Extração com clorofórmio e metanol	37
3.9.3.2.Extração com hexano e isopropanol	37
3.9.3.3.Influência da temperatura na extração de lipídeos	38
3.10.MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL	38
3.10.1.Potencial de <i>Scenedesmus acuminatus</i> para produção de biodiesel	40
3.10.2.Cultivo de <i>Scenedesmus acuminatus</i> em efluente	41
4.MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1.MICROALGAS	43
4.2.EFLUENTE	43
4.2.1.1.Coleta	44
4.2.1.2.Caracterização do efluente	45
4.3.ORGANIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	46
4.4.CULTIVO I – TESTES PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DE <i>Scenedesmus acuminatus</i> EM ÁGUA DE MACERAÇÃO	47
4.5.CULTIVO II	49
4.5.1.Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max})	50
4.6.CULTIVO III – VALIDAÇÃO DO MODELO	53
4.7.EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS	53
4.8.Coleta da Biomassa	53
4.8.1.Extração e quantificação de lipídeos	54
4.8.1.1.Metodologia BLIGH & DYER (1959)	55
4.8.1.2.Metodologia HARA & RADIN (1978)	56

4.9.PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	56
4.10.ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	57
4.10.1.1.Determinação de DQO do meio de cultura.....	57
4.10.1.2.Avaliação da Densidade Celular	59
4.10.1.3.Determinação da concentração de biomassa	59
4.10.1.4.Determinação do pH.....	60
4.10.1.5.Determinação do teor de lipídeos totais	60
5.RESULTADOS	61
5.1.CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE	61
5.2.CULTIVO I - TESTES PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DE <i>Scenedesmus acuminatus</i> EM ÁGUA DE MACERAÇÃO	63
5.2.1.Crescimento e densidade celular	63
5.2.2.Produção de Biomassa	65
1.1.1.Variação do pH.....	66
5.2.3.Avaliação dos resultados preliminares para direcionamento dos próximos experimentos.....	67
5.3.CULTIVO II.....	67
5.3.1.Planejamento experimental – DCCR.....	67
5.3.2.Densidade celular.....	70
5.3.3.Produção de biomassa.....	75
5.3.4.Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	78
5.3.5.Variação do pH.....	83
5.3.6.Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}).....	84
5.4.CULTIVO III - VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS	89
5.4.1.Densidade celular.....	90
5.4.2.Variação do pH.....	91
5.4.3.DQO	92
5.4.4.Produção de biomassa.....	93
5.4.5.Teor de lipídeos totais	94
6.CONCLUSÕES	99
7.SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
APÊNDICE	114

1. INTRODUÇÃO

Desde o advento da Revolução Industrial, a energia influi na qualidade de vida da sociedade, além de interferir na competitividade econômica entre os países. Grande parte da energia consumida em nível mundial é derivada dos combustíveis fósseis, dentre os quais o petróleo tem papel de destaque, pois é responsável por um terço da energia primária consumida no planeta. Entretanto, observa-se o esgotamento progressivo das reservas mundiais de petróleo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2006).

A utilização de fontes de energias renováveis é considerada estratégica por muitos países, pois está aliada à segurança energética e ao cumprimento das metas de redução de emissão dos gases causadores do efeito estufa (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2012). As pesquisas na área energética têm como foco principais o uso de fontes de energia alternativas que, em resumo, atendam às necessidades energéticas, econômicas e ambientais (OVEREND, 2004).

Essas necessidades podem ser atendidas pelos biocombustíveis. Eles podem ser produzidos a partir da biomassa (matéria orgânica) proveniente de fontes vegetais ou compostos de origem animal. Estes materiais têm em comum a origem direta ou indireta do processo de fotossíntese e, conseqüentemente, são recursos renováveis (OVEREND, 2004; PETROBRÁS, 2007).

Os biocombustíveis apresentam muitas vantagens, dentre as quais: diminuem a dependência externa de petróleo, minimizam os efeitos das emissões veiculares na poluição local e controlam a concentração dos gases do efeito estufa na atmosfera (LEITE e LEAL, 2007).

Dentre os combustíveis renováveis mais promissores destaca-se o biodiesel, uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos produzidos pela reação de um óleo ou gordura com um álcool, na presença de um catalisador. O biodiesel pode ser usado puro ou em misturas com o diesel em

motores ciclo diesel, sendo, em alguns aspectos, comparativamente menos poluente que o diesel (FRANCO *et al.*, 2013).

Atualmente, as principais fontes de óleo para a produção de biodiesel são as oleaginosas. A produção brasileira de biodiesel está em crescente dependência de uma única matéria prima, a soja, contrapondo-se ao objetivo do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que tem por meta sustentar sua cadeia na diversidade de materiais graxos disponíveis nas várias regiões do País (FRANCO *et al.*, 2013; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

Novas alternativas de obtenção de matérias-primas para síntese do biodiesel vêm sendo pesquisadas, dentre elas: óleo residual de fritura, gorduras animais e microalgas, dentre outras. As microalgas contêm lipídeos em componentes da membrana, produto de reserva, metabólitos e também como fonte de energia (DEMIRBAS & DEMIRBAS, 2010). Alguns gêneros possuem percentuais elevados de triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos no seu perfil lipídico e possuem grande potencial para sua utilização como matéria prima para a produção de biodiesel (GONZÁLEZ-DELGADO & KAFAROV, 2011).

As microalgas possuem várias vantagens em relação ao cultivo de plantas oleaginosas para produção de biodiesel. Em primeiro lugar, podem ser cultivadas em áreas não apropriadas para as agriculturas e também em água salina. A microalga é considerada um sistema biológico eficiente para transformação de energia luminosa em energia química na forma de compostos orgânicos (BORGHETTI, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012).

Esses microrganismos apresentam alta produtividade em uma área mínima superficial ou volumétrica (BORGHETTI, 2009; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012; TORRES *et al.*, 2014). Segundo HALIM *et al.* (2012), mesmo em um cenário conservador, estima-se que as microalgas possam produzir cerca de 10 vezes mais biodiesel por unidade de área de terra do que uma cultura oleaginosa terrestre típica.

Entretanto, a viabilidade econômica do cultivo de microalgas ainda é prejudicada pelo elevado custo do processo de produção. Entre os fatores que mais oneram o cultivo de microalgas está a adição de nutrientes às culturas (NEVES *et al.*, 2013).

Uma característica importante do metabolismo das algas é sua flexibilidade tanto na variedade de substratos que podem ser assimilados quanto na variação das porcentagens dos vários produtos do metabolismo acumulados no interior das algas (BICUDO e MENEZES, 2006). Microalgas podem crescer nos efluentes e produzir biomassa enquanto removem componentes orgânicos e minerais do meio. É possível combinar os benefícios da produção de um biocombustível, a mitigação de CO₂ e o tratamento de águas residuais. Cerca de 1,8 kg de CO₂ são usados na produção de 1 kg de microalgas (GONZÁLEZ-DELGADO & KAFAROV, 2011; BEEVI & SUKUMARAN, 2014).

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de microalgas é uma alternativa para reduzir os custos referentes à composição dos meios de cultura e, dessa forma, reduzir consideravelmente os custos operacionais. (BORGHETTI, 2009; NEVES *et al.*, 2013).

O milho é uma espécie da família das gramíneas. É produzido em quase todos os continentes e possui diversas formas de utilização: desde a alimentação animal até a produção de filmes e embalagens biodegradáveis. (PAES, 2006). O milho é o cereal mais cultivado e consumido no Brasil (OECD-FAO, 2015).

É utilizado na fabricação de rações e nas indústrias moageiras (via úmida e via seca) para obtenção de produtos variados, como glúten e amido de milho (PINAZZA, 2007). A moagem por via úmida gera um efluente denominado “água de maceração”. Esse subproduto tem sido usado como uma fonte e relativamente barata de nutrientes para compor o meio de cultura de vários microrganismos (NASCIMENTO e MARTINS, 2006).

Desta forma, é importante o desenvolvimento de técnicas e metodologias de cultivo de microalgas aproveitando os resíduos agroindústrias como fonte de material orgânico e inorgânico com o intuito de se obter biomassa com elevado teor de lipídeos. Dentro deste contexto, o objetivo desta pesquisa é investigar o cultivo de microalgas *Scenedesmus acuminatus* em substrato composto por água de maceração do milho. Este processo combina as vantagens da produção de biomassa rica em óleo que pode ser utilizada na síntese de biocombustível e também de tratar o efluente industrial (água residuária) de forma a reduzir os teores de matéria orgânica em níveis aceitáveis para lançamento nos corpos receptores.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o cultivo da microalga *Scenedesmus acuminatus* em meio composto por água destilada e água de maceração do milho (efluente da indústria de processamento de amido de milho) para extração do óleo com fins de produção de biodiesel.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a microalga em estudo se desenvolve em meio de cultura composto por água destilada e água de maceração;

- Identificar as condições ótimas de cultivo em relação à porcentagem de efluente e inóculo através de um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR);

- Avaliar a eficiência da remoção de matéria orgânica do efluente através da comparação dos valores iniciais e finais da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do meio de cultura;

- Realizar a extração dos lipídeos utilizando-se de dois métodos distintos a duas temperaturas diferentes a fim de comparar seu desempenho;

- Quantificar os lipídeos totais obtidos ao final de cada extração realizada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. BIOCOMBUSTÍVEIS

O crescimento da população mundial e da industrialização tem acarretado um aumento no consumo de energia nas últimas décadas. Com o surgimento de indústrias e usinas termelétricas movidas a combustíveis fósseis, principalmente carvão e petróleo, as sociedades modernas passaram a liberar no ar grandes quantidades de dióxido de carbono (CO₂) e outros gases, como dióxido de enxofre (SO₂) e óxido nítrico (NO), agravando o efeito estufa (RADMAN e COSTA, 2008). O aumento do preço do óleo bruto tem acarretado preocupações sobre a segurança energética dos países, pois aproximadamente 85% da demanda de energia global é suportada pela queima de combustíveis fósseis. Esses fatores estimularam a pesquisa por fontes de energia renováveis e limpas (DRAGONE *et al.*, 2010; MINILLO *et al.*, 2013; UNPAPROM *et al.*, 2014).

Segundo a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, biocombustível é um derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna ou para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente os combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2005).

Os biocombustíveis dividem-se em primários e secundários. Os primeiros são utilizados em uma forma não processada, como é o caso da lenha (utilizada para aquecimento, cozimento ou produção de eletricidade). Por outro lado, os de ordem secundária são produzidos a partir do processamento da biomassa, tendo como produto o bioetanol e biodiesel. Os biocombustíveis secundários podem ser subdivididos em três “gerações”: primeira, segunda e terceira. Essa classificação é baseada em diferentes parâmetros, como o tipo de tecnologia de processamento, tipo de matéria-prima ou nível de desenvolvimento (Figura 1) (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2010; DRAGONE *et al.*, 2010).

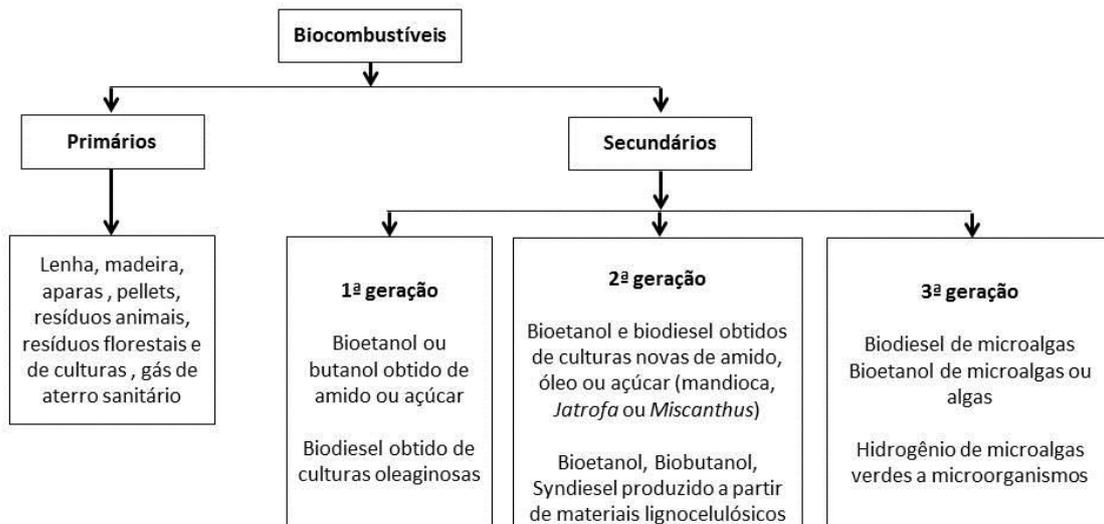


Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis (adaptado de DRAGONE *et al.*,2010).

3.2. BIODIESEL

O biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou para geração de outro tipo de energia (BRASIL, Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005).

Ele é um combustível diesel alternativo: pode ser usado em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação (DELATORRE *et al.*, 2011).

É composto de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa derivados de fontes renováveis, tais como óleo vegetal, gordura animal, ou gorduras residuais, e esses materiais são fontes de lipídeos que, na presença de um catalisador, reagem com álcool etílico ou metílico dando origem a um combustível de alta qualidade (GERIS *et al.*, 2007; DELATORRE *et al.*, 2011; FERNANDES JR. *et al.*, 2012).

Segundo DELATORRE *et al.* (2011), comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas; também reduz em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de oxido de enxofre.

3.2.1. Regulamentação

O biodiesel foi regularizado pelo governo brasileiro no ano de 2004, através da Medida Provisória 227, convertida na Lei 11.116 em 2005. O biodiesel já havia sido incluído na Medida Provisória 214, convertida na Lei 9.478 em 1997 (GERIS *et al.*, 2007).

No ano de 2005 o governo brasileiro regularizou a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira: estipulou a meta de 5% de adição do produto ao óleo diesel em um prazo máximo de oito anos (BRASIL, Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005).

Em 1º de novembro de 2014, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), estabeleceu uma regra para o óleo diesel comercializado em todo o Brasil: aumentou de 5% para 7% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS, 2014). Em 2016 foi sancionada a lei que eleva a mistura de biodiesel ao diesel para 8% (B8) a partir de abril de 2017 (BRASIL, Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016).

3.2.2. Matéria prima

Os ésteres alquílicos de ácidos graxos podem ser produzidos a partir de qualquer tipo de óleo, no entanto, nem todo óleo pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de biodiesel. Isso ocorre porque algumas características deste, tais como a alta viscosidade ou a presença de iodo permanecem no biocombustível, tornando-o inadequado para uso direto em motores do ciclo diesel (DELATORRE *et al.*, 2011).

Dentre as várias espécies de oleaginosas utilizadas como matéria prima para produção de biodiesel destacam-se a mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja. As gorduras de origem animal também podem ser utilizadas para produção de biodiesel. Também é possível preparar o biodiesel a partir dos óleos e gorduras residuais resultantes do processamento

industrial, comercial ou até mesmo doméstico, tais como as sobras de frituras e sabões produzidos no refino do óleo de soja (OLIVEIRA *et al.*, 2008; DELATORRE *et al.*, 2011).

3.2.3. Lipídeos

Os lipídeos são um grupo de substâncias biológicas compostas principalmente de substâncias não polares e compostos mais polares que se ligam covalentemente aos carboidratos e proteínas para formar glicolipídios e lipoproteínas, respectivamente (REIS *et al.*, 2011). Também podem ser definidos como qualquer molécula biológica solúvel em solvente orgânico (HALIM *et al.*, 2012).

A maioria dos lipídeos contém ácidos graxos. Eles são formados por cadeia de átomos que se ligam a átomos de hidrogênio com um radical ácido em uma das extremidades. Eles diferem entre si pelo comprimento da cadeia carbônica e pelo número, orientação e posição das ligações duplas. Nos saturados, os carbonos apresentam ligações simples. Os insaturados possuem uma ou mais ligações duplas na cadeia. Por sua vez, estes são divididos em monoinsaturados (possuem apenas uma ligação dupla) e poli-insaturados (possuem duas ou mais ligações duplas) (MEDINA *et al.*, 1998; HALIM *et al.*, 2012).

Os lipídeos encontrados nas microalgas podem ser classificados em neutros e polares com base na polaridade do grupo cabeça da molécula. A polaridade também está relacionada com a distribuição dos lipídeos na célula. Lipídeos neutros são utilizados para armazenamento de energia, ao passo que os lipídeos polares entram na composição das membranas celulares (bicamada fosfolipídica).

Entre os lipídeos neutros estão os acilgliceróis (ou glicerídeos) e ácidos graxos livres. Os acilgliceróis consistem em ésteres de ácidos graxos ligados a glicerol. São categorizados de acordo com o número de ácidos graxos presentes: triacilgliceróis (ou triglicerídeos), diacilgliceróis (diglicerídeos) e monoacilgliceróis (monoglicerídeos). Eles podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si. Para a produção de biodiesel, apenas os triacilglicerídeos e os

ácidos graxos livres são os lipídeos de interesse (DELATORRE *et al.*, 2011; KROHN *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2014a).

Ácidos graxos livres são ácidos graxos ligados a um átomo de hidrogênio. Também existem alguns tipos de lipídeos neutros que não são formados por ácidos graxos, como hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos. Eles também são solúveis em solvente orgânico, mas não podem ser convertidos em biodiesel. Os lipídeos polares são representados pelos fosfolipídeos e glicolipídeos (HALIM *et al.*, 2012).

Geralmente, a maioria dos lipídeos proveniente de animais ou microrganismos consiste em cerca de 60 a 85% de lipídeos polares. No entanto, a composição de lipídeos das microalgas pode variar de uma espécie para outra. Algumas são mais ricas em lipídeos neutros do que outras (MEDINA *et al.*, 1998; HALIM *et al.*, 2012).

A composição do perfil de ácidos graxos pode variar também função do ciclo de vida, condições de cultivo (como composição do meio, iluminação, temperatura e aeração). As microalgas recuperadas do meio durante a fase estacionária têm menos quantidade de lipídeos neutros se comparadas às células recuperadas na fase exponencial ou lag (HALIM *et al.*, 2012).

Óleos e gorduras são compostos de muitos tipos de triglicerídeos com diferentes graus de insaturação. A proporção de grupos acila saturados e insaturados presentes nos triacilglicerídeos é o que diferencia os óleos das gorduras. Os óleos têm maior número de ácidos graxos insaturados e são líquidos à temperatura ambiente. As gorduras possuem maior composição em ácidos graxos saturados e são pastosos ou sólidos à temperatura ambiente (MEDINA *et al.*, 1998; BELTRÃO & OLIVEIRA, 2008).

As características dos ácidos graxos que compõem os lipídeos influenciam diretamente nas propriedades do biodiesel, bem como em seu processo de obtenção (CARDOSO *et al.*, 2011a).

Os ácidos graxos insaturados têm predisposição a manter-se mais tempo em temperatura ambiente, o que ameniza a possibilidade de solidificação do biodiesel. Isso significa que se obtém um óleo com maior ponto de névoa (PN) e o

ponto de entupimento do filtro a frio (PEFF), o que representará um inconveniente menor em climas frios (DABDOUB *et al.*, 2009).

Por outro lado, quanto maior o número de insaturações presentes, menor o número de cetano, responsável pela ignição e queima eficiente do combustível. Além disso, o elevado número de insaturações torna as moléculas menos estáveis quimicamente. Isso pode provocar inconvenientes devido a oxidações, degradações e polimerizações do combustível (MEDINA *et al.*, 1998; BELTRÃO & OLIVEIRA, 2008; DABDOUB *et al.*, 2009). Em outras palavras, óleos saturados produzem um biodiesel com alta estabilidade oxidativa e alto número de cetano, mas propriedades indesejáveis a baixas temperaturas, sendo susceptível ao estado sólido (CARDOSO *et al.*, 2011a).

No entanto, apesar de lipídeos com elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados possuírem boas propriedades à baixa temperatura, são muito susceptíveis à oxidação, possuindo problemas de instabilidade quando armazenado por muito tempo (CARDOSO *et al.*, 2011a).

Desta forma, tanto o elevado número ácidos graxos saturados quanto o de poli-insaturados possui alguns inconvenientes. De maneira geral, um lipídeo com predominância de ácidos graxos monoinsaturados combinados é o que apresenta os melhores resultados para produção de biodiesel (MEDINA *et al.*, 1998; BELTRÃO & OLIVEIRA, 2008; DABDOUB *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2011a).

3.2.4. Processos para produção do biodiesel

3.2.4.1. Transesterificação

A transesterificação consiste na reação entre um triglicerídeo e um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol) na presença de um catalisador (metal alcalino ou ácido). Como resultado, obtêm-se os ésteres de ácidos graxos metílicos ou etílicos (que compõem o biodiesel) e glicerina (glicerol) como subproduto (GERIS *et al.*, 2007; DRAGONE, 2010; DELATORRE *et al.*, 2011).

É uma das vias mais empregadas na produção de biodiesel, atualmente (GERIS *et al.*, 2007; DELATORRE, *et al.*, 2011). Ela reduz a densidade do óleo em relação ao óleo vegetal, reduz a viscosidade, diminui os pontos de fulgor e névoa, além de aumentar o número do cetano (MEDINA *et al.*, 1998).

Para que uma transesterificação seja estequiometricamente completa, uma proporção molar de 3:1 de álcool por triacilglicerídeo é necessária (Figura 2). No entanto, como essa reação é reversível, o álcool geralmente é adicionado à solução em excesso, o que aumenta o rendimento do éster e facilita a separação da glicerina formada (GERIS *et al.*, 2007). Uma variedade de álcoois tem sido usada para essa reação (metanol, etanol, propanol, butanol), entretanto, o metanol é o mais utilizado devido ao baixo custo e disponibilidade. (YUSOFF *et al.*, 2014).

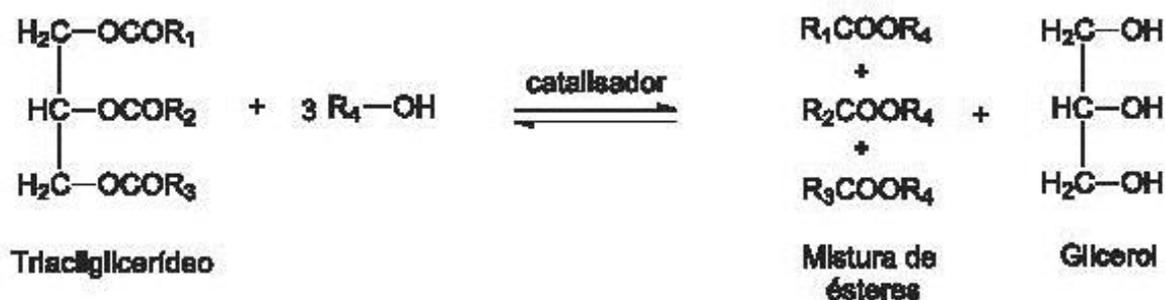


Figura 2 - Equação geral da reação de transesterificação de um triacilglicerídeo (GERIS *et al.*, 2007).

Geralmente se utilizam catalisadores para melhorar a taxa de reação e rendimento, além de aumentar a solubilidade do álcool. Existem dois tipos de catalisadores: heterogêneos e homogêneos. Os mais comumente usados são os catalisadores homogêneos, as bases (hidróxidos e alcóxidos de sódio ou potássio) e os ácidos de Brønsted (ácidos sulfúrico e clorídrico). A glicerina (co-produto) possui alto valor comercial após a sua purificação, podendo ser aproveitada por indústrias de cosméticos e de produtos de limpeza (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Entre os catalisadores alcalinos mais utilizados estão NaOH e KOH; os catalisadores ácidos mais utilizados são H₂SO₄, H₃PO₄ e CaCO₃. A catálise alcalina é ainda preferida devido à sua taxa de conversão rápida: é 4000 vezes

mais rápida do que a catálise ácida; entretanto, ela não é indicada para lipídeos que tenham mais de 5% de ácidos graxos livres em sua composição (YUSOFF, *et al.*, 2014).

3.2.4.2. Esterificação

O processo de obtenção do biodiesel por esterificação consiste na reação de um ácido graxo com um mono-álcool para formar ésteres (Figura 3). As reações de esterificação são catalisadas por ácidos (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

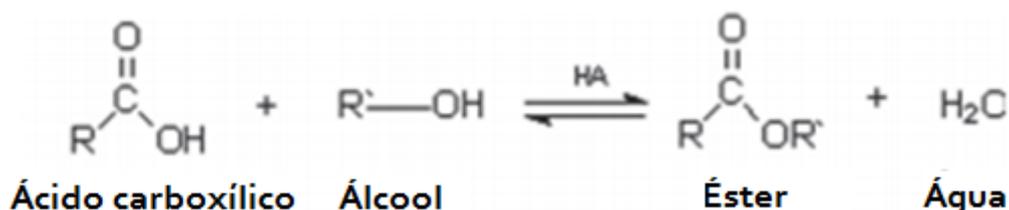


Figura 3 – Reação de esterificação (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

3.2.4.3. Hidroesterificação

A hidroesterificação é um processo que envolve uma etapa de hidrólise seguida de uma etapa de esterificação (Figura 4). Durante a hidrólise ocorre uma reação química entre a gordura ou o óleo com a água, gerando-se glicerina e ácidos graxos (ENCARNAÇÃO, 2008; ARCEO, 2012).

Após a hidrólise, o produto final apresentará acidez superior a 99%, independente da acidez e da umidade da matéria prima utilizada. Por isso, esse processo permite o uso de qualquer matéria-prima lipídica (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros) (ENCARNAÇÃO, 2008; ARCEO, 2012).

Além dessa vantagem, a glicerina obtida tem teor mais puro do que aquela obtida por transesterificação. Após a hidrólise, a glicerina é removida e os ácidos graxos gerados são esterificados com um álcool. Esta etapa irá “neutralizar” a

acidez. A água, subproduto, retornará para o processo de hidrólise (ENCARNAÇÃO, 2008).

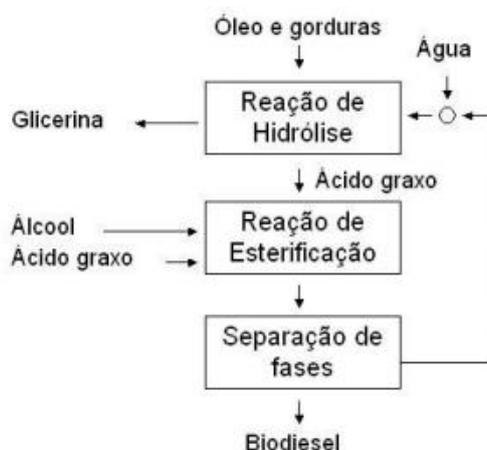


Figura 4 – Etapas da hidroesterificação (ENCARNAÇÃO, 2008).

3.2.4.4. Transesterificação “in situ”

A transesterificação “in situ” consiste na transesterificação direta da matéria prima, ou seja, elimina-se a etapa de extração do óleo (GAMA *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2013). Os lipídeos entram em contato com o álcool de forma direta, em vez de reagir com um óleo refinado. Segundo LI *et al.* (2008), esse processo aumenta a eficiência de conversão do óleo e tem recebido atenção para uso na produção de biodiesel a partir do óleo obtido da biomassa de microalgas.

3.3. MICROALGAS

Microalgas são organismos fotossintetizantes, procariontes ou eucariontes, que tem capacidade de crescer rapidamente e viver em condições adversas devido à sua estrutura relativamente simples: podem ser unicelulares ou pluricelulares simples – agregados de células que formam colônias ou filamentos (MATA *et al.*, 2010; CONCEIÇÃO *et al.*, 2012). Geralmente, seu tamanho varia de 5 a 50 μm (CARDOSO *et al.*, 2011a).

As microalgas são organismos muito flexíveis quanto ao habitat, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada (DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2010; FRANCO *et al.*, 2013). Segundo BICUDO e MENEZES (2006), seus indivíduos são extremamente comuns nas coletas de água em geral. Estima-se que existam mais de 50.000 espécies, mas apenas cerca de 30.000 foram estudadas e analisadas (MATA *et al.*, 2010).

3.3.1. *Scenedesmus acuminatus*

O gênero *Scenedesmus* é composto por indivíduos coloniais que vivem flutuando na água (Figura 5). A colônia sempre plana é formada, em geral, por 2, 4, 8, 16 ou, mais raramente, 32 células dispostas lado a lado, com seus eixos mais longos paralelos entre si (BICUDO e MENEZES, 2006).

As microalgas do gênero *Scenedesmus* são espécies de rápido e fácil crescimento. A reprodução é realizada por isolamento das células individuais seguida por divisão celular (SEBASTIEN & GRANJA, 2005). BICUDO e MENEZES (2006) afirmaram que esta espécie é “sem dúvida, o mais comum e cosmopolita dos gêneros de algas verdes”.

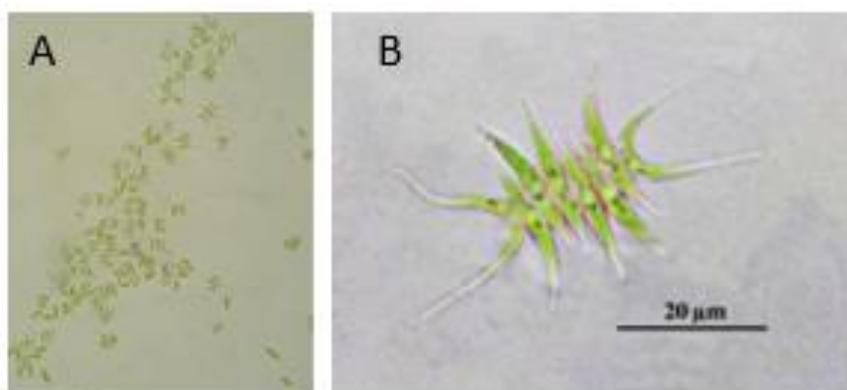


Figura 5 – *Scenedesmus acuminatus*. A – *Scenedesmus acuminatus* observadas ao microscópio óptico (aumento de 400x); B - Microalga em destaque (elaborada pelo autor; UNPAPROM *et al.*, 2014).

3.3.2. Ciclo de vida

Em condições adequadas de clima e nutrientes, as microalgas podem crescer abundantemente. Geralmente, em condições favoráveis elas duplicam a biomassa em 24 horas ou dentro de 3,5 horas durante a fase de crescimento exponencial (MATA *et al.*, 2010). Uma curva típica de crescimento de microalgas envolve cinco etapas, conforme ilustrado na Figura 6. A primeira fase é denominada de fase lag (ou de indução) é a fase jovem da cultura (Figura 6). Nesta etapa, não ocorre divisão celular, pois as algas estão se adaptando ao ambiente. Logo, o número de células permanece constante. Este período tem duração variável, dependendo da composição do meio, espécie, idade e concentração do inóculo. Na fase log (crescimento exponencial) ocorre a taxa máxima de crescimento (sob condições adequadas). Após adaptarem-se ao meio, as microalgas se reproduzem e a população aumenta em progressão geométrica; a célula se ajusta de maneira que não exista síntese de componentes celulares além do necessário para a produção de novas células (DANNENHAER, 2010).

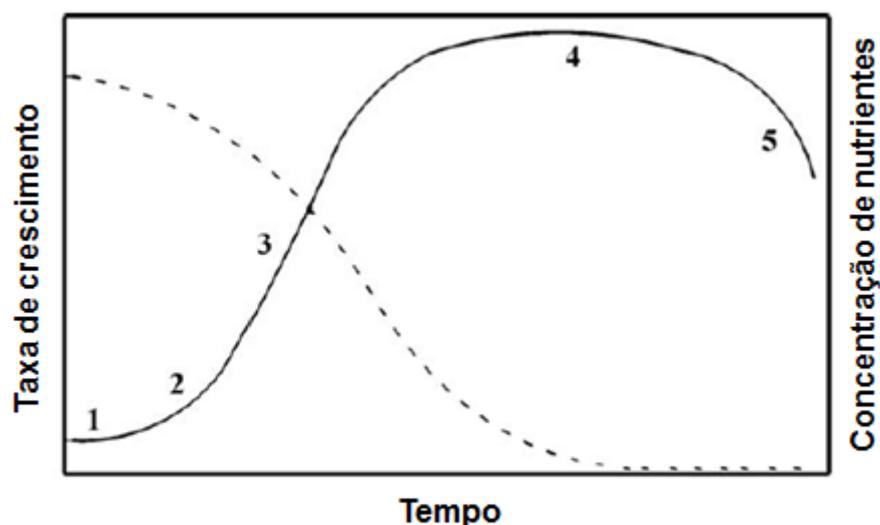


Figura 6 – Curva de crescimento de uma cultura de microalgas (em relação à taxa de crescimento). 1 – Fase lag ou de indução; 2 – Fase log ou de crescimento exponencial; 3 – Fase de crescimento linear; 4 – Fase de crescimento estacionário; 5 – Fase de declínio ou morte. (adaptado de MATA *et al.*, 2010).

A terceira fase (de crescimento linear) se caracteriza pela diminuição da taxa de reprodução, pois alguns nutrientes começam a ficar escassos. Na fase de

crescimento estacionário, como o nome aponta, o número de células permanece estável, pois o meio se encontra esgotado ou quase esgotado em nutrientes. Na última fase a morte e lise das células predominam sobre o crescimento, pois as condições do meio e de nutrientes se tornam desfavoráveis (GOMES, 1986; MATA *et al.*, 2010).

3.4. CULTIVO EM EFLUENTE

Segundo a Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE), efluente é o termo usado para caracterizar os despejos líquidos provenientes de diversas atividades ou processos.

Os efluentes necessitam de tratamento antes de serem lançados em corpos da água. A remoção de matéria orgânica é um dos principais objetivos do tratamento dos efluentes (VALENTE *et al.*, 1997). As fontes que tenham potencial para poluição de recursos hídricos devem buscar gestão de efluentes e, sempre que possível, fazer sua reutilização (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011).

3.4.1. Biodegradação

Existem tratamentos para efluentes que são realizados através de processos biológicos. Nesse método, microrganismos atuam na redução da carga orgânica dos efluentes: transformam a matéria orgânica existente na forma de sólidos em suspensão e sólidos dissolvidos em compostos simples como água, gás carbônico e sais minerais (MAZZER e CAVALCANTI, 2004).

O uso de microalgas para tratamento de águas residuais foi sugerido há vários anos devido à sua capacidade para remover de forma eficaz e com baixo custo o excesso de nutrientes e outros contaminantes que são as causas de eutrofização e poluição de corpos d'água (VOLTOLINA *et al.*, 1998).

O cultivo de microalgas é um processo de custo elevado; grande parte desse custo elevado provém da grande quantidade de água e nutrientes inorgânicos utilizados no meio de cultura - principalmente nitrogênio (N) e fosfato (P) (CHEN *et al.*, 2015). Segundo FRANCISCO *et al.* (2015), estima-se que o substrato orgânico corresponda a aproximadamente 80% do custo total do cultivo de microalgas. A possibilidade de utilizar nutrientes presentes em efluentes pode reduzir ainda mais os custos do cultivo de microalgas e ainda evitar eutrofização nos corpos d'água receptores (TORRES *et al.*, 2014).

Segundo DELABARY (2012), as microalgas do grupo *Scenedesmus* estão entre os grupos de microalgas mais utilizados para remoção de nutrientes. RUDIN & BENAVIDES (2015) fizeram um estudo sobre a capacidade de remoção de amônia (NH_4^+) e fosfato (PO_4) pela *Scenedesmus sp* em efluente e obtiveram como resultado a remoção de 28% a 52% de NH_4 .

3.4.2. DQO – Demanda Química de Oxigênio

A matéria orgânica presente na água consome oxigênio da mesma através da oxidação química e bioquímica que ocorre pela respiração dos microrganismos; como essa respiração depura a matéria orgânica, logo, pode-se avaliar a poluição orgânica de um curso d'água pelo decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido e/ou pela concentração de matéria orgânica em termos de concentração de oxigênio necessário para oxidá-la. Entre os principais indicadores poluição orgânica está a Demanda Química de Oxigênio (DQO) (VALENTE *et al.*, 1997).

BADO *et al.* (2012) define DQO como a medida da quantidade de oxidante químico necessário para oxidar a matéria orgânica de uma amostra. É expressa em miligramas de oxigênio por litro (mgO_2/L). É utilizada como indicador da concentração de matéria orgânica presente na água, permitindo assim uma análise do nível de contaminação desta, sendo muito utilizado no monitoramento de estações de tratamento para a avaliação da contaminação dos efluentes industriais (MOLZ *et al.*, 2011; BADO *et al.*, 2012).

Para a definição da tecnologia ou tratamento que irá remover a carga orgânica existente nos efluentes, é necessária a caracterização física e química desse efluente. Um exemplo de caracterização, que se aplica a quase todos os ramos de atividade industrial é realizado através das análises da DQO e pH (potencial hidrogeniônico) da amostra (MAZZER & CAVALCANTI, 2004).

A produção de microalgas tem como vantagem a redução de DBO (demanda biológica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio) e oxigenação do efluente (BEEVI e SUKUMARAN, 2014). Em estudo, VALENTE *et al.* (1997) avaliaram o grau e capacidade de autodepuração (decomposição natural de poluentes) de um corpo de água da cidade de Botucatu (Estado de São Paulo) através dos parâmetros de DBO e DQO. DQO mostrou-se como a melhor técnica para avaliar o perfil de poluição orgânica, identificar as zonas de depuração também para avaliar a poluição orgânica neste curso d'água.

3.5. MILHO

O milho (*Zea mays*) é uma planta da família *Gramineae*, originária da América Central. Apresenta grande capacidade de adaptação a diversos climas. O termo milho é utilizado também para designar sua semente, um grão do tipo cariopse formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, germe, pericarpo (casca) e ponta (Figura 7) (PAES, 2006; MATOS, 2007; GERALDI *et al.*, 2012).

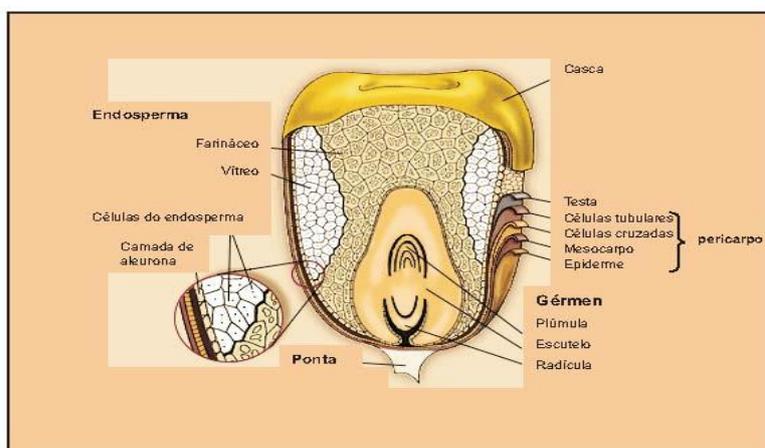


Figura 7 – Estrutura do grão do milho (adaptado de BRITANNICA, 2006 - citado por PAES, 2006).

Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, podendo apresentar matrizes, variando desde a cor preta até a vermelha. O grão (base seca) é composto, em média, por 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo (GERALDI, 2012).

3.6. CADEIA PRODUTIVA DO MILHO

Segundo MIRANDA & LÍCIO (2014), atualmente o milho é a maior cultura agrícola do mundo e a estimativa é de que a demanda para 2020 supere em 385 milhões de toneladas o valor atual. O Brasil é o terceiro produtor mundial.

Atualmente, o Paraná é um dos principais produtores de no país e a importância social e econômica deste cultivo está associada à geração de empregos, valor da produção, tamanho da área cultivada e contribuição na geração de receita para o Estado (GERAGE *et al.*, 1999; MAPA, 2015).

Segundo PINAZZA (2007), a cadeia produtiva do milho é um dos segmentos econômicos mais importantes do agronegócio brasileiro. A produção de milho oriunda da lavoura é direcionada ao consumo diretamente ou após algum processamento industrial de três formas básicas: espigas verdes (milho verde), silagem ou grãos secos (GERAGE *et al.*, 1999; PINAZZA, 2007).

3.6.1. Segmento de Moagem do Milho

Nas indústrias moageiras, o milho é processado basicamente de duas maneiras: por via úmida, um processo químico, ou por via seca, um processo físico (CARDOSO *et al.*, 2011).

A indústria de moagem a seco representa perto de 40% do milho destinado ao consumo industrial. A principal diferença entre a moagem a seco e moagem úmida está na fragmentação do endosperma à seco, portanto, não ocorre a separação do amido e proteínas (Figura 8) (GERAGE *et al.*, 1999; PINAZZA, 2007; CARDOSO *et al.*, 2011).

Neste processo, o milho é degerminado e separado em endosperma (canjica) e gérmen (Figura 8). O endosperma é moído e classificado para a obtenção de produtos finais (canjiquinhas, grits, fubá mimoso médio e fino, creme de milho e outros subprodutos secundários) e o germe passa por processo de extração para a obtenção de óleo e farelo (comercializado para fábrica de rações) (PINAZZA, 2007; CARDOSO *et al.*, 2011).

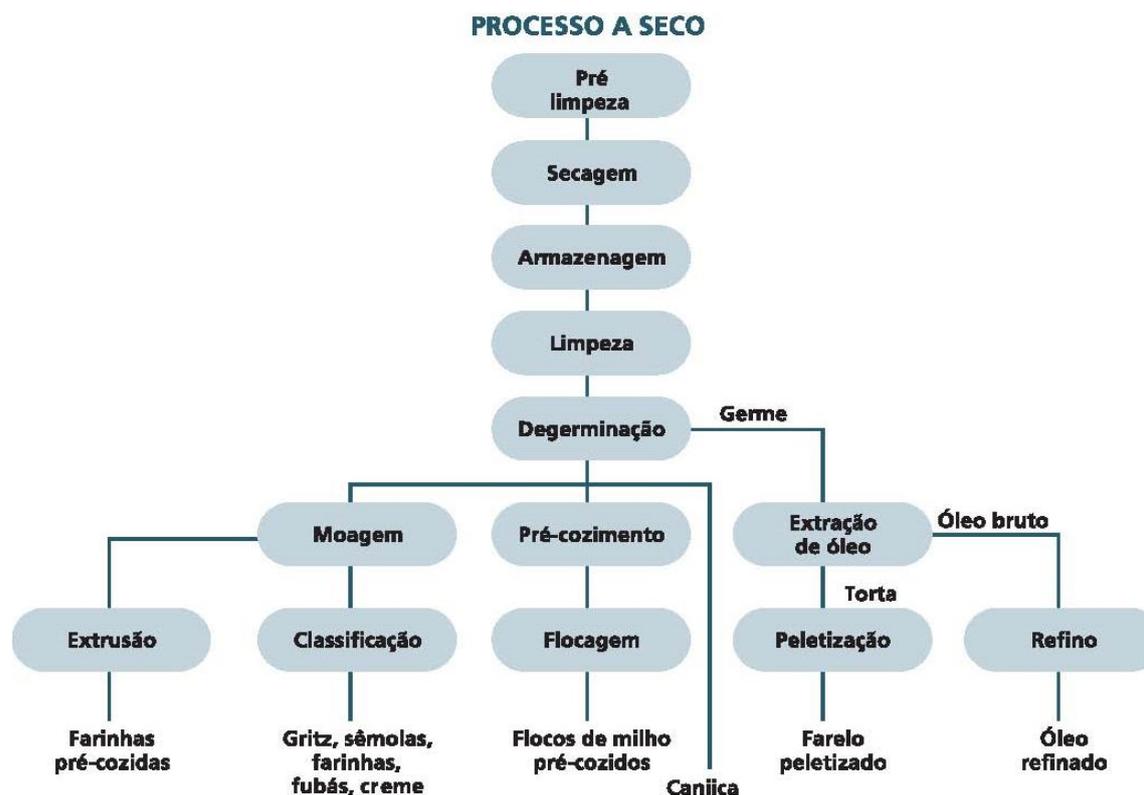


Figura 8 - Fluxograma da moagem do milho – moagem a seco (PINAZZA, 2007).

3.6.1.1. Moagem úmida

A moagem úmida difere da moagem a seco pela presença de uma etapa de maceração durante o processamento. Essa etapa tem por finalidade aumentar a eficiência da separação dos grânulos de amido e proteínas do endosperma por meio da incorporação de água ao grão. O principal objetivo da moagem úmida é a máxima recuperação possível do amido, com alta qualidade para uso industrial

3.6.2. Água de maceração

O processo de produção de amido de milho por moagem pela via úmida gera um efluente chamado de água de maceração do milho (ou milhocina). Esse material tem sido usado como uma fonte relativamente barata de nutrientes microbianos essenciais para uma variedade de propósitos.

Além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, este resíduo fornece vários micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento, como carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (NASCIMENTO & MARTINS, 2006; SILVA, 2006; SOUZA *et al.*, 2016).

VALDUGA *et al.* (2007), em estudo do pré-tratamento da água de maceração para bioprodução de carotenóides, apresentaram a composição de minerais da água de maceração, conforme observado na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da água de maceração do milho

Minerais	Quantidade
N (mg/L)	3503,5 ± 77,7
Ca(mg/L)	239,8 ± 2,9
Na (mg/L)	206,2 ± 10,3
K (mg/L)	2753,9 ± 69,7
P (mg/L)	1,5 ± 0,01
Mg (mg/L)	723,8 ± 1,9
Mn (mg/L)	55,3 ± 1,0
Zn (mg/L)	10,7 ± 0,1
Cu (mg/L)	1,1 ± 0,3
Fe (mg/L)	15,6 ± 8,1

Fonte: VALDUGA *et al.* (2007).

Alguns estudos já foram realizados sobre a utilização desse efluente como meio de cultura para o desenvolvimento de distintos microrganismos, geralmente bactérias e fungos (NASCIMENTO & MARTINS, 2006; LADEIRA *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2013; ZIA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016). NASCIMENTO & MARTINS (2006) estudaram a produção de proteases

por *Bacillus sp* SMIA-2 cultivado em soro de leite e água de maceração de milho. LADEIRA *et al.* (2012) utilizaram a água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus sp.* termofílico. Em 2013, ANTUNES *et al.* investigaram a produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* utilizando este efluente como meio de cultura. No mesmo ano, ZIA *et al.* (2013) analisaram a produção e purificação de glicose oxidase por *Aspergillus niger* e *Penicillium notatum* utilizando a milhocina como substrato. NASCIMENTO *et al.* (2015) avaliaram o aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger*.

Em 2016, SOUZA *et al.* publicaram estudo com objetivo de avaliar a produção de enzimas fibrinolíticas a partir da microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em meio suplementado com a milhocina. O cultivo na condição mixotrófica, com concentração de 0,25% de milhocina se mostrou viável para a produção das enzimas.

3.7. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE MICROALGAS

Há um interesse crescente no potencial das microalgas como matéria-prima para a próxima geração de biocombustíveis (WILLIAMS e LAURENS, 2010). As microalgas contêm lipídios que fazem parte da composição da membrana celular e das substâncias de armazenamento para energia. Cada espécie produz diferentes proporções de lipídeos, carboidratos e proteínas. O óleo obtido de microalgas é semelhante aos óleos de peixes e plantas (BAUMGARTNER *et al.*, 2013).

São organismos com exigência nutricionais simples, para crescimento e que podem produzir lipídios, proteínas e carboidratos, em curto período de tempo (TORRES *et al.*, 2014). O grande atrativo do óleo de microalgas é a grande capacidade de produção. Podem produzir até 58.700 l de óleo por hectare, um número muito maior do que a quantidade obtida em qualquer outro tipo de cultura (BEEVI e SUKUMARAN, 2014; CHEN *et al.*, 2011).

Além disso, a produção de biodiesel a partir de microalgas oferece outras vantagens sobre a utilização de culturas vegetais (fonte mais utilizada atualmente). Possuem altas taxas de crescimento e produtividade e podem ser cultivadas durante todo o ano. Devido a essa característica, o rendimento de óleo por área de cultura excederia em muito o rendimento das melhores culturas oleaginosas (CHEN *et al.*, 2011). Segundo LI *et al.* (2008), microalgas podem produzir 50 vezes mais biomassa em comparação a plantas superiores.

Esses microrganismos utilizam menos água para seu crescimento do que as demais culturas terrestres. Isso reduziria a carga sobre as fontes de água doce. Seu cultivo não requer a aplicação de agrotóxicos. Elas realizam o sequestro de CO₂, reduzindo assim as emissões de um importante gás de estufa (1 kg de biomassa algácea seca utiliza cerca de 1,83 kg de CO₂) (BEEVI e SUKUMARAN, 2014).

Seu cultivo pode ser realizado em terras não aráveis, o que evita a competição por recursos com culturas convencionais da agricultura. Essa característica permitiria a redução do custo do cultivo através da utilização de recursos baratos para a alimentação, como filtrado de aterros sanitários (MAKAREVICIENE *et al.*, 2011).

Dependendo da espécie, outros compostos podem ser extraídos da sua biomassa, como corantes naturais, pigmentos e antioxidantes (DRAGONE *et al.*, 2011).

A produção de biodiesel de óleo de microalgas envolve o cultivo, recuperação da biomassa, extração dos lipídeos, a remoção do excesso de solvente e a etapa de produção do biodiesel propriamente dita (FRANCO *et al.*, 2013).

3.8. CULTIVO DE MICROALGAS

Segundo NEVES *et al.* (2013), as microalgas têm sido cultivadas, principalmente, para a produção de alimento vivo, para atividades aquícolas e para a produção de biomassa microalgal como matéria-prima para extração de

substâncias de interesse comercial (fertilizantes, pigmentos, corantes, alimento humano e animal, biopolímeros, alimentos funcionais, e compostos farmacológicos).

É sabido, desde meados de 1940, que o conteúdo lipídico da célula da microalga pode ser aumentado através de deficiência de nutrientes. Em 1942, R. Harder e H. Von Witsh, dois cientistas alemães, demonstraram a possibilidade de produzir lipídios a partir do cultivo de diatomáceas sob determinadas condições nutricionais (WALTER, 2011). Foi o primeiro estudo para produção de microalgas em larga escala com fins industriais.

Pode-se induzir um aumento na produção de lipídeos por meio da aplicação de condições de *stress* (anaerobiose, temperaturas extremas) na fase de crescimento da biomassa microalgácea. As microalgas podem apresentar de 1 a 40% de lipídios, e em determinadas condições de cultivo, pode alcançar 85% (COSTA *et al.*, 2006; WILLIANS e LAURENS, 2010; FRANCO *et al.*, 2013).

O óleo de algas é considerado como um dos recursos mais potentes para biocombustíveis e é limitado principalmente pelo rendimento sob cultivo fototrófico e os desafios na colheita (Gráfico 1) (BEEVI e SUKUMARAN, 2014).

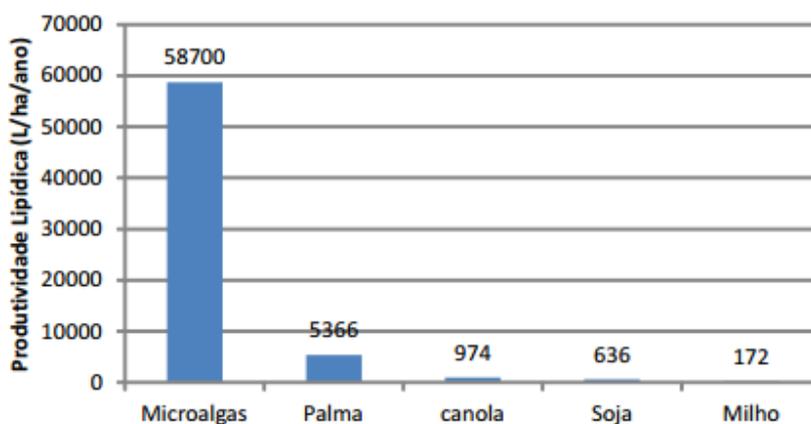


Gráfico 1 - Produtividade lipídica de diferentes culturas vegetais (ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

3.8.1. Sistemas de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser realizado em sistema “*indoor*” (espaço fechado) ou “*outdoor*” (ao ar livre). Em ambos os casos, a fonte de luz e a intensidade da mesma são fatores críticos, pois afetam o desempenho das microalgas fototróficas (CHEN *et al.*, 2011).

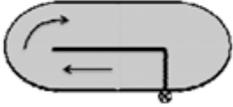
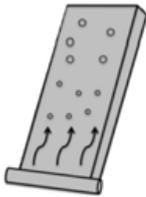
No cultivo ao ar livre, a principal fonte de luz é a solar. Algumas fontes de luz artificial modernas, como o LED e a fibra óptica, por exemplo, podem ser utilizadas no cultivo *indoor*. Também é possível transmitir energia solar do exterior para iluminar os fotobiorreatores (CARDOSO *et al.*, 2011a; CHEN *et al.*, 2011).

As lagoas do tipo *raceway*, também conhecidas como lagoas de rolamento aberto, são bastante utilizadas devido à sua facilidade de operação e construção. Geralmente seu uso está associado à produção de microalgas a um baixo custo (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os sistemas fechados são mais adequados para microalgas que podem ser rapidamente contaminadas por outros microrganismos (CARDOSO *et al.*, 2011a) Algumas das vantagens desse sistema incluem a obtenção de maior produtividade de biomassa microalgal e a possibilidade de maior controle das condições de cultivo (FRANCO *et al.*, 2013; ESPINOSA *et al.*, 2014). Algumas das limitações incluem: sobreaquecimento, bio-incrustantes, acúmulo de oxigênio, dificuldade de ampliação, alto custo de construção, operação e do cultivo das microalgas e danos às células pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*) (CARDOSO *et al.*, 2011a).

Na Tabela 2 estão listados os fotobiorreatores mais utilizados (tanto em sistema aberto e fechado) e suas vantagens e limitações.

Tabela 2 - Vantagens e limitações dos sistemas de cultivo de algas

Sistemas de Cultura	Vantagens	Limitações
<p>Sistemas abertos</p> 	<p>Relativamente econômicos</p> <p>Limpeza fácil</p> <p>Fácil manutenção</p> <p>Não utiliza terras agriculturáveis</p> <p>Necessita de pouca energia</p>	<p>Pouco controle das condições da cultura</p> <p>Pouca luz, homogeneização e utilização de CO₂</p> <p>Dificuldade de cultivar por longo período</p> <p>Pouca produtividade</p> <p>Limitados à algumas espécies</p> <p>Facilidade na contaminação</p>
<p>Fotobiorreatores tubulares</p> 	<p>Relativamente econômicos</p> <p>Grande parte da superfície recebe iluminação</p> <p>Adequada para culturas ao ar livre</p> <p>Boa produtividade em biomassa</p>	<p>Gradientes de pH, oxigênio dissolvido e Co₂ ao longo dos tubos</p> <p>Incrustação</p> <p>Algum grau de crescimento na parede</p> <p>Requer áreas de terra grandes</p> <p>Fotoinibição</p>
<p>Fotobiorreatores planos</p> 	<p>Relativamente econômicos</p> <p>Limpeza fácil</p> <p>Grande parte da superfície recebe iluminação</p> <p>Adequada para culturas ao ar livre</p> <p>Baixo consumo de energia</p> <p>Boa produtividade em biomassa</p> <p>Baixo acúmulo de oxigênio</p>	<p>Difícil de executar em larga escala</p> <p>Difícil controle de temperatura</p> <p>Algum grau de crescimento na parede</p> <p>Estresse hidrodinâmico para algumas espécies</p> <p>Baixa eficiência fotossintética</p>
<p>Fotobiorreatores de coluna</p> 	<p>Baixo consumo de energia</p> <p>Alta transferência de massa</p> <p>Boa homogeneização</p> <p>Melhor exposição aos ciclos dia-noite</p> <p>Baixo nível de tensão de cisalhamento</p> <p>Fácil de esterilizar</p> <p>Fotoinibição reduzida</p> <p>Fotoxidação reduzida</p>	<p>Pequena área da superfície recebe iluminação</p> <p>Materiais de construção sofisticados</p> <p>Tensão de cisalhamento</p> <p>Diminuição da área de superfície iluminada em larga escala</p> <p>Custo alto comparado aos sistemas abertos</p> <p>Custos de manutenção</p> <p>Baixo potencial para produção em escala</p>

Fonte: adaptado de DRAGONE *et al.* (2010).

3.8.2. Nutrição

A maioria das microalgas é considerada fotoautotrófica, isto, é, inteiramente dependentes da fotossíntese para obter suas necessidades

metabólicas, usando a luz solar como fonte energética e dióxido de carbono (CO₂) como fonte de carbono para produção de carboidratos e ATP (WALTER, 2011).

No entanto, elas podem ser cultivadas também sob outras condições, como por exemplo, nos modos heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico, dependendo da adaptação das estirpes de algas ao ambiente. A diferença entre estas modalidades de cultivo está na fonte de energia e de carbono (CHEN *et al.*, 2011; BEEVI & SUKUMARAN, 2014).

No cultivo fotoautotrófico (ou autotrófico), as células obtêm energia da luz e do carbono inorgânico (exemplo: o carbono do CO₂ presente no ar) para produzir, através da fotossíntese, suas biomoléculas (CARDOSO *et al.* 2011a; CHEN *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2013). Em uma cultura heterotrófica, as microalgas utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono na ausência de luz (CARDOSO *et al.* 2011; CHEN *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2013).

Apesar de possuir a vantagem de requerer apenas luz solar e CO₂ para o crescimento, cultivo fotoautotrófico não possui uma alta taxa de produção de biomassa. Já uma cultura heterotrófica, por não necessitar de luz para seu desenvolvimento, permite o aumento de densidade de microalgas e, conseqüentemente, da taxa de produtividade (BEEVI e SUKUMARAN, 2014).

No cultivo fotoheterotrófico a alga requer luz quando utiliza compostos orgânicos como fonte de carbono. A principal diferença entre o cultivo mixotrófico e o fotoheterotrófico é que este último requer luz como fonte de energia, enquanto o mixotrófico pode usar componentes orgânicos para este propósito (CHEN *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2013). Em relação ao metabolismo heterotrófico, as fontes de carbono mais utilizadas são glicose, glicerol e ácido acético (ÂNGELO *et al.*, 2014), no entanto, estudos recentes tem buscado fontes alternativas de meio de cultivo, como os resíduos agroindustriais e sanitários (GIRISHA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2014; FONTOURA *et al.*, 2015).

No cultivo mixotrófico o microorganismo pode viver sob condições fotoautotróficas ou heterotróficas ou, ainda, sob as duas condições; a microalga realiza fotossíntese e assimila de forma simultânea o CO₂ e a fonte de carbono fornecida a ela (CHEN *et al.*, 2011; FRANCO *et al.*, 2013; ORTENZIO *et al.*, 2015). Esse tipo de cultivo garante maior rendimento de biomassa (MELO *et al.*,

2014; LOPES *et al.*, 2015). No mixotrófico, o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO₂ atmosférico (CO₂ inorgânico). A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa (LOPES *et al.*, 2015).

As microalgas requerem ainda outros nutrientes, especialmente os macronutrientes (NPK) e micronutrientes (metais), além de vitaminas, em certos casos (BORGHETTI, 2009; FRANCO *et al.*, 2013).

3.8.3. Condições do cultivo

As condições de cultura interferem diretamente no crescimento das algas e na composição química das células. Entre os fatores abióticos que influenciam estão a qualidade e quantidade de luz, temperatura, O₂, CO₂, pH, salinidade, químicos tóxicos e concentração de nutrientes (além do carbono, nitrogênio, fósforo, sais de magnésio, potássio e cálcio são os elementos mais importantes para nutrição das algas) (BORGHETTI, 2009; MATA *et al.*, 2010). Cada espécie exigirá determinadas concentrações de nutrientes adicionados ao meio, bem como ajustes de pH, temperatura e luminosidade (WALTER, 2011; MELO *et al.*, 2014).

Além desses fatores, condições operacionais também exercem influência sobre o cultivo, como o cisalhamento produzido pela agitação, taxa de diluição do meio, profundidade do reator, frequência da coleta e a adição de bicarbonato (MATA *et al.*, 2010).

Em geral, os cultivos de microalgas são realizados em meio de cultura líquido (WALTER, 2011; MELO *et al.*, 2014). O uso de efluentes industriais, como aqueles provenientes de indústrias de processamento de alimentos, poderia ser uma alternativa viável para uso como meio de cultura, visto que são ricos em nitrogênio, fósforo e carbono (BEEVI e SUKUMARAN, 2014).

3.8.3.1. Assepsia

O cultivo de microalgas está sujeito à contaminação por bactérias, protozoários, fungos ou vírus. A presença de patógenos no meio e a competição com outras espécies de microalgas interferem no desenvolvimento desses microrganismos, portanto, é de fundamental importância que se faça a mitigação desses agentes contaminantes. Para tanto, é necessário cuidar da assepsia do local e dos materiais utilizados no dia a dia do cultivo. O material de limpeza e a vidraria devem ser específicos para cada tarefa, assim como qualquer outro material empregado, como tubos de aeração, baldes, mangueiras, etc. Existem muitos métodos, diferentes e eficazes, de limpeza e esterilização do material, sendo que, para a vidraria, o da autoclave ainda é o mais difundido e indicado. Também é necessário cuidar da filtragem e esterilização da água e meio utilizados (GOMES, 1986; MATA *et al.*, 2010).

3.8.3.2. Aeração

A aeração auxilia na estabilidade do pH através do sistema carbonato-pH, além de aumentar as trocas gasosas entre o ar e a cultura. Ela também serve para homogeneizar os nutrientes e células no meio, permitindo que todas as células recebam luz na mesma proporção. Também evita que as algas se sedimentem ou se agrupem nas paredes, afetando a recepção de luz, o que pode levar à morte das células. A aeração pode ser fornecida por um compressor de pistão seco ou a óleo, ou por um soprador de ar radial (GOMES, 1986; BORGHETTI, 2009; FRANCO *et al.*, 2013).

3.8.3.3. Temperatura

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos, por isso a temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos. A resposta

a diferentes temperaturas varia conforme as espécies e entre cepas da mesma espécie devido a diferenças genéticas, de iluminação, de aclimação, circunstâncias nutricionais. De um modo geral, todas as espécies fitoplanctônicas de importância comercial crescem entre 16 e 24°C. Porém, espécies tropicais suportam temperaturas mais altas. O crescimento das algas pode ser acelerado com o aumento da temperatura até atingir um nível de saturação e morte das células (GOMES, 1986; MORAES, 2011; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

3.8.3.4. *Luminosidade*

A luz é fundamental para o desenvolvimento do cultivo, pois atua como a principal fonte de energia no processo de produção de biomassa; além disso, também interfere na reprodução e morfologia das microalgas (GOMES; 1986; ARCEO, 2012).

Para contornar as limitações da luz natural, pode-se socorrer à iluminação artificial. A maioria das espécies suporta iluminação contínua e, para melhor rendimento, este procedimento tem sido normalmente empregado. A luz artificial possibilita produção diária contínua, pois assume o papel da radiação solar durante a noite ou complementa-a conforme as variações se instalam (GOMES; 1986; ARCEO, 2012).

A alta intensidade luminosa induz a formação de triacilglicerídeos (lipídeos neutros), preferíveis para a produção de biocombustível. Em contrapartida, baixa intensidade luminosa estimula a formação de lipídeos polares, especialmente aqueles associados à membrana celular. O excesso de luz também pode provocar efeito letal nas células, pois induz a formação de peróxido de hidrogênio, que é tóxico para as microalgas. Para fins de iluminação artificial, comumente utilizam-se as lâmpadas fluorescentes (GOMES; 1986, XIN *et al.*, 2010; ARCEO 2012).

3.8.3.5. pH – Potencial Hidrogeniônico

O pH é um dos parâmetros mais importantes no processo de cultivo de microalgas e determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, o que tem influência direta ou indireta no metabolismo das microalgas (ARCEO, 2012; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

As alterações no valor de pH também dependem de vários fatores, como composição e capacidade tamponante do meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade de CO₂) e atividade metabólica das células. Por outro lado, cada espécie de microalgas possui uma faixa de pH adequada para seu crescimento. A maioria das espécies de microalgas cresce em pH neutro a alcalino (ARCEO, 2012; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

3.8.4. Crescimento celular

A análise do crescimento da microalga em função do tempo é o método mais eficaz para o conhecimento da velocidade de sua reprodução, por serem organismos unicelulares, com rápido ciclo de vida quando comparado com plantas terrestres (PEREIRA FILHO *et al.*, 2010).

Para se acompanhar o desenvolvimento da cultura a concentração celular deve ser determinada diariamente (GOMES, 1986). Esse procedimento também permite a verificação de possível contaminação das culturas. A contagem de células em câmaras especiais (Neubauer) em microscópio é o método mais difundido e também o mais econômico.

A câmara de Neubauer é um tipo de hemocitômetro. Ela possui duas áreas de contagem de células, situadas lado a lado no meio da lâmina. Podem-se observar, em cada área, linhas que se cruzam transversalmente formando quatro quadrantes. O volume contido nesses quatro quadrados é de 0,1 mm³ (GOMES, 1986).

Deve-se proceder com a contagem das células (microalgas) presentes em cada quadrante da câmara. A média obtida deve ser multiplicada por 10^4 para obter-se o número de células presentes em cada mililitro. Havendo diluições anteriores ao início da contagem, deve-se multiplicar também pelo fator de diluição (GOMES, 1986).

3.9. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS

3.9.1. Recuperação da biomassa

Após o cultivo, a biomassa de microalgas deve ser separada do meio de cultura para que seja aproveitada. Esse processo é chamado de recuperação, colheita ou coleta da biomassa (DRAGONE *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2011a; CHEN *et al.*, 2011).

Uma coleta eficiente da biomassa é essencial para que seja viável a produção em grande escala de biodiesel a partir de microalgas. Os custos e consumo de energia para essa etapa podem ser elevados, devido à relativa baixa concentração de biomassa nos cultivos e o tamanho das células. O custo de recuperação de biomassa a partir do caldo pode representar 20-30% do custo total da produção da biomassa (DRAGONE *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2014).

A recuperação de biomassa de microalgas pode ser obtida de várias formas: física, química ou biológica. Geralmente, é um processo de dois estágios, que envolvem: colheita de massa (separação de biomassa a partir da suspensão grandes quantidades) e espessamento (onde a pasta fluida é concentrada) (DRAGONE *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2013). Processos de separação sólido-líquido são empregados, como centrifugação, floculação e filtração.

3.9.1.1. Centrifugação

Esse processo envolve a aplicação de forças centrífugas para separar a biomassa de microalgas do meio de cultura. Uma vez separadas, as microalgas podem ser removidas da cultura por simples drenagem do excesso de meio. É um método rápido de recuperação de células, mas as forças gravitacionais e de cisalhamento podem danificar a estrutura celular. Outra desvantagem deste processo é o elevado consumo de energia, principalmente quando se trata de um cultivo de volume grande (DRAGONE *et al.*, 2010).

3.9.1.2. Filtração

Existem várias formas de filtração: filtração sem saída, microfiltração, ultra filtração, filtração sob pressão, filtração sob vácuo e filtração de fluxo tangencial. Todos esses processos tratam da filtração da cultura através de filtros: o meio passa pela malha do filtro enquanto as algas ficam ali retidas (DRAGONE *et al.*, 2010).

Esse processo é mais adequado para microalgas de tamanho grande como *Coelastrum proboscideum* e *S. Platensis*, mas não funciona para organismos com dimensões menores, como é o caso da *Scenedesmus* (MATA *et al.*, 2010).

3.9.1.3. Floculação

Esse processo tem por objetivo a agregação de células de microalgas no meio. As microalgas transportam uma carga negativa que impede a auto agregação em suspensão. A adição de produtos químicos conhecidos como floculantes neutraliza ou reduz a carga de superfície negativa, provocando a agregação das células. Isso cria partículas maiores e facilita o processo de sedimentação, centrifugação e até filtração. Estes produtos químicos coagulam as algas sem afetar a composição e toxicidade do produto. Geralmente são

usados como floculantes sais de metais multivalentes como cloreto férrico (FeCl_3), sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) (DRAGONE *et al.*, 2010; DEMIRBAS e DEMIRBAS, 2010; MATA *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2013). Entre as tecnologias, a floculação parece ser a mais vantajosa devido ao baixo custo energético requerido (HALIM *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2014).

3.9.2. Secagem da biomassa e armazenamento

Após a recuperação a biomassa ainda possuirá um teor alto de umidade. Geralmente, aplica-se um método de desidratação para preservar a qualidade do material. A secagem auxilia na ruptura das células, tendo como consequência a liberação do conteúdo lipídico, o que torna o processo de extração a partir da biomassa seca um processo mais fácil do que o realizado em biomassa úmida (CARDOSO *et al.*, 2011a). A desidratação pode ser realizada através de secagem ao sol, secagem por nebulização, tambor de secagem ou liofilização (ARCEO 2012, ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

3.9.3. Extração dos lipídeos totais

A extração de lipídios a partir de algas é um processo de elevada complexidade, pois os lipídios intracelulares estão ligados às membranas celulares, ou seja, é necessário romper a parede celular das algas para maximizar a extração do material lipídico (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Existem vários métodos para romper a parede celular das microalgas. Classificam-se entre aqueles que utilizam ação mecânica, como prensa, homogeneizador de alta pressão, moinho de bolas, autoclave ou liofilização, micro-ondas e ultrassom (este não é aplicável a grandes escalas) e os que não a utilizam, como o congelamento, utilização de solvente orgânico, choque osmótico e reações ácidas, básica, enzimáticas (CARDOSO *et al.*, 2011a; ANDRADE & COLOZZI FILHO, 2014).

Os métodos para extração de óleo de microalgas são, na maioria das vezes, derivados de técnicas de extração convencional de óleo de sementes vegetais, como por exemplo, a prensagem e extração por solventes químicos (ou a combinação dos dois) (DANTAS *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014).

Segundo BRUM *et al.* (2009) a extração de óleo com solvente é “um processo de transferência de constituintes solúveis (o óleo) de um material inerte (a matriz graxa) para um solvente com o qual a matriz se acha em contato”.

Lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares; lipídios polares estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio e requerem solventes polares para quebrar essas ligações e liberá-los (BRUM *et al.*, 2009). Logo, a fração lipídica extraída pode mudar seu conteúdo e composição de acordo com a polaridade do solvente (HALIM *et al.*, 2012; HAKALIN *et al.*, 2014). Solventes como hexano, metanol, etanol e misturas de clorofórmio: metano, etanol: hexano, clorofórmio: metanol: água e etanol:hexano:água são comumente utilizados (BRUM *et al.*, 2009; HAKALIN *et al.*, 2014).

O método deve ser rápido, eficiente e ocorrer em condições moderadas para reduzir a degradação dos lipídeos ou ácidos graxos. Os solventes utilizados devem ser baratos, possuir seletividade para separar o óleo de materiais indesejáveis (como proteolipídeos, moléculas pequenas); ter baixa toxicidade; fácil recuperação sem deixar resíduos no óleo; imiscibilidade em água; e apresentar ponto de ebulição que favoreça sua posterior eliminação (BRUM *et al.* 2009., MEDINA *et al.*, 1998).

A pouca permeabilidade da célula aos solventes impede a extração. Nesses casos a taxa de lipídeos pode ser aumentada pela adição de uma pequena quantidade de água à solução solvente. A água faz com que estruturas ricas em polissacarídeos inchem, facilitando o acesso do solvente aos lipídeos (MEDINA *et al.*, 1998). Como os lipídios têm uma grande faixa de hidrofobicidade, é praticamente inviável a utilização de um único solvente universal para a extração dos lipídios (BRUM *et al.*, 2009).

Alguns materiais biológicos contêm enzimas que degradam os lipídeos durante a extração. Geralmente, solventes que contêm álcool inativam várias fosfatidases e lipases que degradam lipídeos (MEDINA *et al.*, 1998). Entretanto, solventes alcoólicos também extraem alguns contaminantes celulares como açúcares, aminoácidos, sais, proteínas hidrofóbicas e pigmentos.

3.9.3.1. *Extração com clorofórmio e metanol*

A metodologia de BLIGH & DYER (1959) é uma versão simplificada do procedimento clássico usando clorofórmio-metanol proposto por FOLCH *et al.* (1957). Possui como desvantagens a toxicidade e inflamabilidade dos solventes (clorofórmio e metanol). Uma das vantagens na utilização desse sistema é a capacidade de extrair de forma eficiente tanto os lipídeos neutros e os lipídeos polares (BRUM *et al.*, 2009; HALIM *et al.*, 2012).

3.9.3.2. *Extração com hexano e isopropanol*

Estudos apontam que o hexano é menos eficiente que o clorofórmio na extração de lipídeos de microalgas. Apesar disso, ele é menos tóxico, tem pouca afinidade com componentes não lipídicos e alta seletividade para a fração neutra dos lipídeos (MEDINA *et al.*, 1998; HALIM *et al.*, 2011).

HARA & RADIN (1978) propuseram um método bastante simples de extração baseado na mistura de hexano e isopropanol. Hexano-isopropanol (3:2 v/v) é um solvente com baixa toxicidade.

BRUM *et al.* (2009) compararam diferentes métodos de extração de lipídeos em peito de frango e aveia em flocos. A mistura n-hexano-isopropanol apresentou vantagens como menor toxidez e melhor separação das fases (mais rápida) quando da adição do sulfato de sódio anidro, na etapa de lavagem, removendo eficientemente os não-lipídios da fase orgânica. Entretanto, a extração por BLIGH & DYER (1959) obteve os melhores resultados.

Em estudo conduzido por HALIM *et al.*, (2011), a inclusão do isopropanol como co-solvente aumentou a quantidade de lipídeos extraídos por hexano puro em 300%, sendo extraídos 0,015 gramas de lipídeos por grama de biomassa seca enquanto que para o sistema hexano-isopropanol, o resultado foi de 0,068g de lipídeos extraídos por biomassa de alga seca.

3.9.3.3. *Influência da temperatura na extração de lipídeos*

A extração por solventes também pode acontecer sob condições diferenciadas de temperatura e pressão. A temperatura em que é realizada a extração influencia no rendimento de lipídeos: ela pode reduzir a viscosidade do óleo e aumentar a solubilidade dos triacilgliceróis, aumentando a eficiência e rapidez da extração (DAGOSTIN, 2005; HALIM *et al.* (2012).

3.10. MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BODIESEL

De acordo com CHEN *et al.*, (2015), o primeiro documento tratando sobre biocombustível de microalgas apareceu em 1970 e, desde então, o número de publicações sobre este tema tem mostrado um aumento anual global. Na Tabela 3 são apresentados os teores lipídicos e produção de biomassa de algumas espécies de microalgas.

Pode-se encontrar na literatura exemplos de estudos demonstrando potencial de produção de biodiesel a partir de óleo de microalgas do grupo *Scenedesmus* (RAMIREZ *et al.*, 2014; FONTOURA *et al.*, 2015).

RAMIREZ *et al.* (2014) cultivaram a *Scenedesmus sp.* em meio suplementado com vinhaça, um subproduto da produção de etanol a partir da cana de açúcar. FONTOURA *et al.* (2015) estudaram o desenvolvimento de *Scenedesmus sp.* em efluente de suinocultura, onde observaram a eficiência destas na adaptação ao efluente através do aumento da biomassa durante os oito dias de cultura.

Tabela 3 - Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas

Espécie de microalga	Teor lipídico (%)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24.0 – 31.0
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0 – 75.0
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	14.6 – 16.4
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0 – 63.0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14.6–57.8
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0–22.0
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0–58.0
<i>Chlorella sp.</i>	10.0 – 48.0
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0 – 2.90
<i>Chlorella</i>	18.0–57
<i>Chlorococcum sp.</i>	19.3
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20.0–51.1
<i>Dunaliella salina</i>	6.0–25.0
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7–71.0
<i>Dunaliella sp.</i>	17.5–67.0
<i>Ellipsoidion sp.</i>	27.4
<i>Euglena gracilis</i>	14.0–20.0
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0–40.0
<i>Isochrysis sp.</i>	7.1–33
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0
<i>Monallanthus salina</i>	20.0–22.0
<i>Nannochloris sp.</i>	20.0–56.0
<i>Nannochloropsis oculata.</i>	22.7–29.7
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12.0–53.0
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0–65.0
<i>Nitzschia sp.</i>	16.0–47.0
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5
<i>Pavlova salina</i>	30.9
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0–57.0
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0–18.8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0–55.0
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9 – 18.4
<i>Scenedesmus sp.</i>	19.6 – 21.1
<i>Skeletonema sp.</i>	13.3 – 31.8
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5–51.3
<i>Spirulina platensis</i>	4.0–16.6
<i>Spirulina maxima</i>	4.0–9.0
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5–23.0
<i>Tetraselmis sp.</i>	12.6–14.7

Fonte: MATA et al. (2010).

3.10.1. Potencial de *Scenedesmus acuminatus* para produção de biodiesel

Scenedesmus acuminatus já foi avaliada quanto ao seu potencial em relação à produção de óleo para transformação em biodiesel em alguns estudos (MUSHARRAF *et al.*, 2012; BAUMGARTNER *et al.*, 2013b; MINILLO *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

MUSHARRAF *et al.* (2012) analisaram o perfil de ácidos graxos de seis espécies de microalgas: *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus acuminatus*, *Nannochloropsis sp.*, *Anabaena sp.*, *Chlorella sp.* e *Oscillatoria sp.* Dentre estas, *Scenedesmus acuminatus* demonstrou ser a mais promissora em termos de produção de óleo, atingindo um teor de 17% de óleo considerado adequado para a produção de biodiesel (Gráfico 2).

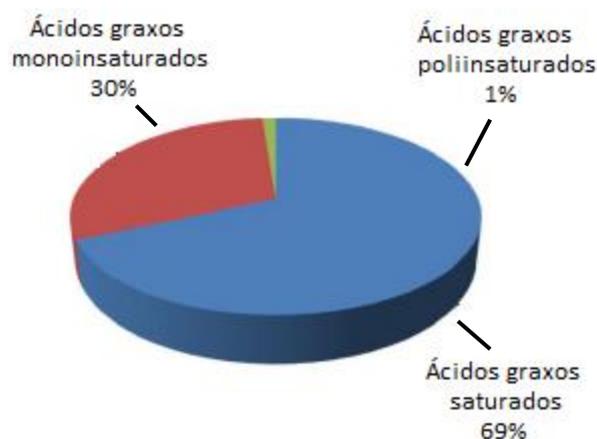


Gráfico 2 – Distribuição dos ácidos graxos em *Scenedesmus acuminatus* (MUSHARRAF *et al.*, 2012).

BAUMGARTNER *et al.* (2013b) avaliaram três distintos métodos de extração de lipídeos totais da microalga *Scenedesmus acuminatus*, avaliando teor de lipídeos totais obtidos, além de caracterizar o óleo quanto à massa molar, índice de acidez e perfil de ácidos graxos. O método de extração sucessiva com hexano obteve os melhores resultados em relação ao perfil de ácidos graxos, onde obteve-se um óleo com potencial para obtenção de biodiesel de qualidade.

MINILLO *et al.* (2013) estudaram a cinética de crescimento de quatro espécies de microalgas, avaliando também a exposição destas ao CO₂; dentre as

quatro, *Scenedesmus acuminatus* foi a que apresentou melhor desempenho no crescimento celular em ambos tratamentos testados. NASCIMENTO *et al.* (2015) demonstraram o potencial dessa microalga na extração lipídica para produção de biodiesel.

3.10.2. Cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em efluente

Também existem estudos que investigaram o desenvolvimento de *Scenedesmus acuminatus* em meio de cultura contendo efluente (ADAMSSON, 2000; UNPAPROM *et al.*, 2014).

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos de *Scenedesmus acuminatus*

Ácidos graxos	Conteúdo (% de ácidos graxos totais)
Ácido cáprico (C10:0)	0.13
Ácido mirístico (C14:0)	1.87
Ácido Pentadecanóico (C15:0)	0.53
Ácido palmítico (C16:0)	19.34
Ácido palmitoléico (C16:1)	11.73
Ácido hexadecadienóico (C16:2)	3.81
Ácido esteárico (C18:0)	19.55
Ácido oléico (C18:1)	23.2
Ácido linoleico (C18:2)	9.75
Ácido linolênico (C18:3)	4.95
Outros	5.1
Total de ácidos graxos saturados	34.45
Total de ácidos graxos insaturados	54.65
Relação ácidos graxos saturados / insaturados	1.55

Fonte: UNPAPROM *et al.*, 2014.

UNPAPROM *et al.* (2014) avaliaram o cultivo dessa espécie em efluente de suinocultura para produção de biodiesel e tratamento desse resíduo, obtendo o perfil de ácidos graxos da mesma (Tabela 4); concluíram que a substituição de 10% do meio de cultura por efluente em estudo poderia fornecer produtividade em biomassa líquida de 3,24 g/L ao dia. Deste modo, observa-se através dos estudos apontados que *Scenedesmus acuminatus* possui potencial para produção de lipídeos para conversão em biodiesel; ademais, essa microalga já demonstrou

que pode desenvolver-se em meio de cultura suplementado por água de maceração (SOUZA *et al.*, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICROALGAS

As microalgas cultivadas neste experimento pertencem à espécie *Scenedesmus acuminatus*. O inóculo foi cedido pelo Prof. Dr. Nyamien Sebastien, do Instituto de Pesquisa em Aquicultura (INPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Toledo.

4.2. EFLUENTE

O efluente foi coletado na Unidade Industrial de Mandioca e Milho da Cooperativa Agroindustrial Lar (UIM), localizada no Distrito de Dom Armando, Município de Missal (PR). A UIM faz o processamento do milho via moagem por via seca (canjica) e via úmida (amido de milho). O processo utilizado na via úmida pode ser observado na Figura 10.

A moagem por via úmida gera como efluente líquido a “água de maceração”. Na UIM ela é reutilizada por duas vezes antes de ser descartada para tratamento. Ela não pode ser comercializada, pois isso depende de uma estrutura para concentração desse resíduo. Logo, esse efluente é tratado na própria unidade.

O tratamento é realizado em um sistema composto por oito lagoas de decantação e um biodigestor. A biodigestão ocorre depois da passagem do efluente pela terceira lagoa, onde são acrescentados microrganismos para início da fermentação anaeróbia e pré-acidificação do meio. Ou seja, quando o efluente entra no reator, a fermentação já está na penúltima fase, aguardando a ação das bactérias metanogênicas. O efluente bruto possui coloração amarela e aspecto turvo; o biodigerido possui coloração acinzentada e aspecto mais líquido (Figura 11) (LAR - Comunicação pessoal).

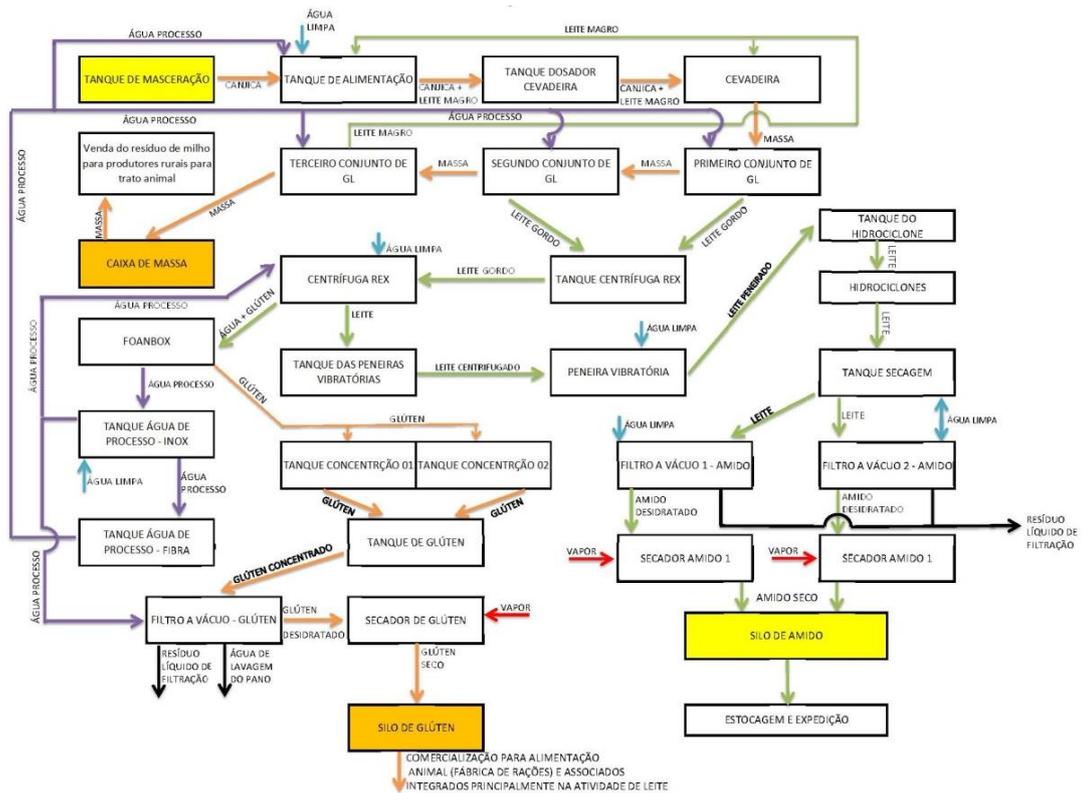


Figura 10 – Fluxograma da produção de amido de milho (LAR, 2015).



Figura 11 – Saída do efluente bruto (água de maceração) da Unidade Industrial de Mandioca e Milho da Cooperativa Agroindustrial Lar (UIM) (elaborado pelo autor).

4.2.1.1. Coleta

Para a realização dos testes preliminares foram coletadas amostras de efluente bruto (na saída do processo, conforme observado na Figura 11) e

também de efluente biodigerido (coletado na saída do biodigestor). As amostras foram identificadas e transportadas para o laboratório em caixa de isopor contendo gelo. Em seguida foram refrigeradas até o início de experimento (iniciado no prazo de 24 horas).

Uma segunda coleta foi realizada para obter efluente suficiente para os demais cultivos do experimento (foram coletados aproximadamente 60 litros de efluente). As amostras foram transportadas para o laboratório e acondicionadas em congelador à temperatura de -10°C (Figura 12) localizado no Laboratório de Sedimentologia da Itaipu.



Figura 12 – Parte das amostras de água de maceração armazenadas em congelador (elaborada pelo autor).

4.2.1.2. Caracterização do efluente

As amostras da segunda coleta foram enviadas para o Laboratório Nucleotec, em Foz do Iguaçu, para realização das seguintes análises: pH, DBO, fósforo total, ortofosfato solúvel, cianeto, óleos e graxas totais, amônia, nitrogênio NKT, nitrogênio orgânico, teor de lipídeos e cinzas. A análise de DQO (essa e as demais realizadas ao longo do estudo) foram realizadas no Setor de Ensaio Químico-Físicos do Laboratório Eletro-eletrônico e Químico da Itaipu (BORGHETTI, 2009; NOVAES JR., 2013).

4.3. ORGANIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram divididos em duas etapas: cultivo das microalgas e extração e quantificação dos lipídeos (Figura 13).

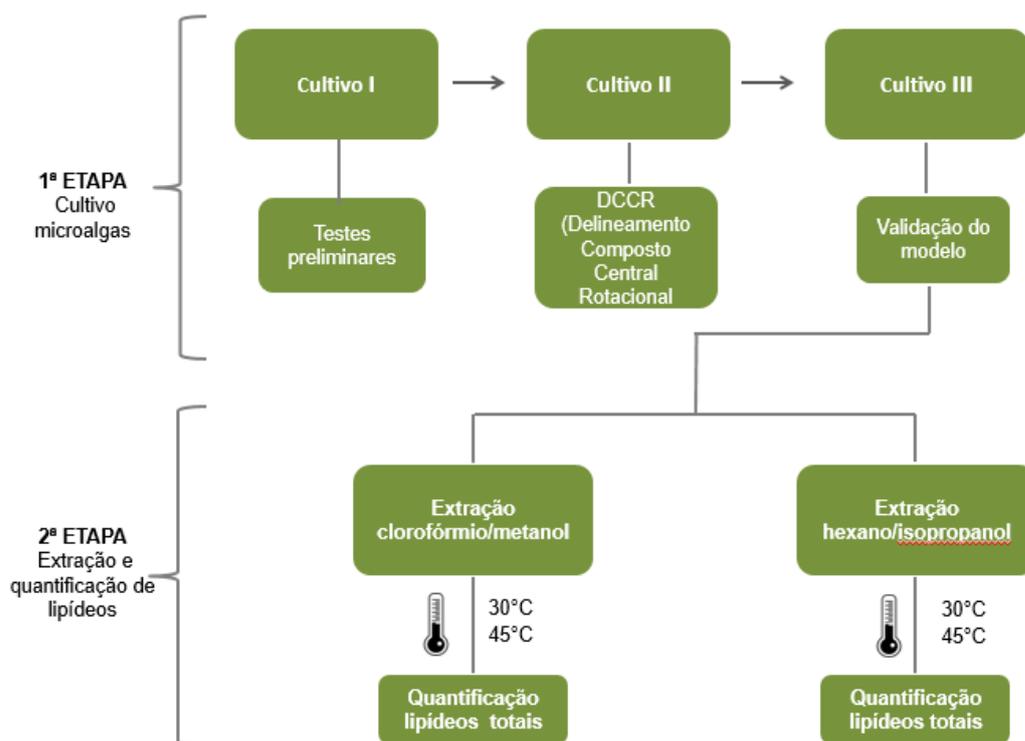


Figura 13 – Esquema geral do experimento (elaborada pelo autor).

A primeira etapa consistiu em testes preliminares para verificar a viabilidade do crescimento das algas no efluente em estudo. Também tinha como objetivo avaliar e detectar em qual destes meios (efluente bruto, efluente biodigerido, auto-clavado ou in natura) a microalga apresentaria maior potencial de cultivo considerando a densidade celular.

O segundo cultivo teve por objetivo identificar as condições ótimas de cultivo das microalgas por meio de um delineamento composto central rotacional na qual foram avaliados os efeitos das variáveis proporção de inóculo e fração água/efluente presente no meio de cultura. O planejamento fatorial, em estudos que abrangem muitas variáveis, economiza tempo e recursos financeiros, pois

permite que o estudo seja realizado de maneira organizada e com a quantidade mínima de experimentos (SILVA *et al.*, 2008).

As variáveis dependentes para este estudo foram densidade celular, peso em biomassa seca, DQO do meio de cultura pós cultivo e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}). Foram avaliadas as 2 variáveis independentes (percentual de inóculo e proporção de efluente presente no meio de cultura) em 5 níveis e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Os resultados foram analisados estatisticamente através do Software Statistica 7.0 (Startsoft).

Segundo NAKASHIMA *et al.* (2000), independente do quanto um modelo se ajusta ao conjunto de dados que o geraram, o seu valor real está baseado no quão bem ele pode prever a variável de resposta. Logo, a fim de validar o modelo estatístico, um terceiro cultivo foi realizado, cujas condições experimentais foram determinadas a partir da análise estatística dos resultados do delineamento composto central rotacional. Este cultivo foi realizado em triplicata, em condições de temperatura e iluminação semelhantes ao cultivo anterior.

A segunda etapa consistiu na extração e quantificação dos lipídeos presentes na biomassa proveniente do cultivo realizado nas condições ótimas encontradas. Essa extração foi processada através de solventes orgânicos, em dois sistemas diferentes: clorofórmio/metanol (BLIGH & DYER, 1959; CHEN *et al.* (2012) e hexano/isopropanol (HARA & RADIN, 1978, ARAÚJO, 2011; HALIM *et al.*, 2011.), com modificações/adaptações, sob duas temperaturas diferentes: 30 e 45°C. Essa etapa teve por objetivo quantificar lipídeos totais produzidos pela microalga cultivada e também identificar qual dos dois sistemas foi mais eficiente na extração dos mesmos.

4.4. CULTIVO I – TESTES PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* EM ÁGUA DE MACERAÇÃO

O cultivo das microalgas foi realizado no Laboratório Ambiental da Usina Hidrelétrica Itaipu Binacional, localizada na cidade de Foz do Iguaçu, estado do Paraná.

Este cultivo foi realizado em condições mixotróficas, ou seja, a fonte de carbono foi obtida do meio de cultivo (nesse caso, da água de maceração) e do ar atmosférico (SILVA *et al.*, 2009). Os biorreatores consistiram em frascos erlemeyers de 1000 mL de capacidade. Os quatro biorreatores receberam substrato conforme condições especificadas na Tabela 5.

O cultivo recebeu iluminação 24 horas (sem fotoperíodo) através de quatro lâmpadas fluorescentes, resultando em uma luminosidade média de 7000 lux (Luxímetro Yokogawa 510).

Tabela 5 – Condições dos meios nos biorreatores do Cultivo I

Condição	Efluente	Estéril
1	Bruto	Não
2	Biodigerido	Não
3	Bruto	Sim
4	Biodigerido	Sim

Fonte: elaborada pelo autor.

A homogeneização se deu por aeração através de mangueiras de silicone conectadas a uma bomba de aquário (0,8 L/s) conforme observado na Figura 14 (B). A temperatura se manteve na faixa de 28 a 30°C (MUSHARRAF *et al.*, 2012; FRANCISCO *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016).

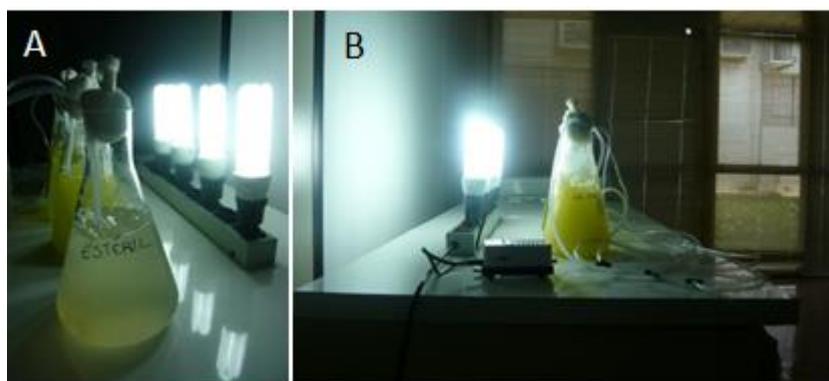


Figura 14- Aspecto do Cultivo I. A – Iluminação; B – Aeração (elaborada pelo autor).

Os reatores receberam 900 mL de meio de cultura cada, composto por água estéril e efluente a 30%. Essa proporção foi determinada com base em trabalhos da literatura (TAHER, 2013; DA SILVA, 2014; RAMIREZ *et al.*, 2014)

que cultivaram microalgas do gênero *Scenedesmus* em meio suplementado por distintos efluentes. DA SILVA (2014) avaliou o cultivo de microalgas do gênero *Scenedesmus* em diferentes concentrações de esgoto sanitário e obteve o melhor resultado com a concentração de 35%. RAMIREZ *et al.* (2014) avaliaram o cultivo de *Scenedesmus sp* em vinhaça e mostraram a possibilidade de cultivar esses microrganismos em meio de cultura contendo até 40% desse resíduo. TAHER (2013) verificou que *Scenedesmus* não se desenvolveu em com diluição superior a 30% de dejetos suíno biodigerido.

Cada biorreator recebeu 9 mL de inóculo com concentração celular de $3350 \cdot 10^4$ células/mL. Nestes ensaios não foram realizadas as caracterizações das amostras, pois o objetivo principal foi identificar o meio (efluente) mais adequado para uso nos próximos ensaios e também verificar a viabilidade do cultivo das microalgas. Foi avaliada somente a concentração de células no meio de cultura para confecção da curva de crescimento e quantificação da biomassa ao final do cultivo.

4.5. CULTIVO II

Para este cultivo, construíram-se estantes de madeira /compensado em modelo semelhante às que são utilizadas em cultivos de microalgas. O fundo da estante foi fechado para conservação da temperatura e recebeu tinta branca (espelho) para favorecer a luminosidade (Figura 15).

O cultivo recebeu 24 horas de iluminação artificial através de um sistema composto de lâmpadas fluorescentes dispostas acima dos reatores e na parte anterior da estante, perfazendo total de 8000 lux. A homogeneização seguiu o mesmo padrão do experimento anterior: aeração através de bombas de aquário e mangueiras de silicone com capacidade de bombear 0,8 litros/segundo de ar por reator.

Foi utilizado inóculo com densidade celular de $3200 \cdot 10^4$ células por mL. Este inóculo teve origem em cultivo com efluente em estudo na concentração de 30%. Foi utilizado efluente da segunda coleta para o meio de cultura.



Figura 15 – Estante utilizada no cultivo do DCCR – Cultivo II (elaborada pelo autor).

A avaliação do desenvolvimento dos cultivos foi realizada em função da determinação dos seguintes parâmetros: determinação da densidade celular (células/mL), quantificação de biomassa seca (g/L) e determinação do pH (TAHER, 2013). A avaliação de degradação da matéria orgânica foi realizada através da análise de DQO do meio de cultura antes da inoculação e depois de terminado o cultivo; através desses dados foi calculada a eficiência do tratamento.

Considerando-se que os cultivos apresentaram curvas de crescimento diferentes, com distintos valores de densidade celular inicial e período de cultivo, a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) foi adicionada ao planejamento como uma variável resposta adicional. Dessa forma, os resultados obtidos para cada tratamento puderam ser comparados de maneira mais adequada.

4.5.1. Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max})

A dinâmica de crescimento dos microorganismos pode ser representada por modelos matemáticos. Estes se baseiam na hipótese de que o efeito de

propriedades do meio (temperatura, concentração, pH, dentre outros) pode ser representado por meio de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos (NAKASHIMA *et al.*, 2000).

Existem diferentes modelos de taxas de crescimento para microorganismos. Um dos modelos mais empregados é a Equação de Monod (Equação 1) que descreve o crescimento de bactérias em função da concentração de um único substrato limitante (GALVÃO *et al.*, 2011).

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (1)$$

Em que:

μ_x (h^{-1}) velocidade específica de crescimento;

μ_{max} (h^{-1}) é a velocidade máxima específica de crescimento (parâmetro cinético);

K_S = constante de Monod;

S = concentração de insumo limitante (valor da DQO)

O μ_{max} é coeficiente cinético da taxa de crescimento máximo do modelo de Monod, ou seja, define a velocidade máxima específica de crescimento de um microorganismo em função da concentração de um único substrato limitante (GALVÃO *et al.*, 2011). A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de microrganismos em um dado instante (LOPES *et al.*, 2016).

O modelo matemático para o crescimento de *Scenedesmus acuminatus* em um biorreator descontínuo foi elaborado a partir do balanço de massa diferencial representado pelas Equações 2 e 3. Para descrever a velocidade específica de crescimento celular empregou-se o modelo cinético de Monod, representado pela Equação 1, com a adição de um termo referente à morte celular.

$$\frac{\partial X}{\partial t} = (\mu_x - k_D)X \quad (2)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x \quad (3)$$

Em que:

X é a concentração de células (cel/mL);

t é o tempo (dia);

μ_x : é a velocidade específica de crescimento celular (d^{-1});

k_D é a constante de morte celular;

$Y_{X/S}$ é o coeficiente estequiométrico (fator de conversão de substrato em células);

S é o substrato (representado pelo valor de DQO).

Os parâmetros do modelo (μ_{max} , k_s , k_d e $Y_{X/S}$) foram ajustados aos dados experimentais da curva de crescimento utilizando o método de otimização Downhill Simplex (NELDER & MEAD, 1965), empregando como função objetivo a seguinte equação:

$$F = \sum_{i=1}^{ndad} [(X_{EXP,i} - X_{MOD,i})^2 + (S_{EXP,i} - S_{MOD,i})^2] \quad (4)$$

Em que:

F é o valor da função objetivo;

N_{dad} o número de dados experimentais utilizados no ajuste;

X é a concentração de Células no ponto experimental i previsto pelo modelo e obtido experimentalmente;

S é a concentração de substrato no ponto experimental *i* previsto pelo modelo e obtido experimentalmente.

4.6. CULTIVO III – VALIDAÇÃO DO MODELO

Para validar a otimização foi realizado um cultivo sob as mesmas condições de iluminação, temperatura e aeração do experimento anterior.

Foram analisados pH, densidade celular, peso em biomassa seca e DQO utilizando-se dos mesmos procedimentos realizados no segundo cultivo.

4.7. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Foi realizada extração dos lipídeos totais a partir da biomassa obtida no cultivo III (seção 4.6).

4.8. Coleta da Biomassa

O primeiro passo realizado foi a coagulação do conteúdo dos biorreatores com a utilização de sulfato de alumínio - $(Al_2(SO_4)_3)$. Através da revisão bibliográfica realizada, encontrou-se o valor 200mg/L (FERRIOLS & AGUILAR; 2012) a 250 mg/L (TORRES *et al.*, 2014); em estudo sobre métodos para floculação de *Scenedesmus sp.* CHEN *et al.* (2013) encontraram o valor de 400 mg/L de sulfato de alumínio como concentração ótima para coagulação desta microalga. Foram realizados testes preliminares para verificar a quantidade necessária para coagulação neste ensaio. Verificou-se a que a quantidade de 500 mg/L por reator seria ideal para este experimento.

Também se verificou durante os testes que seria necessário ajustar o pH do meio após a mistura do sulfato, pois a coagulação só ocorreu depois do ajuste para valores específicos (5 ou 7).

Os frascos erlenmeyer foram agitados manualmente durante alguns minutos para dissolução do sulfato no meio. Depois do ajuste de pH com ácido sulfúrico (pois o meio estava básico – tendendo para o pH 10), observou-se a coagulação. Aguardaram-se 60 minutos para a total decantação da biomassa. Retiraram-se 10 mL de amostra do sobrenadante para realização de análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO). O restante foi descartado.

A biomassa resultante foi acondicionada em placas de Petri e levada para secagem em estufa a 45°C por 24 horas. Ao final do processo, a biomassa foi “raspada” das placas com auxílio de espátula esterilizada, o que transformou o produto final em um material granulado de coloração esverdeada. Os recipientes contendo biomassa seca foram acondicionados em freezer até o início da extração de óleo (BRANCO *et al.*, 2014).

4.8.1. Extração e quantificação de lipídeos

A extração e quantificação dos lipídeos foram realizadas na UNIOESTE (campus de Toledo), em dois laboratórios: Laboratório de Limnologia do Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia (GERPEL) e no Laboratório de Processos Biotecnológicos e de Separação do Centro de Engenharia e Ciências Exatas (CECE).

A extração dos lipídeos foi realizada utilizando-se de solventes orgânicos sob duas metodologias distintas: BLIGH & DYER (1959), de maneira adaptada (CHEN *et al.*, 2012), que utiliza clorofórmio e metanol para extração e HARA & RADIN (1978), também adaptada (HALIM *et al.*, 2011; ARAÚJO, 2011), que utiliza hexano e isopropanol.

Para avaliar a influência da temperatura nesse tipo de extração foram realizados dois ensaios em temperaturas distintas (30°C e 45°C), para os dois sistemas de extração, todos em duplicata. É sabido que um aumento na temperatura de extração (de 30° C a 60° C) pode aumentar a eficiência de extração em matéria prima de origem animal. Entretanto, temperaturas acima de 70°C podem levar a uma degradação oxidativa de componentes termossensíveis (HALIM *et al.*, 2012), ocasionando menor rendimento na extração.

A temperatura máxima também foi avaliada tendo-se em conta, além de outros fatores, o ponto de ebulição (PE) de cada solvente utilizado, para que ele não fosse evaporado no meio do processo, alterando as proporções originais (isopropanol - PE 82,5 °C; hexano – PE 68°C; clorofórmio – PE 61,2 °C e metanol - PE 64,7 °C).

4.8.1.1. Metodologia BLIGH & DYER (1959)

Inicialmente, 50 mg de biomassa foram pesadas em balança analítica e acondicionadas em tubo do tipo Falcon (15 mL). A esse tubo foram adicionados 5 mL de solução de clorofórmio/metanol na proporção de 1:2(v/v). Procedeu-se com homogeneização do conteúdo através de agitação manual por 30 segundos. O tubo foi inserido em banho-maria por 1 hora, nas temperaturas de estudo (30° C pra um experimento e 45°C para outro). Após esse tempo foram retirados e aguardou-se o resfriamento para iniciar a centrifugação (5000 rpm por 5 minutos). Em seguida, a fase líquida foi retirada com auxílio de pipeta Pasteur e essa alíquota foi inserida em outro tubo do tipo Falcon (capacidade de 50 mL). Esse procedimento foi repetido mais uma vez e a fase líquida resultante foi adicionada a esse tubo novamente.

Adicionou-se mais clorofórmio e solução de cloreto de sódio a 1% de forma que o volume final do tubo apresentasse a proporção de 1:1:0,9 de clorofórmio/metanol/água. Aguardaram-se 20 minutos para sedimentação da amostra.

Após esse tempo, observou-se a formação de duas fases: uma clara, de aspecto translúcido e outra verde, que continha os lipídeos extraídos. Essa fase (camada inferior) foi recolhida com auxílio de pipeta Pasteur e inserida em um tubo de ensaio de massa conhecida. As amostras foram levadas para a estufa por 24 horas, a 60°C para completa evaporação dos solventes. O tubo foi, então, pesado para aferir a quantidade de lipídeos extraída.

4.8.1.2. Metodologia HARA & RADIN (1978)

Foram pesadas 0,3 gramas de amostra (biomassa seca) em um tubo de ensaio (em balança analítica). A este tubo foram adicionados 1,2 mL de isopropanol e 1,8 mL de n-hexano. As amostras foram levadas para o banho-maria e aquecidas nas temperaturas correspondentes (30°C para um ensaio e 45°C para outro), conforme indicado na secção anterior.

Após aquecimento, adicionou-se 3,6 mL de solução de sulfato de sódio (1:15) (p/v), ou seja, 1g de sulfato de sódio para cada 15 mL de água destilada. Os tubos foram levados para centrifugação (7000 rpm) por 10 minutos. Formaram-se três fases: fase inferior contendo biomassa (verde escura), fase intermediária (translúcida) e fase superior verde clara. Essa camada superior foi recolhida com auxílio de pipeta Pasteur e inserida em um tubo de ensaio com massa conhecida. Assim como na outra extração, as amostras foram levadas para a estufa por 24 horas, a 60°C para completa evaporação dos solventes. Os tubos foram, então, pesados para aferir a quantidade de lipídeos extraída.

4.9. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Toda a vidraria utilizada para o cultivo das algas foi preparada a partir da lavagem com água e detergente neutro, seguida de enxague com água destilada, secagem em estufa e esterilização em autoclave a 120°C por 15 minutos. Antes de sua utilização, os erlemeyers foram vedados com algodão, recobertos com papel Kraft para esterilização e novamente levados à estufa para secagem (BORGHETTI, 2009, FRANCISCO *et al.*, 2015) (Figura 16).

O processo de preparação dos meios e inserção no erlemeyers, bem como a inoculação e conexão das mangueiras foi realizada em um fluxo laminar. O fluxo foi limpo com álcool a 70% e esterilizado através de luz UV por 30 minutos.

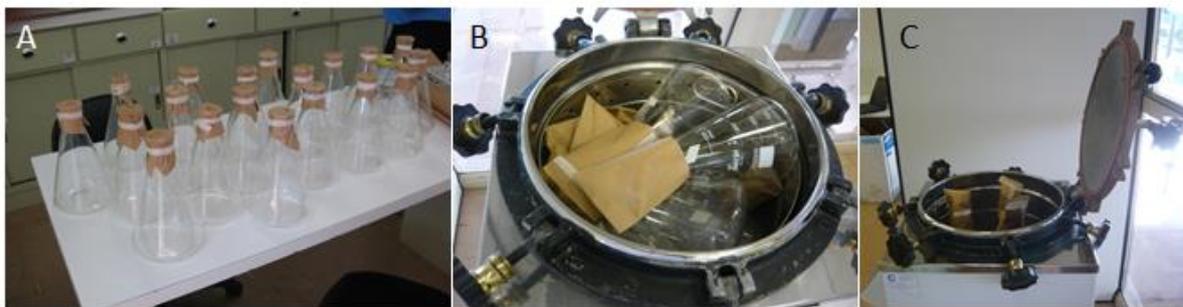


Figura 16 - Preparo e esterilização dos erlemeyers. A – Erlemeyers limpos e secos com tampa de papel kraft; B e C – Erlemeyers dispostos na autoclave para esterilização (elaborada pelo autor).

4.10. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.10.1.1. Determinação de DQO do meio de cultura

Além da análise de DQO do efluente bruto, foram analisados também os valores de DQO dos meios de cultura utilizados, tanto no início e final do cultivo (para todos os onze tratamentos propostos no planejamento experimental).

Utilizou-se a metodologia de digestão no reator adaptado de JIRKA & CARTER (1975) para análise de água residuária. Para tanto, foram utilizados kits para análise de DQO da marca HACH, faixa de 20-1500 mg/L. Esse kit é composto por tubos de ensaio com tampa de rosca contendo os reagentes para a digestão (Figura 17).



Figura 17 – Tubos contendo reagentes para análise de DQO (elaborada pelo autor).

Foram preparados nove tubos de ensaio contendo água e efluente, respeitando-se as proporções propostas no planejamento experimental e utilizadas durante o cultivo. Devido à faixa de detecção do kit disponível para análise (leitura até 1500 mg/L DQO) ser baixo em relação ao valor encontrado para o efluente puro (2861,11 mg/L), as condições 2, 4, 5, 7, 8 e 9 foram diluídas em água destilada, conforme observado na Tabela 6. Após leitura no espectrofotômetro, o valor obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

Tabela 6 - Diluições utilizadas para análise de DQO dos meios utilizados para cultura no cultivo II.

Condição	Percentual Efluente (%)	Diluição utilizada
1	23,1	Sem diluição
2	86,9	1/10
3	23,1	Sem diluição
4	86,9	1/10
5	55	1/2
6	10	Sem diluição
7	100	1/10
8	55	1/2
9	55	1/2

Fonte: elaborada pelo autor.

Com auxílio de pipeta automática, foram inseridos 2 mL de amostra em cada tubo. Apenas água destilada foi adicionada a um dos tubos: este foi utilizado como “branco”. Os recipientes foram vedados com fita veda-rosca antes do fechamento para evitar evaporação de água durante a análise. O tubo foi invertido várias vezes e agitado manualmente. Depois foram levados à estufa por 2 horas, à temperatura de 150°C. Após 20 minutos da retirada da estufa, os tubos foram invertidos várias vezes até seu resfriamento.

Foi realizada, então, a leitura de todos os tubos no espectrofotômetro na faixa de 620nm. O resultado expresso no visor foi anotado em mg/L (Figura 18).



Figura 18 – Análise de DQO. A – Tubos contendo amostra após passar pela estufa; B – Leitura de uma amostra no espectrofotômetro (elaborada pelo autor).

4.10.1.2. Avaliação da Densidade Celular

A concentração celular foi calculada através de contagem de células por amostragem em Câmara de Neubauer do tipo espelhada (SEBASTIEN *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2013; MINILLO *et al.*, 2013; TORRES *et al.*, 2014).

As análises foram realizadas diariamente a partir de uma amostra de 5 mL do cultivo. Cada vez que a contagem ultrapassou a quantidade de 400 células, foi realizada diluição da amostra em água estéril (0,1 mL de amostra para 9,9 mL de água). O valor final foi multiplicado pelo fator de diluição utilizado (nesse caso, por 100).

4.10.1.3. Determinação da concentração de biomassa

A determinação de biomassa foi realizada a partir de uma alíquota de 5 mL retirada do cultivo e acondicionada em tubo de ensaio previamente pesado. O tubo (de massa conhecida) foi inserido em estufa a 45°C por 24 horas para evaporação do líquido. Retirou-se o tubo da estufa e aguardou-se seu resfriamento até atingir temperatura ambiente e massa constante. Aferiu-se o peso do tubo em balança analítica. O cálculo da biomassa foi realizado a partir da diferença entre o peso do tubo vazio e cheio (contendo biomassa).

O volume de água evaporado foi repostado sempre que necessário com água estéril e auxílio de pipeta e ponteiros esterilizados (TAHER, 2013).

4.10.1.4. Determinação do pH

O pH também foi monitorado diariamente através de amostra de 5 mL do cultivo utilizada também para contagem celular. Foi utilizado pHmetro calibrado da marca OAKTON, previamente calibrado com solução tampão de 4,00, 7,00 e 10,0 (TREVISAN *et al.*, 2013).

4.10.1.5. Determinação do teor de lipídeos totais

A determinação do teor de lipídeos totais foi realizada através de quantificação gravimétrica, para os dois tipos de extração. Os tubos utilizados para armazenamento dos lipídeos extraídos foram pesados previamente. Após a extração, os tubos contendo lipídeos extraídos e solvente foram levados para a estufa a 60°C, por 24 horas. Após completa evaporação dos solventes, o peso dos tubos foi aferido. Através da diferença entre o peso inicial e final de cada tubo foi calculado o rendimento da extração em mg/L e também o teor de lipídeos totais (em %).

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

Foram realizadas duas coletas de efluente. Na primeira coleta foram obtidas amostras de duas variações da água de maceração do milho: a bruta e a biodigerida (Figura 19). Na segunda coleta somente água de maceração em estado bruto foi coletada, cuja caracterização está apresentada na Tabela 7.



Figura 19 - Aspecto do efluente bruto e do biodigerido (primeira coleta) (elaborada pelo autor).

Tabela 7 - Caracterização da água de maceração do milho

Parâmetro	Resultado	Unidade	Método Utilizado
DBO	2861,110	mg/L	Espectrofotométrico
DBO	934,74	mg/L	Teste 5 dias
Óleos e Graxas totais	273,00	mg/L	Gravimétrico
Fósforo Total	1,38	mg/L	Espectrofotométrico
Amônia	497,62	mg/L	Titulométrico
Fosfato	9,15	mg/L	Espectrofotométrico
Cinzas	814,00	mL/L	Gravimétrico
pH	4,43	u pH	Potenciométrico
Nitrogênio Kjeldahl Total	409,80	mg/L	Titulométrico

Fonte: elaborada pelo autor.

O efluente biodigerido foi utilizado somente no primeiro cultivo, que se tratava de um teste preliminar, portanto, foi realizada somente a caracterização da água de maceração bruta (utilizada nos testes preliminares, no DCCR e também na validação do modelo), cujos resultados são apresentados na Tabela 7.

De acordo com a Resolução nº 430 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, de 13 de maio de 2011, os efluentes, sejam eles provenientes de qualquer fonte poluidora, somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores depois de receber o devido tratamento, de acordo com as condições, padrões e exigências vigentes (BRASIL).

Entretanto, a resolução 357/05 do CONAMA (Brasil, 2005) não faz referência ao parâmetro de demanda química de oxigênio (DQO) na classificação dos corpos d'água e nos padrões de lançamento de efluentes (BADO *et al.*, 2012). No estado do Paraná, o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA), através da Resolução nº 70/2009, anexo 7 (Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes Líquidos Industriais) estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes líquidos industriais. Ela estabelece o valor de 200mg/L de DQO como padrão para lançamento de efluentes líquidos em corpos receptores (na categoria "outras atividades"). Logo, observa-se que a água de maceração está cerca de 14 vezes superior ao limite máximo permitido.

Quanto ao pH, este encontra-se um pouco abaixo do que preconiza a Resolução nº 430 (BRASIL, CONAMA, 13 de maio de 2011), que estabelece que o pH para lançamento de efluentes esteja entre 5 a 9.

A partir da caracterização constatou-se a presença de nitrogênio e também fósforo nesse efluente, elementos considerandos fundamentais no desenvolvimento das microalgas e que possuem influência direta na cinética de crescimento da alga (XIN *et al.*, 2010).

5.2. CULTIVO I - TESTES PRELIMINARES PARA ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DE *Scenedesmus acuminatus* EM ÁGUA DE MACERAÇÃO

5.2.1. Crescimento e densidade celular

O cultivo I consistiu em um conjunto de quatro biorreatores contendo efluente esterilizado e não esterilizado e também efluente bruto e biodigerido. O Gráfico 3 mostra a curva de crescimento celular de cada reator. Este cultivo foi conduzido por 20 dias, a fim de obter uma visão mais completa da curva de crescimento celular. A exceção é o biorreator II, que foi interrompido ao sétimo dia, pois apresentou contaminação por outra espécie de microalga.

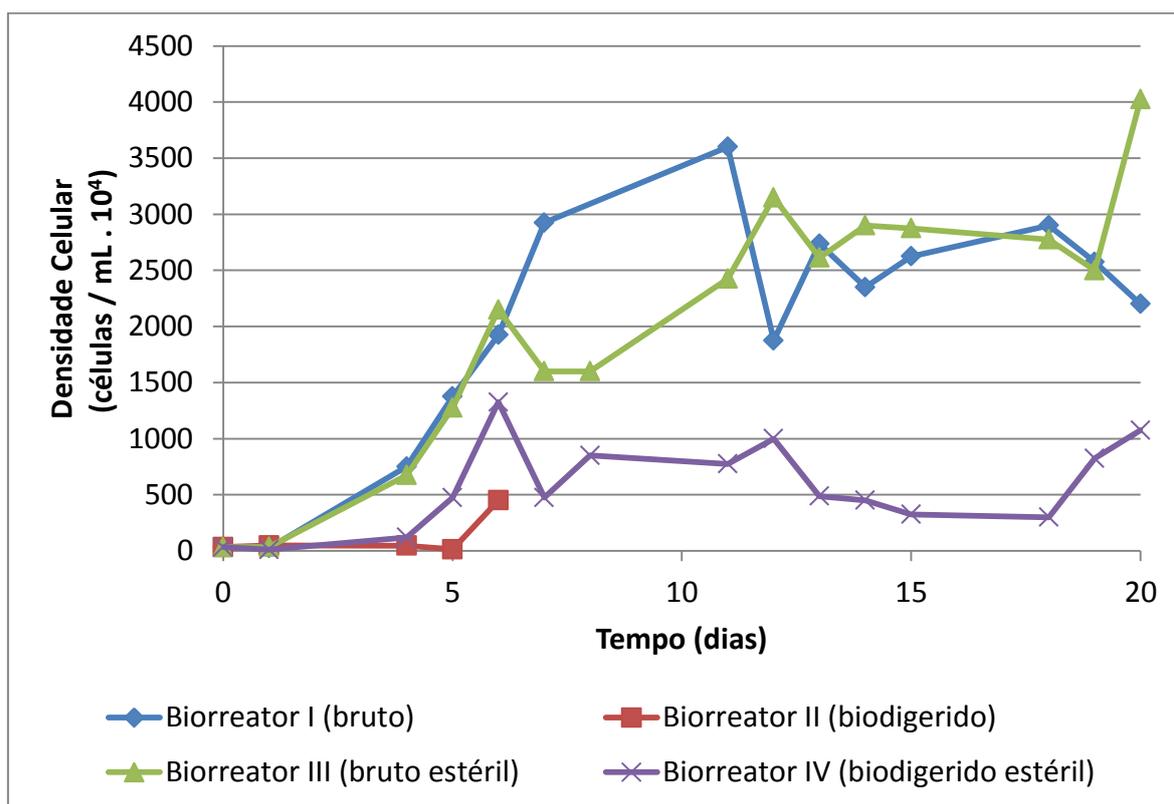


Gráfico 3 – Curva de crescimento celular – Cultivo I - Testes preliminares (elaborado pelo autor).

Foram inseridos 9 mL de inóculo em cada reator contendo 3350.10^4 células por mL. Como a quantidade de meio em cada erlemeyer era de 900 mL, a densidade celular inicial nos reatores era de $33,5.10^4$ células por mililitro.

Neste cultivo, pode-se observar a fase lag, onde os microrganismos estão em período de adaptação ao meio de cultura e condições de cultivo; nessa fase ocorre um ajuste da fisiologia e bioquímica das células para que sejam capazes de explorar o ambiente onde se encontram (DANNENHAER, 2010). O início da fase exponencial ocorreu no quarto dia de cultivo, exceto no reator II, cujo aumento da densidade celular ocorreu no sexto dia, o que sugere que as microalgas encontraram dificuldade para adaptar-se a esse substrato (efluente biodigerido, não estéril).

Pode observar-se nos reatores uma sucessão de picos de produção celular seguidas de um decaimento na densidade (fase de declínio). De acordo com experimento conduzido por SEBASTIEN & GRANJA (2005), observou-se que o gênero *Scenedesmus* não desenvolve um estágio estacionário. Ou seja, ela passa da fase de crescimento linear diretamente para a fase de morte celular. Este padrão foi observado nos três reatores cultivados até o fim do período de observação (20 dias). Portanto, optou-se por condicionar o término do próximo cultivo ao primeiro dia de decaimento na densidade celular.

Nota-se que no reator IV foi observada um comportamento na curva que corresponde a uma fase estacionária, que ocorreu do 15º ao 18º dia; entretanto, essa fase só ocorreu depois do pico de produção ocorrido no sexto dia (1325.10^4 cel/mL).

O biorreator número I apresentou produção máxima em densidade celular durante o período avaliado no 11º dia, com 3600.10^4 células por mililitro. O reator II apresentou baixa densidade celular em relação aos demais sistemas. No último dia de cultivo (7º dia), foi obtido o valor de 450.10^4 cel/mL. O reator III apresentou os maiores valores para densidade celular: 4025.10^4 cel/mL no 20º dia de cultivo. O primeiro decaimento ocorreu no 7º dia, com densidade celular passando de 2150.10^4 cel/mL para 1600.10^4 cel/mL.

5.2.2. Produção de Biomassa

Foram inseridos no reator o equivalente a 0,01g de biomassa (correspondente a 9 mL de inóculo). Ou seja, no início dos cultivos, concentração inicial de biomassa presente em cada erlemeyer era de 1,11 g/L. Devido à boa produção obtida nos reatores com efluente bruto, calcularam-se apenas os valores de biomassa final para estas condições (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultado da Produção de Biomassa - Cultivo I

Biorreator	Peso Inicial (g/L)	Peso Final (g/L)
1	1,11	1,90
3	1,11	1,88

Fonte: elaborada pelo autor.

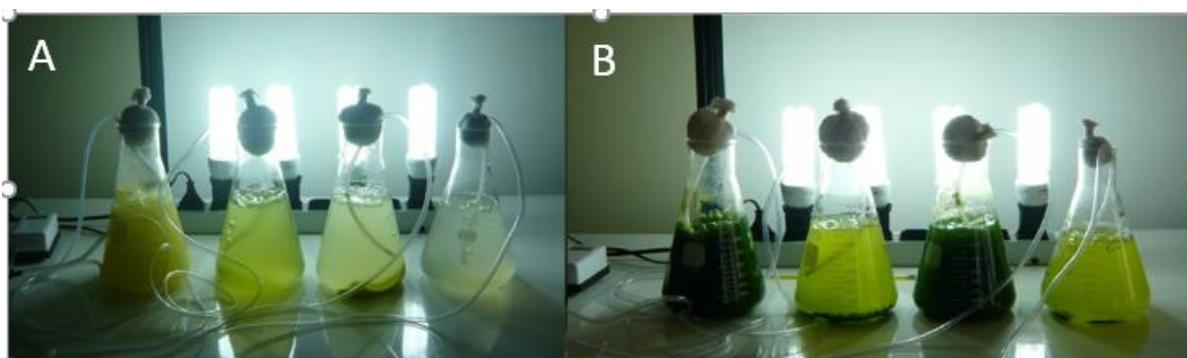


Figura 20 – Biorreatores do Cultivo I. A) no primeiro dia; B) 20º dia de cultivo (elaborada pelo autor).

Considerando-se os valores obtidos para a biomassa, tanto o reator que recebeu efluente esterilizado quanto o que recebeu efluente não esterilizado apresentaram valores muito próximos de biomassa ao final do cultivo, sendo o maior peso em biomassa obtido no biorreator I. Pode-se observar visualmente esse aumento de biomassa através do contraste entre a coloração verde-clara do início do cultivo (Figura 20A) e a coloração verde-escura ao final do cultivo (Figura 20B).

1.1.1. Variação do pH

Microalgas e organismos fotossintetizantes necessitam de CO_2 (dióxido de carbono) para fazer o processo de fotossíntese. A análise do pH é importante para avaliar indiretamente o consumo de CO_2 pelas microalgas. O gás carbônico confere uma natureza ácida aos cultivos e à medida que o pH se eleva a disponibilidade de dióxido de carbono diminui, normalmente relacionado a uma grande presença de células e, conseqüentemente, uma maior demanda pelo gás (TAHER, 2013). Observa-se no Gráfico 4 que o pH do meio aumentou gradativamente ao longo do cultivo em todos os reatores. Esse fenômeno pode ser atribuído à atividade fotossintética no biorreator, que foi consumindo o gás carbônico presente no meio.

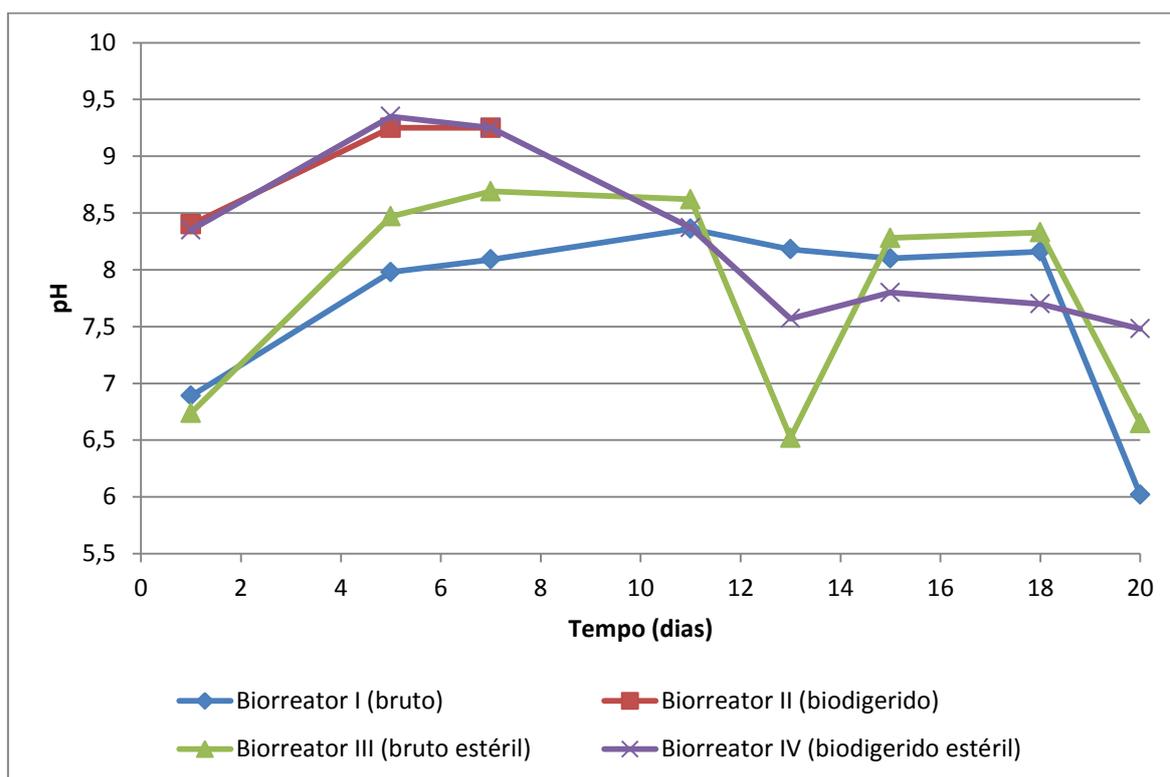


Gráfico 4 – Variação do pH – Teste preliminar (elaborado pelo autor).

5.2.3. Avaliação dos resultados preliminares para direcionamento dos próximos experimentos

Tanto efluente bruto como biodigerido demonstraram viabilidade para uso como meio de cultura para crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (na concentração de 30% em água esterilizada).

Além de apontar a viabilidade do uso do efluente como composto do meio de cultura, a primeira fase mostrou que a densidade celular obtida foi maior do que a do inóculo cultivado em meio tradicional.

Considerando a densidade celular como fator principal de avaliação do desempenho do meio de cultura, o efluente bruto apresentou o melhor resultado. A falta de esterilização pode ter influenciado a contaminação que ocorreu no segundo reator, porém, o outro recipiente com efluente sem tratamento na autoclave permaneceu axênico até o fim do cultivo.

Segundo ANDRADE & COLOZZI FILHO (2014), o desenvolvimento de uma cultura de microalgas resulta da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos; entre os biológicos se encontram a taxa metabólica da espécie, tamanho das células e possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento das microalgas. Desta forma, considerando os resultados da densidade celular foram estabelecidas as condições para o substrato a ser utilizado no DCCR: efluente bruto sem tratamento na autoclave.

5.3. CULTIVO II

5.3.1. Planejamento experimental – DCCR

O segundo conjunto de experimentos de cultivo foi realizado sobre as condições propostas em um planejamento do tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) (Tabela 9).

Esse planejamento foi realizado a fim de avaliar o efeito das variáveis independentes (percentual de efluente na composição do meio e percentual de inóculo) sobre as variáveis dependentes (densidade celular, quantidade de biomassa seca, valor de DQO e μ_{max} - velocidade específica máxima de crescimento).

Tabela 9 - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X1	X2	Efluente (%)	Inóculo (%)
1	-1	-1	23,1	1,9
2	1	-1	86,9	1,9
3	-1	1	23,1	8,6
4	1	1	86,9	8,6
5	-1,41	0	10,0	5,3
6	1,41	0	100,0	5,3
7	0	-1,41	55,0	0,5
8	0	1,41	55,0	10,0
9	0	0	55,0	5,3
10	0	0	55,0	5,3
11	0	0	55,0	5,3

Fonte: elaborada pelo autor.

Para tanto, foram estabelecidos 11 ensaios (Figura 21) estabelecidos a partir da combinação entre cinco níveis (-1,41, -1, 0, 1 e +1,41). Entre os ensaios propostos, 4 eram fatoriais (combinações entre os níveis -1 e +1), 4 axiais (combinação entre os níveis -1,41 e +1,41 e 0) e três repetições no ponto central (todas as variáveis no nível 0).

O efluente bruto e não esterilizado utilizado nos cultivos tem um elevado teor de matéria orgânica, portanto, a fim de evitar a contaminação por outros microrganismos, foi realizada a filtragem do efluente antes do cultivo. Para tanto, este foi deixado decantar em fluxo laminar (para evitar contaminação) até que os materiais em suspensão se depositassem ao fundo do recipiente (LOPES *et al.*, 2015a).

Nenhum dos onze ensaios realizados apresentou densidade celular superior à obtida no primeiro cultivo. Esse fato pode ser explicado devido à diferença da composição do meio devido à filtragem. No entanto, não ocorreu contaminação nos reatores, o que justifica a escolha pela realização desse procedimento.



Figura 21 – Aspecto dos reatores no Cultivo do DCCR - (primeiro dia) (elaborada pelo autor).

O período de cultivo foi inicialmente definido em 10 dias, a partir dos resultados dos testes preliminares. Porém, ao iniciar o experimento, observou-se que os reatores apresentavam curvas celulares distintas, com fases exponenciais e lineares ocorrendo em dias distintos, dependendo das condições do meio e inóculo. Em função disto, optou-se por cessar o cultivo logo no primeiro dia de decaimento na densidade celular. Deve-se destacar que as microalgas utilizadas como inóculo já estavam adaptadas ao efluente em estudo.

Com exceção dos reatores contendo 55% de efluente e 0,5% de inóculo, cujo pico de produção ocorreu no 7º dia, os demais tiveram um período de cultivo mais longo: nove dias para os reatores pertencentes às condições 1, 3 e 4 e dez dias para os reatores nas condições 2, 5, 6, 7 e 9.

5.3.2. Densidade celular

Os resultados para densidade celular obtida nos ensaios do DCCR são apresentados na Tabela 10. No Gráfico 5 pode-se observar a cinética de cultivo de *Scenedesmus acuminatus* cultivadas de acordo com as condições experimentais definidas no DCCR: a curva de crescimento mostra a densidade de microalgas em função do tempo (HAKALIN *et al.*, 2014).

Para padronizar os dados cinéticos são apresentados os resultados até o sétimo dia, pois este foi o menor tempo de cultivo (comportamento apresentado pelo sétimo ensaio). Observa-se dos resultados apresentados no Gráfico 5 e Tabela 10 que os ensaios do ponto central (55% de efluente e 5,3% de inóculo) apresentaram rendimentos superiores aos demais.

Tabela 10– Resultados do Delineamento Composto Central Rotacional considerando como variável resposta a Densidade Celular

Ensaio	Efluente (%)	Inóculo (%)	Densidade celular inicial .10 ⁴ (cel/mL)	Densidade celular final cultivo .10 ⁴ (cel/mL)
1	23,1	1,9	60,8	428,8
2	86,9	1,9	60,8	303,8
3	23,1	8,6	275,2	932,5
4	86,9	8,6	275,2	628,8
5	10,0	5,3	168,0	326,3
6	100,0	5,3	168,0	362,5
7	55,0	0,5	16,0	104,8
8	55,0	10,0	320,0	1045,0
9	55,0	5,3	168,0	1475,0
10	55,0	5,3	168,0	1000,0
11	55,0	5,3	168,0	2100,0

Fonte: elaborada pelo autor.

O ensaio 8, que assim como os pontos continha 55% de efluente e 10% de inóculo, apresentou o segundo melhor rendimento em densidade celular, o que sugere que esse percentual de efluente aproxima-se de uma condição ótima para composição de substrato. Deve-se observar que no ensaio 7, que possuía meio

de cultura com 55% de efluente também, apresentou o pior resultado em densidade celular: $104,8 \cdot 10^4$ cel/mL; entretanto, esse reator recebeu também menor quantidade de inóculo (0,5%), o que sugere que o percentual de inóculo teve influência sobre a curva de crescimento.

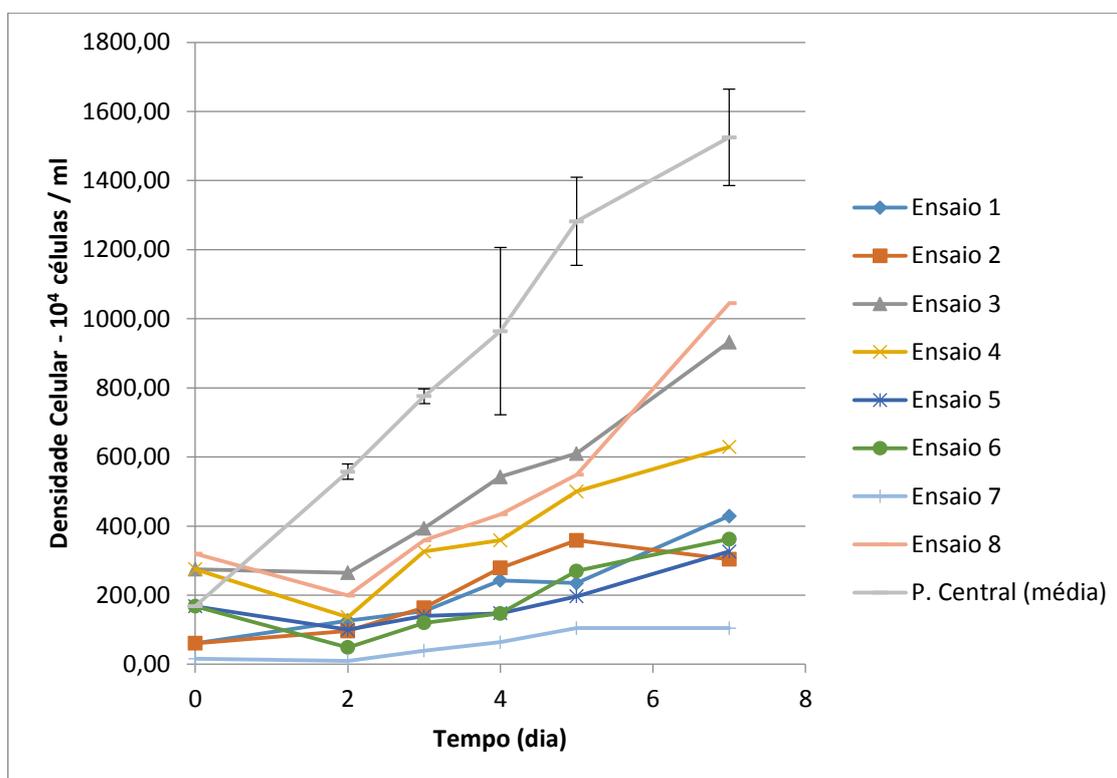


Gráfico 5 – Curva de crescimento dos ensaios do DCCR (elaborado pelo autor).

Foram calculados os efeitos principais e de interação das variáveis, os seus respectivos coeficientes para o modelo matemático, os parâmetros do modelo matemático, coeficiente de regressão (R^2), análise de variância (ANOVA) a um intervalo de confiança de 90% e teste de Fisher para determinar a validade do modelo. Os resultados da análise de variância são apresentados na Tabela 11.

O teste de Fisher foi realizado para verificar a validade do modelo, ou seja, a significância do modelo frente ao erro. O F_{calc} (17,167) foi cinco vezes superior ao F_{tab} (3,113). Segundo LADEIRA *et al.* (2013), quando o valor de F calculado for maior que o tabelado, existe evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis estudadas.

Tabela 11 - Análise de variância do DCCR - Densidade Celular

Fonte de variação	Somatório quadrático	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	2899478,9	2	1449739	17,167	3,113
Erro	675580,4	8	84447,55		
Total	3575059,3	10			

Fonte: elaborada pelo autor.

O coeficiente de regressão (R^2), que varia entre 0 e 1, indica o quanto um modelo consegue explicar os valores observados; quanto mais próximo de 1 melhor é o ajuste do modelo. Neste caso, o R encontrado foi de 0,80476.

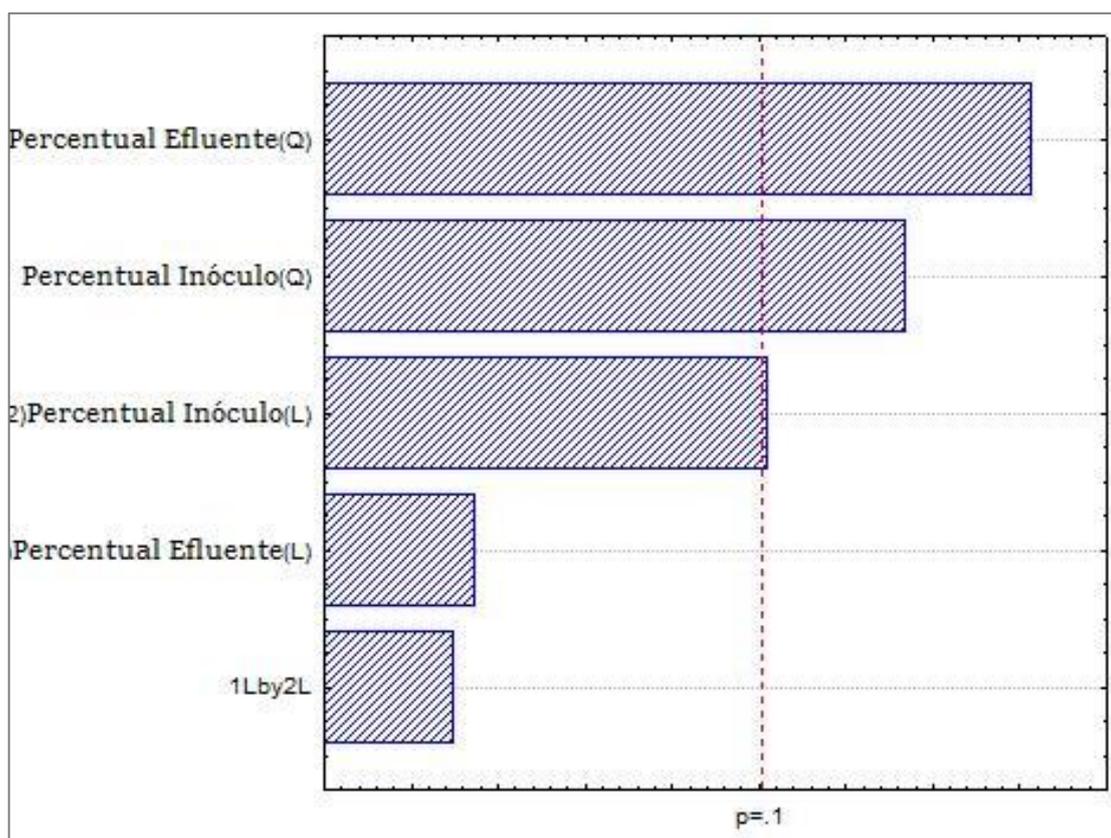


Gráfico 6 – Gráfico de Pareto para densidade celular (elaborado pelo autor).

O gráfico de Pareto (Gráfico 6) indica a ordem de magnitude do efeito estimado de cada variável sobre o aspecto em estudo, neste caso a densidade

celular (HAKALIN *et al.*, 2014). Ele também indica o efeito das interações entre as variáveis “percentual de inóculo” e “percentual de efluente” sobre a variável resposta “densidade celular”. As barras são ordenadas de acordo com a importância de cada fator. As barras que ultrapassam a linha vertical (que representa o valor de p - nesse caso, $p=0,1$ - o que indica significância a nível de 90%) indicam que são estatisticamente significativas.

No Gráfico 6 observa-se que tanto os termos quadráticos do percentual de efluente como o de inóculo, bem como o termo linear do inóculo possuem influência sobre a quantidade de células no cultivo. O efluente interfere no teor de células principalmente devido sua composição, pois é a fonte de carbono (nutrição) para as microalgas. Em estudo sobre o efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular de *Xantomonas campestris*, PAN *et al.* (2000) observaram que os ensaios com concentrações iniciais elevadas de células apresentaram maior produção e estabilidade celular durante a fermentação.

A partir da análise dos efeitos das variáveis e das interações entre elas foi obtida seguinte equação codificada (Equação 5), que se constitui em modelo para o cálculo da densidade celular (Y) em função dos percentuais de inóculo e efluente:

$$Y = 1524,523 - 47,346 PE - 563,380 PE^2 + 270,116 PI - 447,440 PI^2 - 44,688 PE * PI \quad (5)$$

Em que:

PE: percentual de efluente

PI: percentual de inóculo

O Gráfico 7 apresenta a distribuição dos resíduos em torno da reta $y=0$, os quais não apresentam padrão definido de distribuição. Isso significa que os resíduos não possuem tendência, ou seja, não são necessários ajustes adicionais no modelo.

A partir do modelo matemático (Equação 6) foi gerado um gráfico de superfície de resposta (Gráfico 8) para analisar a máxima densidade celular em

função dos percentuais de inóculo e efluente. Na Tabela 12 estão apresentados os coeficientes utilizados para gerar o modelo (polinômio).

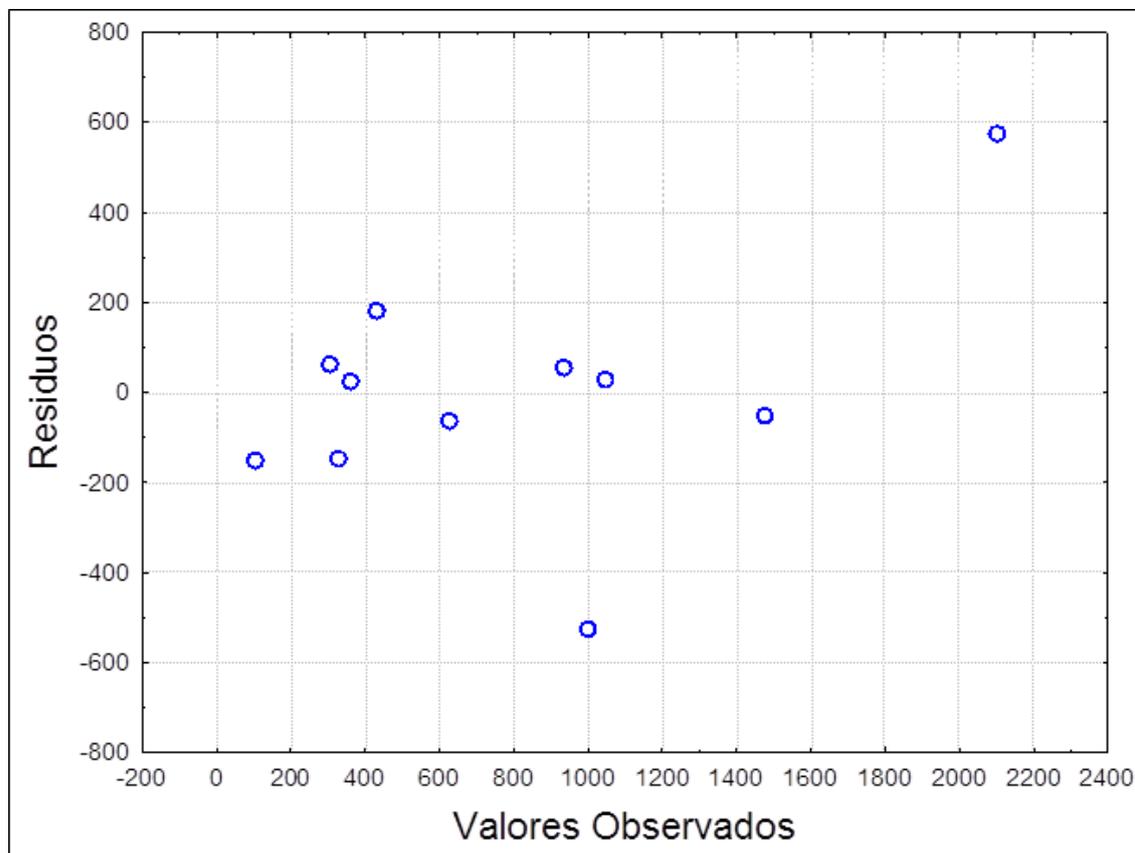


Gráfico 7 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para a densidade celular (elaborado pelo autor).

Tabela 12 - Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para Densidade Celular (valores não codificados)

	Densidade celular
Média/Interação	-1694,71
(1)Percentual Efluente(L)	61,54
Percentual Efluente(Q)	-0,55
(2)Percentual Inóculo(L)	517,02
Percentual Inóculo(Q)	-39,43
1L by 2L	-0,42

$$Y = -1694,71 + 61,54 PE - 0,55PE^2 + 517,02 PI - 39,43 PI^2 - 0,42PE * PI \quad (6)$$

Em que:

Y = Densidade celular

PE : percentual de efluente

PI : percentual de inóculo

A metodologia de superfície permite obter as condições ótimas de densidade celular. Observa-se deste Gráfico que o ponto de máxima densidade ocorre em condições de concentração de inóculo e efluente próximas às estipuladas para o ponto central.

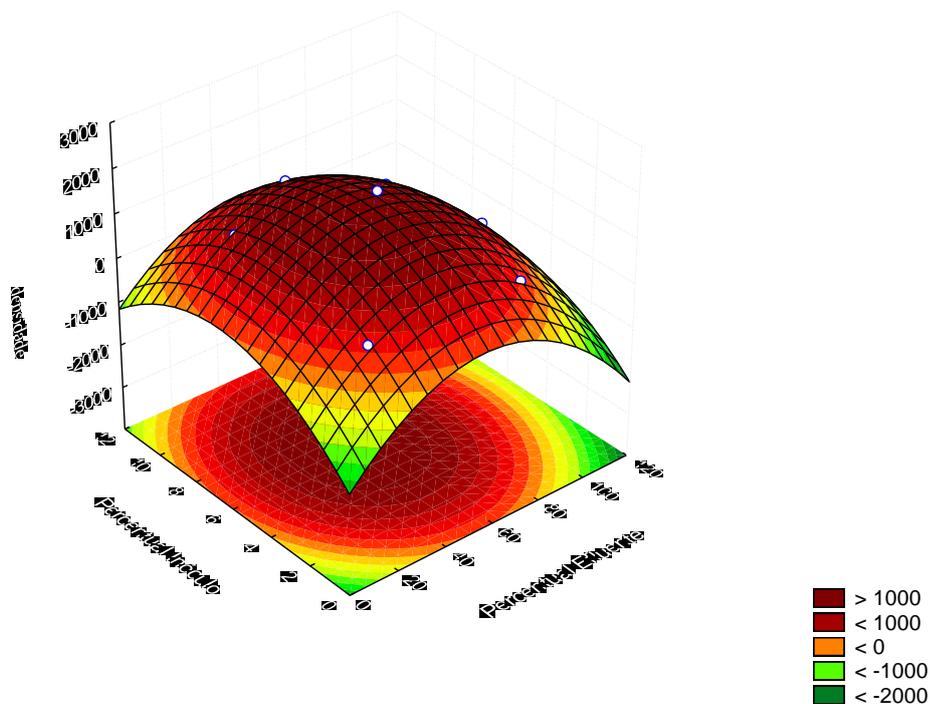


Gráfico 8 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a densidade celular (elaborado pelo autor).

5.3.3. Produção de biomassa

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados do DCCR em relação a concentração de biomassa. O ensaio 2, que continha 86,9% de efluente e 1,9%

de inóculo foi o que alcançou maior rendimento em biomassa (Tabela 13), alcançando rendimento em biomassa de 0,64 g/L no sétimo dia. MELO *et al.* (2014), que fizeram um estudo utilizando o mesmo efluente para o meio de cultura, conseguiram rendimento em biomassa de 0,79 g/L após 15 dias de experimento. No entanto, deve-se observar que neste DCCR só foram utilizados os dados referentes ao cultivo até o sétimo dia e nos demais biorreatores a fase exponencial se prolongou até o 9º e 10º dia, provavelmente esses valores seriam mais altos do que o considerado para esta análise. Deve-se ter em conta também que a porcentagem utilizada no estudo de MELO *et al.* (2014) foi baixa em relação aos valores estudados no DCCR, com o rendimento máximo em biomassa obtido na concentração de apenas 1,2% de substrato orgânico, o que inviabilizaria a proposta de ensaio do efluente, já que seriam necessária uma quantidade grande de água para complementar a proporção correta do meio de cultura a fim de se obter o desenvolvimento das microalgas.

Tabela 13 - Resultados do DCCR considerando como variável resposta a concentração de biomassa seca

Ensaio	Efluente (%)	Inóculo (%)	Peso em biomassa seca (g/L)
1	23,1	1,9	0,37
2	86,9	1,9	0,64
3	23,1	8,6	0,57
4	86,9	8,6	0,49
5	10,0	5,3	0,18
6	100,0	5,3	0,32
7	55,0	0,5	0,22
8	55,0	10,0	0,52
9	55,0	5,3	0,30
10	55,0	5,3	0,24
11	55,0	5,3	0,27

Fonte: elaborada pelo autor.

Assim como na análise de rendimento em densidade celular, os dados obtidos para produção de biomassa foram avaliados para verificar confiabilidade dos resultados obtidos através da análise de variância.

Na análise dos efeitos das variáveis e das interações entre elas nenhuma teve efeito significativo ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$), conforme ilustrado no Gráfico 9. Em função disto, não foram apresentados a análise estatística do modelo (ANOVA) e superfície de resposta.

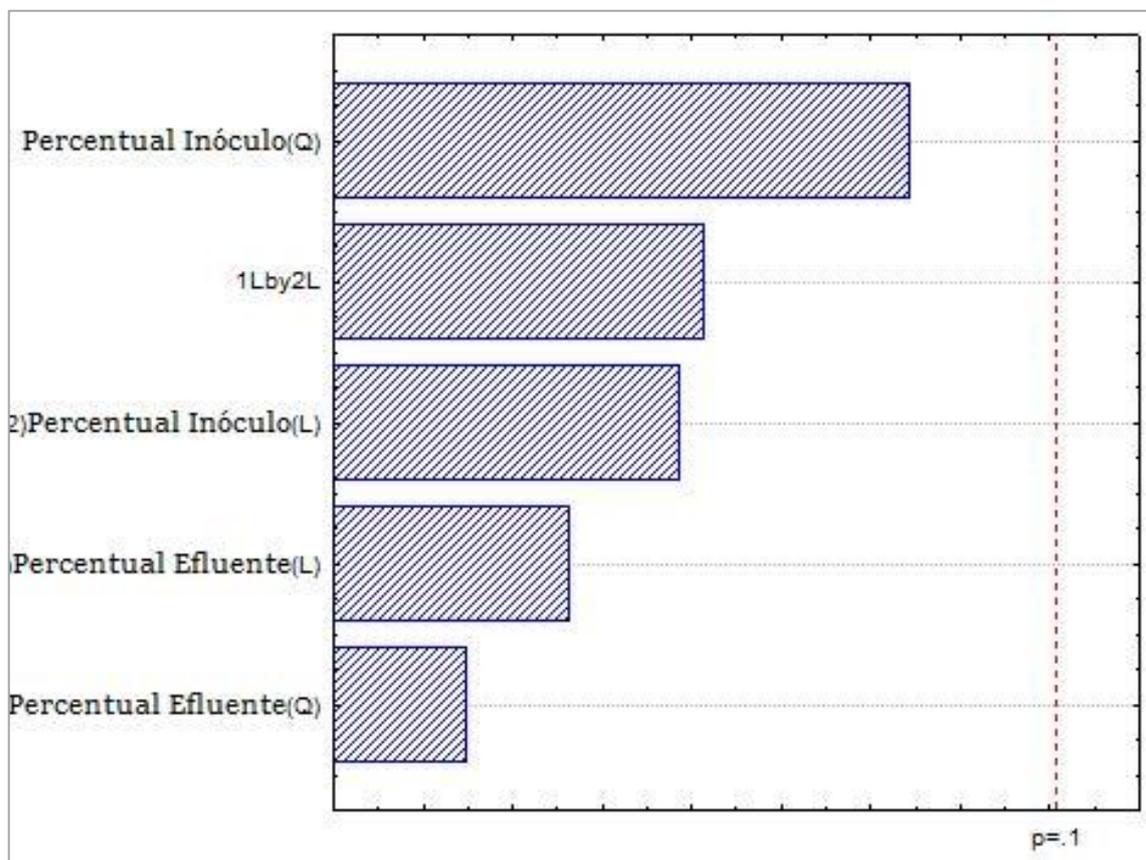


Gráfico 9 – Gráfico de Pareto para a concentração de biomassa seca (elaborado pelo autor).

Tendo-se em consideração que os resultados das pesagens não seguiram uma sequencia lógica, ou seja, estes deveriam ir aumentando com o passar dos dias (e aumento de biomassa) e não decair, como ocorreu em alguns casos, sugere-se que houve algum fenômeno que alterou as pesagens, como detalhado no próximo parágrafo.

ANDRADE & CUSTÓDIO (2000) afirmam que a temperatura do frasco de pesagem e seu conteúdo devem estar à mesma temperatura que a do ambiente da câmara de pesagem (balança analítica), pois a existência de uma diferença de temperatura entre a amostra e o ambiente da câmara de pesagem provoca

correntes de ar. Estas correntes de ar originam forças sobre o prato de pesagem, o que faz com que a amostra pareça mais leve, em um fenômeno conhecido como flutuação dinâmica. Além disso, existe um filme de umidade que cobre qualquer amostra e este varia com a temperatura. Este filme é encoberto pela flutuação dinâmica. Isto faz com que um objeto frio pareça mais pesado ou um objeto mais quente mais leve.

No caso da pesagem realizada neste estudo, os frascos eram pesados logo após serem retirados da estante de cultivo. Sabe-se que este ambiente encontrava-se a uma faixa de temperatura entre 28 a 30°C e a sala onde se localizava a balança era resfriada por ar condicionado. Mesmo que este fosse desligado no momento da pesagem, a sala permanecia ainda em uma temperatura menor do que a utilizada nos cultivos, estabelecendo então, uma diferença de temperatura entre o frasco e o ambiente de pesagem. Sugere-se que estes fenômenos (flutuação dinâmica e filme de umidade da amostra) possam explicar porque os dados referentes à pesagem da biomassa não foram significativos.

5.3.4. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Na Tabela 14 se encontram os resultados de DQO obtidos no DCCR. A eficiência de remoção de DQO foi calculada a partir da Equação 7 (BEZERRA & MATSUMOTO, 2011; LOPES *et al.*, 2015).

$$E = \frac{DQO(i) - DQO(f)}{DQO(i)} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

E = eficiência do tratamento (%);

DQO_(i) = valor de DQO inicial do meio de cultura;

DQO_(f) – valor de DQO do meio de cultura após tratamento.

Observa-se na Tabela 14 que apenas o ensaio 4 apresentou DQO final maior que 200mg/L (valor estabelecido pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente do Paraná – CEMA - como padrão para lançamento de efluente líquido industrial). Ou seja, os demais ensaios demonstraram que as microalgas foram eficientes no consumo da matéria orgânica em relação a DQO e atende a legislação ambiental em relação a este parâmetro do Paraná, estado origem do efluente utilizado nesse estudo.

O ensaio que resultou em maior eficiência de remoção foi o de número 6, que iniciou com 100% de efluente, 5,3 % de inóculo e DQO de 2861,11 mg/L, com resultado de 96,17% de eficiência. O menos eficiente foi encontrado no ensaio 5, com apenas 55,13 %; ainda assim, o valor final para DQO do meio de cultura foi de 71,0 mg/L, dentro do limite estabelecido.

Tabela 14 - Resultados do Delineamento Composto Central Rotacional considerando como variável resposta a DQO

Ensaio	Percentual efluente no meio de cultura	Percentual de inóculo	DQO final (mg/L)	Percentual de remoção de DQO (%)
1	23,1	1,9	85,5	81,02
2	86,9	1,9	78,0	95,61
3	23,1	8,6	38,7	91,42
4	86,9	8,6	230,0	87,05
5	10,0	5,3	71,0	55,13
6	100,0	5,3	109,5	96,17
7	55,0	0,5	76,5	92,24
8	55,0	10,0	78,0	92,09
9	55,0	5,3	117,0	88,13
10	55,0	5,3	97,0	90,16
11	55,0	5,3	116,0	88,23

Fonte: elaborada pelo autor.

Convém notar que a análise de DQO final do cultivo foi realizada após coagulação do meio por sulfato de alumínio, logo, os resultados da remoção de DQO são resultantes da ação das microalgas e também do coagulante.

Na análise dos efeitos das variáveis sobre a DQO ao nível de 90% de confiança ($p < 0,1$) verificou-se que o termo de interação e percentual de efluente tiveram influência nos resultados da DQO, conforme ilustrado no Gráfico 10.

A análise do modelo matemático foi avaliada a partir do coeficiente de regressão (R^2), análise de variância (ANOVA) a um intervalo de confiança de 90%. Os resultados da análise de variância estão expressos na Tabela 15.

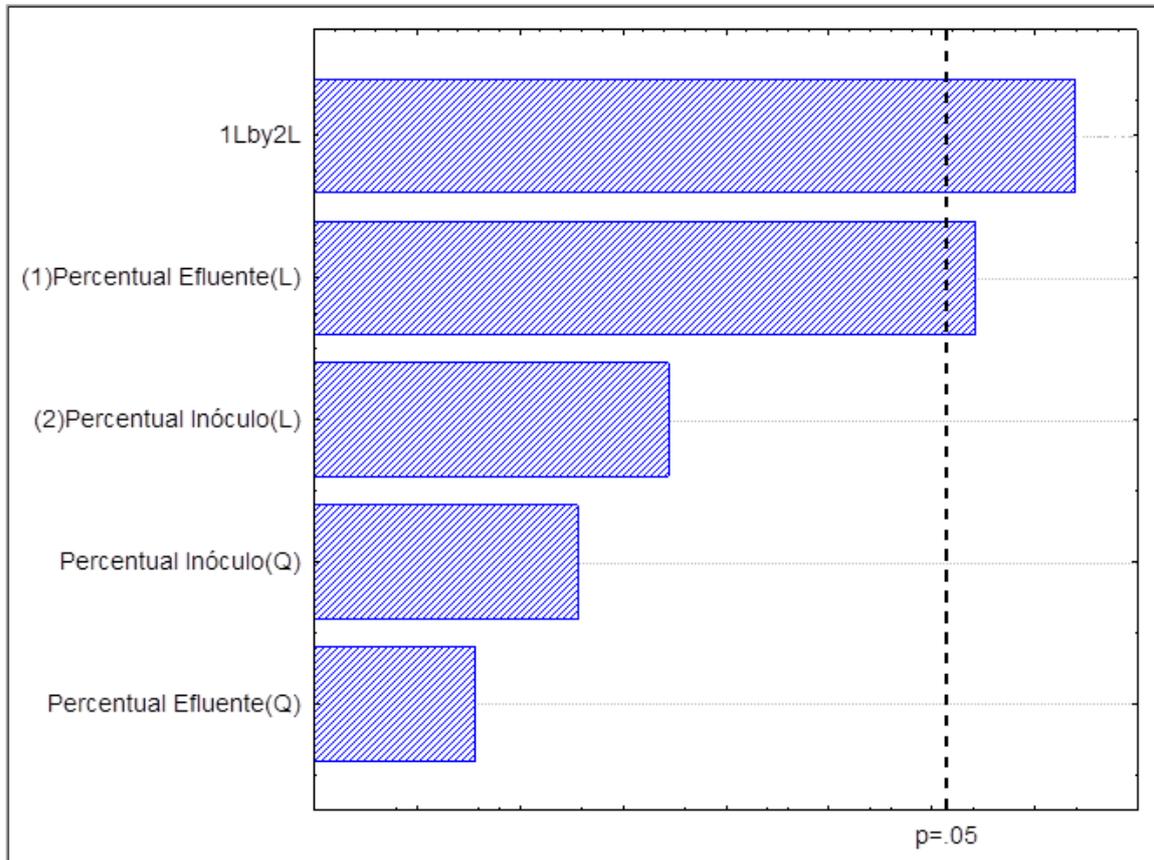


Gráfico 10 – Gráfico de Pareto da DQO (elaborado pelo autor).

A partir da análise do efeito das variáveis e das interações entre elas na demanda química de oxigênio foi obtido o seguinte modelo matemático (variáveis codificadas):

$$Y = 109,903 + 29,854 PE + -3,737 PE^2 + 13,450 PI + -10,276 PI^2 + 49,708 PE * PI \quad (8)$$

Em que:

PE: percentual de efluente;

PI: percentual de inóculo;

Y: DQO final do efluente (água de maceração) após o cultivo.

Tabela 15 - Análise de variância do DCCR - DQO

Fonte de variação	Somatório quadrático	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	16992,36455	1	16992,36455	22,214	3,360
Erro	6884,433429	9	764,9370477		
Total	23876,79798	10			

Fonte: elaborada pelo autor.

O teste de Fisher apontou significância do modelo frente ao erro, visto que F calculado (22,214) foi seis vezes superior ao F tabelado (3,360). O coeficiente de regressão (R^2) obtido foi de 0,79702.

O Gráfico 11 apresenta a distribuição dos resíduos em torno da reta $y=0$, os quais não apresentam padrão definido de distribuição. Isso significa que os resíduos não possuem tendência, ou seja, não são necessários ajustes adicionais no modelo.

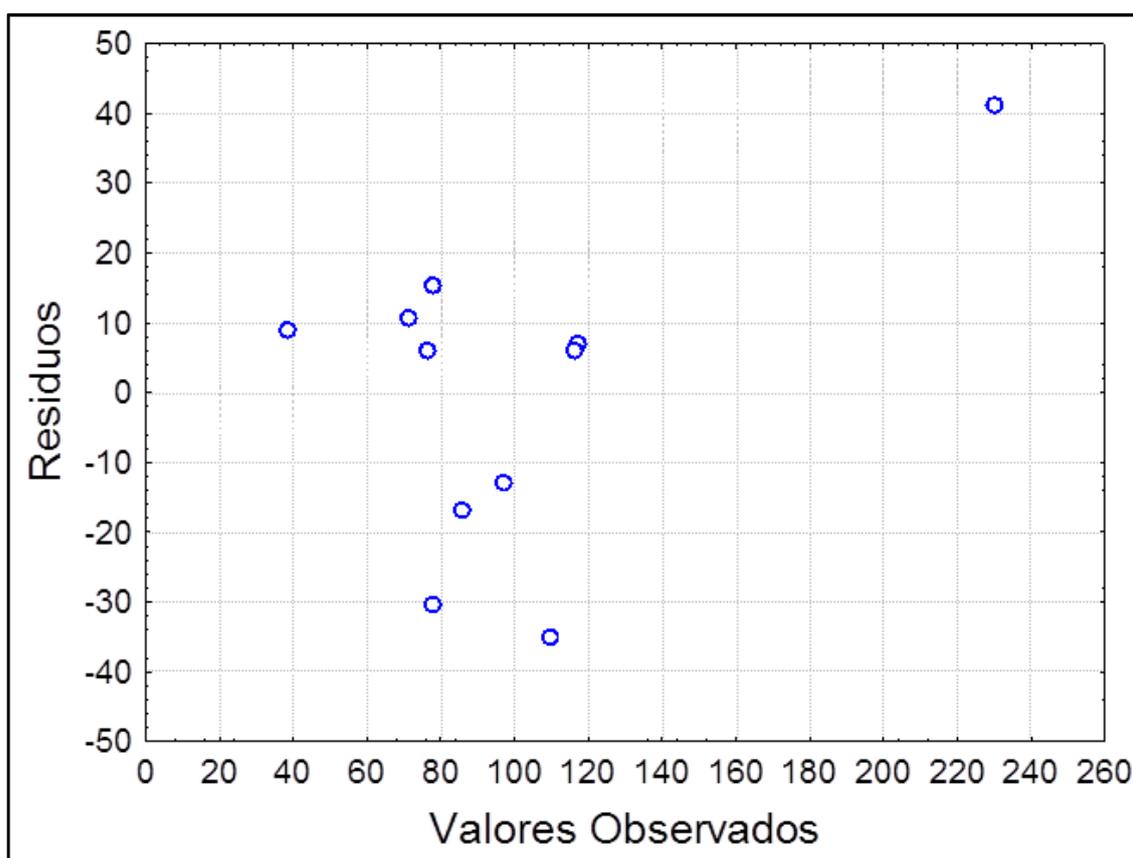


Gráfico 11 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para a DQO (elaborado pelo autor).

A superfície de resposta foi gerada a partir do modelo proposto na Equação 9. Esta representação permite uma visualização dos efeitos que as variáveis estudadas exercem na sobre a DQO. Na Tabela 16 estão indicados os valores dos coeficientes utilizados para gerar o modelo (polinômio).

Tabela 16 - Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para DQO (valores não codificados)

	DQO
Média/Interação	134,94
(1)Percentual Efluente(L)	-1,09
Percentual Efluente(Q)	-0,00
(2)Percentual Inóculo(L)	-11,93
Percentual Inóculo(Q)	-0,91
1L by 2L	0,46

Fonte: elaborada pelo autor.

$$Y = 134,9406 - 1,0883 PE - 0,0037 PE^2 - 11,9289 PI - 0,9054 PI^2 + 0,4623PE * PI \quad (9)$$

Em que:

PE: percentual de efluente;

PI: percentual de inóculo;

Y: DQO final do efluente (água de maceração) após o cultivo.

A superfície de resposta para a DQO em função dos percentuais de inóculo e efluente é apresentada no Gráfico 12. O menor valor da DQO que corresponde ao ponto ótimo foi numa região limite da superfície, isto mostra que pode ser possível obtenção de valores mais reduzidos em outras condições experimentais, bem como aumentando o tempo de cultivo.

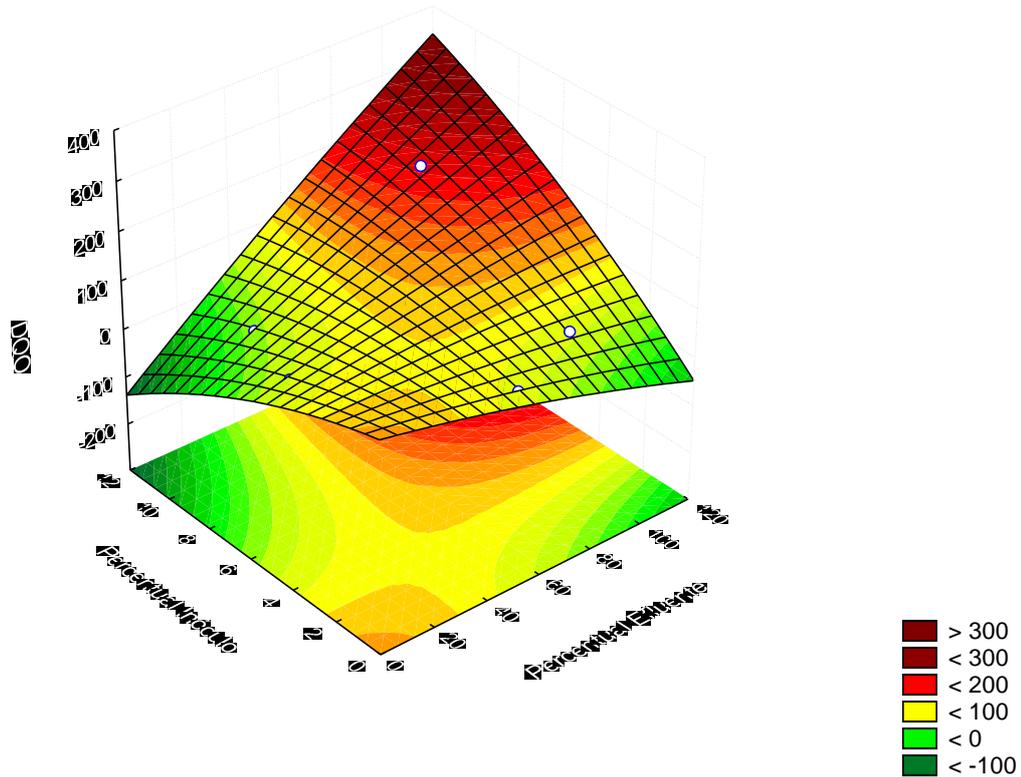


Gráfico 12 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a Demanda Química de Oxigênio (DQO) (elaborado pelo autor).

5.3.5. Variação do pH

O Gráfico 13 apresenta os resultados do acompanhamento do pH ao longo dos sete dias de cultivo. Observa-se um aumento gradativo do pH ao longo do tempo de cultivo 7. Esse aumento pode ser atribuído à atividade fotossintética no reator. Durante a fotossíntese, as microalgas fixam dióxido de carbono (CO_2) presente no meio de cultura, o que ocasiona uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato; isso faz com que a acidez carbônica seja removida do meio e ocorra a liberação de íons hidroxila (OH^-) no meio, acarretando um aumento do pH (MELO *et al.* 2014).

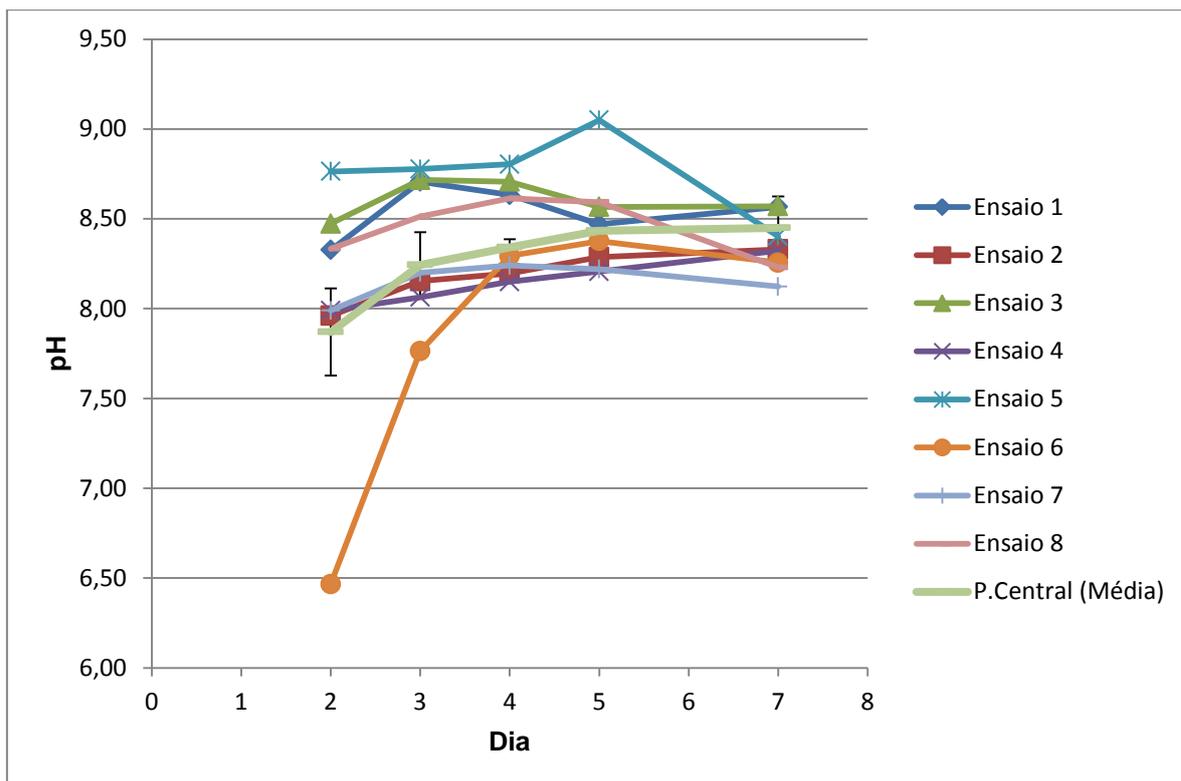


Gráfico 13 - Variação do pH no DCCR (elaborado pelo autor).

A partir do segundo dia de cultivo já foi possível observar um aumento no pH. Ao final do tratamento, todos os ensaios indicaram pH na faixa de 8,12 a 8,57. Estes valores encontram-se dentro da faixa permitida pelo CONAMA (Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011), que estabelece que o pH para lançamento de efluentes (entre 5 a 9, nesse caso).

5.3.6. Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max})

A velocidade máxima de crescimento obtida foi obtida no ponto central, cujo valor foi de $25,8 \pm 0,69$ foi obtida nos pontos centrais, conforme indicado na Tabela 17.

LOPES *et al.* (2015) cultivou *Chlorella sp* em meio BBM (Bold's Basal Medium) suplementado por diferentes proporções de vinhaça, efluente de reator tipo UASB e efluente de filtro anaeróbico, em meio mixotrófico. Neste trabalho, que

avaliou a densidade celular em cel/ml, o maior valor do parâmetro μ_{\max} foi de 0,48 /d na concentração de efluente a 5%.

Tabela 17 - Resultados do DCCR considerando como variável resposta a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{\max})

Ensaio	Efluente (%)	Inóculo (%)	μ_{\max} (d ⁻¹)
1	23,1	1,9	6,98
2	86,9	1,9	1,59
3	23,1	8,6	0,23
4	86,9	8,6	3,55
5	10,0	5,3	0,07
6	100,0	5,3	1,46
7	55,0	0,5	3,75
8	55,0	10,0	0,63
9	55,0	5,3	25,61
10	55,0	5,3	26,50
11	55,0	5,3	25,13

Fonte: elaborada pelo autor.

No Gráfico 14 observa-se que os termos quadráticos do percentual de efluente e inóculo e o efeito de interação efluente X inóculo exercem influência sobre a velocidade máxima específica de crescimento. O percentual de efluente é o que possui maior influência, de acordo com o Gráfico de Pareto, o que sugere que água de maceração presente no meio de cultura foi utilizada como fonte de carbono pelas microalgas.

A partir dos resultados dos efeitos das variáveis e das interações entre elas no parâmetro μ_{\max} foi obtida a seguinte equação (valores codificados):

$$Y: 25,737 + -0,014 PE + -12,120PE^2 + -1,152 PI + -11,403 PI^2 + 2,178 PE * PI \quad (10)$$

Em que:

PE: percentual de efluente;

PI: percentual de inóculo;

Y: parâmetro de taxa de crescimento máximo do modelo cinético de Monod μ_{\max}

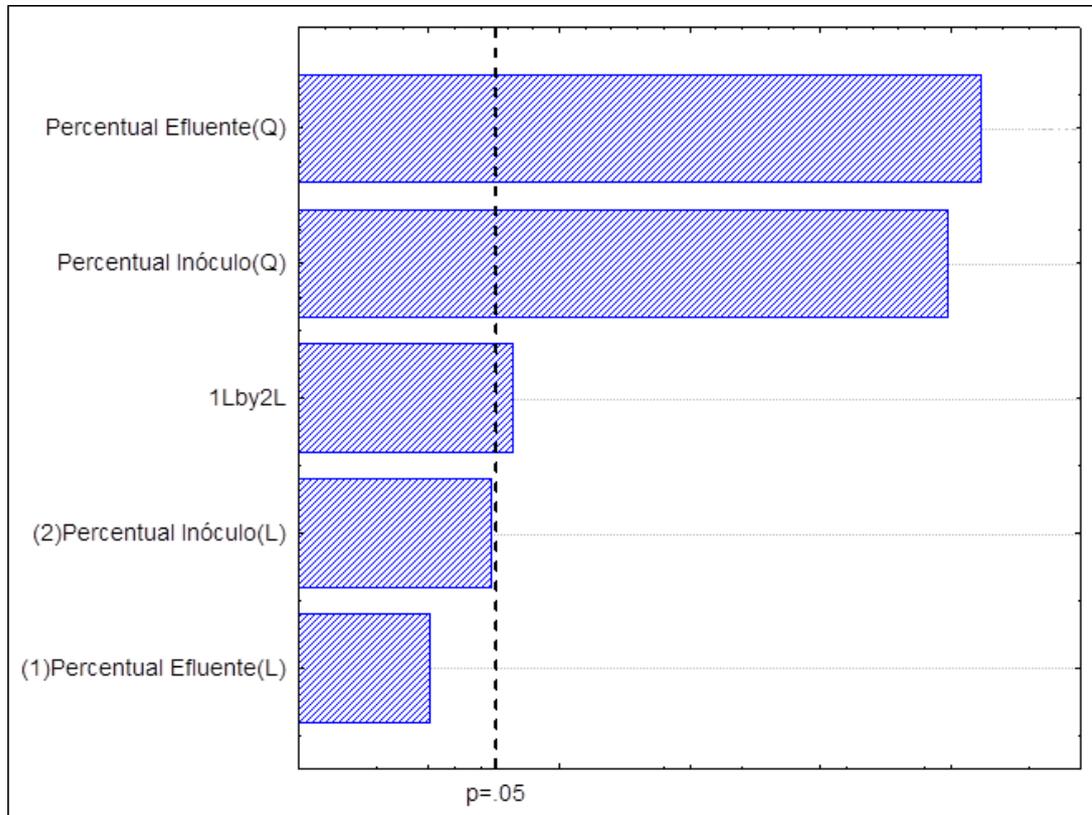


Gráfico 14 – Gráfico de Pareto do μ_{\max} (elaborado pelo autor).

O teste de Fisher foi realizado para verificar a validade do modelo, ou seja, a significância do modelo frente ao erro. O F_{calc} (714,523) foi duzentas e doze vezes superior ao F_{tab} (3,360). Segundo LADEIRA *et al.* (2013), quando o valor de F_{calc} for maior que o F_{tab} , existe evidência estatística suficiente para supor a existência de uma relação entre as variáveis estudadas.

Tabela 18 - Análise de variância do DCCR - Velocidade máxima específica de crescimento (μ_{\max})

Fonte de variação	Somatório quadrático	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}	F_{tab}
Modelo	1570,15	1	1570,152013	714,523	3,360
Erro	19,78	9	2,197482928		
Total	1589,93	10			

Fonte: elaborada pela autor.

O coeficiente de regressão (R^2), que varia entre 0 e 1, indica o quanto um modelo consegue explicar os valores observados; quanto mais próximo de 1 melhor é o ajuste do modelo. Neste caso, o R encontrado foi de 0,9926.

O Gráfico 15 apresenta a distribuição dos resíduos em torno da reta $y=0$, os quais não apresentam padrão definido de distribuição. Isso significa que os resíduos não possuem tendência, ou seja, não são necessários ajustes adicionais no modelo.

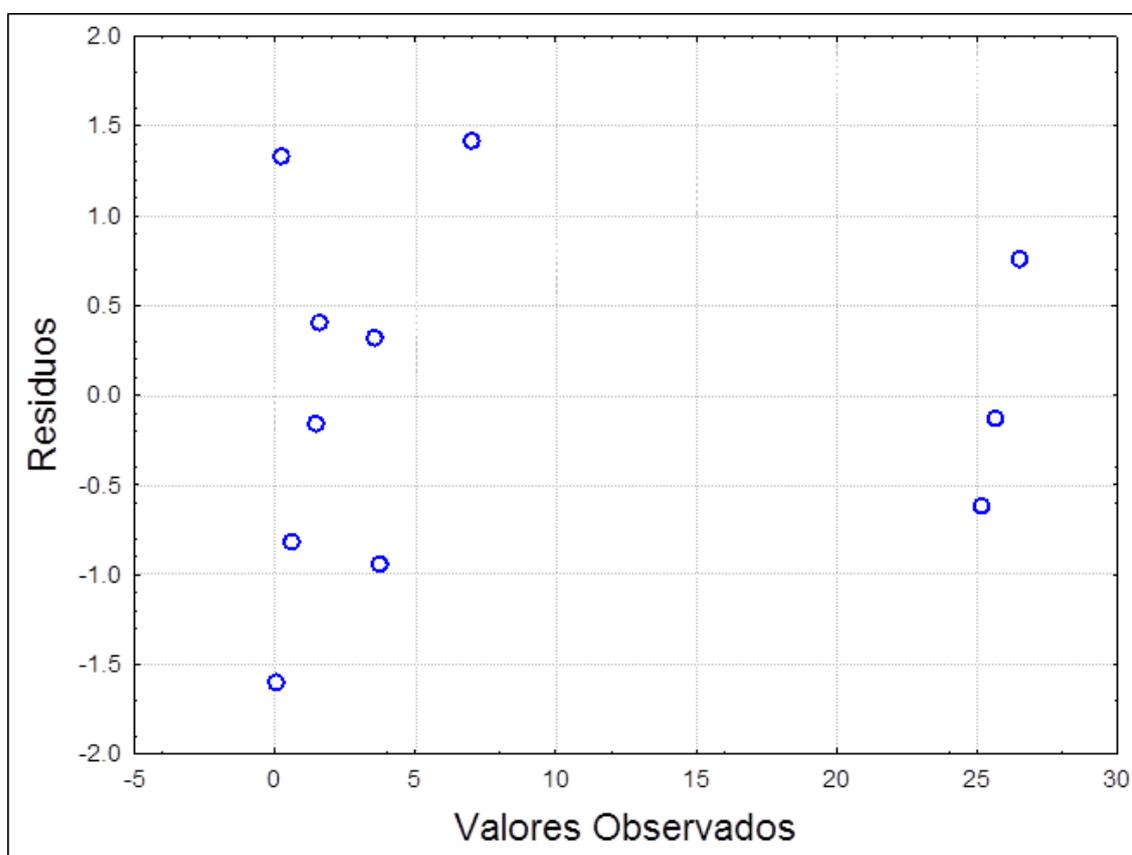


Gráfico 15 – Distribuição dos resíduos em função dos valores observados para μ_{\max} (elaborado pelo autor).

A Equação 11 representa o modelo matemático codificado proposto para analisar a melhor velocidade máxima específica de crescimento em função dos percentuais de inóculo e efluente nas condições de estudo empregadas no DCCR. As superfícies de respostas foram geradas a partir do modelo (polinômio) obtido a partir dos coeficientes expressos na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores utilizados para elaboração do polinômio (modelo) para μ_{\max} (valores não codificados)

	μ_{\max}
Média/Interação	-30,28
(1)Percentual Efluente(L)	1,20
Percentual Efluente(Q)	-0,01
(2)Percentual Inóculo(L)	9,09
Percentual Inóculo(Q)	-1,00
1L by 2L	0,02

Fonte: elaborada pelo autor.

$$Y: - 30,2799 + 1,2021 PE - 0,0119PE^2 + 9,0934 PI \pm 1,0047 PI^2 + 0,0203 PE * PI \quad (11)$$

Em que:

PE: percentual de efluente;

PI: percentual de inóculo;

Y: DQO final do efluente (água de maceração) após o cultivo.

Observa-se no Gráfico 16 que a região ótima para μ_{\max} (em vermelho) está dentro da faixa de estudo do DCCR. A velocidade máxima de crescimento, cujo valor foi de $25,8 \pm 0,69$, foi obtida nos pontos centrais, conforme indicado na Tabela 17. O ponto ótimo foi obtido através da otimização do polinômio obtido e apresentado nas superfícies de resposta, dentro dos limites estudados.

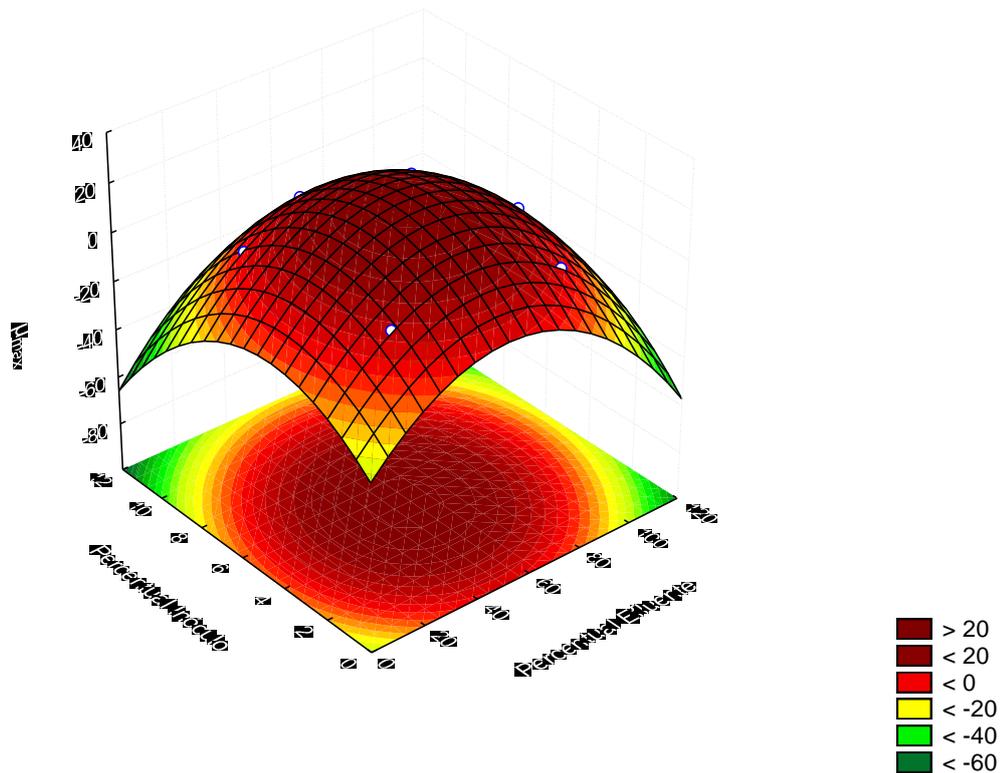


Gráfico 16 – Superfície de resposta em função dos percentuais de inóculo e efluente para a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) (elaborado pelo autor).

5.4. CULTIVO III - VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Os resultados do modelo matemático obtidos a partir da análise do efeito das variáveis e as interações entre elas considerando como variável resposta determinou como condições ótimas para porcentagem de efluente no meio e inóculo a serem utilizados no cultivo: 53,5% de efluente e 5,2% de inóculo (480,6 mL e 46,8 mL, respectivamente). Portanto, um terceiro cultivo foi realizado nas mesmas condições de temperatura, iluminação e aeração dos ensaios do DCCR, respeitando-se as porcentagens de efluente e inóculo sugeridas pela análise, em quintuplicata.

5.4.1. Densidade celular

O valor de densidade celular previsto pelo modelo foi de $1509,79 \cdot 10^4$ cel/mL. O valor experimental - $1630 \cdot 10^4$ cel/mL – foi obtido no sétimo dia de cultivo, para uma população inicial aproximada de $164,8 \cdot 10^4$ cel/mL (Tabela 20, Gráfico 17 e Figura 22). Esse valor foi superior aos valores obtidos no experimento anterior, considerando-se a média das densidades obtidas no ponto central ($1525 \cdot 10^4$ cel/mL), ou seja, o modelo encontrou o ponto de rendimento máximo em densidade celular.

Tabela 20 – Valor previsto e valor experimental – Densidade celular

Densidade Celular $\cdot 10^4$ (cel/mL)	
Valor previsto	1509,79
Valor experimental	1630,00
Desvio experimental	$\pm 461,43$

Fonte: elaborada pela autor.

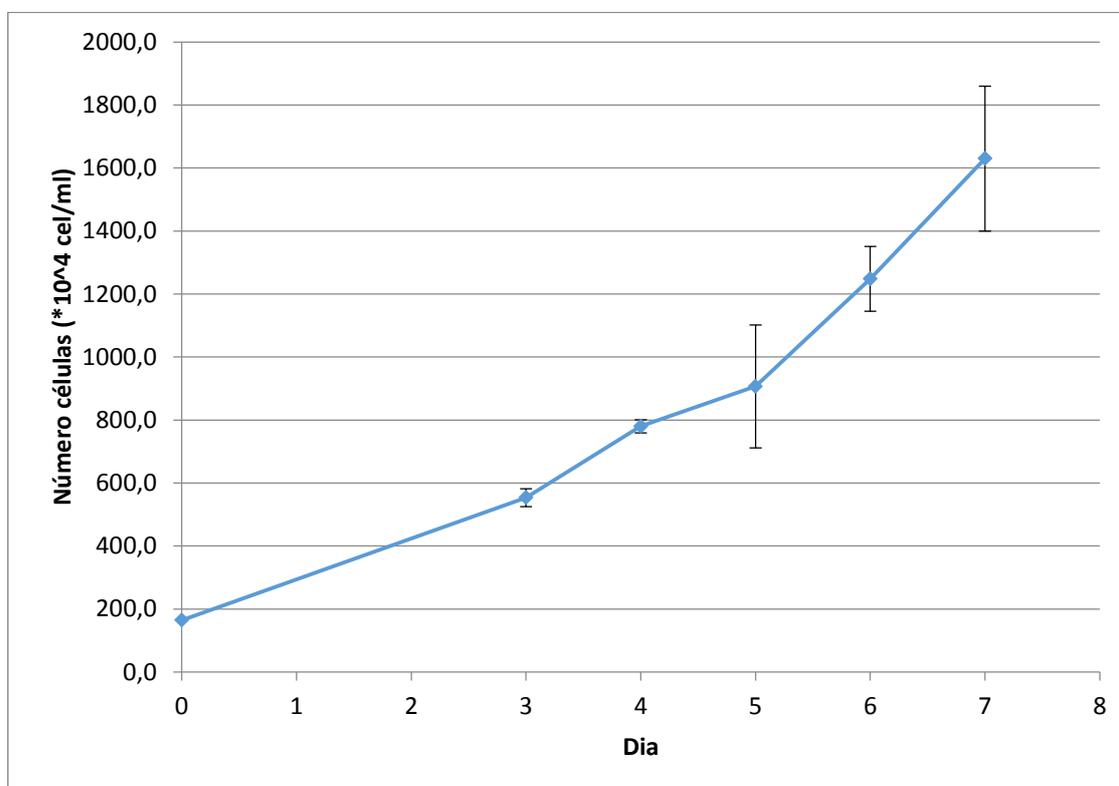


Gráfico 17 – Curva de crescimento – Cultivo III – Validação do modelo (elaborado pelo autor).

Em estudo de LOPES *et al.* (2015), que cultivou *Chlorella sp* utilizando efluente de filtro anaeróbio para suplementar meio BBM (Bold's Basal Medium), foi observada densidade celular máxima de $1150 \cdot 10^4$ cel/mL, partindo de uma população de $49,9 \cdot 10^4$ cel/mL para cultivo com 5% de concentração de efluente.

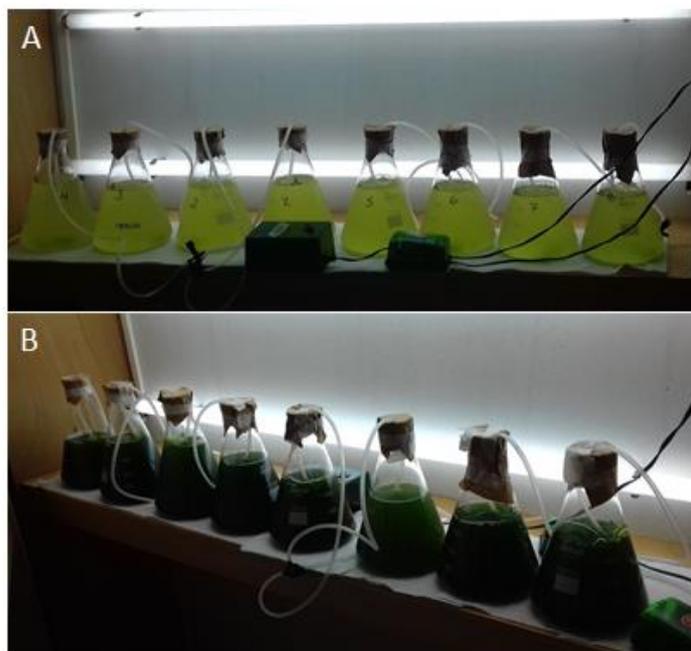


Figura 22 – Cultivo de validação do experimento. A – Aspecto dos reatores no primeiro dia; B – Aspecto dos reatores no último dia (7º) (elaborada pelo autor).

5.4.2. Variação do pH

O Gráfico 18 representa o resultado do acompanhamento do pH ao longo dos 7 dias de cultivo. O pH deste cultivo iniciou com um valor comparativamente alto em relação aos demais cultivos; entretanto, apresentou o mesmo comportamento observado nos Cultivos I e II: aumento do pH; isso pode ter ocorrido devido a atividade fotossintética que ocorreu no biorreator, que tem como consequência à fixação do carbono (CO_2), o que eleva o pH do meio de cultura (MELO *et al.*, 2014).

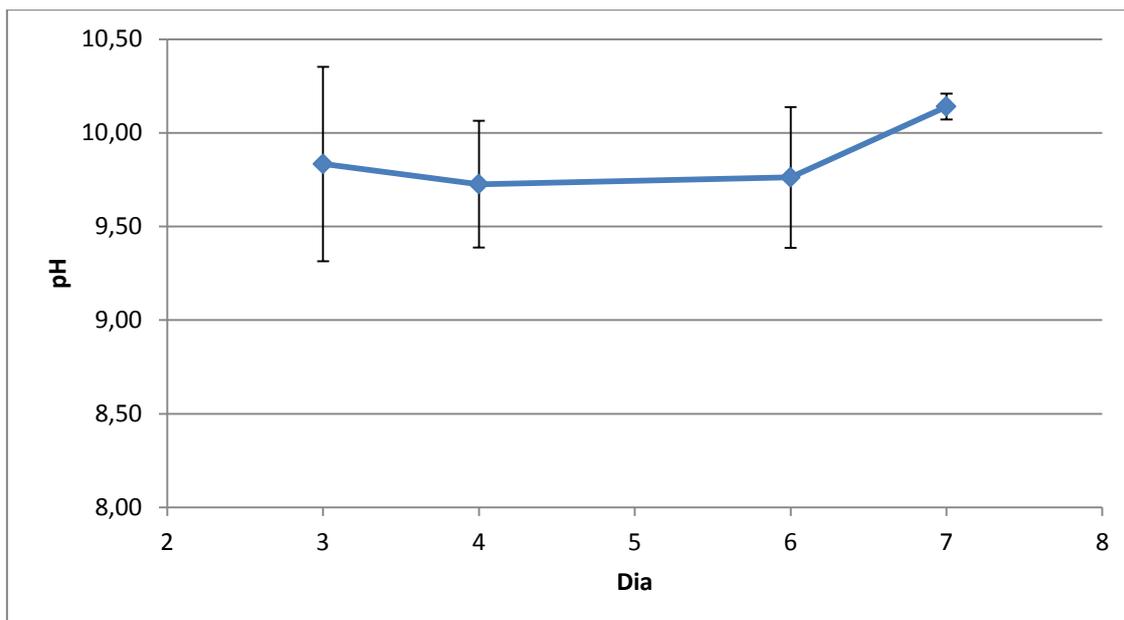


Gráfico 18 - Variação do pH nos cinco biorreatores do Cultivo III - validação do modelo (elaborado pelo autor).

5.4.3. DQO

Na Tabela 21 se encontram os valores finais de DQO do meio de cultura, tanto o experimental quanto o previsto.

Tabela 21 – Valor previsto pelo modelo e experimental - DQO

	DQO
Valores previsto	109,05
Valores experimental	103,67
Desvio experimental	± 27,06

Fonte: elaborada pela autor.

A eficiência do tratamento foi de 89%, resultado semelhante ao encontrado em estudo de LOPES *et al.* (2015) para *Chlorella sp.* Esta microalga foi cultivada em vinhaça e alcançou eficiência na remoção de DQO de aproximadamente 87% (DQO inicial de 1528 mg/L e DQO final de 190 mg/L) do meio de cultura composto por meio BBM e apenas 5% de vinhaça; com a adição de 15% de vinhaça ao meio, a eficiência do tratamento diminuiu para cerca de 84%. Entretanto, o próprio

autor do estudo afirma que “estudos com a *Chlorella vulgaris* em 100% de vinhaça obtiveram apenas 25% de remoção de DQO e baixo crescimento celular” (LOPES *et al.*, 2015).

TORRES *et al.* (2014), que também cultivou *Scenedesmus sp.* em efluente (neste caso, efluente autoclavado de UASB ou RALF - Reator Anaeróbio de Leito Fluidizado) obteve DQO final de 76,24 mg/L com eficiência de remoção de 58,60% em dez dias de cultivo dessa microalga.

5.4.4. Produção de biomassa

O valor obtido no experimento está em conformidade com o valor previsto pelo modelo (Tabela 22).

Tabela 22 - Valor previsto pelo modelo e experimental - Biomassa

Biomassa (g/L)	
Valores previsto	0,27
Valores experimental	0,30
Desvio experimental	± 0,20

Fonte: elaborada pelo autor.

Na Tabela 23 pode se observar uma relação de estudos sobre *Scenedesmus acuminatus* e seus respectivos rendimentos em biomassa e na Tabela 24 estão listados alguns estudos e seus resultados em relação à biomassa obtida no cultivo em efluente, para fins de comparação. De acordo com os valores observados, percebe-se que os rendimentos variam, dependendo do meio de cultivo utilizado e também do número de dias de cultivo. Nota-se que BAUMGARTNER (2013a) obteve biomassa de 0,60g/L para um cultivo com duração de quinze dias. Levando-se em conta que neste estudo o rendimento em biomassa foi de 0,30g/L para sete dias, poderia aumentar-se o tempo de cultivo para tentar obter um rendimento maior em biomassa seca.

Tabela 23 - Comparativo entre quantidade de biomassa obtida no cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em outros estudos

Estudo	Meio de cultura	Tempo de cultivo (dias)	Biomassa (g/L)
Baumgartner <i>et al.</i> (2013a)	MC	14	0,60
Unpaprom <i>et al.</i> (2014)	Efluente suinocultura	10	3,24
Nascimento <i>et al.</i> (2015 ^a)	Chu 12	–	1,19
Este estudo (2016)	Água de maceração	7	0,30

Fonte: elaborada pela autor.

Tabela 24 – Comparativo entre quantidade de biomassa obtida no cultivo de microalgas em efluentes distintos

Espécie	Efluente	Porcentagem efluente no meio de cultura (%)	Tempo de cultivo (dias)	Biomassa (g/L)	Teor lipídico (%)	Estudo
<i>Scenedesmus</i>	Efluente suinocultura	50	18	1,72	–	Fontoura <i>et al.</i> , 2015
<i>Scenedesmus</i> sp.	Esgoto	25	30	4,53	49	Girisha <i>et al.</i> , 2014
<i>Chlorella vulgaris</i>	Milhocina	1,2	15	1,3	–	Melo <i>et al.</i> , 2014

Fonte: elaborada pela autor.

5.4.5. Teor de lipídeos totais

A biomassa obtida no cultivo III (validação do experimento) foi recuperada e armazenada em congelador (Figura 23) até início das extrações. As duas extrações foram realizadas no mesmo dia (Figuras 24 e 25).



Figura 23 – Recuperação da biomassa do cultivo III. A – Início coagulação; B – Coagulação finalizada; C – Biomassa disposta em placas de petri no interior da estufa; D – biomassa seca; E – Biomassa triturada no recipiente coletor (elaborada pelo autor).

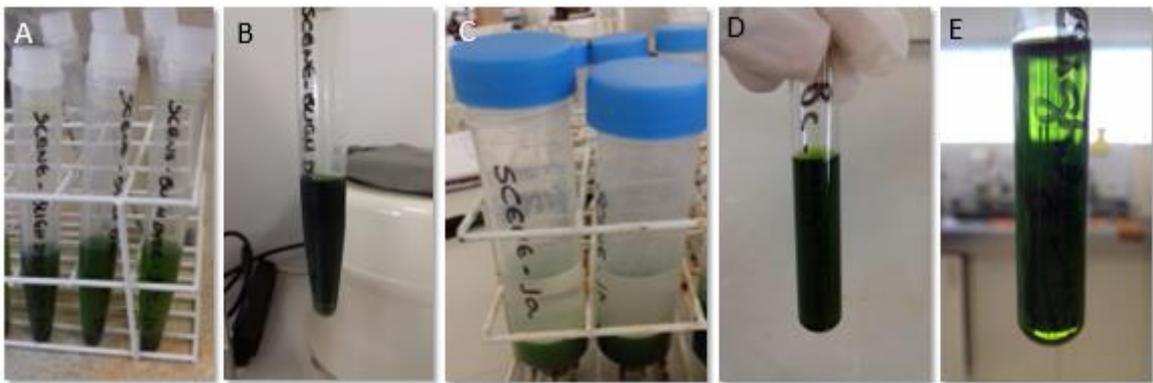


Figura 24 – Extração via método BLIGH & DYER (1959). A – Tubos contendo biomassa e mistura de clorofórmio e metanol; B – Aspecto da mistura após centrifugação; C – aspecto das duas fases formadas na última etapa do procedimento; D – Aspecto do conteúdo extraído; E – Aspecto do conteúdo extraído sob luz natural (elaborada pelo autor).

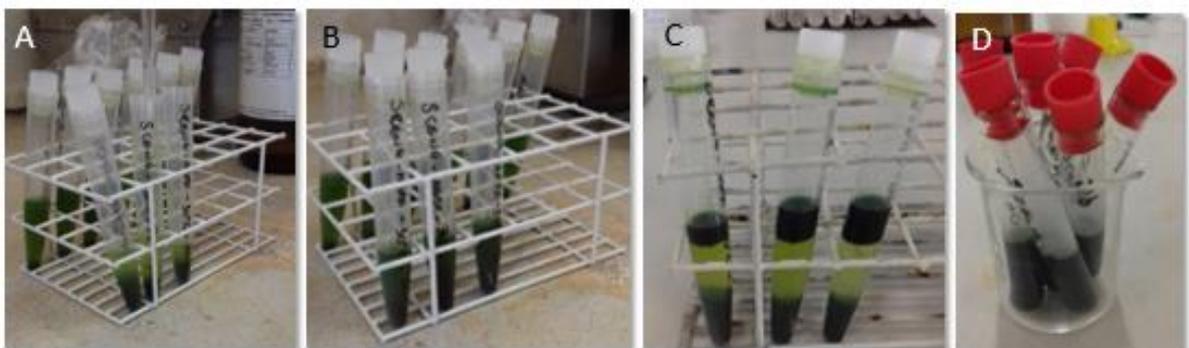


Figura 25 – Extração via método HARA & RADIN (1978). A – Tubos contendo amostra de biomassa e solventes (isopropanol e hexano); B – Aspecto dos tubos após banho-maria; C – Tubos contendo três fases formadas após adição da solução de sulfato de sódio e centrifugação; D – Tubos contendo solvente e lipídeos extraídos (elaborada pelo autor).

Os lipídeos totais foram quantificados, conforme se observa na Tabela 25. A partir desse valor foi calculado o teor de lipídeos (Gráfico 19).

Tabela 25 – Rendimento em lipídeos totais obtidos nas extrações - Cultivo III – Validação do modelo

Método/Temp.	Peso óleo final (mg por litro de cultura)	DESVIO PADRÃO
HARA & RADIN (30°C)	18,98	1,41
HARA & RADIN (45°C)	44,50	2,12
BLIGH & DYER (30°C)	32,70	1,27
BLIGH & DYER (45°C)	40,80	0,85

Fonte: elaborada pelo autor.

Pode-se observar na Tabela 25, que a extração via método HARA & RADIN (1978) obteve o melhor rendimento em teor de óleo ($44,50 \pm 2,12$ mg de óleo/L de cultura em extração a 45°C). Na extração realizada a 30°C o melhor rendimento foi obtido com o método BLIGH & DYER (1959) ($32,70 \pm 1,27$ mg de óleo/L de cultura).

O resultado encontrado para a extração à 30°C está de acordo com os resultados encontrados por BRUM *et al.* (2009) e ARAÚJO (2011). BRUM *et al.* (2009) comparou métodos de extração de óleo de matérias primas vegetais e animais; a extração com hexano e isopropanol obteve menor rendimento em lipídeos extraídos ($6,6 \pm 0,031$ g/100g de aveia e $1,4 \pm 0,016$ g/100g de frango) do que a que empregou clorofórmio e metanol ($7,7 \pm 0,020$ g/100g de aveia e $1,7 \pm 0,018$ g/100g de frango). ARAÚJO (2011) também obteve o maior teor de lipídeos totais da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando o método BLIGH & DYER (1959) ($52,49 \pm 3,37$ %); para o método HARA & RADIN (1978) o teor de lipídeos obtido foi de $2,15 \pm 0,23$ %. Segundo BRUM *et al.* (2009), esses resultados podem ser atribuídos ao fato do método HARA & RADIN (1978) utilizar solventes hidrocarbonetos (como é o caso do hexano), os quais extraem apenas os lipídeos polares; os solventes utilizados no método de BLIGH & DYER (1959) abrangem uma faixa mais ampla de polaridade, logo, tem capacidade de extrair mais lipídeos da matéria prima (polares e apolares).

Entretanto, neste estudo, a metodologia de HARA & RADIN (1978) foi a que se mostrou mais eficiente na extração à 45°C (Gráfico 19), apesar dos valores terem sido próximos (14,8 ± 0,7% de teor de lipídeos em comparação com os 13,6 ± 0,3 % de lipídeos totais obtidos no outro método).

Nota-se também que a extração a 45°C foi capaz de extrair maior quantidade de lipídeos tanto para um método como para o outro (Gráfico 19). Ou seja, a temperatura teve influência na quantidade de lipídeos extraída para os dois métodos testados, o que pode ter sido ocasionado pelo aumento da solubilidade dos triacilgliceróis frente à temperatura mais alta, além da diminuição da viscosidade do óleo (HALIM *et al.*, 2012).

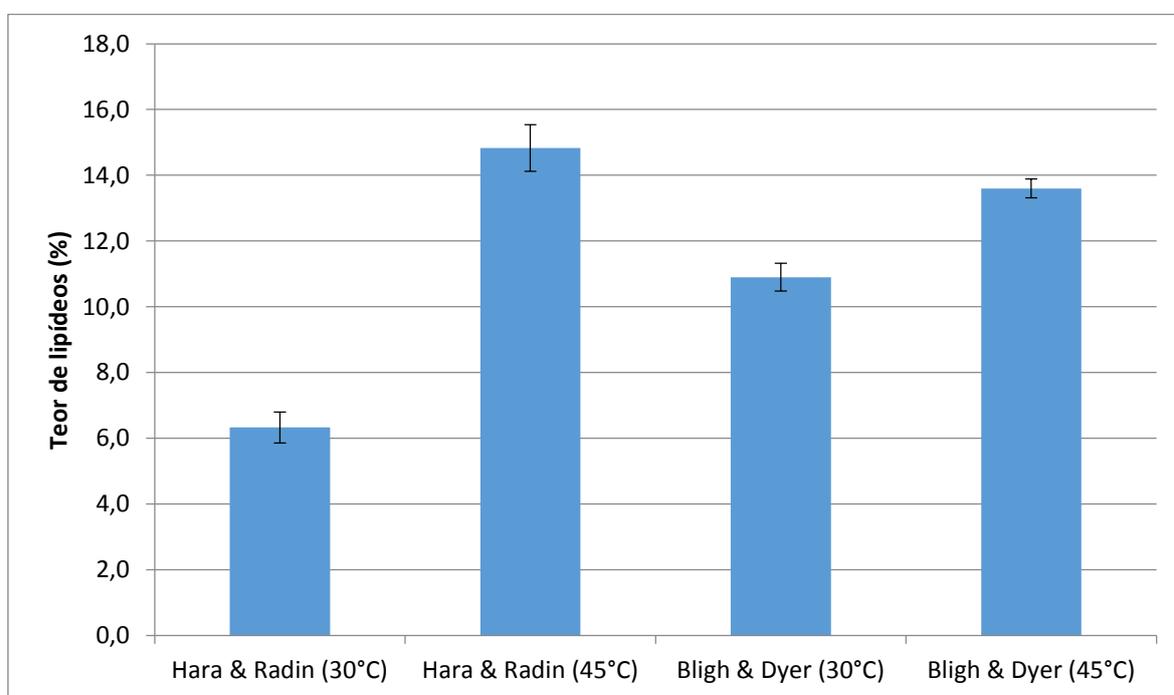


Gráfico 19 – Teor de lipídeos extraídos através do método HARA & RADIN (hexano e isopropanol) e BLIGH & DYER (clorofórmio e metanol) (elaborado pelo autor).

O maior teor lipídico encontrado para a microalga neste estudo (14,8 ± 0,7%) mostrou-se coerente com o que é apresentado na literatura para cultivos dessa espécie (MONTERO-SANCHEZ *et al.*, 2012; MUSHARRAF *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2015a) e superior ao encontrado por BAUMGARTNER *et al.* (2013b) (Tabela 26). Em estudo de TORRES *et al.* (2014) cultivou seis estirões de microalgas, entre elas a *Scenedesmus sp.* L08 em

efluente de UASB autoclavado, obteve um teor de lipídeos totais no valor de 15,0 ± 0,6%.

Na Tabela 27 estão apresentados os teores lipídicos obtidos por outros estudos, utilizando outras espécies de microalgas para fins de comparação.

Tabela 26 – Comparativo do teor de lipídeos totais obtidos de *Scenedesmus acuminatus* em outros estudos

Fonte	Meio de cultura	Tempo de cultivo (dias)	Extração	Teor Lipídico (%)
Montero-Sanchez <i>et al.</i> (2012)	Meio Bristol	10	Clorofórmio/metanol	15,3
Musharraf <i>et al.</i> (2012)	BBM (Bold's Balsal Medium)	–	Clorofórmio/metanol	17
Baumgartner <i>et al.</i> (2013b)	–	–	Clorofórmio/metanol	8,3
Garcia <i>et al.</i> (2015)	BBM (25%)	10	Clorofórmio/metanol	19,8
Nascimento <i>et al.</i> (2015 ^a)	Chu 12	–	Clorofórmio/metanol	19,1
Este estudo (2016)	Água de maceração	7	Clorofórmio/metanol	14,8

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 27 - Conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas

Espécie	Teor lipídico (% da matéria seca)
<i>Chlorella protothecoides</i>	23-55
<i>Chlorella vulgaris</i>	5-50
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19-22
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22-30
<i>Dunaliella salina</i>	14-20
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-65
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Spirulina maxima</i>	4-9
<i>Chlorococcum sp.</i>	19

Fonte: FRANCO *et al.* (2013).

6. CONCLUSÕES

- A microalga *Scenedesmus acuminatus* pode desenvolver-se em meio de cultura composto por água destilada e água de maceração em cultivo mixotrópico;
- No planejamento do DCCR e do experimento de validação do modelo foi identificado que o ponto ótimo para cultivo da *Scenedesmus acuminatus* em água de maceração pode ser alcançado com a utilização de meio de cultura contendo 53,5 % de efluente e 5,2 % de inóculo;
- A análise estatística indicou que os percentuais de inóculo e efluente tiveram influência sobre a densidade celular, DQO e velocidade máxima específica de crescimento;
- Para este estudo, a extração via método HARA & RADIN (1978) foi mais eficiente para a extração dos lipídeos totais à temperatura de 45°C; entretanto, utilizando-se de temperatura à 30°C, a metodologia BLIGH & DYER (1959) foi a mais eficiente;
- A temperatura de extração teve influência sobre o rendimento em lipídeos: o procedimento realizado a 45°C foi capaz de extrair maior quantidade de lipídeos para ambos os métodos: 14,8% de lipídeos totais para HARA & RADIN (1978) e 13,6% para BLIGH & DYER (1959);
- O cultivo de *Scenedesmus* em meio composto por água de maceração a 53,5% pode alcançar o rendimento de biomassa com teor de 14,8% de lipídeos totais;
- O cultivo de *Scenedesmus acuminatus*, em conjunto com a coagulação, foi eficiente para tratamento do efluente “água de maceração”, ao menos no que se refere à adequação do pH e DQO aos padrões vigentes na legislação correspondente;
- O cultivo realizado com efluente “água de maceração” obteve maior desempenho na concentração de 53,5%, porém, as outras concentrações não devem ser desprezadas e podem ser utilizadas para cultivo das microalgas;

- O cultivo de microalgas em meio composto pela água de maceração contribui para reduzir os custos relacionados ao meio de cultura, o que aumenta a viabilidade da geração de biodiesel a partir de óleo microalgal;
- *Scenedesmus acuminatus* possui teor considerável de lipídeos totais que, uma vez extraídos, poderiam ser utilizados como matéria prima para obtenção de biodiesel;
- O cultivo de *Scenedesmus acuminatus* em efluente “água de maceração” configura-se em uma abordagem sustentável e renovável para produção de energia.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o consumo de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) do efluente pelas microalgas;
- Verificar a absorção dos metais presentes no efluente pelas microalgas;
- Avaliar a possibilidade de acrescentar a água de maceração a um meio de cultura tradicional para *Scenedesmus*, como por exemplo, o Chu 10, e verificar o desenvolvimento dessa microalga nessas condições;
- Avaliar o período de cultivo que apresente a melhor eficiência da remoção de DQO (aumentar o número de dias de cultivo);
- Avaliar o perfil de ácidos graxos do óleo extraído;
- Avaliar a composição dos lipídeos em relação ao grau de saturação (lipídeos saturados e insaturados);
- Verificar a composição do óleo extraído em relação à proporção de lipídeos neutros e polares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSSON, M. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). **Ecological Engineering**, 16, p. 243–254, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. Biodiesel – Introdução. Dez, 2014. Disponível em < <http://www.anp.gov.br/?pg=46827&m=&t1=&t2=&t3=>>. Acesso: 05 dez 2015.

ALMEIDA, V. F.; RIOS, L. F.; FILHO, R. M.; MACIEL, M. R. W. Estudo do crescimento autotrófico de três cepas de microalgas visando a produção de biodiesel. In: **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. Campinas, 2015.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais**. Londrina, Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, 2014. 481 p. Volume 2.

ÂNGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral non-photoautotrophic cultivation of microalgae: an overview. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 125-136, jul./dez. 2014.

ANTUNES, A. A.; ARAÚJO, H. W. C.; DA SILVA, C. A. A.; ALBUQUERQUE, C. D. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 334-341, 2013.

ARAÚJO, G. S. **Utilização de microalgas na biotecnologia, com ênfase para biodiesel e análise de imunoparâmetros em camarões marinhos**. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

ARCEO, A. A. **Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

BADO, C.; PERCIO, J. E.; ANTONIO, C. A. A demanda química de oxigênio: questionamentos. **Revista Analytica**, n. 62, 2012.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; BAUMGARTNER, D.; ZANIN, G. M.; ARROYO, P. A. Biomass production and ester synthesis by in situ transesterification/esterification using the microalga *Spirulina platensis*. **Hindawi Publishing Corporation – International Journal of Chemical Engineering**, 2013.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M. E.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 250-255, abr./jun. 2013a.

BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; ZANIN, G. M.; BAUMGARTNER, D.; SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Different methods for extracting oil from the microalga *Scenedesmus acuminatus* for biodiesel production. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, 10, p. 441–445, 2013b.

BEEVI, U. S.; SUKUMARAN, R. K. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. **Bioresource Technology**, 2014.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008.

BEZERRA, L. F.; MATSUMOTO, T. Avaliação da remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada de águas residuárias em biorreator de membranas. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.16, n.3, p. 253-260, jul/set. 2011.

BICUDO, C. E.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2 ed. São Carlos, Rima, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, ago. 1959.

BORGHETTI, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutíssima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2009.

BRANCO, K. B. Z. F.; TREVISAN, E.; DOS REIS, N. V.; ARROYO, P. A. Purificação e caracterização do óleo da microalga *Scenedesmus acuminatus* visando à produção de biodiesel. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ**, Florianópolis, 2014.

BRASIL. **Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005**. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis n^{os} 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso: 05 maio 2015.

BRASIL – Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA). **Resolução nº 070 de 01 de outubro de 2009**. Dispõe sobre o licenciamento ambiental, estabelece condições e critérios e dá outras providências, para empreendimentos industriais. Disponível em http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/Legislacao_ambiental/Legislac

ao_estadual/RESOLUCOES/resoluçã_o_cema_70_2009.pdf>. Acesso: 20 jan. 2016

BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2016/Lei/L13263.htm>. Acesso: 25 jun. 2016.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2004.

BRUM, A. A. S.; DE ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 849-854, 2009.

CARDOSO, W. S.; PINHEIRO, F. de A.; MACHADO, F. de P.; BORGES, J. T. da S.; RIOS, S. de A. Indústria do Milho. *In*: BORÉM, A.; RIOS, S. de A. **Milho biofortificado**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. P. 173-195.

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

CARDOSO, W. A.; ALMEIDA, W. B.; GEREMIAS, R.; PUCKOSKI, A. G.; ANGIOLETTO, E. Comparação entre métodos de extração de óleo de microalgas. **Revista Iniciação Científica**, Criciúma, v. 12, n. 1, 2014.

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

CHEN, L; LIU, T.; XHANG W.; CHEN, X.; WANG, J. Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion. **Bioresource Technology**, v. 111, n. 0, p. 208-214, 2012.

CHEN, H.; QIU, T.; RONG, J.; HE, C.; WANG, Q. Microalgal biofuel revisited: An informatics-based analysis of developments to date and future prospects. **Applied Energy**, v. 55, n.1, p. 585–598, 2015.

CONCEIÇÃO, R. C.; FRASÃO, C. V.; DA SILVA, M. C.; MEDEIROS, J. L.; ARAÚJO, O. Q. F.; PICARDO, M. C. Caracterização composicional e transesterificação de óleo de microalga: uma abordagem computacional. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1336-1342, 2012.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Guia do milho: tecnologia do campo à mesa**. 2010. Disponível em < http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf>. Acesso: 10 de janeiro de 2015.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. **Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011**. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresol_lanceflue_30e31mar11.pdf>. Acesso: 04 maio 2015.

COSTA; J. A. V.; RADMN, E. M.; CERQUIA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil dos ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutíssima* cultivadas em diferentes condições. *Alim. Nutr. Araraquara*, v.17, n. 4, p.29-36, out/dez 2006.

CUI, Y.; YUAN, W.; CHENG, J. Understanding pH and ionic strength effects on aluminum sulfate-induced microalgae flocculation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DAGOSTIN, J. L. A. **Estudo da extração etanólica de óleo de soja utilizando ésteres como co-solventes**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2015.

DANNENHAUER, C. E. Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

DANTAS, D. M. M.; DRUMMOND, A. R. F.; SANTOS, L. B. G.; SANTOS, F. K.; BEZERRA, R. S.; GÁLVEZ, A. O. Extração de óleo de microalga utilizando ultrassom com diferentes solventes visando a produção de biodiesel. *In: IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*. João Pessoa, 2010.

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

DELABARY, G. S. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos suínos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.

DELATORRE, A. B.; RODRIGUES, M. R.; AGUIAR, C. J.; ANDRADE, V. V. V.; AREDES, A.; PEREZ, V. H. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias primas e rotas tecnológicas de processos. **Perspectivas online**, v. 1, n. 1, 2011.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. **Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel**. Springer, 2010. 200 p. (Green Energy and Technology).

DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Third generation biofuels from microalgae. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Portugal, 2010.

ENCARNAÇÃO, A. P. G. **Geração de biodiesel pelos processos de transesterificação e hidroesterificação: uma avaliação econômica.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

ESPINOSA, L.; TAPANES, N. L. C. O.; ARANDA, D. A. G.; CRUZ, Y. R. As microalgas como fonte de produção de biodiesel: discussão de sua viabilidade. **Acta Scientiae & Technicae**, v. 2, n. 1, jun. 2014.

FERNANDES JR., V. J.; ARAÚJO, A. S. VINHADO, F. S.; PIVESSO, P. R. Caracterização de resíduo sólido formado em biodiesel de sebo bovino. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1901-1906, 2012.

FERRIOLS, V. M. E. N.; AGUILAR, R. O. Efficiency of various flocculants in harvesting the green microalgae *Tetraselmis tetrahele*. **Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society**, v. 5, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), p. 497-509, 1957.

FONTOURA, J. T.; ROTERMUND, S. V.; RAMIREZ, N. N. V.; RUBLESKE, M. B.; FARENZENA, M.; GUTERRES, M. Removal of nitrogen in tannery wastewater using *Scenedesmus* sp. In: **IV SOLABIIA Latin American Congress**, Florianópolis, 2015.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; DA CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L.; ALMEIDA NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, Vol. 36, No. 3, 437-448, 2013.

FRANCISCO, E. C.; FRANCOLL, T. T.; MARONEZELL, M. M.; ZEPKALL, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.2, p.349-355, 2015.

GALVÃO, R, M.; SANTANA, T. S.; FONTES, C.H.O.; SALES, E.A. Estudo da Taxa de crescimento de microorganismos e proposta de modelo para produção de biomassa de *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Cleaner Production – Especial Edition – Cleaner Production Initiatives and Challenges for a sustainable word**. São Paulo, maio, 2011.

GAMA, P. E.; GIL, R. A. S.; LACHTER, E. R. Produção de biodiesel através de transesterificação in situ de sementes de girassol via catálise homogênea e heterogênea. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v.33, n. 9, p. 1859-1862, 2010.

GERAGE, A. C.; SAMAHA, M. J.; BITTENCOURT, C. R.; CORREA, V. J. **Cadeia produtiva do milho: diagnóstico e demandas atuais no Paraná**. Londrina, IAPAR, 1999.

GERALDI, C. A. Q.; PEREIRA, N. C.; FRARE, L. M.; KLASSEN, T. Análise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. **Engevista**, v. 14, n. 2. p. 185-195, ago. 2012.

GERIS, R.; DOS SANTOS, N. A. C.; AMARAL, B. A.; MAIA, I. S.; CASTRO, V. D.; CARVALHO, J. R. M. Biodiesel de soja – reação de transesterificação para aulas práticas de química. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1369-1373, 2007.

GIRISHA, S. T.; RAVIKUMAR, K.; GIRISH, V.; MRUNALINI, B. R. Growing of Chlorella, Scenedesmus and Botryococcus in sewage water for biodiesel production. **Archives of Applied Science Research**, 6, 1, p. 131-138, 2014.

GOMES, L. A. O. **Cultivo de Crustáceos e Moluscos**. São Paulo, Nobel, 1986.

GONZÁLEZ-DELGADO, A. D.; KAFAROV, V. Microalgae based biorefinery: issues to consider. CT&F - **Ciencia, Tecnología y Futuro** - Vol. 4 Num. 4 Dec. 2011.

HAKALIN, N. L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga Scenedesmus sp. para a produção de biodiesel**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

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

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P.A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102, p. 178–185, 2011.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. **Analytical Biochemistry**, 90, p. 420-426, 1978.

JIRKA, A. M.; CARTER, M. J. **Analytical Chemistry**, 1975, 47(8) 1937 para análise de água, água residuária e água salgada.

KROHN, B. J.; MCNEFF, C. V.; YAN, B.; NOWLAN, D. Production of algae-based biodiesel using the continuous catalytic Mcgyan process. **Bioresource Technology**, 102, p. 94–100, 2011.

KROUMOV, A. D.; MÓDENES, A. N.; WENZEL, B. M. Desenvolvimento de um modelo da cinética enzimática da transesterificação de óleos vegetais para produção de biodiesel. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 9-16, 2007.

LADEIRA, S. A.; DELATORRE, A. B.; ANDRADE, M. V. V.; MARTINS, M. L. L. Utilização da pectina, proteínas do soro de queijo e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus sp.* termofílico. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v. 15, n. 1, p. 92-98, jan./mar. 2012.

LAR. **Cooperativa LAR: história**. Disponível em <<http://www.lar.ind.br/v4/institucional/index.php>>. Acesso: 16 de maio 2015.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, 78, p. 15-21, jul. 2007. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/nec/n78/03.pdf>>. Acesso: 16 de set. 2014.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629-636, 2008.

LOPES FILHO, J. F. Avaliação da maceração dinâmica do milho após um curto período de hidratação e subsequente quebra do pericarpo do grão. **Ciência, Tecnologia e Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 3, set./dez. 1999.

LOPES, T. S. A.; SILVEIRA, T. N.; ALMEIDA, O. E. L.; DE BRITO, Y. J.; FERREIRA, W. B. Efeitos da variação de pH e luminosidade no desenvolvimento da microalga *Chlorella sp* visando à produção de biocombustíveis. *In: Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciência*, Campina Grande, 2016.

LOPES, T. S. A.; FERREIRA, W. B.; ALMEIRA, O. E. L.; DE BRITO, Y. J. V.; SILVEIRA, T. N. Avaliação do cultivo mixotrófico de microalgas com potencial para produção de biocombustível suplementado com efluente de filtro anaeróbio. *In: I Congresso Nacional de Engenharia de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis*, Campina Grande, 2015.

MACHADO, W. R. C.; BURKERT, J. F. M. Produção de carotenoides microbianos pela levedura *Sporidiobolus pararoseus* utilizando coprodutos. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v. 6, No. 2, 2014.

MAKAREVICIENE, V.; ANDRULEVICIUTE, V.; SKORUPSKAITE, V.; KASPEROVICIENE, J. Cultivation of microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* as a potential biofuel feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 57, n. 3, p. 21-27, 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATOS, E. H. S. F. **Cultivo do milho verde – Dossiê Técnico**. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (CDT) / Universidade de Brasília (UnB), 2007. Disponível em <<http://www.agrolink.com.br/downloads/Cultivo%20do%20Milho%20Verde.pdf>>. Acesso em 05 de fev. 2015.

MAZZER, C.; CAVALCANTI, O. A. Introdução à gestão ambiental de resíduos. **Infarma**, v. 16, n. 11-12, 2004.

MEDINA, A. R.; GRIMA, E. M.; GIMENEZ, A. G.; GONZALES, M. J. I. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 3, p. 517-580, 1998.

MELO, R. G. ; SILVA, M. F. ; COSTA E SILVA, P. E. ; VIANA MARQUES, D. A. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A.L.F. Utilização de resíduo agroindustrial como substrato para produção da microalga *Chlorella vulgaris*. In: **Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde e Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Pernambuco, 2014.

MELO, R. G.; SILVA, M. F.; SILVA, P. E. C.; MARQUES, D. A. V.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F. Utilização de resíduo agroindustrial como substrato para produção da microalga *Chlorella vulgaris*. In: **Simpósio Integrado de Ciências Biológicas e da Saúde e Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Vitória do Santo Antão, 2014.

MINILLO, A.; GODOY, H. C.; FONSECA, G. G. Growth performance of microalgae exposed to CO₂. **Journal of Clean Energy Technologies**, v. 1, n. 2, abril 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Agroenergia: 2006-2011**. 2 ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Disponível em < http://www.embrapa.br/publicacoes/institucionais/agroenergia_miolo.pdf>. Acesso: 16 set. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Agroenergia: 2006-2011**. 2 ed. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Plano Decenal de Expansão de Energia 2021**. Brasília: Energética, 2012. Disponível em <www.epe.gov.br/PDEE/20120924_1.pdf>.

MIRANDA, R. A.; LÍCIO, A. M. A. **Diagnóstico dos Problemas e Potencialidades da Cadeia Produtiva do Milho no Brasil**. 1. ed. Embrapa Sorgo e Milho, Sete Lagoas, 2014.

MOLZ, C. H.; DE SOUZA, A. A. R.; GOMES, L. P.; MIRANDA, L. A. S. Proposta de metodologia para a análise da demanda química de oxigênio pelo método colorimétrico, com digestão por refluxo fechado, visando a redução do volume dos resíduos gerados. In: **26º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Porto Alegre, 2011.

MONTERO-SANCHEZ, Y.; GALLO, A.; GOMEZ, L. M.; ALVAREZ, I.; SABINA, L. C.; TAMBARA, Y.; ALVAREZ, A.; ALFONSO, M. C.; RAMIREZ, L. R. PR

Productividad de lipidos y composición de ácidos grasos de cinco espécies de microalgas. **Investigación y Saberes**, v. 1, n. 2, p. 37-43, 2012.

MORAES, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

MUSHARRAF, S. G.; AHMED, M. A.; ZEHRA, N.; KABIR, N.; CHOUDHARY, M. I.; RAHMAN, A. Biodiesel production from microalgal isolates of Southern Pakistan and quantification of FAMES by GC-MS/MS analysis. **Chemistry Central Journal**, 6, 149, 2012.

NAKASHIMA, S. M. K.; ANDRÉ, C. D. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of Food Technology**, 3, p. 41-51, 2000.

NASCIMENTO, R. A. L.; ALVES, M. H. M. E.; FREITAS, J. H. E. S.; MANHKE, L. C.; LUNA, M. A. C.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. E.; SILVA, C. A. A. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **Exacta**, Belo Horizonte, v. 8, n.1, p. 15-29, 2015.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(3), p. 582-588, jul./set. 2006.

NEVES, F. F.; JEREMIAS, M. L.; LOPES, R. G.; SARDA, A.; RÖRIG, L. R.; DENNER, R. B.; LISBOA, H. M. Efeito do uso do efluente doméstico tratado como meio de cultura sobre o crescimento e produtividade no cultivo de *Chlamydomonas sp.* isolada de lixiviado de aterro sanitário. **Tecno-lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 17, n. 1, p. 30-37, jan/jun. 2013.

NOVAES JR, S. O. **Potencial de aproveitamento de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* como matéria prima para obtenção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo, 2013.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. **The Computer Journal**, 7, 4, p. 308-313, 1965.

OECD-FAO (ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO). **Agricultural Outlook 2015**, 144 p., 2015. Disponível em <http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2015/panorama-general-de-ocde-fao-perspectivas-agricolas-2015-2024_agr_outlook-2015-4-es>. Acesso em 27 de set. 2016.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. Biodiesel: possibilidades e desafios. **Química e Sociedade – Química Nova na Escola**, n. 28, maio 2008.

OLIVEIRA, C. J.; SCHAFFNER, R. A.; CREMONEZ, P. A.; FEROLDI, M.; TELEKEN, J. G. Produção de biodiesel a partir das algas: uma revisão. **Journal of Agronomic Sciences**, v.3, n. especial, p.202-221, 2014.

ORTENZIO, Y. T.; AMARAL, G. G. .; ALMEIDA, S. S. .; OLIVEIRA, E. C. A. M. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em revista: diálogos**, ano 5; n. 1, p. 58-65, jan./jun. 2015.

OVEREND, R.P. Energy From Biomass. *In: Renewable Energy Sources Charged with Energy from the Sun and Originated from Earth-Moon Interaction*, Ed. Evald E. Shpilrain, 2004. In Encyclopedia of Life Support, Eolss Publishers, Oxford ,UK.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2006. Circular Técnica 75.

PAN, Adriana; MOREIRA, A.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento e qualidade de biopolímeros de *Xantomonas campestris* pv. *pruni* cepa 06. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 n.3, p. 273-277, set-dez, 2000.

PEREIRA FILHO, S. M.; CUNHA, M. C. C.; DRUMMOND, A. R.; DANTAS, D. M. M.; GÁLVEZ, A. O. Matéria-prima do Biodiesel com Curto Tempo de Coleta: Microalga (*Scenedesmus subspicatus*). *In: II Seminário Biodiesel Fonte de Energias das Oleaginosas em Pernambuco: Evolução do Cenário e Novas Perspectivas no Brasil*, 2010, Pernambuco.

PETROBRÁS. **Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado**. Ministério de Minas e Energia, 2007.

PINAZZA, L. A. **Cadeia Produtiva do Milho**. MAPA/SPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2007. Série Agronegócios. v.1

RADMAN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of Microalgae *Scenedesmus* sp in Ethanol Vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n.5, p. 630-635, 2014.

REIS, E.; VARGAS, E.; ANSCHAU, A.; FRANCO, T. Extração de Lipídios de *Lipomyces starkeyi*. *In: Congresso Interamericano de Ingeniería*, 2011. Disponível em <aiquruguay.org/congreso/download/TL74.pdf>. Acesso em 15 de jan. 2015.

SANTOS, G. P.; REGO, N. A. C.; DOS SANTOS, J. W. B.; DELANO JR, F. D.; SILVA JR, M. F. S. Avaliação espaço-temporal dos parâmetros de qualidade da água do rio Santa Rita (BA) em função do lançamento de manipueira. **Revista Ambiente & Água – Na Interdisciplinary Journal of Applied Science**: v. 7, n.3, 2012.

SEBASTIEN, N. Y.; GRANJA, R. P. Cultivo de *Scenedesmus*: alimento vivo para a manutenção de organismos planctônicos e implementação na dieta humana. **Revista Varia Scientia**, v. 05, n. 10, p. 113-121, 2005.

SEBASTIEN, N. Y.; SAKAMOTO, B. A. M.; ESTAVAS, M.; REFOSKO, R. M. C. Tecnologia de produção de *Spirulina platensis* em diferentes meios de cultura. *In: I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente*, Cascavel, 2009.

SILVA, C. R. **Otimização do meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração do milho para produção de proteases por *Bacillus sp* SMIA-2**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2006.

SILVA, G. S.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P.; ZANDONÁ FILHO, A. Oil extraction of microalgae for biodiesel production. **Espaço e Energia**, n. 21, 2014.

SILVA, L. A.; PALMA, M. B.; TAVARES, L. B. B.; MEIER, H. F. Estudo da cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* para produção de lipídeos como matéria prima para biodiesel. *In: 2º Simpósio Nacional de Biocombustíveis (BIOCOM)*, Recife, 2009.

SOUZA, A. T. V.; COSTA E SILVA, P. E.; BARROS, P. D. S.; HERCULANO, P. N.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P. Otimização da Produção de Enzimas Fibrinolíticas pela Microalga *Scenedesmus sp.* *In: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática*, Caxias do Sul, 2016.

TAHER, D. M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Ciências e Materiais) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

TORRES, H. S. J.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F. Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis. *In: IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental*, Porto Alegre, 2014.

TREVISAN, E.; LEAL NETO, M.; MORO, P.; HOSHINO, S. O.; ARROYO, P. A. Avaliação do pH em cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. *In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, Maringá, 2013.

UNPAPROM, Y.; TIPNEE, S.; RAMESHPRABU, R. Biodiesel from green alga *Scenedesmus acuminatus*. **International Journal of Sustainable and Green Energy**, n. 4, 2014.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; JACQUES, R. A.; FÚRIGO JR., A. Pré-tratamentos de melão de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenóides. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1860-1866, 2007.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu – SP. **Eclética Química**, v. 22, p. 49-66, 1997.

VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVESC, M.; SOTO, L. P. Growth of *Scenedesmus* sp. In artificial wastewater. **Bioresource Technology**, México, n. 68, p. 265-268, 1998.

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2011.

WILLIAMS, P. J de le B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, 3, 554–590, 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, 101, p. 5494–5500, 2010.

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**, 102, p. 3098–3102, 2011.

YUSOFF, M. F. M.; XU, X.; GUO, Z. Comparison of Fatty Acid Methyl and Methyl Esters as Biodiesel Base Stock: a Review on Processing and Production Requirements. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 2014.

ZIA, M. A.; RIAZ, A.; RASUL, S.; ABBAS, R. Z. Evaluation of Antimicrobial Activity of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* EBL-A and *Penicillium notatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n.6, p. 956-961, 2013.

ZUNIGA, A. D. G.; PAULA, M. M.; COIMBRA, J. S. R.; MARTINS, E. C; A.; SILVA, D. X.; TELIS-ROMERO, J. Revisão: propriedades físico-químicas do biodiesel. **Pesticidas**, v. 21, p. 55-72, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Gráficos das curvas de crescimento celular ajustadas pelo modelo.

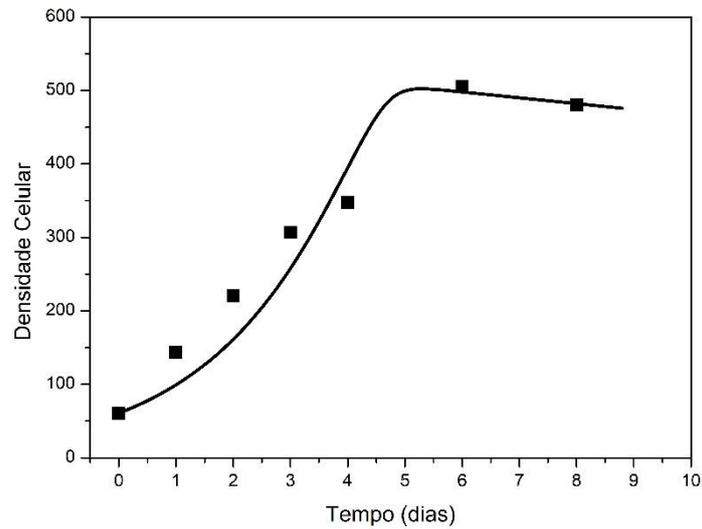


Gráfico A1 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 1 do DCCR 23% de efluente e 1,9% de inóculo).

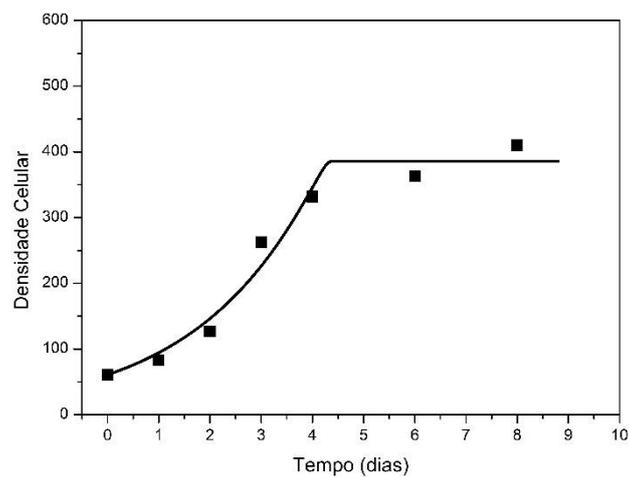


Gráfico A2 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 2 do DCCR (86,9% do efluente e 1,9% de inóculo).

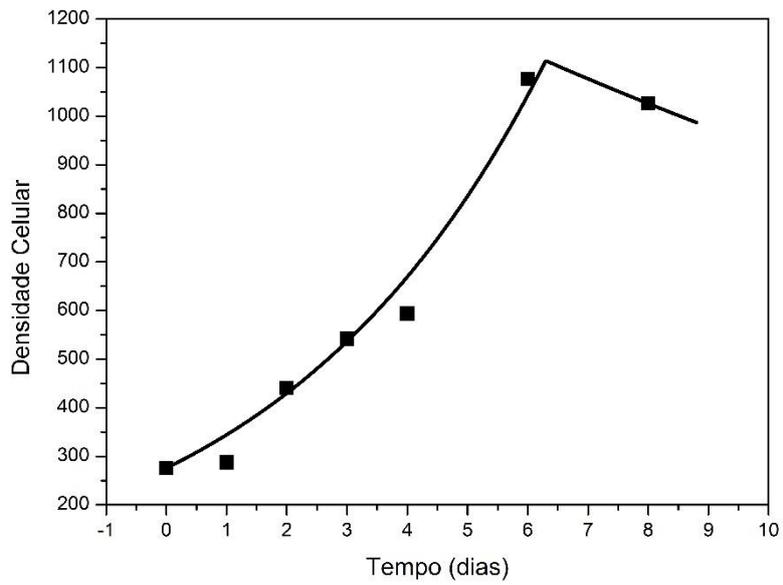


Gráfico A3 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 3 do DCCR (23,1% do efluente e 8,6% de inóculo).

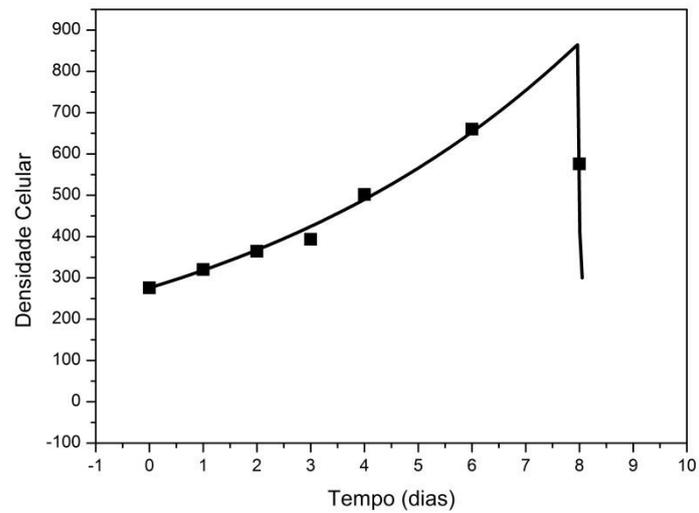


Gráfico A4 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 4 do DCCR (86,9% do efluente e 8,6% de inóculo).

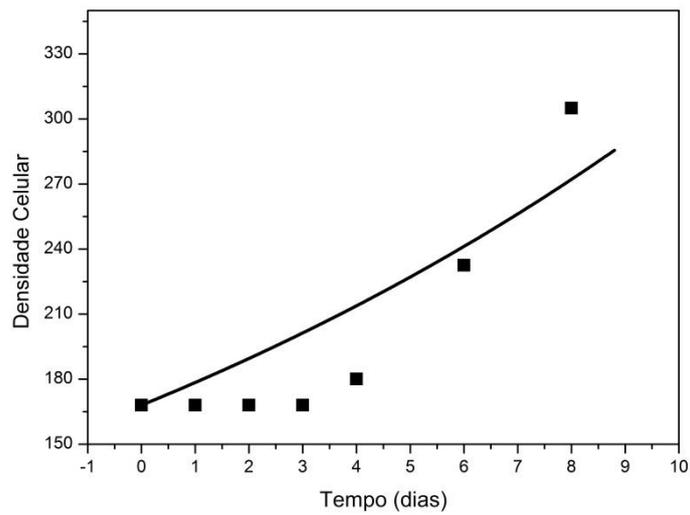


Gráfico A5 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 5 do DCCR (10% do efluente e 5,3% de inóculo).

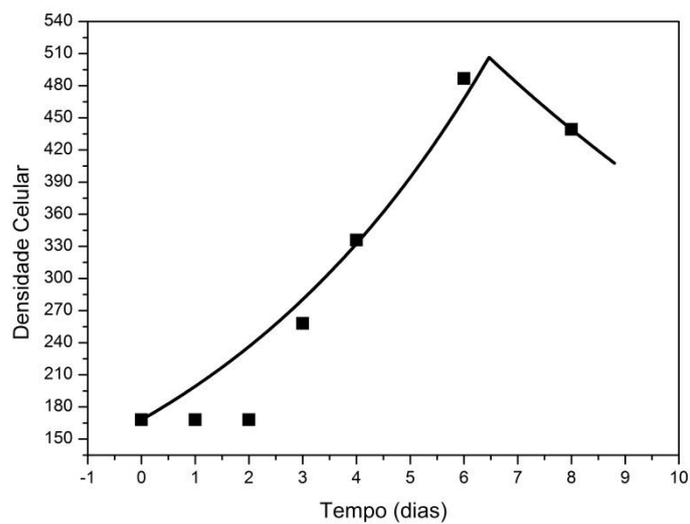


Gráfico A6 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 6 do DCCR (100% do efluente e 5,3% de inóculo).

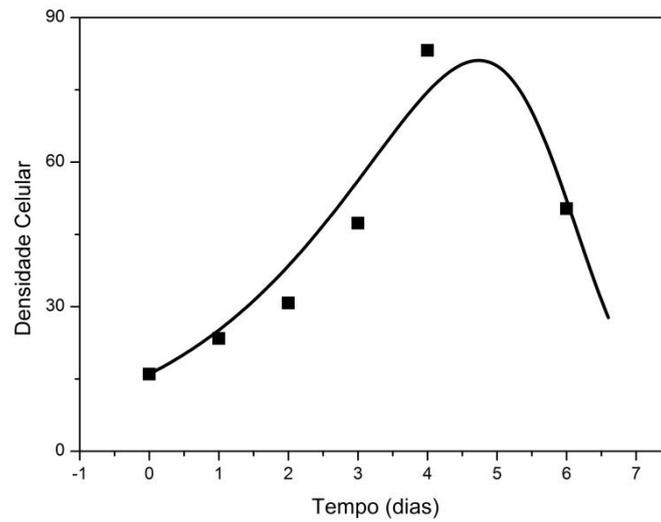


Gráfico A7 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 7 do DCCR (55% do efluente e 0,5% de inóculo).

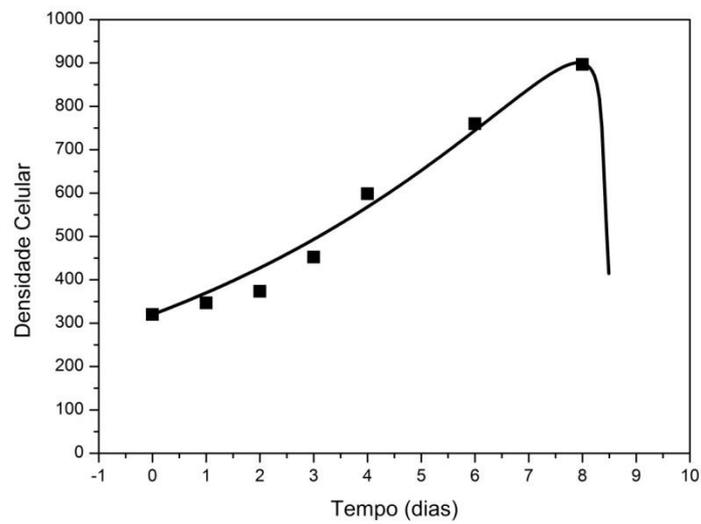


Gráfico A8 – Curva de crescimento ajustada referente ao ensaio 8 do DCCR (55% do efluente e 10% de inóculo).

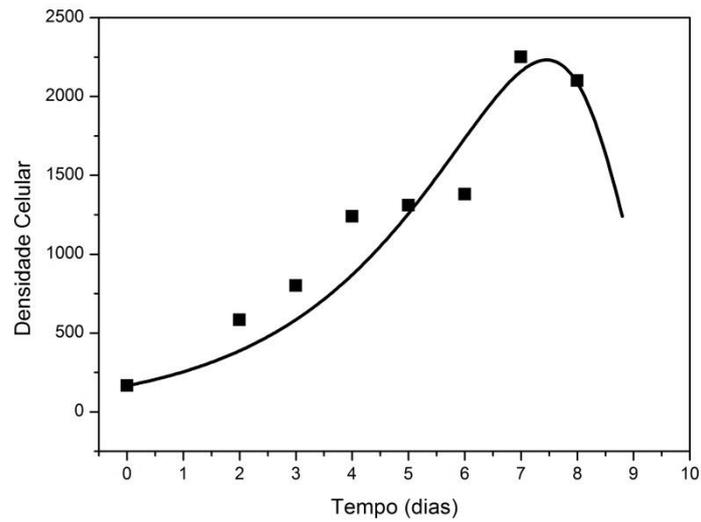


Gráfico A9 – Curva de crescimento ajustada referente ao ponto central I do DCCR (55% do efluente e 5,3% de inóculo).

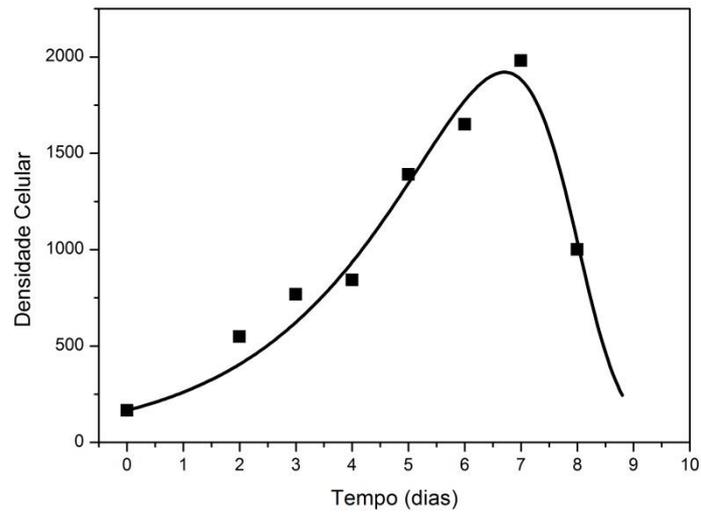


Gráfico A10 – Curva de crescimento ajustada referente ao ponto central II do DCCR (55% do efluente e 5,3% de inóculo).

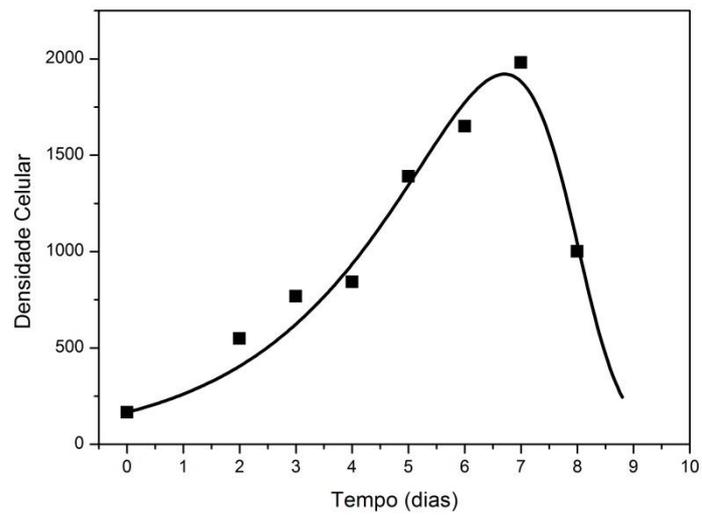


Gráfico A11 – Curva de crescimento ajustada referente ao ponto central III do DCCR (55% do efluente e 5,3% de inóculo).