



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCINO COSTA PALHARES DA SILVA

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

FRANCINO COSTA PALHARES DA SILVA

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA PARA
PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de mestre em Bioenergia.

Orientadora: Dr.^a Diva de Souza Andrade.
Coorientador: Dr. Helder Rodrigues da Silva.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Francino Costa Palhares da.

Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça para produção de biomassa / Francino Costa Palhares da Silva. - Londrina, 2018.

84 f. : il.

Orientador: Diva Souza Andrade.

Coorientador: Helder Rodrigues da Silva.

Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Produção de biomassa - Tese. 2. Vinhaça - Tese. 3. Otimização - Tese. 4. Superfície de resposta - Tese. I. Andrade, Diva Souza . II. Silva, Helder Rodrigues da. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Bioenergia. IV. Título.

FRANCINO COSTA PALHARES DA SILVA

**CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA PARA PRODUÇÃO DE
BIOMASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioenergia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de mestre em Bioenergia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dr.^a Diva de Souza Andrade
Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR

Dr.^a Lisandra Ferreira de Lima
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de março de 2018.

A Deus;
a meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à agências de fomento CAPES pelo auxílio financeiro, que foi fundamental para a realização e desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade e pelo conhecimento adquirido no programa de pósgraduação em Bioenergia.

Agradeço ao Instituto Agronômico do Paraná Londrina – IAPAR pelo apoio acadêmico, pelo suporte instrumental, oportunidade, e conhecimento adquirido no dias a dia do programa de pós graduação em Bioenergia.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Diva de Souza Andrade, não só pela orientação, mas sobretudo, por abrir as portas do laboratórios, por todo conhecimento, sabedoria, paciência, atenção, auxílio, sugestões, contribuições, e amizade, dos quais foram fundamentais para a realização desta pesquisa. Acrescentando novos conhecimentos à minha vida acadêmica e pessoal.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Helder Rodrigues da Silva, por ter confiado e acreditado no meu trabalho desde o início do projeto, até a entrega da versão final da dissertação. Foram inumeros os momentos onde encontramos desafios, dos quais foram superados com muita luta, que hoje tenho certeza que serviu muito de aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional ao longo dos quais pude contar com seu apoio. Muito obrigado.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite Dra. Lisandra Ferreira de Lima e Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete.

Ao apoio e parceria do Dr. Cássio Egídio Cavenaghi Prete e Dr. Ricardo Tadeu de Faria, por todo o suporte acadêmico que foi fundamental no desenvolvimento da pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório do Solo, Marcio, Geraldo técnicos do Laboratório de fitotecnia, Nelson técnico de laboratório da biotecnologia, e demais colaboradores pela disposição e ajuda com as análises, orientação e revisão dos métodos.

Aos meus amigos do mestrado que se dispuseram a me ajudar nos momentos mais difíceis do mestrado, quando as coisas não estão certas, e o apoio, as trocas de informações, parceria em análises e acima de tudo a amizade sincera em especial Guilherme Augusto Colusse, Raoni Oliveira de Souza, Kawana Bortolato

Aos companheiros do mestrado pela amizade sincera, meu amigo Guilherme Augusto Colusse, Raoni Oliveira de Souza, foram bons momentos que levarei muitas lembranças comigo!.

Aos companheiros de classe, principalmente durante o período das disciplinas, José

Batista, Carlos Peraro conhecido como Dr Celso, Oscar Andrés Goyeneche, Aristóteles Aggens amigo do chimarrão, Raphael Neves, Marissa Kimura, Isadora Branco, Anathan Bichel e Jozomar Ferreira pela amizade.

Meus amigos de longa data: Raí Rigonatto Batista, Danilo Herculano, Cintia Santos. A todos os colegas da pós-graduação em rede em Bioenergia André Luiz, Nighel Fernando (Dinoite), Pardinho, Edinei, Arthur.Ceraso. Foram muitas histórias e experiências boas, que levarei comigo na memória.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em bioenergia, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do programa especialmente a Prof.^a Dra. Carmen Luísa Barbosa Guedes.

À Usina de Açúcar COSAN S/A do grupo RAÍZEN localizada na cidade de Assis - São Paulo, Brasil pelo fornecimento da vinhaça utilizada nesta pesquisa.

À minha namorada Sandra Keiko Ito, pelo seu amor, compreensão, paciência, dedicação a qual me motivou nos momentos difíceis, dando todo o suporte para que pudesse me dedicar mais livremente a este trabalho, me apoiando nesta etapa da pós-graduação.

À minha família, em especial minha mãe que, nos momentos mais difíceis, mostrou ser uma guerreira, com força e superação que me inspira e me dá força de seguir em frente. Que a pesar de todas as dificuldades, sempre procurou me ajudar, dando incentivo a fim de que continuasse os meus estudos.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu
tamanho original”

Albert Einstein.

SILVA, Francino Costa Palhares da. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça para produção de biomassa**. 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio com sais nutrientes hidropônicos com diferentes concentrações de vinhaça, extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e pH. No primeiro experimento foi realizado o planejamento fatorial para a obtenção dos pontos ótimos de cada variável, pH, concentrações de vinhaça (% do meio hidropônico) e de extrato de levedura, no segundo experimento estes parâmetros ajustados fixos foram analisados para otimizar a produção de biomassa de *C. vulgaris*. O planejamento experimental Box-Behnken foi realizado com 13 tratamentos com 4 repetições no ponto central, para as variáveis de concentrações de 15, 25 e 40% de vinhaça; 30, 40 e 50 mg L⁻¹ de extrato de levedura seca (*S. cerevisiae*) e pH 7, 8 e 9. Nos dois experimentos, para o cultivo da *C. vulgaris* foi utilizado inóculo inicial na concentração de 20% (v/v), em frascos Erlenmeyers de 500 mL, contendo 250 mL de meio de acordo com os tratamentos. Os experimentos foram realizados em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12:12 h claro/escuro e temperatura controlada de 28 ± 1°C. Os parâmetros foram medidos a cada quatro e cinco dias, no primeiro e no segundo experimento, respectivamente, durante 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*. Após a obtenção dos resultados, foram gerados gráficos de superfície de resposta e o do ponto ótimo para produção de biomassa seca e demais parâmetros da *C. vulgaris*. A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento, foi realizado o segundo ensaio onde as variáveis otimizadas para a produção de biomassa seca foram: 40% de vinhaça, 30 mg L⁻¹ extrato de levedura e pH 7, com 5 repetições. Nos dois experimentos, após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*, a condutividade elétrica, a densidade óptica e biomassa aumentaram linearmente e com isso o pH tornou se alcalino. No primeiro experimento, após 20 dias de cultivo de *C. vulgaris* a maior produção de biomassa seca foi de 2,59 g L⁻¹ com produtividade de 0,129 g L⁻¹ d⁻¹. No segundo experimento, após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris* a maior produção média de biomassa obtida foi de 2,09 g L⁻¹±0,06, sendo que a produtividade foi de 0,104 g L⁻¹ d⁻¹ e a redução total da demanda química de oxigênio (DQO) foi de 93,45%. A otimização do cultivo de *C. vulgaris em vinhaça*, extrato de levedura seca (*S. cerevisiae*) e a pH 7 foi eficiente, podendo ser uma alternativa para produção de biomassa de *C. vulgaris* para bioenergia.

Palavras-chave: Extrato de levedura. Efluente usina sucroenergética. Microalgas. Otimização. Superfície de resposta.

SILVA, Francino Costa Palhares da. **Cultivation of *Chlorella vulgaris* in vinasse for the production of biomass**. 2018. 84 p. Dissertation (Master's Degree in Bioenergy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018

ABSTRACT

The objective of this work was to optimize the biomass production of *Chlorella vulgaris* grown with hydroponic nutrient salts medium with different concentrations of vinasse, yeast extract (*Saccharomyces cerevisiae*) and pH. The first experiment was carried out with the factorial planning to obtain the optimum points of each variable, pH, vinasse dose (% of the hydroponic medium) and yeast extract. In the second experiment, these fixed points were used to optimize the biomass production of *C. vulgaris*. The Box-Behnken experimental design was with 13 treatments with 4 replicates at the central point, for the variables of concentrations of 15, 25 and 40% vinasse; 30, 40 and 50 mg L⁻¹ of dry yeast extract (*S. cerevisiae*) and pH 7, 8 and 9. In the two experiments, for the cultivation of *C. vulgaris*, initial inoculum was used at a concentration of 20% (v/v) in Erlenmeyer flasks of 500 mL, containing 250 mL of medium according to the treatments. Analyzes of the second experiment were performed at five-day intervals, for twenty days. The experiments were carried out in a growth chamber under controlled conditions with photoperiod of 12:12 hours light:dark and temperature of 28 ± 1°C. The parameters were measured every four and five days, in the first and in the second experiment, respectively, during twenty days of cultivation of *C. vulgaris*. After obtaining the results, response surface graphs a graph with the optimum point for the production of dry biomass of *C. vulgaris* were generated for dry biomass production and other analyzes performed in the experiments. From the results obtained in the first experiment, the second test was performed, where the variables optimized for the production of dry biomass were: 40% vinasse, 30 mg L⁻¹ yeast extract and pH 7, with 5 replicates. In both experiments, after 20 days of *C. vulgaris* cultivation, the electrical conductivity, the optical density, and the dry biomass increased linearly and pH tended to be alkaline. In the first experiment for the optimization, after 20 days of cultivation of *C. vulgaris*, was obtained the highest productivity for dry biomass of 2.59 g L⁻¹ with productivity of 0.129 g L⁻¹ d⁻¹. In the second experiment, after 20 days of cultivation of *C. vulgaris*, the highest biomass production corresponding to an average of 2.09 g L⁻¹ ± 0.06, with productivity of 0.104 g L⁻¹ d⁻¹ and the Chemical Oxygen Demand (COD) reduction was of 93.45%. The optimization of *C. vulgaris* cultivation in vinasse, yeast extracts (*S. cerevisiae*) and pH 7 was efficient and could be an alternative for dry biomass production of *C. vulgaris* for bioenergy.

Keywords: Yeast extract. Effluent plant sugarcane. Microalgae. Optimization. Response surface.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Percentual da produção de etanol anidro e hidratado, nas regiões brasileiras em 2016	5
Figura 2 - Participação de renováveis na matriz energética Brasileira.....	6
Figura 3 - Consumo final de energia no Brasil por fonte	6
Figura 4 - Consumo de energia nos transportes na matriz brasileira.....	7
Figura 5 - Fotomicrografia óptica de células da microalga <i>C. vulgaris</i>	10
Figura 6 - Gráfico das fases de crescimento exponencial da microalga clorófito <i>Neochloris oleoabundans</i> , durante 28 dias de cultivo	15
Figura 7 - Raceway ponds com o cultivo de microalgas	19
Figura 8 - Fotobiorreator vertical tubular em PEBD	22
Figura 9 - Localização das usinas de cana-de-açúcar e radiação fotossinteticamente ativa com média anual no Brasil	27
Figura 10 - (a) Placa petri com meio sólido hidropônico com 1% de ágar e células de <i>C. vulgaris</i> para o cultivo, (b) Frasco Erlenmeyer com meio hidropônico líquido utilizado na manutenção e produção de inóculo inicial e (c) Frasco Erlenmeyer com meio hidropônico líquido e <i>C. vulgaris</i> inoculada à 10%	31
Figura 11 - Foto demonstrativa dos tubos das amostras no experimento composto de 13 tratamentos e 4 repetições no ponto central cultivo de <i>C. vulgaris</i>	35
Figura 12 - Foto demonstrativa dos tubos na otimização do cultivo de <i>C. vulgaris</i> (a) 1º amostragem no dia zero (b) na 5º amostragem aos 20 dias	35
Figura 13 - Frascos Erlenmeyer utilizados na otimização do cultivo de <i>C. vulgaris</i> com 60% do meio de sais hidropônicos, 40% vinhaça, 30 mg L ⁻¹ de extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> em pH 7.0 e inóculo cultivado com sais hidropônicos em pH 7	37
Figura 14 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em 20 dias de cultivo.....	44
Figura 15 - Superfície de resposta para variável biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> g L ⁻¹ em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> fixo em 30 mg L ⁻¹ e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i>	45

Figura 16 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre densidade óptica <i>C. vulgaris</i> em 670 (Abs) nm em 20 dias de cultivo	47
Figura 17 - Superfície de resposta densidade óptica de <i>C. vulgaris</i> em (Abs) 670 nm em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> fixo em 30 mg L ⁻¹ e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 18 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a condutividade elétrica final da <i>C. vulgaris</i> , em 20 dias de cultivo.....	50
Figura 19 - Superfície de resposta da condutividade elétrica do meio de cultivo, (a) extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> fixo em 30 mg L ⁻¹ , variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> . Avaliação após 20 dias de cultivo da <i>C. vulgaris</i>	51
Figura 20 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a diferença da condutividade elétrica da <i>C. vulgaris</i> em 20 dias de cultivo	52
Figura 21 - Superfície de resposta para diferença da condutividade elétrica (μS/cm ⁻¹ a 20°C) em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> fixo em 30 mg L ⁻¹ , variação no pH e concentração da vinhaça, (b) variação do pH e do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> na concentração de 40% de vinhaça	53
Figura 22 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre o pH final em 20 dias de cultivo	54
Figura 23 - Superfície de resposta pH final em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> fixo em 30 mg L ⁻¹ e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i>	55
Figura 24 - Parâmetros desejáveis para pontos ótimos na produção de biomassa seca de <i>C. vulgaris</i>	56
Figura 25 - Consumo de macro e micronutrientes em mg L ⁻¹ no cultivo da <i>C. vulgaris</i> no experimento de otimização	58

Figura 26 - Consumo de Potássio (K) mg L ⁻¹ no cultivo da <i>C. vulgaris</i> no experimento de otimização	58
Figura 27 - Biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> (g L ⁻¹) em 20 dias de cultivo	59
Figura 28 - Densidade óptica (Abs _{670nm}) da <i>C. vulgaris</i> em 20 dias de cultivo	61
Figura 29 - Número de células de <i>C. vulgaris</i> , contagem a cada 5 dias durante 20 dias de cultivo	62
Figura 30 - Fotomicrografia óptica das células <i>C. vulgaris</i> no vigésimo dia, em meio de cultivo otimizado nas concentrações de 40% de vinhaça, 30 mg L ⁻¹ de extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> em pH 7,0 utilizando um microscópio óptico marca ZEISS modelo AX10 nas objetivas (a) de 20X e (b) 50X	63
Figura 31 - Condutividade elétrica (μS/cm ⁻¹ a 20°C) do meio em durante 20 dias de cultivo da <i>C. vulgaris</i>	67
Figura 32 - Valores de pH do meio durante 20 dias de cultivo da <i>C. vulgaris</i>	68
Figura 33 - Proteínas transportadoras, sistema simporte	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características das diferentes formas de metabolismo das microalgas	12
Tabela 2	- Principais características de cada fase da curva de crescimento exponencial em cultivos de microalgas em sistemas de “batelada” (estanque).....	14
Tabela 3	- Comparação entre fontes de matérias primas para produção de biodiesel	16
Tabela 4	- Teor de lipídeos por biomassa seca em várias estirpes de microalgas	17
Tabela 5	- Condições de crescimento em cepas típicas de microalgas cultivadas em sistemas abertos	20
Tabela 6	- Vantagens e desvantagens dos Raceway ponds	20
Tabela 7	- Características da vinhaça resultante do mosto de melão, caldo de cana de açúcar e do mosto misto de caldo e melão.....	28
Tabela 8	- Planejamento fatorial Box-Behnken com 17 tratamentos.....	32
Tabela 9	- Nível dos fatores, de Vinhaça, pH e extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i> no cultivo de <i>C. vulgaris</i>	33
Tabela 10	- Parâmetros de caracterização da vinhaça de acordo com as normas	34
Tabela 11	- Caracterização físico-química da vinhaça utilizada nos dois experimentos.....	41
Tabela 12	- Caracterização química do extrato de levedura <i>S. cerevisiae</i>	42
Tabela 13	- Análise de variância ANOVA de acordo com a variável resposta biomassa seca g L ⁻¹ de <i>C. vulgaris</i>	43
Tabela 14	- Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para a densidade óptica da microalga da <i>C. vulgaris</i>	46
Tabela 15	- Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para a condutividade final da <i>C. vulgaris</i>	49
Tabela 16	- Caracterização química do meio de cultivo inicial com 40% de vinhaça 30 mg L ⁻¹ de extrato de levedura em pH 7.0, do meio no final dos 20 dias de cultivo e consumo de nutrientes pela <i>C. vulgaris</i> em 20 dias	57
Tabela 17	- Caracterização macro e micronutrientes da biomassa seca da <i>C. vulgaris</i>	58
Tabela 18	- Parâmetros de crescimento da <i>C. vulgaris</i> em 20 dias de cultivo.....	64
Tabela 19	- Resultados das análises de DQO.....	65
Tabela 20	- Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta diferença de condutividade da <i>C. vulgaris</i>	78
Tabela 21	- Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para o pH final da <i>C. vulgaris</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP	Agencia Nacional do Petróleo
B100	Biodiesel puro
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
GEE	Gases do Efeito Estufa
IEA	International Energy Agency
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
J	Joule
MAP	Mono Amônio Fosfato
MB/D	Milhões de barris por dia
RESI	Retorno de Energia Sobre Investimento
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixo
STV	Sólidos Totais Voláteis
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1	IMPORTÂNCIA DA BIOENERGIA NO BRASIL	4
3.2	MICROALGAS	8
3.2.1	Reprodução das Microalgas	9
3.2.2	Diversidade e Metabolismo da <i>Chlorella</i>	10
3.2.3	Fatores de Crescimento de Microalgas	13
3.2.4	Sistemas de Cultivos de Microalgas	17
3.2.5	Cultivos em Tanques Abertos	18
3.2.6	Cultivos em Fotobiorreatores	21
3.3	CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA	22
3.4	USINAS SUCROENERGÉTICAS	24
3.5	VINHAÇA	28
4.	METODOLOGIA	30
4.1	LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	30
4.2	MICROALGA UTILIZADA E O MEIO DE CULTIVO	30
4.3	PREPARAÇÃO DO INÓCULO	30
4.4	AMBIENTE DE CULTIVO INICIAL DO INÓCULO	31
4.5	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE MICROALGA EM VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA <i>S. CEREVISIAE</i>	32
4.6	ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	35
4.6.1	Densidade Óptica	36
4.6.2	Contagem de Células	36
4.6.3	pH	36
4.6.4	Condutividade Elétrica	36
4.6.5	Biomassa Seca	36

4.7	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE CULTIVO	37
4.8	ANÁLISE DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO NO CULTIVO DA <i>C. VULGARIS</i>	38
4.9	TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES	38
5.0	PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA.....	39
5.1	CÁLCULOS PARA TAXA DE CRESCIMENTO	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DE FÍSICO-QUÍMICA E MACRO E MICRONUTRIENTES DA VINHAÇA E DO EXTRATO DE LEVEDURA <i>S. CEREVISIAE</i>	41
5.2	BIOMASSA SECA <i>C. VULGARIS</i>	43
5.3	DENSIDADE ÓPTICA <i>C. VULGARIS</i>	46
5.4	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO MEIO DE CULTIVO DA <i>C. VULGARIS</i>	49
5.5	PH FINAL DO MEIO DE CULTIVO DA <i>C. VULGARIS</i>	54
5.6	OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL	57
5.6.1	Caracterização de Macro e Micronutrientes do Meio de Cultivo Inicial e do Meio de Cultivo Final no cultivo da <i>C. vulgaris</i> em 20 dias	57
5.6.2	Produção de Biomassa Seca	59
5.6.3	Densidade Óptica <i>C. vulgaris</i> ($Abs_{670\text{ nm}}$).....	61
5.6.4	Contagem de Célula <i>C. vulgaris</i>	62
5.6.5	Demanda Química de Oxigênio no Cultivo de <i>C. vulgaris</i>	65
5.6.6	Condutividade Elétrica	67
5.6.7	pH da <i>C. vulgaris</i>	68
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ANEXO I	78
	ANEXO II	80

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento tecnológico crescente dos países juntamente com o crescimento populacional, tem elevado a demanda por produtos e serviços relacionados as atividades industriais, o que tem resultado na grande produção de resíduos e a expansão significativa na exploração e utilização de fontes de energias de origens fósseis e renováveis. As projeções do U. S. Energy Information Administration (EIA), indicam que o consumo mundial total de energia comercializada aumentará em torno de 48% entre 2016 e 2040, e o consumo de petróleo aumentará de 90 milhões de barris por dia (mb/d) aproximadamente 14.3 bilhões litros de petróleo em 2014 para 104 mb/d aproximadamente 16.5 bilhões de litros de petróleo em 2040, prevendo um crescimento maior da demanda global neste período, a produção mundial total passará para 120 mb/d aproximadamente 19.0 bilhões de litros de petróleo em 2040 (IEA 2016).

Um dos principais problemas na atualidade está relacionado ao aumento na demanda por energia que causam impactos ambientais pelo aproveitamento dos combustíveis de origens fósseis como o gásóleo, devido a liberação de emissões dos gases para a atmosfera, principalmente o dióxido de carbono. Neste contexto, há preocupação política e ambiental em substituir a matriz energética fóssil devido as emissões desses gases poluentes e também devido a redução da disponibilidade dos combustíveis fósseis ao longo dos anos (ANTUNES; SILVA, 2010).

O Brasil é um exemplo na produção de biocombustíveis em larga escala, sendo o segundo maior produtor de etanol no mundo. A utilização de etanol de cana-de-açúcar como biocombustível, no entanto, gera grande quantidade de efluentes, para cada litro de etanol produzido, são gerados em média 13 litros de vinhaça (UNICA, 2007; IEA 2016).

A vinhaça é um líquido castanho escuro que tem alta turbidez, alto teor de matéria orgânica e nutrientes minerais, alta demanda bioquímica de oxigênio e pH ácido. Este resíduo pode ser tóxico se descartado inadequadamente. Possui um potencial de contaminação cerca de cem vezes maior do que o esgoto doméstico. Seu descarte em ambientes aquáticos é nocivo para os microrganismos e para a fauna em geral (CETESB, 2015; SILVA *et al.* 2007).

Por ser rica em nutrientes, a vinhaça é utilizada no solo em áreas de cultivo da cana-de-açúcar, de acordo com limites impostos pela legislação. Entretanto, o pH ácido, a alta condutividade elétrica e os elementos químicos presentes na vinhaça da cana-de-açúcar podem causar alterações nas propriedades físico-químicas dos solos, rios e lagos com descargas frequentes durante um longo período de tempo, têm efeitos adversos sobre os solos agrícolas e a biota em geral (CHRISTOFOLETTI, *et al.*, 2013).

Segundo o último relatório publicado pela IEA Algae Bioenergy uma das alternativas para a produção de biomassa de microalgas utilizadas para a geração de biocombustíveis é o aproveitamento de efluentes líquidos industriais, bem como a vinhaça da cana de açúcar (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017).

As microalgas se destacam como um grupo importante, com característica de crescimento rápido e grande produção de biomassa, a qual possui compostos específicos, alguns altamente energéticos. Além da produção da biomassa, o cultivo das microalgas não compete com a agricultura, pois independe de solos férteis (ANDRADE *et al.*, 2014)

No geral, as estirpes de microalgas necessitam em seu crescimento meios rico em nutrientes, apesar de a vinhaça ser promissora para tal finalidade, seu pH ácido necessita ser ajustado e a alta turbidez requer estirpes de microalgas adaptadas as condições adversas com metabolismo mixotrófico. A *Chlorella vulgaris* é uma espécie presente em ambientes de águas continentais doces e salobras, pertence as microalgas verdes unicelulares do filo: *Chlorophyta*, gênero: *Chlorella* e espécie: *C. vulgaris* apresenta formato esférico, com tamanho de cerca de 2 a 10 µm e não possui flagelo. Contêm pigmentos fotossintetizantes como a clorofila a e clorofila b em seu cloroplasto e possui um teor de lipídeos em média de 14-22% por peso seco (ANDRADE *et al.*, 2014; CANDIDO, LOMBARDI, LIMA, 2015; CANDIDO, LOMBARDI 2017).

A *C. vulgaris*, utilizada neste estudo, é facilmente encontrada em diversos ambientes, é uma microalga resistente, se adapta fácil em cultivos aberto e fechado, que consegue se desenvolver nas condições físico-químicas da vinhaça (MARCHELLO *et al.*, 2015; CANDIDO, LOMBARDI, LIMA, 2015; CANDIDO, LOMBARDI, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em meio de sais nutrientes hidropônicos com diferentes concentrações de vinhaça, extrato de levedura de *Saccharomyces cerevisiae* e pH.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar os efeitos das concentrações de vinhaça, extrato de levedura e pHs no crescimento da microalga *C. vulgaris*. Utilizar o planejamento box-behnken para ajustar as variáveis de concentrações de vinhaça e extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH para obtenção de biomassa *C. vulgaris*. Otimizar o cultivo dessa microalga em escala de laboratório, considerando as variáveis com melhor resultado na produção de biomassa seca, obtidas com a metodologia do planejamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA DA BIOENERGIA NO BRASIL.

Os biocombustíveis continuam sendo uma das poucas opções possíveis para reduzir a dependência do mundo da utilização dos combustíveis fósseis para o transporte. No entanto, apesar de possuírem muitos recursos atraentes, também têm suas limitações, principalmente no custo de produção, e sua viabilidade depende diretamente do preço do petróleo. Outros obstáculos ligados à produção dos biocombustíveis são a disponibilidade e a concorrência por terras férteis para a produção de matéria prima. É neste contexto que as microalgas vêm sendo muito estudadas, pois podem ser produzidas em terras não agricultáveis aráveis e necessitam de menor área se comparado com culturas oleaginosas como exemplo a soja (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017).

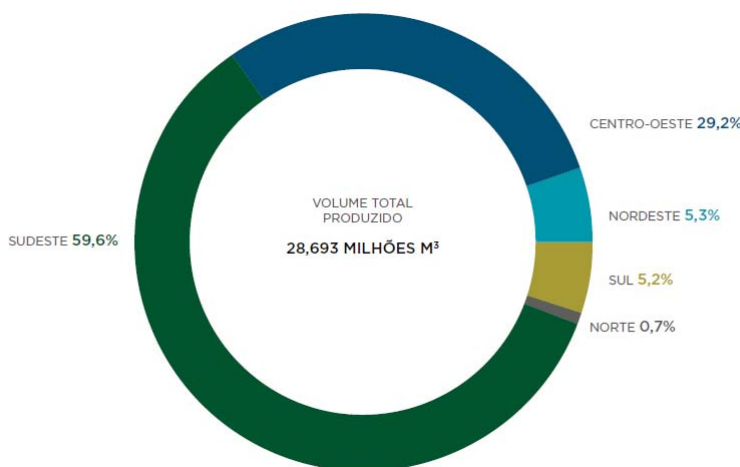
As microalgas são consideradas uma fonte promissora de matéria prima para produção de bioenergia, isso devido a eficiência metabólica em acumular lipídeos compatíveis aos utilizados na produção de biodiesel, além de possuir carboidratos para produção de etanol, também compõe sua parede celular a celulose e hemicelulose, que podem ser utilizadas para produção de etanol de segunda geração, além de outras fontes de bioenergia como o biohidrogênio e biogás (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017; RICHMOND, 2014, UGGETT *et al.*, 2016; DUTTA, NETO, COELHO, 2016).

O Brasil possui um dos mais bem-sucedidos programas de produção de biocombustíveis em larga escala no mundo. Em 1975, como resposta à crise do petróleo de 1973, os investimentos maciços do governo no Programa Nacional de Combustíveis de Álcool (ProÁlcool) promoveram e impulsionaram o uso de etanol de cana-de-açúcar como biocombustível para veículos em substituição aos combustíveis fósseis, principalmente a gasolina. Porém com a nova queda no preço do petróleo, na década de 1990 o etanol passou a não ser competitivo com o preço da gasolina, que só veio a se firmar depois dos anos 2000 com o novo aumento no preço do petróleo e programas de incentivo do governo federal, como a criação de veículos flex (UNICA, 2007).

A produção total de etanol no Brasil em 2016 caiu 6,5%, totalizando 28.6 bilhões de litros (Figura 1). Porém estudos indicam que, assim que a tecnologia de

produção do etanol lignocelulósico for totalmente dominada, a produção de etanol no Brasil pode vir a aumentar a produção sem necessitar a ampliar a área de plantio, elevando consequentemente a geração de vinhaça, que pode vir a ser tornar um problema ambiental no futuro (SANTOS *et al.*, 2012; BEM, 2016).

Figura 1 - Percentual da produção de etanol anidro e hidratado, nas regiões brasileiras em 2016.

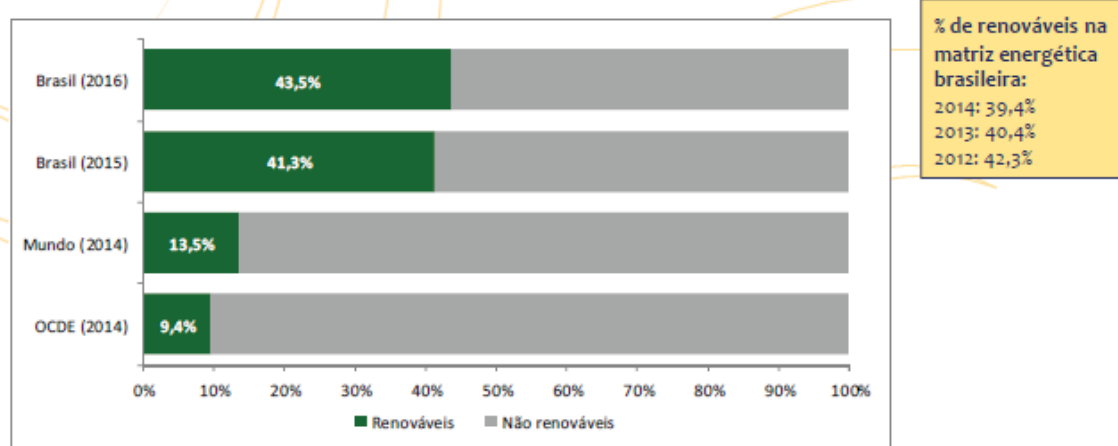


Fonte: ANP, 2017

Em 2005 o Brasil adicionou em 2% de biodiesel ao diesel mineral na matriz energética com as condições de mercado e a produção regulamentadas pela Lei nº.11097, de 13 de janeiro de 2005 onde se estabeleceu um aumento na porcentagem do biodiesel ao longo dos anos (BRASIL, 2005). Dia 23 de março de 2016 foi sancionada a lei 13.263 que modificou o percentual mandatório de biodiesel adicionado ao diesel mineral comercializado para 8% em 2016, 9% em 2017 e 10% em 2018 após a data de promulgação desta Lei, respectivamente (BRASIL, 2016).

A participação Brasileira na utilização de energias renováveis na Matriz Energética em 2015 se manteve entre as mais elevadas do mundo (Figura 2). Entre as fontes renováveis 17,5% são da biomassa da cana-de-açúcar, 12,6 % de fontes hidráulica (Hidrelétricas), 8,0% de lenha e carvão vegetal, e 5,4% de lixo e outras fontes renováveis como eólica. Entre as fontes fósseis 36,5% é de origem do petróleo e seus derivados, 12,3% gás natural, 5,5% carvão mineral. O urânio 1,5% e outras fontes não renováveis somam 0,7% (EPE, 2017).

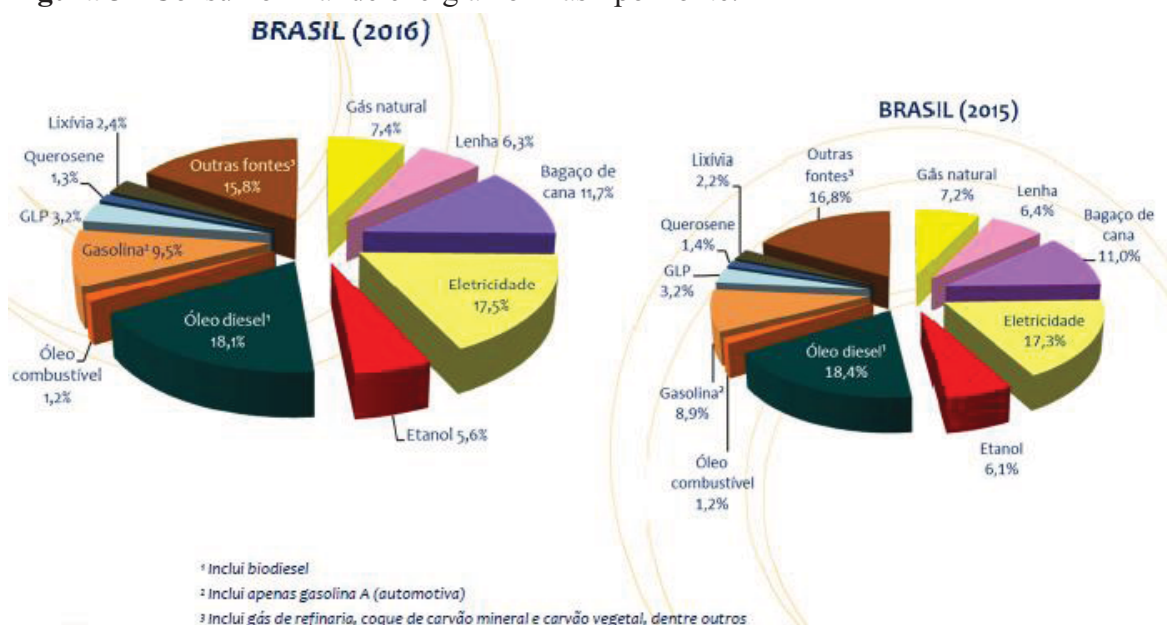
Figura 2 - Participação de renováveis na matriz energética Brasileira.



Fonte: EPE; Agência Internacional de Energia, 2017.

O Brasil é um dos poucos países que possuem uma matriz elétrica de origem predominantemente renovável, a produção de energia hidráulica responde a 55,6% da oferta interna. Já as fontes renováveis representam 81,7% do mercado interna de eletricidade no Brasil, que é a derivada da soma dos montantes referentes à geração nacional somando as importações, que são essencialmente de fontes renováveis (Figura 3) (BEN, 2017)

Figura 3 - Consumo final de energia no Brasil por fonte.

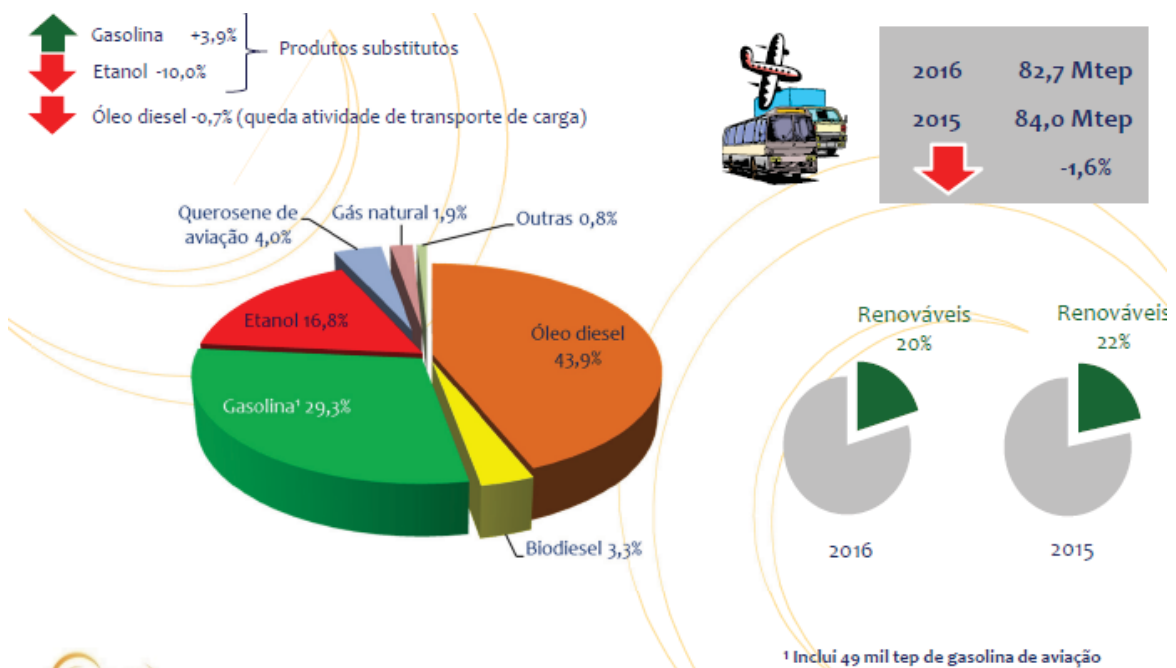


Fonte: BEN, 2017.

Já a produção de energia elétrica a partir das fontes não renováveis em 2016 representou 19,6% do total nacional. Também compõe o setor a geração de autoprodutores que em 2016 integrou ao sistema 17,0% do total produzido. Esse sistema de autoprodução integra as mais diversas instalações industriais, que produzem energia para consumo próprio, exemplos: os setores como indústrias de Usinas Sucoenergéticas, Indústrias de Celulose, Siderurgia, entre outros (BEN, 2017).

O consumo de energia por setor, na sociedade Brasileira, está dividido em setores, sendo 33,0% para o consumo Industrial, 9,7% o residencial, 10,3% para os setores energéticos como petrolíferas, 4,0% do agronegócio, 32,4% o dos transportes entre outros setores não energéticos 5,8%. O consumo de combustíveis e bicompostíveis na produção industrial, o transporte de carga e a mobilidade das pessoas correspondem por aproximadamente 65% do consumo de energia no país (Figura 3) (EPE, 2017).

Figura 4 - Consumo de energia nos transportes na matriz brasileira.



Fonte: BEN, 2017.

A produção de petróleo no Brasil cresceu 3% em 2016, obtendo uma média de 2,52 mb/d (BEN, 2017). Devido a redução do preço ao aumento na produção do petróleo, as perspectivas para a produção comercial de biocombustíveis estão mais desafiadoras. Como consequência da redução do preço do petróleo bruto, os desafios

econômicos para produção de biocombustíveis à base de microalgas aumentaram consideravelmente, sendo necessário buscar alternativas que reduzam o preço da produção da biomassa microalgal (LAURENS, CHEN-GLASSER, 2017).

3.2 MICROALGAS

O termo algas não possui uma posição taxonômica formal; no entanto, é rotineiramente usado para indicar um grupo polifilético (isto é, inclui organismos que não compartilham uma origem comum, mas seguem linhas evolutivas múltiplas e independentes), de organização não coesa e artificial de organismos evolutivos, fotossintéticos de O₂ (com várias exceções de membros incolores, sem dúvida, relacionadas com formas pigmentadas) (BARSANTI, GUALTIERI, 2014).

As algas formam um grupo de organismos de grande diversidade morfofisiológica e genética, incluindo os indivíduos microscópicos e macroscópicos. Entre as algas, microalgas e as plantas superiores terrestre existem alguns aspectos e semelhanças, porém, algumas características são bem distintas entre esses grupos como, por exemplo, a ausência de tecidos vasculares nas algas e microalgas (ANDRADE, *et al.*, 2014, BARSANTI E GUALTIERI, 2014).

Assim as algas macroscópicas e as microalgas são consideradas organismos relativamente simples, por não possuírem (raízes, caules e folhas) típicos de plantas superiores terrestres. Muitas espécies que são encontradas em água doce, água salgada, no solo e também em associação com plantas, apresentam paredes celulares que são formadas por carboidratos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A estrutura principal das microalgas é definida de talo e sua morfologia é diversificada, podendo ser unicelular, cenobial, colonial, filamentoso e sifonoso. Conforme a espécie da microalga, o diâmetro do talo unicelular pode variar de 0,2 µm a 2,0 µm, já as que apresentam talo na conformação colonial podem ser classificadas como um conjunto bem organizado de células individuais que são levemente unidas, não existindo divisão de trabalho entre as células ou número pré-determinado de células (BARSANTI E GUALTIERI, 2014).

3.2.1 Reprodução das Microalgas

A reprodução das microalgas é bastante diversificada e podendo ocorrer de forma vegetativa, assexuada e sexuada. Primariamente acontece a divisão de células vegetativas (assexuadas), ainda que a reprodução sexuada possa ocorrer em várias espécies quando estão em condições favoráveis para a replicação celular. A condição mais simples de reprodução é assexuada também denominada fissão binária, ocorre na maioria das microalgas unicelulares, duplicando seu material genético e dando origem a duas células vegetativas idênticas. Estas duas células-filhas vão originar quatro células iguais e assim por diante (ANDRADE, *et al.*, 2014).

Reprodução assexuada por esporos podem ser gerados a partir de células vegetativas, de células específicas ou, por estruturas denominadas esporângios. Estes acinetos são esporos originados da diferenciação de uma célula vegetativa, cheios de substâncias de reserva e com parede espessada, podendo sobreviver assim durante anos, até que haja novamente uma situação favorável para seu desenvolvimento reestabelecer na sua forma vegetativa (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

A reprodução assexuada via fragmentação, acontece normalmente em espécies filamentosas e nas espécies que formam colônias cenobiais. O talo da microalga se quebra e, por mitose, cada fragmento reproduz suas células, originando novos talos idênticos, dando início a novas células. Nesse tipo de reprodução também pode ocorrer também em união de vários fragmentos e a formação de novos indivíduos (ANDRADE, *et al.*, 2014).

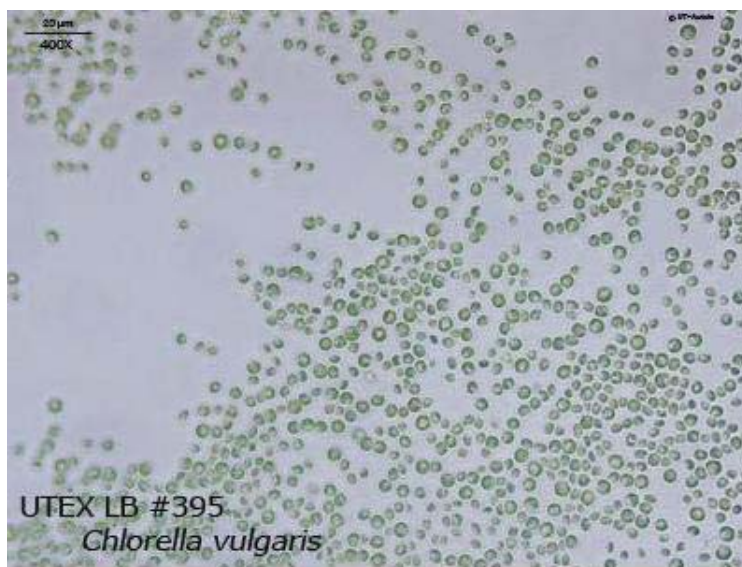
Há também a reprodução sexuada, que pode estar presente em muitas espécies de microalgas e permitindo a troca do material genético, o que mantém a variabilidade genética dentro da população. A reprodução sexuada em microalgas compreende uma etapa com diferentes estágios que formam o ciclo de vida sexuado, incluindo a formação e a fusão dos gametas (TOMASELLI, 2014).

Este tipo de reprodução pode elevar a sobrevivências das espécies e, portanto, o sucesso evolucionário. Os gametas podem ser morfológicamente iguais às células vegetativas ou distintos do material de origem, dependendo do grupo ao qual pertence a microalga, e bem como é possível a combinação de diferentes tipos de gametas (ANDRADE *et al.*, 2014).

3.2.2 Diversidade e Metabolismo da *Chlorella*

A diversidade das microalgas é muito ampla, entretanto nesta revisão da dissertação será destacado apenas a *C. vulgaris* (Figura 5) que é uma espécie presente em ambientes de águas continentais (doces e salobras), gênero pertence de microalgas verdes unicelulares do filo: *Chlorophyta*, gênero: *Chlorella* e espécie: *C. vulgaris* apresenta formato esférico, com tamanho de cerca de 2 a 10 μm e não possui flagelo. Contem pigmentos fotossintetizantes como a clorofila *a* e clorofila *b* em seu cloroplasto e possui um teor de lipídeos em média de 14-22% por peso seco (ANDRADE *et al.*, 2014).

Figura 5 - Fotomicrografia óptica de células da microalga *C. vulgaris*.



Fonte: <https://utex.org/products/utex-0395>

As *Chlorophyta* são microalgas eucariontes encontradas em vários ambientes. A morfologia do talo das clorófitas é bastante diversificada sendo possível observar três tipos de talos predominantes: unicelular, filamentosos e colonial, pode-se observar que as células são de coloração verde, variando de unicelulares a colonial e as formas de ovaladas a falcadas. As microalgas clorófitas possuem em suas células, acondicionados no interior de seus plastídios com duas membranas, os pigmentos

fotossintetizantes clorofila *a* e clorofila *b* e o produto de reserva na forma de amido (ANDRADE, *et al.*, 2014; BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

A célula de *Chlorella* em geral é esférica, elipsoidal ou ovoide, mas também pode ser reniforme ou um pouco assimétrica. A parede celular é bem distinta, porém delgada. O cloroplastídeo, normalmente é único, com a forma de taça e raramente ocorre em número de dois, nesses casos, cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. Pirenoide que é uma massa fundamentalmente proteica, incolor, que se observa no estroma dos plastos de muitas algas nem sempre presente na *Chlorella* (ANDRADE, *et al.*, 2014)

As microalgas podem ser classificadas de acordo com a forma de obter energia pela célula, podendo ser: autotróficas, heterotróficas, mixotróficas ou fotoheterotróficas (GROBBELAAR, 2004).

Sua capacidade fotossintética elevada possibilita a formação de biomassa em curto espaço de tempo, o cultivo de microalgas pode colaborar com a fixação de CO₂ residual visto que para cada 1 kg de biomassa microalga são metabolizados em média 1,83 kg de CO₂. (ARANDA, 2012; KAJIWARA S., YAMADA H., NARUMASA, 1997), esse contexto é fundamental para o desenvolvimento de tecnologias voltadas à produção de bioenergia à base da biomassa de microalgas que pode vir a substituir quantidades significativas de energia fósseis. A partir da atividade fotossintética, as microalgas produzem açúcares que são convertidos em todos os outros componentes celulares como lipídios, carboidratos e proteínas que compõem a massa celular das microalgas (LAURENS, CHEN-GLASSER, 2017).

As microalgas fotoautotróficas necessitam em seu desenvolvimento de uma fonte de luz, macronutrientes como (C, N, O, P, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Co, Cu, Zn, Se e B), além da adição ao meio de cultura de vitaminas ou substâncias específicas que algumas culturas necessitam, entre tanto os nutrientes limitantes para o crescimento das microalgas são: N e P, embora o C seja apontado como o um dos elementos mais importante (GROBBELAAR, 2004).

Já as culturas de microalgas heterotróficas, realizam a oxidação de compostos orgânicos externos como: glicerol, glicose e acetato como fonte de carbono para obter energia, não havendo a necessidade obrigatória de fonte de energia luminosa. O cultivo heterotrófico necessita de menor área para instalação se comparado ao cultivo

fotoautotrófico e, em geral, as espécies de microalgas que possuem esse metabolismo apresentam produtividade elevada de biomassa. O problema para o cultivo de microalgas heterotrófico está na dependência de fontes de nutrientes externo de carbono orgânico, o que pode vir a encarecer o sistema além do elevado consumo de O₂ no processo (ANDRADE *et al.*; 2014).

Outro metabolismo é o mixotrófico isso é a capacidade de realizar a fotossíntese e também oxidar fontes de carbono com ou sem luz, por exemplo, a *C. vulgaris* que possui a capacidade tanto de ser fototrófica quanto heterotrófica. Já as espécies fotoheterotróficas, precisam de luz necessariamente para que ocorra a oxidação dos compostos orgânicos, na Tabela 1 podemos ver as características das diferentes formas de metabolismo das microalgas (TOMASELLI, 2004).

Tabela 1 - Características das diferentes formas de metabolismo das microalgas.

Metabolismo	Fonte de Energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou orgânico
Fotoheterotrófico	Luz	Orgânico

Fonte: Modificado Grobbelaar (2014).

A produção heterotrófica de microalgas é uma tecnologia bem estabelecida e já é comercializada, isso graças ao alto teor de concentração de lipídios das microalgas cultivadas nesses sistemas, junto ao seu potencial de manipulação bioquímico. Porém há desafios econômicos na adaptação dessa tecnologia para ser aplicada na produção de biocombustíveis, pois requerem insumos caros e fornecimento de O₂ no cultivo. Mesmo assim, muitas empresas já produzem comercialmente óleos de microalga heterotróficos para aplicações de produtos de maior valor agregado como alimentos, nutracêuticos, lubrificante entre outros (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017).

3.2.3 Fatores de Crescimento de Microalgas

O desenvolvimento das microalgas pode variar de estirpe para estirpe de acordo com às condições do meio de cultivo, desta forma deve-se direcionar a produção de determinados compostos tendo em vista as características da estirpe a ser cultivada. A taxa de crescimento das microalgas pode variar dependendo de fatores físicos, químicos e biológicos, entre os fatores, o biológico incluem taxas metabólicas da estirpe cultivada e a interferência de microrganismos contaminantes; já entre os fatores físicos e químicos, estão a disponibilidade de nutrientes, luz, temperatura e o pH (RICHMOND, 2014; LOURENÇO, 2006).

O crescimento celular e composição bioquímica das estirpes cultivadas estão diretamente relacionados ao meio de cultivo, sendo os elementos químicos mais relevantes: carbono, nitrogênio, fosfato, sais de magnésio, potássio e cálcio entre micronutrientes como manganês e cobalto e as fontes de carbono como os carboidratos ou CO₂. O crescimento fotoautotrófico das microalgas é dependente de fonte de carbono, pode estar está na forma de CO₂ (RICHMOND, 2004).

As fases do crescimento das microalgas apresentam etapas diferentes e estão descritas na Tabela 2, e podem variar de acordo com os nutrientes utilizados nos meios de cultivos, pH, luminosidade e a temperatura. A taxa de crescimento é o parâmetro mais aplicado para calcular a alteração no número ou massa celular por unidade de tempo. A curva exponencial do crescimento das microalgas é dividida em geral em cinco fases:

- a) Lag, onde ocorre a adaptação ou a indução de crescimento;
- b) Log ou de crescimento exponencial;
- c) Fase de redução de crescimento ou transição;
- d) Estacionária de crescimento;
- e) Fase de declínio ou morte celular devido à limitação de substrato ou produção e acúmulo de metabólitos tóxicos.

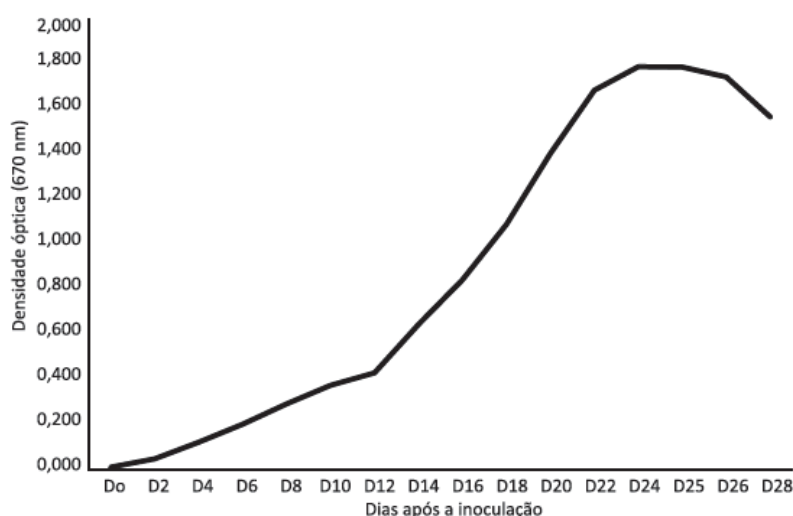
Tabela 2 - Principais características de cada fase da curva de crescimento exponencial em cultivos de microalgas em sistemas de “batelada” (estanque).

Fases de crescimento	Características
Lag ou de adaptação	<ul style="list-style-type: none"> - Intensa atividade metabólica, principalmente a síntese de DNA e enzimas; - Aumento na biomassa, com pequenas variações na densidade e no volume celular.
Log ou de crescimento exponencial	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da taxa de crescimento atinge valor constante; - Maior atividade metabólica; - Excreção de compostos orgânicos no meio de cultivo; - Duração variável, de acordo com a disponibilidade de nutrientes essenciais.
Redução de crescimento ou transição	<ul style="list-style-type: none"> - Redução relativa na taxa de crescimento; - Grande volume de biomassa; - Estado fisiológico da população menos favorável ao crescimento; - Pode ser difícil de ser detectada devido à semelhança com suas fases adjacentes.
Estacionária ou equilíbrio	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição da velocidade de crescimento: a taxa de crescimento se torna estável e mais baixa; - O número de morte celular é equivalente ao de células novas; - Grande volume de biomassa e excreção de metabólitos; - Geralmente é a fase mais longa de crescimento microbiano.
Declínio ou morte celular	<ul style="list-style-type: none"> - Morte das células; - Taxa negativa de crescimento, isto é, o número de células mortas excede o de células novas; - Presença de autoinibidores de crescimento; - Duração variável e altamente dependente da estirpe.

Fonte: Modificado de Andrade *et al.*, 2014; Richmond, 2004.

A Figura 6 mostra um exemplo de uma curva exponencial de crescimento da microalga *Neochloris oleoabundans*, durante 28 dias de cultivo em sistema fechado com agitação, temperatura controlada em $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h claro/escuro.

Figura 6 - Gráfico das fases de crescimento exponencial da microalga clorófita *Neochloris oleoabundans*, durante 28 dias de cultivo.



Fonte: Andrade *et al.*, 2014.

A atividade fotossintética das microalgas, corresponde por mais de 50% da fotossíntese global, por meio de reações de redução e oxidação converter a energia da radiação fotossinteticamente ativa em energia biologicamente aproveitável. O ideal para desenvolvimento no cultivo de microalgas, é uma taxa máxima equivalente à taxa máxima da fotossíntese (ANDRADE *et al.*, 2014).

A irradiância na superfície da Terra é, em média, de aproximadamente 1000 Wm^{-2} ($1 \text{ Wm}^{-2} = 4,5 \mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), sendo que aproximadamente 8% representa o feixe de luz UV (300-400 nm), 41% à luz visível (400-700 nm) e 51% à luz infravermelha (700-4000 nm). Porém, somente a faixa de luz visível equivale à radiação fotossinteticamente ativa, aquela capaz de excitar os elétrons das moléculas e assim proporciona a realização de fotossíntese, que é o meio básico para o fornecimento de energia das microalgas (ANDRADE *et al.*, 2014).

As microalgas não produzem estruturas elaboradas como a seiva ou estruturas reprodutivas (fruto e sementes) como as plantas oleaginosas terrestre, elas dedicam sua energia à captura e conversão da energia luminosa e CO_2 em massa celular. Portanto, estima-se que a produção de microalgas requer menor área de terra por unidade de óleo produzida em comparação com matérias-primas terrestres, como soja, colza, amendoim entre outras culturas, isso mesmo que as condições de crescimento não sejam

otimizadas para aumentar o teor de lipídios das microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

A eficiência em concentrar lipídeos na biomassa como matéria prima de biocombustíveis, calculada através da capacidade fotossintética de absorção da energia solar, é maior nas microalgas que pode metabolizar de 3% a 8% do que nas culturas oleaginosas terrestres que expressam desempenho de aproximadamente 0,5%. A produtividade de lipídeos das microalgas é cerca de 8 a 20 vezes superior à produtividade de lipídeos das culturas energéticas terrestres (CHISTI, 2007; LARDON *et al.*, 2009; RAMALHO, 2013).

As propriedades físico-químicas dos lipídeos extraídos das microalgas são análogas aos das plantas superiores oleaginosas terrestres, assim os óleos extraídos de microalgas são apontados como matéria-prima com potencial para a produção de biodiesel (FRANCO *et al.*, 2013).

Em relação as culturas energéticas terrestres, as microalgas as necessitam de menos hectares de terra por produção, isto por apresentarem uma maior eficiência por unidade de área comparada às culturas energéticas terrestres podendo ser cultiváveis em fotobiorreatores fechados e em tanques/lagoas abertas (Tabela 3). Assim o cultivo de microalgas pode não ocasionar alterações diretas e indiretas significativas do emprego do solo, isso por que não há a necessidade de se retirar ou de se introduzir nutrientes diretamente ao solo (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017; RAMALHO, 2013).

Tabela 3 - Comparação entre fontes de matérias primas para produção de biodiesel.

Cultura	Produção de óleo (L ha⁻¹)
Soja	446
Milho	172
Colza	1.190
Coco	2.689
Óleo de palma	5.950
Microalgas (70% lipídeo/peso seco)	136.900
Microalgas (30% lipídeo/peso seco)	58.700

Fonte: Modificado Antunes e Silva, 2010.

Algumas estirpes de microalgas podem apresentar desenvolvimento rápido e o seu teor de lipídeos pode variar entre 4% e algumas estirpes podem superar

80% do seu peso seco. As culturas de microalgas diferenciam significativamente em relação ao teor de óleo, como mostra a Tabela 4 com o teor de lipídeos em espécies de microalgas (Tabela 4) (BRENNAN, OWENDE, 2010).

Tabela 4 - Teor de lipídeos por biomassa seca em várias estirpes de microalgas.

Espécies	Teor de lipídeos (% peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–80
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	21
<i>Chlorella emersonii</i>	28–32
<i>Chlorella protothecoides</i>	57,9
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	46,7
<i>Chlorella vulgaris</i>	14–22
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Dunaliella salina</i>	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	35,6
<i>Euglena gracilis</i>	14–20
<i>Hormidium sp.</i>	38
<i>Isochrysis sp.</i>	25–33
<i>Neochloris oleoabundans</i>	19–47

Fonte: Modificado de Singh *et al.*, 2012. Silva *et al.*, 2016.

A produção de bioenergia a partir de matéria prima sem a utilização de grandes áreas de terras aráveis ou que reduzem a exploração de florestas tropicais, melhora significativamente a viabilidade social e ecológica desta alternativa. É neste contexto que as rotas baseadas na produção de biocombustíveis com a biomassa de microalgas produzidas aproveitando efluentes líquidos e gasosos de industriais pode vir a contribuir no Brasil e no Mundo (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017).

3.2.4 Sistemas de Cultivos de Microalgas

Com o domínio das técnicas de isolamento e composição do meio de cultivo das microalgas, os métodos para os cultivos de microalgas em escala comercial, começaram a serem desenvolvidos em 1940, estes procedimentos iniciaram de forma independente em países como Alemanha, Estados Unidos e Japão. Praticamente todas as

pesquisas da época aplicavam uma microalga bastante popular entre os pesquisadores, a *Chlorella*, isso devido as características rústicas e de fácil cultivo, sendo cultivada em dois tipos básicos de sistemas: de forma aberta em lagoas e fechado em fotobiorreatores (LOURENÇO, 2006).

3.2.5 Cultivos em Tanques Abertos

A técnica do cultivo em lagoas ou tanques tipo *raceway ponds* aberto é de forma geral possui menor custo quando comparado com os métodos de cultivo em fotobiorreatores fechados, porém o número de estirpes de microalgas que suportam o crescimento neste sistema é limitado. Outro fator que implica no cultivo comercial aberto é a limitação das zonas tropicais e subtropicais. Embora a maior parte das estirpes de microalgas necessitem de uma fonte de luz e dióxido de carbono, elas são bastantes diferentes nos requisitos ambientais (BOROWITZKA, 2005).

A maioria dos sistemas lagoas ou tanques tipo *raceway ponds* abertos necessitam de um sistema de eficiente de homogeneização, um exemplo muito utilizado são as pás giratórias, o cultivo deve ser misturado movimentando as microalgas da parte inferior do tanque para parte superior, maximizando a quantidade de luz que as células recebem (RICHMOND, 2004).

Apesar do cultivo tipo *raceway ponds* (Figura 7) ser de menor custo do que os em fotobiorreatores, o retorno do investimento para produção de bioenergia em uma unidade extensa pode variar de 10 15 anos sem mencionar os custos operacionais e o grande volume de água utilizada no processo. Assim há a necessidade de estratégias alternativas para abordar as principais barreiras de custos para que os biocombustíveis de microalgas possam alcançar todo o seu potencial, como a aplicação de efluentes ou nutrientes de baixo custo no cultivo (ROGERS *et al.*, 2014).

Figura 7 - Raceway ponds com o cultivo de microalgas.



Fonte: Borowitzka, 2005.

O tamanho das áreas para cultivar microalgas em tanques ou lagoas extensas pode variar de 1 hectare a mais de 200 hectares, com uma profundidade média de 20 a 30 cm. Os tanques tipo *raceway ponds* ou lagoas mais profundas, geralmente possuem sistema de homogeneização por aeração, e são utilizados principalmente para a produção em pequena escala, as áreas de que as lagoas ocupam neste caso é normalmente é inferior a 10 m², com profundidades de 50 cm ou mais. Embora estes sistemas estejam sujeitos a contaminação, são fáceis de operar e possuem baixo custo (BOROWITZKA, 2005).

Segundo o último relatório publicado em pela IEA em 2017, para o cultivo de microalgas voltadas a produção de biocombustíveis ser socioeconomicamente viável, a água utilizada no cultivo deve der ser de origens residuais. A vinhaça é um efluente liquido proveniente de usinas sucroenergéticas, e tem chamado atenção em vários estudos para produção de microalgas (LAURENS, CHEN-GLASSER, Mc MILLAN, 2017).

O cultivo em tanques abertos necessita de um controle em relação a microrganismos contaminantes, uma forma de controlar o cultivo é alterar o pH deixando o meio alcalino, como exemplo o cultivo de *C. vulgaris* BA050 em tanques aberto com o controle de microrganismos contaminantes utilizando o pH (~9,8) monitorado em um período de 16 dias. Através de análises de DNA das amostras do tanque, observou que

93% da população presente pertencem a *C. vulgaris*. Na Tabela 5 podemos observar as condições de crescimento das microalgas normalmente utilizadas em cultivo com sistemas abertos (BELL *et al.*, 2016).

Tabela 5 - Condições de crescimento em cepas típicas de microalgas cultivadas em sistemas abertos.

Condição da espécie	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Dunaliella salina</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
Habitat natural	Água doce	hipersalino	Água doce	lagoas alcalinas
Salinidade, ótimo (% [w/v] NaCl)	0	22% (crescimento) 35% (Carotenogênese)	0	0 até 1%
Salinidade, máxima (% [w/v] NaCl) ^a	~1%	35%	~1%	<3%
Temperatura (°C), ótima	~25	30–40	~18–22	30–38
pH ótimo	6.5–7.5	~9.0	~7.0	~9.0 (-10.0)
Meios comuns	Bolds basal	Modified Johnson's	Bolds basal	Zarrouk

Fonte: Modificado de Borowitzka, 2005.

A Assim a contaminação em tanques/lagoas abertas pode ser controlada pela manutenção do pH em estirpes de microalgas resistentes a pH básico como a *C. vulgaris* (BELL *et al.*, 2016). A Tabela 6 mostra as vantagens e desvantagens do cultivo em tanques abertos.

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens dos Raceway ponds.

Sistema de produção	Vantagens	Desvantagens
Tanques/Lagoa "raceway"	Relativamente barato	Baixa produtividade de biomassa.
	Fácil limpeza e Manutenção	Necessidade de grandes áreas.
	Utilização de terrenos não-agrícolas	Limitado à algumas espécies de microalgas
	Baixa necessidade energética	Homogeneização pobre, luminosidade e utilização de CO ₂
		Perigo de contaminação das culturas

Fonte: Modificado de Brennan e Owende, 2010.

3.2.6 Cultivos em Fotobiorreatores

Os cultivos de microalgas em fotobiorreatores fechados permitem superar a maioria das dificuldades associadas aos sistemas de cultivo em lagoas abertas. Os sistemas fechados permitem o cultivo de uma única estirpe de microalga por extensos períodos e com baixo risco de contaminação. Os fotobiorreatores podem ser produzidos em uma série de tubos de plástico ou vidro e alinhados de várias formas: horizontalmente, verticalmente, inclinado em hélice entre outras formas, o modelo vai depender da incidência da luz solar e dos custos de implantação (CHISTI, 2007).

O cultivo em fotobiorreator proporciona melhor exposição do cultivo ao ambiente principalmente a fonte de luz, pois podem ser instalados ao ar livre ou em ambientes cobertos. No caso de cultivos em locais abertos, a luz solar é aproveitada como fonte de energia no crescimento das microalgas. Já em ambientes fechados, existe a possibilidade da aplicação em casas de vegetação, cujo teto e paredes laterais são transparentes, permitindo o aproveitamento da radiação solar e aproveitamento do calor da estufa no cultivo, podendo ser auxiliada pela ação de iluminação artificial (LOURENÇO, 2006).

A circulação do meio de cultivo pode ser realizada por injeção de ar via compressor ou por motores de circulação. O controle da temperatura pode ser realizado por trocadores de calor ou por resfriamento evaporativo com aspersão de água na extensão superficial dos fotobiorreatores (ANDRADE *et al.*, 2014).

Os fotobiorreatores fechados para o cultivo de microalgas sofrem com os custos elevados de instalação e com despesas na manutenção, energia utilizada nos processos de mistura, refrigeração, insumos entre outros fatores. A medida que os sistemas abertos possuem custos reduzidos e um balanço energético mais favorável. No entanto nos sistemas abertos é impossível manter o cultivo livre de contaminação necessitando de um controle (ZITTELLI *et al.*, 2014). Nos fotobiorreatores, as metodologias que pode ser utilizada na esterilização é o uso de vapor de água que é menos custoso, e também é possível a esterilização por rota química (RICHMOND, 2004).

Para o cultivo de microalgas como matéria-prima de biocombustíveis a redução de custos é importante, na Figura 8 tem um exemplo de fotobiorreator vertical tubular patente da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em parceria com Instituto

Agrônomo do Paraná-Londrina (IAPAR), com a intenção de oferecer uma opção em sistema fechado de fácil instalação, economicamente viável porque é de baixo custo, reduzindo assim a presença de contaminantes destinado ao cultivo de microalgas para produção de biomassa microalgal, visando a extração de substâncias de interesse biotecnológico como os biocombustíveis e coprodutos, (NITPAR, 2014; SILVA, 2013)

Figura 8 - Fotobiorreator vertical tubular em PEBD.



Fonte: Patente BR 10 2014 021567 0 UEL/IAPAR 2014.

Além de melhorar os projetos clássicos como os fotobiorreatores tubulares, painéis planos, entre outro, novos conceitos estão sendo propostos, como sistemas híbridos que combinam fotobiorreatores e lagoas abertas (ZITTELLI *et al.*, 2014; RICHMOND, 2014). As estratégias de cultivo para produção em sistemas híbridos combinam o cultivo aberto com os fotobiorreatores fechados em dois estágios distintos. No primeiro, as microalgas se desenvolvem em um ambiente controlado em unidades fechadas, favorecendo a divisão celular e evitando a contaminação da estirpe. Já o segundo estágio células das microalgas são expostas a um estresse nutricional ao movê-las do cultivo fechado para o aberto, o que normalmente altera o metabolismo para a produção de lipídeos (ANDRADE *et al.*, 2014).

3.3 CULTIVO DE MICROALGAS PARA PRODUÇÃO DE BIOENERGIA

Atualmente para que o desenvolvimento do uso de microalgas para bioenergia seja sustentável, é necessário o desenvolvimento das seguintes etapas:

1º Seleção de estirpe de microalgas junto a compreensão das características celulares, essas características podem servir para estudos nas

modificações genéticas, em que funções de vias biológicas e redes pode promover a bioengenharia de rotas biológicas para maior biossíntese de biomassa e compostos de interesse biotecnológico, como a produtividade de biocombustíveis (LIMA, MAROUBO, VIEIRA, 2014; WINCK, RIAÑO-PACHÓN; FRANCO, 2016).

2º Um retorno de energia sobre o investimento (RESI) que seja comparável a outros combustíveis de transporte, ou pelo menos melhorando e aproximando o RESI de outros combustíveis de transporte (DUTTA, NETO, COELHO, 2016; ROGERS et al., 2014).

3º Utilização de águas residuais, como exemplo a vinhaça oriunda da destilação da produção de etanol para o cultivo de microalgas para biocombustíveis ou a reciclagem de água da colheita, especialmente se água doce for utilizada no cultivo de microalgas (KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

4º Reciclagem dos nutrientes nos cultivos de microalgas voltadas a produção biocombustíveis, como exemplo a reutilização da água após a colheita da biomassa das microalgas e a utilização do biofertilizante produzido na geração do biogás (UGUETTI *et al.*, 2016).

5º Uma avaliação nacional para os aspectos de terra disponível para o cultivo das microalgas que tenha em conta as condições climáticas, disponibilidade de água doce, águas salinas interiores e costeiras e recursos de águas residuais e fontes de CO₂ (ROGERS *et al.*, 2014; LAURENS, CHEN-GLASSER, 2017).

As indústrias e as instituições de pesquisas no mundo têm recebido, nos últimos anos, o apoio governamental para o desenvolvimento de técnicas voltadas a produção de biomassa a partir do cultivo de microalgas. Este apoio é motivado principalmente pela necessidade de políticas públicas que reduzem a dependência de cada país da importação de combustíveis fósseis e assim ter segurança energética independente. A produção de bioenergia a partir da biomassa das microalgas pode ajudar a suprir o consumo de energia fóssil e mitigar as emissões de gases do efeito estufa (GEE) com o aproveitamento do CO₂ no cultivo das microalgas (LAURENS, CHEN-GLASSER, McMILLAN, 2017).

Uma das alternativas para a viabilidade da produção de microalgas é integração do cultivo com usinas sucroenergéticas que produzem etanol no fornecimento de CO₂ com pureza através da fermentação integrando com o tratamento da vinhaça,

ambos os processos podem ser realizados e aumenta a sustentabilidade econômica e ambiental do ciclo todo. A integração do cultivo de microalgas com as águas residuais é considerada uma alternativa economicamente viável para a produção em larga escala de biocombustíveis a partir da produção de microalgas (CHIARAMONTI, 2017).

Uma avaliação do ciclo de vida favorável é um fator importante e essencial para a promoção do processo de bioenergia. A avaliação do ciclo de vida mostraria saldos de gases do efeito estufa (GEE) obtidos de todas as entradas e saídas usando metodologias aprovadas. A avaliação do ciclo de vida ajuda a avaliar o impacto das inovações tecnológicas na etapa de produção e em cada etapa relevante na produção de bioenergia, sendo extremamente útil na determinação dos produtos energéticos e dos coprodutos que demonstrarão maior viabilidade e o menor impacto ambiental (ROGERS *et al.*, 2014; DUTTA, NETO, COELHO, 2016).

O setor sucroenergético no Brasil está em constante desenvolvimento desde a década de 70, combinando essas características com a disponibilidade de terra e alta insolação solar, além da disponibilidade de água, para formar um panorama ideal para a implantação de plantas de microalgas no país (KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

3.4 USINAS SUCROENERGÉTICAS

A integração das usinas sucroenergéticas com o cultivo de microalgas é pesquisada, devido a estrutura já implantada nas usinas, uma estrutura que produz energia térmica através das tubulações e energia elétrica fornecida pelo sistema de cogeração. Assim, a possibilidade de integração a partir de usinas sucroenergéticas é única, isso devido aos materiais disponíveis e aos vetores de energia como: nutrientes inorgânicos, carbono, água, vapor e energia elétrica (CHIARAMONTI, 2017; KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

A integração entre usinas sucroenergética da cana-de-açúcar e outras unidades industriais já é feita no Brasil em alguns casos específicos. Conforme o perfil do processo industrial, as usinas integradas podem beneficiar da gestão conjunta do fornecimento de matéria-prima; a obtenção produtos intermediários, produtos

finalizados ou energia excedente da usina sucroenergética, recursos agrícolas e equipamentos dos processos (KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

Um exemplo da integração de uma usina sucroenergética cana-de-açúcar que produz etanol, açúcar e eletricidade está integrada a uma usina que produz biodiesel de óleo de soja no estado de Mato Grosso na região centro-oeste do Brasil. A fábrica de biodiesel opera desde o final de 2006 foi integrada a uma usina sucroenergética inaugurada em 1983. A integração ocorre tanto nos processos agrícola na produção, transporte, refino da matéria-prima como área industrial, estimam que os custos de uma usina de biodiesel independente não integrada no Brasil tem um custo de 22% superior ao de uma planta integrada (OLIVÉRIO, BARREIRA, RANGEL, 2007).

Outra empresa integrada a uma usina sucroenergética é a Joint Venture SB, a Bunge e Corbion TerraVia (anteriormente Solazyme) com capacidade de produção de até 100 mil toneladas de óleo de microalgas por ano, a operação teve início em 2014 em Orindiúva-SP, Brasil. Porém o investimento e o planejamento feitos nesta integração, foram antes da queda do preço do petróleo, e a empresa não foi planejada para utilizar um subproduto da usina sucroenergética como a vinhaça, atualmente a empresa cultiva as microalgas para produtos de maior valor agregado, como suplementos alimentares (KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

Neste contexto o cultivo das microalgas pode vir a produzir biomassa para produção de biocombustíveis em integração com as biorrefinarias como as usinas sucroenergética, o biocombustível produzido pode ser utilizado para substituir o consumo de combustível fóssil no estágio da produção agrícola da cana-de-açúcar e da própria usina. Com esta abordagem, as emissões globais de gases do efeito estufa (GEE) ligadas à produção de etanol, podem ser mitigadas em média de 30% (CHAGAS *et al.*, 2016).

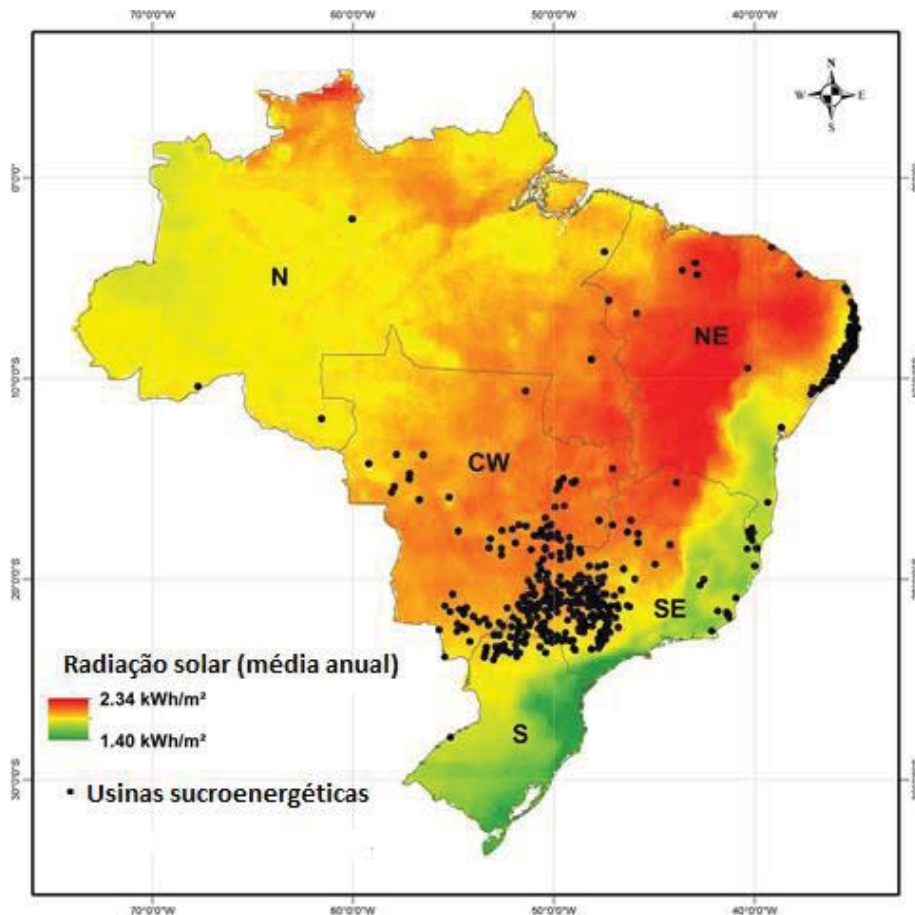
Os principais grupos que produzem etanol a partir da cana-de-açúcar, no Brasil, ocorrem nas regiões: central e sudeste, especialmente no estado de São Paulo. As atuais fronteiras para o cultivo da cana de açúcar no Brasil, agora abrangem os estados da região centro-oeste, ou seja, Goiás e Mato Grosso do Sul. Estas regiões equivalem a mais de 87% da cana de açúcar processada em 2014–2015. As plantações de cana-de-açúcar e as usinas sucroenergética estão concentradas em regiões geográficas específicas no Brasil, conforme a Figura 9 (CONAB, 2016).

A partir de uma avaliação geral, a maior parte do território brasileiro apresenta incidência solar elevada no decorrer de todo o ano, com uma ampla parcela do país chegando a valores médios superiores a 2,0 kWh/m²s dia de radiação solar fotossinteticamente ativa (PEREIRA *et al.*, 2006).

A radiação fotossinteticamente ativa em excesso pode ser um problema e causar a fotoinibição, que pode afetar o desenvolvimento das microalgas. O grau em que as microalgas são afetadas pelas irradiações radiais extremas é dependente das estirpes de microalgas aplicadas. Por exemplo, para uma estirpe de *C. vulgaris* que suporta uma ótima gama de fótons, o desempenho está estabelecido entre 150 e 350 μmol de fótons/m²s, com fotoinibição ocorrendo em irradiações superiores a 369 μmol de fótons/m²s (BHOLA *et al.*, 2011).

Analisando o mapa apresentado na Figura 9, pode-se observar que as usinas sucroenergética no Brasil estão localizadas em regiões de alta radiação fotossinteticamente ativa. Para a integração do cultivo de microalgas, as usinas sucroenergética deverão projetar a construção de reatores de microalgas e adaptação a toda infraestrutura associada próxima às usinas (KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017).

Figura 9 - Localização das usinas de cana-de-açúcar e radiação fotossinteticamente ativa com média anual no Brasil.



Fonte: KLEIN, BONOMI, MACIEL FILHO, 2017.

Além da radiação fotossinteticamente ativa as microalgas necessitam uma quantidade considerada de água para o cultivo, na ordem de 11 a 13 milhões L ha⁻¹ ano⁻¹ se for utilizado um sistema de tanques/lagoas abertas. As usinas sucroenergéticas possui a vinhaça, um efluente residual rico em nutrientes essenciais para o desenvolvimento das microalgas (CHIARAMONTI, 2017).

3.5 VINHAÇA

A vinhaça trata-se de um efluente líquido obtido em grandes volumes durante a destilação do etanol. Devido ao seu alto nível de compostos orgânicos e nutrientes, a vinhaça é considerada um efluente. No Brasil, as usinas sucroenergética produzem em média de 10 a 15 L de vinhaça por litro de etanol. (CETESB, 2015; UNICA, 2016).

A vinhaça possui matéria orgânica e importantes elementos químicos como C, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Cu, Mn, entre outros, porém a quantidade de nutrientes da vinhaça pode variar de acordo com a região de onde a cana é produzida e o tipo de matéria prima utilizada na fermentação etílica do etanol, como mostra a Tabela 7 (UNICA, 2016; PRADA, GUEKEZIAN, SUÁREZ-LHA, 1998).

Tabela 7 - Características da vinhaça resultante do mosto de melaço, caldo de cana de açúcar e do mosto misto de caldo e melaço.

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 - 5,0	3,7 - 4,6	4,4 - 4,6
Temperatura	80 - 100	80 - 100	80 - 100
¹ DBO (mg L ⁻¹)	25.000	6.000 - 16.500	19.800
² DQO (mg L ⁻¹)	65.000	15.000 - 33.000	45.000
Sólidos totais (mg/L)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg/L)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg/L)	21.500	3.700	12.700
N (mg/L N)	450 - 1.610	150 - 700	480 - 710
Fósforo (mg/L P ₂ O ₅)	100 - 290	10 - 210	9 - 200
Potássio (mg/L K ₂ O)	3.740 - 7.830	1.200 - 2.100	3.340 - 4.600
Cálcio (mg/L CaO)	450 - 5.180	130 - 1.540	1.330 - 4.570
Magnésio (mg/L MgO)	420 - 1.520	200 - 490	580 - 700
Sulfato (mg/L SO ₄ ²⁻)	6.400	600 - 760	3.700 - 3.730
Carbono (mg/L C)	11.200 - 22.900	5.700 - 13.400	8.700 - 12.100
Relação C/N	16 - 16,27	19,7 - 21,07	16,4 - 16,43
Subst. redutoras (mg/L)	9.500	7.900	8.300

1 DBO = Demanda Bioquímica de oxigênio
2 DQO = Demanda Química de oxigênio

Fonte: Modificada de Prada, Guekezian, Suárez-lha, 1998;

Considerando que em para cada 1 litro de etanol produzido, são gerados em média de 13 litros de vinhaça, só em 2016, foram produzidos aproximadamente 28,6 bilhões de litros de etanol, então foram produzidos em média 390 bilhões de litros de vinhaça no Brasil em 2016 (EPE, 2017). No estado do Paraná foram produzidos

aproximadamente 1,65 bilhões de litros de etanol em 2015, e foram gerados aproximadamente 21,4 bilhões de litros de vinhaça (UNICA, 2016).

O uso final mais empregado para a vinhaça tem sido *in natura* como fertilizante, no entanto sua aplicação tem que ser limitada, devido à saturação do solo por nutrientes, e os riscos associados à contaminação dos lençõs freáticos (SILVA, 2007, NETO, 2016). Outro fator que dificulta o emprego da vinhaça na fertirrigação é o alto custo do transporte, o que limita sua aplicação para áreas mais próximas da usina.

A utilização das águas residuais como a vinhaça pode ser um meio adequado para a produção no cultivo das microalgas onde o carbono orgânico entre outros nutrientes pode fornecer as condições que as microalgas necessitam para crescer, num cenário heterotrófico ou mixotrófico, provavelmente com consórcios de diferentes espécies de microalgas (CHIARAMONTI, 2017).

Neste caso, para aplicar a vinhaça no cultivo das microalgas, com foco na produção de bioenergia há dois fatores que podem ser destacados.

1º) O uso direto desse efluente no cultivo de microalgas como forma de tratamento, podendo ser reutilizado no cultivo ou aplicado diretamente ao solo como biofertilizante.

2º) A utilização da vinhaça tratada ou não tratadas como meio de cultura é reciclado repetidamente para o cultivo de microalgas

Assim na aplicação do tratamento das águas residuais como a vinhaça, os principais produtos seriam água recuperada, fertilizantes à base de microalgas e a bioenergia produzida como biogás, biodiesel, etanol, cogeração de energia elétrica. (UGUETTI *et al.*, 2016). Normalmente, a biomassa produzida a partir de uma instalação de tratamento das águas residuais é restrita nas suas aplicações e tipos de produtos finais para os quais ela pode ser usada, para produção de bioenergia. (CHIARAMONTI, 2017).

4. METODOLOGIA

4.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados na Universidade Estadual de Londrina (UEL) nos seguintes Laboratórios: Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica – LAFLURPE, localizado no Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas (CCE), Laboratório do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia do (CCE), Laboratório do Departamento de Agronomia, Centro de Ciência Agrárias (CCA) e no Laboratório de microbiologia do solo no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

4.2 MICROALGA UTILIZADA E O MEIO DE CULTIVO

Os experimentos foram conduzidos, utilizando a estirpe de microalga *Chlorella vulgaris*, cedida pela Dra. Ana Teresa Lombardi da Universidade Federal de São Carlos, (UFSCAR) ao Dr. Helder Rodrigues da Silva.

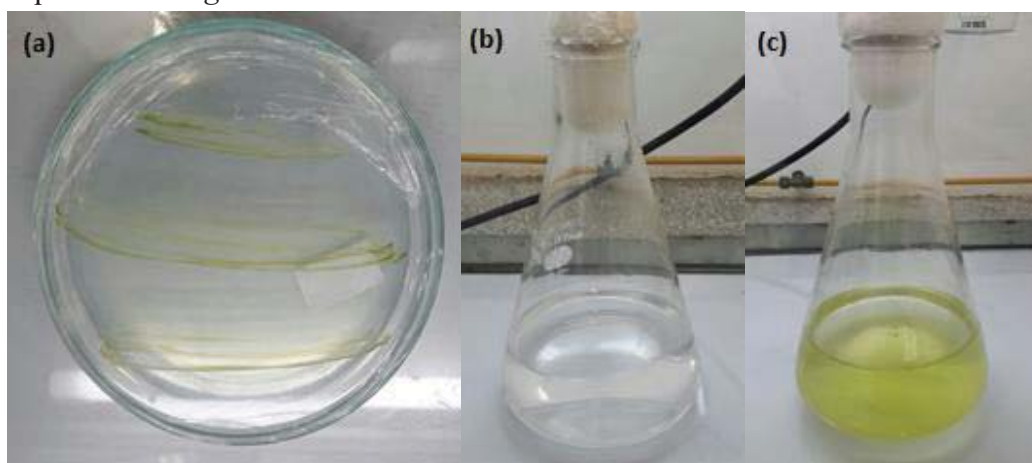
O meio nutritivo utilizado no cultivo e para manutenção do inóculo inicial foi o meio de cultivo preparado com sais hidropônicos (MH) contendo os seguintes sais: (Mono amônio fosfatado (MAP)) - 0,19 g L⁻¹, CaCl₂ - 0,025 g L⁻¹, KNO₃ - 0,12 g L⁻¹, MgSO₄ - 0,075 g L⁻¹. Solução de micronutrientes Yara Vita® (11,6% de K₂O, 1,28% de S, 0,86% de Mg, 2,1% de B, 0,36% de Cu, 2,66% de Fe, 2,48% de Mn, 0,036% de Mo e 3,38% de Zn) - 0,03 g L⁻¹ (SILVA, 2016).

4.3 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para a manutenção e produção do inóculo inicial, foi realizada inicialmente uma repicagem de células de *C. vulgaris* em meio hidropônico com 1% de ágar em placas de petri. Após seu crescimento uma porção foi alçada e transferida para tubos com 50 mL de meio líquido. Este inóculo permaneceu em média 10 a 15 dias na

câmara de crescimento sem agitação, até atingir altas concentrações de células, sendo em seguida inoculados em meios com maiores volumes na proporção de 10% no volume final do cultivo (Figura 10).

Figura 10 - (a) Placa petri com meio solido hidropônico com 1% de ágar e células de *C. vulgaris* para o cultivo, (b) Frasco Erlenmeyer com meio hidropônico liquido utilizado na manutenção e produção de inóculo inicial e (c) Frasco Erlenmeyer com meio hidropônico liquido e *C. vulgaris* inoculada à 10%.



Fonte: Próprio autor.

4.4 AMBIENTE DE CULTIVO INICIAL DO INÓCULO

O ambiente de cultivo foi em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, intensidade luminosa de 22 lâmpadas (tipo Led) de 40W e temperatura controlada de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ localizado no Departamento de Agronomia da UEL.

O inóculo utilizado no primeiro experimento do planejamento fatorial Box-Behnken apresentou as seguintes características: densidade óptica ($\text{DO}_{670\text{nm}}$) de 1,09 e biomassa seca de $0,65 \text{ g L}^{-1}$ e pH de 7,27.

O inóculo utilizado no segundo experimento de otimização apresentou as seguintes características: densidade óptica ($\text{DO}_{670\text{nm}}$) de 0,93, concentração de celular de $1,01 \cdot 10^7 \text{ células mL}^{-1}$, biomassa seca de $0,39 \text{ g L}^{-1}$ e pH de 6,74.

4.5 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE MICROALGA EM VINHAÇA E EXTRATO DE LEVEDURA *S. CEREVISIAE*

O planejamento fatorial Box-Behnken foi realizado no programa STATISTICA 7.0, constituído de 13 tratamentos com 4 repetições no ponto central, o experimento foi realizado em bancada, com 17 frascos tipo Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, onde foram adicionados um total de 250 mL variando as concentrações de meio MH com sais hidropônicos, vinhaça, extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH ajustado com solução de KOH 1 molar em 7, 8 e 9 no cultivo, de acordo com a Tabela 8.

Em seguida os frascos foram vedados com boneca de algodão, recobertos com papel Kraft e esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 atm por 20 min. Após a esterilização, foi adicionado um volume de 20% de inóculo de microalgas *C. vulgaris* em fase de crescimento exponencial.

Tabela 8 - Planejamento fatorial Box-Behnken com 17 tratamentos.

Tratamentos	Variáveis Independentes		
	Diluição Vinhaça em %	pH	Concentração Extrato Levedura <i>S. cerevisiae</i> mg.L ⁻¹
1	-1 (10)	-1 (7,0)	0 (40)
2	1 (40)	-1 (7,0)	0 (40)
3	-1 (10)	1 (9,0)	0 (40)
4	1 (40)	1 (9,0)	0 (40)
5	-1 (10)	0 (8,0)	-1 (30)
6	1 (40)	0 (8,0)	-1 (30)
7	-1 (10)	0 (8,0)	1 (50)
8	1 (40)	0 (8,0)	1 (50)
9	0 (25)	-1 (7,0)	-1 (30)
10	0 (25)	1 (9,0)	-1 (30)
11	0 (25)	-1 (7,0)	1 (50)
12	0 (25)	1 (9,0)	1 (50)
13	0 (25)	0 (8,0)	0 (40)
14	0 (25)	0 (8,0)	0 (40)
15	0 (25)	0 (8,0)	0 (40)
16	0 (25)	0 (8,0)	0 (40)
17	0 (25)	0 (8,0)	0 (40)

Fonte: O próprio autor.

O cultivo foi analisado em um período de 20 dias com coleta a cada 4 dias. Os resultados obtidos foram analisados por meio de metodologia de superfície de resposta para três variáveis independentes: três níveis codificados (-1, 0, 1) três fatores (I, II, III, correspondem: vinhaça, pH e extrato de levedura (Tabela 9).

Tabela 9 - Nível dos fatores, de Vinhaça, pH e extrato de levedura *S. cerevisiae* no cultivo de *C. vulgaris*.

Fatores	Gama de níveis (X)		
	-1	0	1
I Vinhaça mL ⁻¹	10%	25%	40%
II pH	7,0	8,0	9,0
III Extrato de levedura mg.L ⁻¹	30	40	50

Fonte: O próprio autor.

A vinhaça utilizada no trabalho foi fornecida pela Usina de Açúcar COSAN S/A do grupo RAÍZEN localizada na cidade de Assis - São Paulo, Brasil. A vinhaça foi submetida a análises físico-químicas (Tabela 10) de acordo as normas (APHA, 2005). Para os dois experimentos, a vinhaça foi utilizada sem tratamento prévio para retirada de sólidos suspenso e antes das análises permaneceu armazenada em geladeira a 4 °C por 2 meses.

O extrato de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizado na pesquisa foi da marca Yes® levedura seca tipo 3 comprado da empresa YES LEVEDURA SECA. A caracterização dos macros e micronutrientes segue as normas de análises da Embrapa adaptadas SILVA, (1999).

Tabela 10 - Parâmetros de caracterização da vinhaça de acordo com as normas.

Parâmetro	Método analítico	Descrição
Teor de umidade (%)	Gravimétrico	Secagem da amostra em estufa (103 ± 2)°C até peso constante.
pH	Potenciométrico (4500-H/APHA 2005)	Medida direta por meio de eletrodo específico.
DQO (mg L ⁻¹) Demanda Química de Oxigênio	Espectrofotométrico (5220-D/APHA 2005)	Oxidação por dicromato de potássio em meio de ácido sulfúrico. Digestão a 150°C por 2 h em leitura a 600 nm.
ST (mg L ⁻¹) Sólidos Totais	Gravimétrico (2540-B/APHA 2005)	Secagem da amostra em estufa (103 ± 02)°C até peso constante.
STF (mg L ⁻¹) Sólidos Totais Fixos	Gravimétrico (2540- E/APHA 2005)	Após secagem em estufa, calcinação em mufla (550°C) até peso constante.
STV (mg L ⁻¹) Sólidos Totais Voláteis	Gravimétrico (2540-E/APHA 2005)	Após secagem em estufa, calcinação em mufla (550°C) até peso constante.
Cu, Zn, Fe e Mn	Espectrometria de absorção atômica - EEA	0,1 mL amostra + 4,9 oxido de lantânio 0,5%.
P	Espectrometria com azul de molibdênio	0,5mL amostra + 4,5 mL de solução de ácido perclórico.
K	Fotômetro de Chama	0,5mL amostra + 4,5 mL + 10 mL STM + 0,1 mL ácido ascórbico.
Ca e Mg	Espectrometria de absorção atômica - EEA	0,1 mL amostra + 4,9 oxido de lantânio 0,5%.
N total	Método de Kjeldahl	Titulação

4.6 ANÁLISE DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

O primeiro experimento foi composto de 13 tratamentos e 4 repetições no ponto central, onde foram coletadas amostras com volume de 50 mL para as análises a partir do dia 0 de cultivo e, em intervalos de 4 dias, durante 20 dias (Figura 11).

Figura 11 - Foto demonstrativa dos tubos das amostras no experimento composto de 13 tratamentos e 4 repetições no ponto central cultivado de *C. vulgaris*.

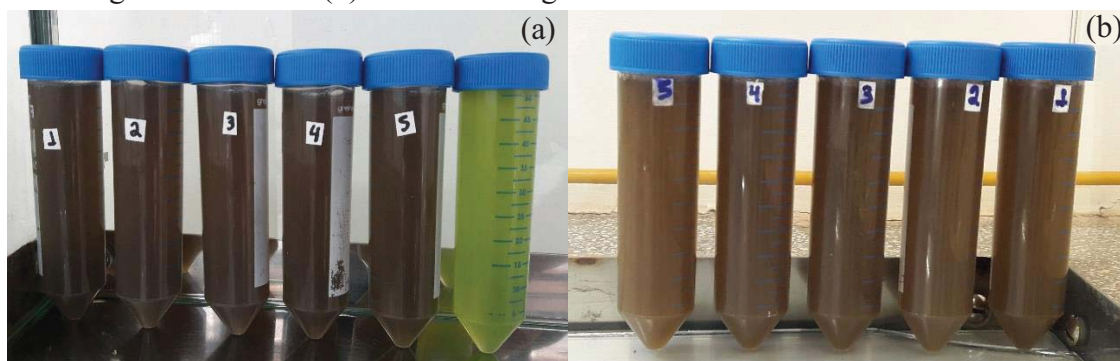


Fonte: O próprio autor.

No segundo experimento de otimização do método, composto de 1 tratamento com 5 repetições, foi coletado amostras com 50 mL para análises a partir do dia 0 e em intervalos de 5 dias durante 20 dias de cultivo (Figura 12).

No primeiro e segundo experimento, o crescimento da *C. vulgaris* foi monitorado através das análises de densidade celular a (OD_{670nm}) e biomassa seca em função do tempo em dias (LOURENÇO, 2006, ANDRADE *et al.*, 2014). No segundo experimento também foi realizada a contagem de células em função do tempo em dias.

Figura 12 - Foto demonstrativa dos tubos na otimização do cultivo de *C. vulgaris* (a) 1^o amostragem no dia zero (b) na 5^o amostragem aos 20 dias.



Fonte: O próprio autor.

4.6.1 Densidade Óptica

A determinação da densidade óptica das células das microalgas em suspensão foi com o comprimento de onda de 670 nm (OD_{670nm}). A OD_{670nm} foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV Genesys 10 (ANDRADE *et al.*, 2014).

4.6.2 Contagem de Células

A contagem de células das microalgas foi feita somente na otimização do método em escala de laboratório, mediante o uso da câmara de Neubauer, utilizando um microscópio óptico marca Nikon® mod. Eclipse E200, com objetiva de 40x, obtendo um aumento visual de 400x, e expressando o número de células (células mL^{-1}) (LOURENÇO, 2006, ANDRADE *et al.*, 2014).

4.6.3 pH

Para análise de pH foi utilizado um pHmetro de marca Metrohm modelo 827 pH lab (Potenciométrico 4500-H/APHA 2005).

4.6.4 Condutividade Elétrica

Na análise de condutividade elétrica, foi utilizado um condutivímetro, da marca Tecnon, modelo Mca-100, versão 6.2.

4.6.5 Biomassa Seca

Para determinar a biomassa seca utilizou-se a técnica de gravimetria, uma alíquota de 40 ml foi coletada em tubos falcon e centrifugada a 10.000 rpm durante 10 min a 4 °C (Modelo Z383 HERMLE K). O sobrenadante foi descartado e a biomassa sedimentada é seca até peso constante, em estufa a 60°C. Após a secagem, a amostra foi armazenada em dessecador e pesada em balança analítica e os resultados expressos em $g L^{-1}$ (LOURENÇO, 2006; ANDRADE *et al.*, 2014).

A biomassa seca foi determinada por meio da Equação 1:

$$BS = \frac{(B2 - B1)}{V} \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

BS = biomassa seca (g L^{-1});

B1 = massa do saco plástico (g);

B2 = massa do saco plástico/alumínio + massa da biomassa seca (g);

V = volume da amostra centrifugada (L).

4.7 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE CULTIVO

A otimização do cultivo da *C. vulgaris* em vinhaça e extrato de levedura (*S. cerevisiae*) foi realizada em escala de laboratório com 5 repetições. Os fatores utilizados na otimização foram obtidos da análise dos resultados do primeiro experimento. A otimização da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* foi em frascos Erlenmeyers com capacidade de 500 mL, onde foram adicionados 60% do meio com sais hidropônicos, 40% vinhaça, 30 mg L^{-1} de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) em pH 7.0 totalizando 250 mL, mais 20% de inóculo de *C. vulgaris* (Figura 13).

Figura 13 - Frascos Erlenmeyer utilizados na otimização do cultivo de *C. vulgaris* com 60% do meio de sais hidropônicos, 40% vinhaça, 30 mg L^{-1} de extrato de levedura *S. cerevisiae* em pH 7.0 e inóculo cultivado com sais hidropônicos em pH 7.



Fonte: O próprio autor.

4.8 ANÁLISE DA DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO NO CULTIVO DA *C. VULGARIS*

A análise da DQO da vinhaça foi obtida pelo método do dicromato, de acordo com APHA 5220-D, utilizando uma solução ácida feita de ácido sulfúrico e dicromato para a digestão das amostras a 150 °C durante 2 h em um bloco digestor HACH®. As amostras digeridas foram arrefecidas até a temperatura ambiente e a absorvância lida a 600 nm no espectrofotômetro usando cubetas de vidro e curva de calibração com solução de Biftalato.

A eficiência percentual da remoção do substrato da DQO do cultivo foi determinada por meio da Equação 2 (MATOS, BASTOS, 2015).

$$\frac{E - S}{S_0} = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde E – S é a remoção do substrato da DQO,

S é a concentração final de substrato.

S₀ é a concentração inicial do substrato.

4.9 TEORES DE MACRO E MICRONUTRIENTES

As amostras de vinhaça e os meios de cultivo foram analisados na forma líquida enquanto, as amostras do extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e da biomassa de microalga *C. vulgaris* foram secas em estufa a 100 °C por 48 h, moídas e pesadas porções de 500 mg do material seco e para as análises de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, cobre e zinco. Após a pesagem, as amostras foram colocadas e tubos digestores e foi adicionada a solução nitroperclórica onde ficou em descanso por 12 h fazendo uma pré-digestão. Após as 12 h as amostras foram levadas para o bloco digestor e onde foram digeridas e em seguida analisadas de acordo com a metodologia proposta por (SILVA, 1990). Para análise de nitrogênio total foi utilizado o método de Kjeldahl.

5.0 PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA.

A produtividade da biomassa *C. vulgaris* no experimento, foi definida como a massa celular formada em determinado volume na unidade de tempo e foi determinada por meio da Equação 3:

$$P_x = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde, X (g L^{-1}) é a concentração celular de biomassa seca final, X_0 (g L^{-1}) é a concentração celular de biomassa seca inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial.

5.1 CÁLCULOS PARA TAXA DE CRESCIMENTO

A taxa de crescimento específico, o rendimento celular, a duplicação celular por dia e o tempo de duplicação (dia) foram calculados (LOURENÇO, 2006; BARSANTI, GUALTIERI, 2014). A taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* no experimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo em dia (d) e foi determinada por meio da Equação 4,

$$\text{Taxa de crescimento específico } \mu = \frac{\ln(N_t / N_0)}{\Delta t} \text{ ou } \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde μ = é taxa instantânea de crescimento, e sua unidade pode ser expressa por unidade de tempo em horas, dias ou semana; N_0 = é equivalente ao número de células no início do intervalo de tempo; N_t = corresponde ao número de células no final do intervalo de tempo.

O rendimento celular máximo foi determinada por meio da Equação 5.

$$\text{Rendimento celular máximo: } R = N_t - N_0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Onde N_t = corresponde ao número de células no final do intervalo de tempo e N_0 = é equivalente ao número de células no início do intervalo de tempo.

A taxa de crescimento instantâneo pode ser convertida em duplicações por dia, através da Equação 6 e variável é representada por k.

$$\text{Duplicação por dia} \quad k = \frac{\mu}{0,6931} \text{ ou } \frac{\log_2(N_1/N_2)}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 6})$$

Para isto basta divide μ pelo logaritmo natural de 2,0 = 0,6931 A taxa de crescimento instantâneo pode ser convertida em duplicações por dia, variável representada por k. Para isto basta divide μ pelo logaritmo natural de 2,0 = 0,6931.

O tempo de duplicação (T_d), corresponde ao intervalo de tempo necessário para que ocorre a formação de uma nova geração inteira de células no cultivo, ou seja, a duplicação da população. (T_d) é determinada pela Equação 7.

$$\text{Tempo de duplicação (dia)} \quad T_d = \frac{0,6931}{\mu} \quad (\text{Eq. 7})$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE MACRO E MICRONUTRIENTES DA VINHAÇA E DO EXTRATO DE LEVEDURA *S. CEREVISIAE*

Entre as características físico-químicas, a vinhaça tem um teor elevado de 97,8% de água que é fundamental para o cultivo das microalgas, porém sua condutividade elétrica de 14690,00 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20 °C pode inibir o crescimento da *C. vulgaris*, necessitando a redução, que neste trabalho foi feita por diluição da vinhaça em meio hidropônico. Para os dois experimentos, o pH ácido da vinhaça com valor de 4,7 também necessitou ser ajustado e utilizou se KOH 1 molar e observando a Tabela 11 verifica se alto teor de potássio, portanto, neste caso, o ajuste do pH deveria ter sido feito com outro reagente.

Tabela 11 - Caracterização físico-química da vinhaça utilizada nos dois experimentos.

Parâmetros físico-químicos da vinhaça	
Teor de água (%)	97,82 ± 0,02
Sólidos totais (%)	2,23 ± 0,02
Sólidos totais voláteis (%)	1,53 ± 0,03
Sólidos totais fixos (%)	0,70 ± 0,02
DQO mg L ⁻¹	21805,56 ± 485,48
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C)	14690,00 ± 0,02
pH	4,7 ± 0,02
Nitrogênio total (N) mg L ⁻¹	187,36 ± 0,256
Fósforo (P) mg L ⁻¹	33,68 ± 0,77
Potássio (K) mg L ⁻¹	2279,34 ± 16,93
Cálcio (Ca) mg L ⁻¹	414,55 ± 12,56
Magnésio (Mg) mg L ⁻¹	243,83 ± 11,44
Ferro (Fe) mg L ⁻¹	221,22 ± 12,76
Manganês (Mn) mg L ⁻¹	15,24 ± 0,59
Cobre (Cu) mg L ⁻¹	0,349 ± 0,05
Zinco (Zn) mg L ⁻¹	2,109 ± 0,20

Fonte: O próprio autor.

A caracterização de macro e micronutriente mostra que a vinhaça tem alta demanda química de oxigênio (DQO) e teores de nutrientes que podem ser utilizados pela microalga *C. vulgaris* no seu crescimento, como nitrogênio, fosforo, potássio entre outros.

As concentrações de macros e micronutrientes do extrato de levedura de (*S. cerevisiae*) utilizada no trabalho são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Caracterização química do extrato de levedura *S. cerevisiae*.

Parâmetros	Concentração
Nitrogênio (N) g Kg ⁻¹	48,63 ± 5,98
Fósforo (P) g Kg ⁻¹	6,61 ± 0,17
Potássio (K) g Kg ⁻¹	15,77 ± 0,45
Cálcio (Ca) g Kg ⁻¹	11,50 ± 0,09
Magnésio (Mg) g Kg ⁻¹	1,26 ± 0,06
Ferro (Fe) mg Kg ⁻¹	1937,16 ± 27,55
Manganês (Mn) mg Kg ⁻¹	142,73 ± 18,91
Cobre (Cu) mg Kg ⁻¹	16,03 ± 2,51
Zinco (Zn) mg Kg ⁻¹	385,00 ± 2,93

Fonte: O próprio autor.

A caracterização dos macros e micronutrientes do extrato de levedura da *S. cerevisiae* mostra que possui nutrientes que podem vir a complementar e ajustar um balanço de nutrientes no meio hidropônico com a vinhaça, entre esses nutrientes, podemos citar o nitrogênio, ferro, manganês, cobre e o zinco.

5.2 BIOMASSA SECA *C. VULGARIS*

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o software STATISTICA 7.0 para verificar qual a concentração mais adequada das variáveis vinhaça, extrato de levedura e pH para o meio de cultivo de *C. vulgaris*. De acordo com a análise da biomassa seca g L⁻¹ de *C. vulgaris*. A análise estatística indicou efeito significativo ($p < 0,05$) para a variável concentração da vinhaça (%) (Figura 14). O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,84098$) corresponde a 84,0% da variabilidade (Tabela 13) que pode ser explicada pelo modelo e melhor previsão de resposta (SILVA *et al.*, 2016).

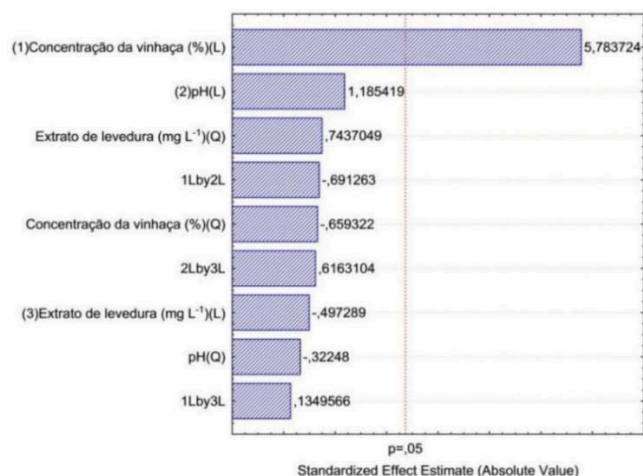
Tabela 13 - Análise de variância ANOVA de acordo com a variável resposta biomassa seca g L⁻¹ de *C. vulgaris*.

Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração da vinhaça (%) L+ Q (1)	2,616	2	1,308	11,478	0,022
pH L+ Q (2)	0,116	2	0,058	0,511	0,634
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) L+Q (3)	0,061	2	0,030	0,271	0,775
1*2	0,036	1	0,036	0,323	0,599
1*3	0,001	1	0,001	0,012	0,916
2*3	0,029	1	0,029	0,257	0,638
Lack of Fit	0,084	3	0,028	0,247	0,859
Pure Error	0,455	4	0,113		
Total SS	3,398	16			
$R^2 = 0,84098 / R^2 \text{ adj} = 0,63653$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de Pareto (Figura 14), no qual o comprimento da barra é proporcional à importância do efeito, ultrapassando o nível de significância mínimo de 5%, valor mínimo do erro experimental.

Figura 14 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a biomassa seca de *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo.



A Equação 8, apresentada na Figura 15a, descreve a modelagem de superfície de resposta para a biomassa seca de *C. vulgaris* g L⁻¹ com extrato de levedura fixo em 30 mg L⁻¹, em 20 dias de cultivo. Onde z= Biomassa seca g L⁻¹; x= concentração da vinhaça em % é y= pH. ($Z = 4,02 \cdot 10^{-1} + 1,03 \cdot 10^{-1} \cdot x - 3,96 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 6,32 \cdot 10^{-1} \cdot y - 4,36 \cdot 10^{-2} \cdot y^2 - 6,40 \cdot 10^{-3} \cdot x \cdot y + 1,24 \cdot 10^{-4} \cdot 30 \cdot x + 8,56 \cdot 10^{-3} \cdot 30 \cdot y - 3,80$).

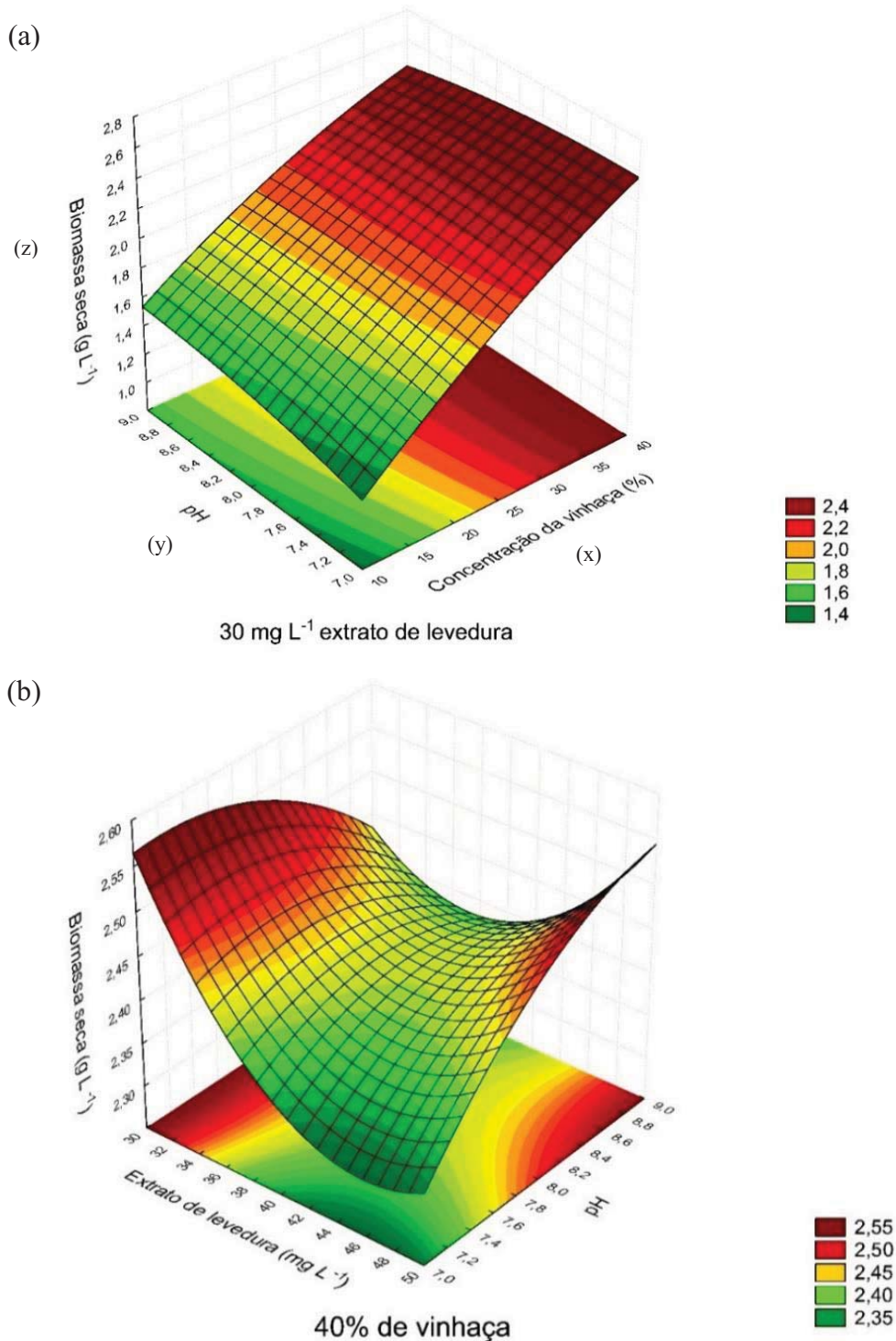
A Equação 9, apresentada na Figura 15b, descreve a modelagem de superfície de resposta para a biomassa seca de *C. vulgaris* g L⁻¹ com concentração de vinhaça fixa em 40%, em 20 dias de cultivo. Onde z= Biomassa seca g L⁻¹; x= pH e y= extrato de levedura. ($Z = 4,02 \cdot 10^{-1} + 6,32 \cdot 10^{-1} \cdot y - 4,36 \cdot 10^{-2} \cdot y^2 - 1,57 \cdot 10^{-1} \cdot x + 1,00 \cdot 10^{-3} \cdot x^2 - 6,40 \cdot 10^{-3} \cdot 40 \cdot y + 1,24 \cdot 10^{-4} \cdot 40 \cdot x + 8,56 \cdot 10^{-3} \cdot y \cdot x + 3,52$).

Com base nos resultados do planejamento fatorial para produção de biomassa de *C. vulgaris* foi gerado o gráfico de superfície de resposta. A superfície de resposta Figuras 15a e b descreve o comportamento da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* em g L⁻¹ de em função das variáveis analisadas. Pela análise da figura 15a é possível concluir que os pontos ótimos para a maior produção de biomassa seca, correspondente a 2,59 g L⁻¹, são na concentração de 40% de vinhaça e pH 7,0. Com base na superfície de resposta, conclui se que os menores valores para produção de biomassa seca foram obtidos na faixa de pH 7,0 a 9,0 na concentração de até 25% de vinhaça.

Assim, a conclusão é que nas concentrações de vinhaça acima de 25% e com pH na faixa entre 7,0 a 9,0 produz biomassa seca de *C. vulgaris* acima de 2,40 g L⁻¹. A partir destes dados foi gerada a superfície de resposta com a concentração de vinhaça fixada a 40% (Figura 15b), onde foi possível verificar que a maior produção de biomassa seca correspondente a 2,59 g L⁻¹ é na concentração de 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura

(*S. cerevisiae*) e correspondente a pH entre 7,0. Os menores resultados em valores para produção de biomassa seca foram obtidos nas concentrações entre 40 a 50 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) faixa de pH 7,0 a 9,0 que produziram biomassa seca de *C. vulgaris* de até 2,35 g L⁻¹.

Figura 15 - Superfície de resposta para variável biomassa seca de *C. vulgaris* g L⁻¹ em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura *S. cerevisiae* fixo em 30 mg L⁻¹ e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura *S. cerevisiae*.



O melhor resultado na produtividade em dias da biomassa seca no cultivo da *C. vulgaris*, no planejamento fatorial foi de 0,129 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa de *C. vulgaris* por dia, e 2,59 g L⁻¹ em 20 dias de cultivo (Figura 15a e b).

5.3 DENSIDADE ÓPTICA *C. VULGARIS*

Na análise de densidade óptica em 670 nm (Abs) do cultivo da *C. vulgaris* a análise estatística indicou significativa ($p < 0,05$) as variáveis de extrato de levedura (*S. cerevisiae*), pH e vinhaça (Figura 16). O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,9591$) conforme a Tabela 14 e corresponde a 95,91% da variabilidade que pode ser explicada pelo modelo e melhor previsão de resposta (SILVA *et al.*, 2016).

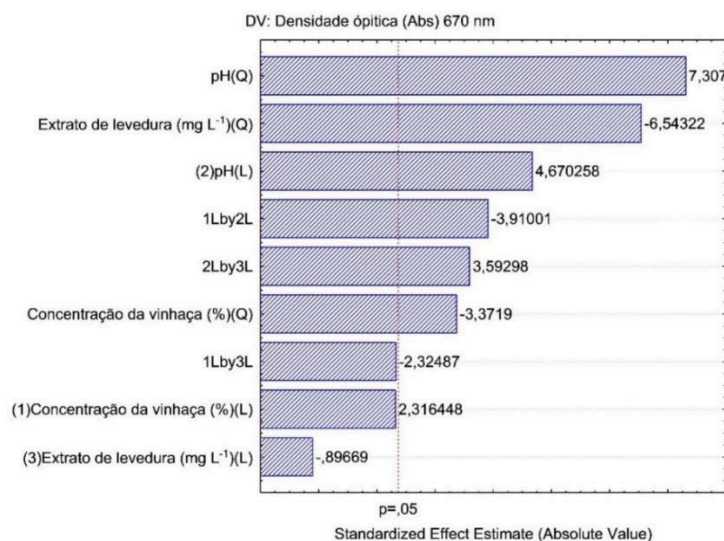
Tabela 14 - Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para a densidade óptica da microalga da *C. vulgaris*.

Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração da vinhaça (%) L+Q ⁽¹⁾	0,021	2	0,010	32,919	0,009
pH L+Q ⁽²⁾	0,106	2	0,053	159,740	8,97 10 ⁻⁴
(3)Extrato de levedura (mg L ⁻¹) L+Q	0,057	2	0,028	85,540	0,002
1*2	0,021	1	0,021	65,646	0,003
1*3	0,007	1	0,007	23,208	0,017
2*3	0,018	1	0,018	55,432	0,005
Lack of Fit	0,008	3	0,002	8,539	0,055
Pure Error	0,001	3	3,34 10 ⁻⁴		
Total SS	0,243	16	0,010		
$R^2 = 0,9591 / R^2 \text{ adj} = 0,90653$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

O uso de densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas baseia-se na obstrução física da luz pelas células. Quanto mais células estiverem presentes na amostra, maior será a absorção de luz e menor será a passagem de luz pela amostra. Utiliza-se um espectrofotômetro para realizar as medições.

Figura 16 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre densidade óptica *C. vulgaris* em 670 (Abs) nm em 20 dias de cultivo.



A Equação 10, apresentada na Figura 17a, descreve a modelagem de superfície de resposta para a densidade óptica *C. vulgaris* em 670 (Abs) nm, após 20 dias de cultivo, com extrato de levedura fixo em 30mg L⁻¹. Onde z= DO_{670nm}; x= concentração de vinhaça em % e y= pH. ($Z = -5,11 + 3,94 \cdot 10^{-2} \cdot x + 2,76 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 + 2,07 \cdot y - 1,34 \cdot 10^{-1} \cdot y^2 - 4,93 \cdot 10^{-3} \cdot x \cdot y - 2,93 \cdot 10^{-4} \cdot 30 \cdot x + 6,8 \cdot 10^{-3} \cdot 30 \cdot y - 3,25$).

A Equação 11, apresentada na Figura 17b, descreve a modelagem de superfície de resposta para a biomassa seca de *C. vulgaris* g L⁻¹ com concentração de vinhaça fixa em 40%, em 20 dias de cultivo. Onde z= DO_{670nm}; x= extrato de levedura e y= pH. ($Z = -5,11 + 2,07 \cdot y - 1,34 \cdot 10^{-1} \cdot y^2 - 1,44 \cdot 10^{-1} \cdot x + 1,20 \cdot 10^{-3} \cdot x^2 - 4,93 \cdot 10^{-3} \cdot 40 \cdot y - 2,93 \cdot 10^{-4} \cdot 40 \cdot x + 6,8 \cdot 10^{-3} \cdot y \cdot x + 2,02$).

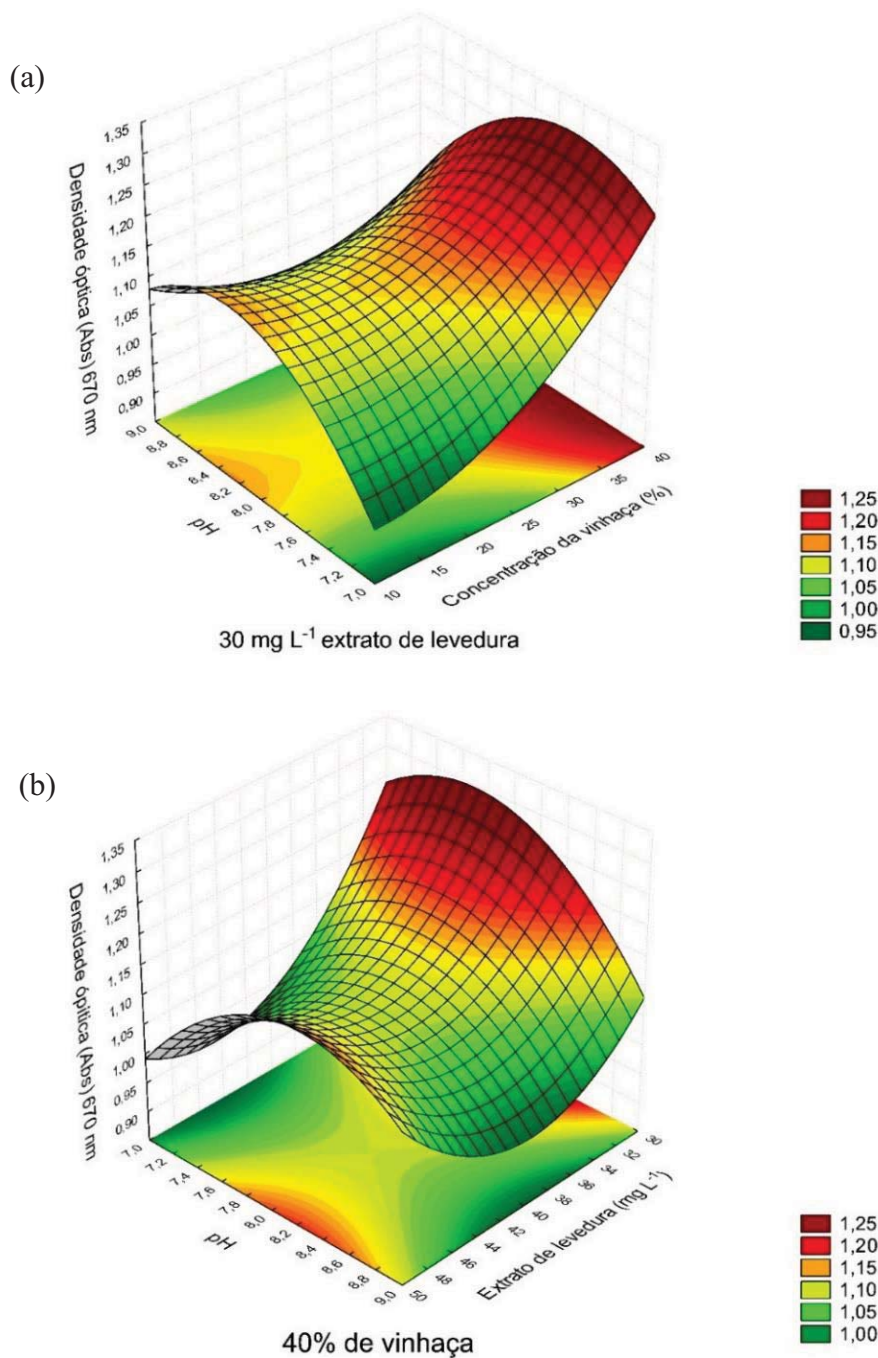
Com base nos resultados do planejamento fatorial para produção de biomassa se de *C. vulgaris* foi gerado a superfície de resposta. A superfície de resposta, (Figuras 17a e b), que descreve o comportamento da análise de densidade óptica do cultivo da *C. vulgaris* medida a 670 (Abs) nm, em função das variáveis analisadas.

Na Figura 17a é possível concluir que a maior taxa de absorbância foi correspondente 1,30 (Abs) 670 nm que corresponde a concentração de 40% de vinhaça e pH 8,0. Os menores valores para a taxa de absorbância foram obtidos nas faixas de concentrações de 10 e 25% de vinhaça e o pH entre de 7,0 a 9,0, correspondendo a 1,05 de (Abs) 670 nm.

Com base no resultado foi gerada a superfície de resposta com a concentração de vinhaça a 40% (Figura 17b), que descreve o comportamento da análise

de densidade óptica da *C. vulgaris* em 670 (Abs) correspondente 1,30 (Asb) 670 nm em concentração de 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH 8,0. Os menores valores para a análise de densidade óptica da *C. vulgaris* em 670 (Abs) nm em função das variáveis analisadas foram obtidos nas concentrações de 36 a 44 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH 9,0 com 1,00 de (Abs) 670 nm.

Figura 17 - Superfície de resposta densidade óptica de *C. vulgaris* em (Abs) 670 nm em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura *S. cerevisiae* fixo em 30 mg L⁻¹ e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura *S. cerevisiae*.



5.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DO MEIO DE CULTIVO DA *C. VULGARIS*

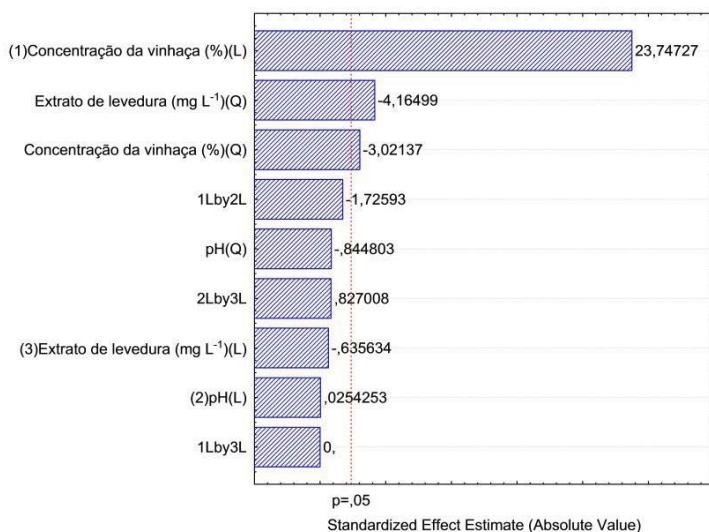
No experimento a condutividade elétrica final do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* na análise estatística indicou significativa ($p < 0,05$) para as variáveis de concentração da vinhaça e extrato de levedura (*S. cerevisiae*) (Figura 18). O coeficiente de regressão ($R^2 = 0,98842$) apresentado na Tabela 15, corresponde a 98,84% da variabilidade que pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 15 - Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para a condutividade final da *C. vulgaris*.

Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração da vinhaça (%) L+Q ⁽¹⁾	11,08	2	5,543	207,35	9,1 10 ⁻⁵
pH L+Q ⁽²⁾	0,013	2	0,006	0,258	0,784
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) L+Q ⁽³⁾	0,343	2	0,171	6,423	0,056
1*2	0,057	1	0,057	2,155	0,215
1*3	0,000	1	0,000	0,000	1,000
2*3	0,013	1	0,013	0,494	0,520
Lack of Fit	0,028	3	0,009	0,355	0,789
Pure Error	0,106	4	0,026		
Total SS	11,68	16			
$R^2 = 0,98842 / R^2 \text{ adj} = 0,97353$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

Figura 18 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a condutividade elétrica final do meio de cultivo da *C. vulgaris*, em 20 dias de cultivo.



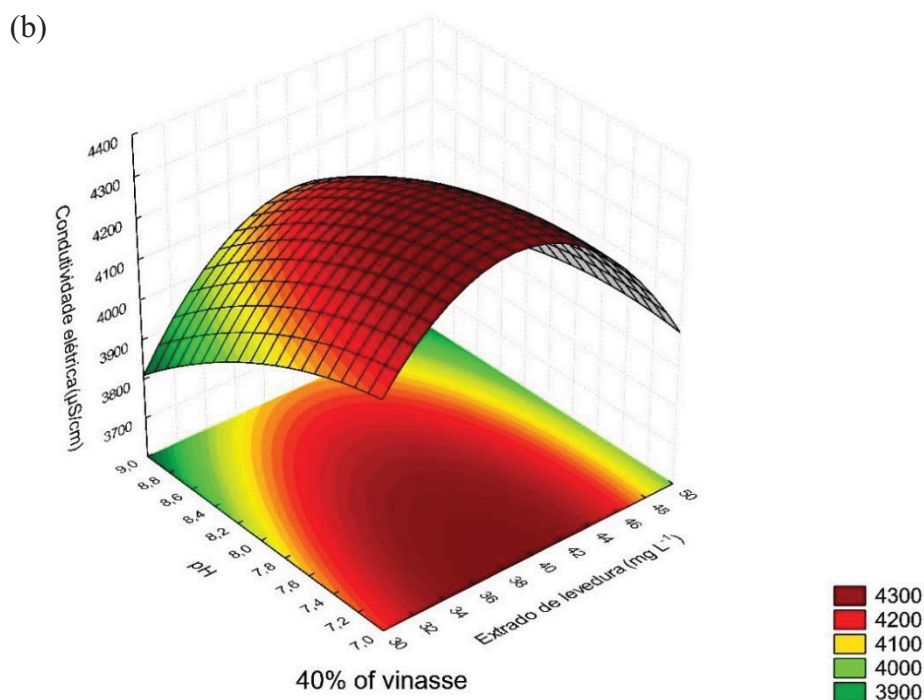
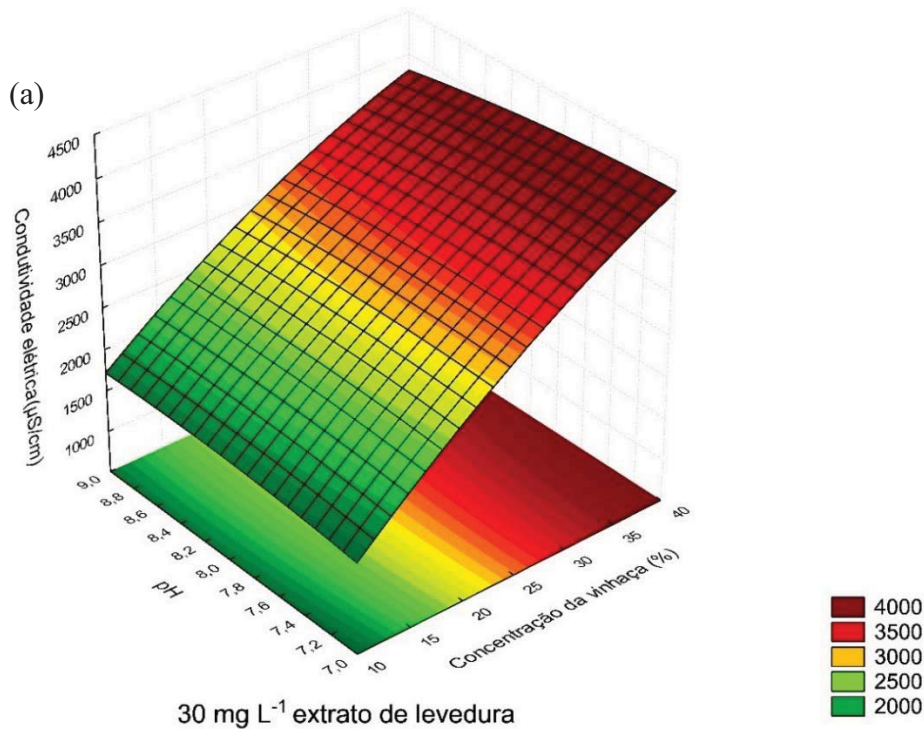
A Equação 12, apresentada no gráfico da Figura 19a, descreve a modelagem de superfície de resposta para a condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C (CE) final após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*, em meio com extrato de levedura fixo em 30mg L^{-1} . Onde $z = \text{CE final}$; $x = \text{concentração de vinhaça em \%}$ e $y = \text{pH}$. ($Z = -7,00 \cdot 10^{-1} + 1,87 \cdot 10^{-2} \cdot x - 9,1 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 + 8,87 \cdot 10^{-2} \cdot y - 5,72 \cdot 10^{-3} \cdot y^2 + 8 \cdot 10^{-4} \cdot x \cdot y - 2 \cdot 10^{-18} \cdot 30x + 5,75 \cdot 10^{-4} \cdot 30y + 2,76 \cdot 10^{-1}$)

A Equação 13, apresentada no gráfico da Figura 19b, descreve a modelagem de superfície de resposta para a condutividade elétrica (CE), após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*, com concentração de vinhaça fixa em 40%. Onde $z = \text{CE final}$; $x = \text{extrato de levedura}$ e $y = \text{pH}$. ($Z = -7,00 \cdot 10^{-1} + 8,87 \cdot 10^{-2} \cdot y - 5,72 \cdot 10^{-3} \cdot y^2 + 1,76 \cdot 10^{-2} \cdot x - 2,82 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 8 \cdot 10^{-4} \cdot 40y - 2 \cdot 10^{-18} \cdot 40x + 5,75 \cdot 10^{-4} \cdot y \cdot x + 6,03 \cdot 10^{-1}$).

Com base nos resultados do planejamento fatorial para produção de biomassa se de *C. vulgaris* foi gerado a superfície de resposta. A superfície de resposta descreve o comportamento da condutividade elétrica (CE) final da *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo em função das variáveis analisadas (Figuras 19a e b). Na Figura 19a é possível concluir que a maior (CE) final do meio de cultivo da *C. vulgaris* foi de $4000 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C , correspondendo a concentração de 40% de vinhaça e pH 7,0. Os menores valores (CE) final do meio de cultivo da *C. vulgaris* foram de $2000 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C foi nas faixas de concentrações de 10 e 15% de vinhaça e o pH entre de 7,0 a 9,0. Com base nos resultados foi gerado a superfície de resposta com a concentração de vinhaça a 40% (Figura 19b), descreve o comportamento da (CE) final da *C. vulgaris* onde a maior CE

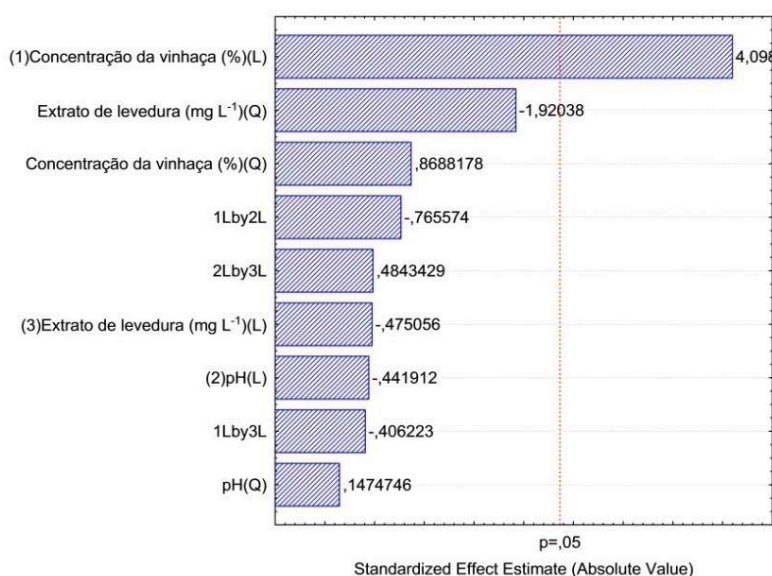
corresponde a $4300 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C em concentração de 40 mg L^{-1} de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH 7,0. O menor valor para (CE) final do meio de cultivo da *C. vulgaris* em função das variáveis analisadas foi obtido na concentração de 50 mg L^{-1} de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH 9,0 com $3900 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C .

Figura 19 - Superfície de resposta da condutividade elétrica do meio de cultivo, (a) extrato de levedura *S. cerevisiae* fixo em 30 mg L^{-1} , variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura (*S. cerevisiae*). Avaliação após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*.



A diferença de condutividade elétrica do meio antes e após o cultivo da *C. vulgaris* na análise estatística indicou significativa ($p < 0,05$) apenas para a variável de concentração da vinhaça (Figura 20). Os dados das análises de variância (ANOVA) para a diferença da condutividade elétrica estão dispostos no Anexo I.

Figura 20 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre a diferença da condutividade elétrica da *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo.

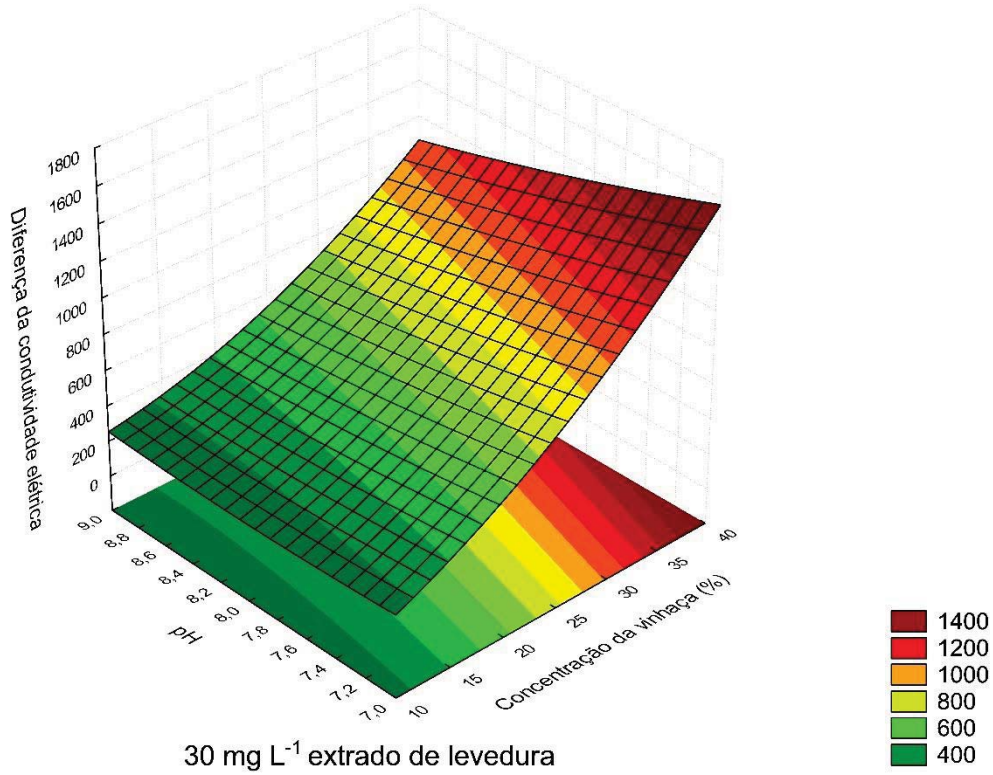


A superfície de resposta descreve o comportamento da condutividade elétrica (CE) da *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo em função das variáveis analisadas (Figuras 21a e b). Na Figura 21a é possível concluir que para a maior diferença na CE correspondente a $1400 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C na concentração de 40% de vinhaça e pH 7,0. Os menores valores de diferença da CE na *C. vulgaris* foram obtidos na faixa de pH 7,0 a 9,0 na concentração de 10% de vinhaça.

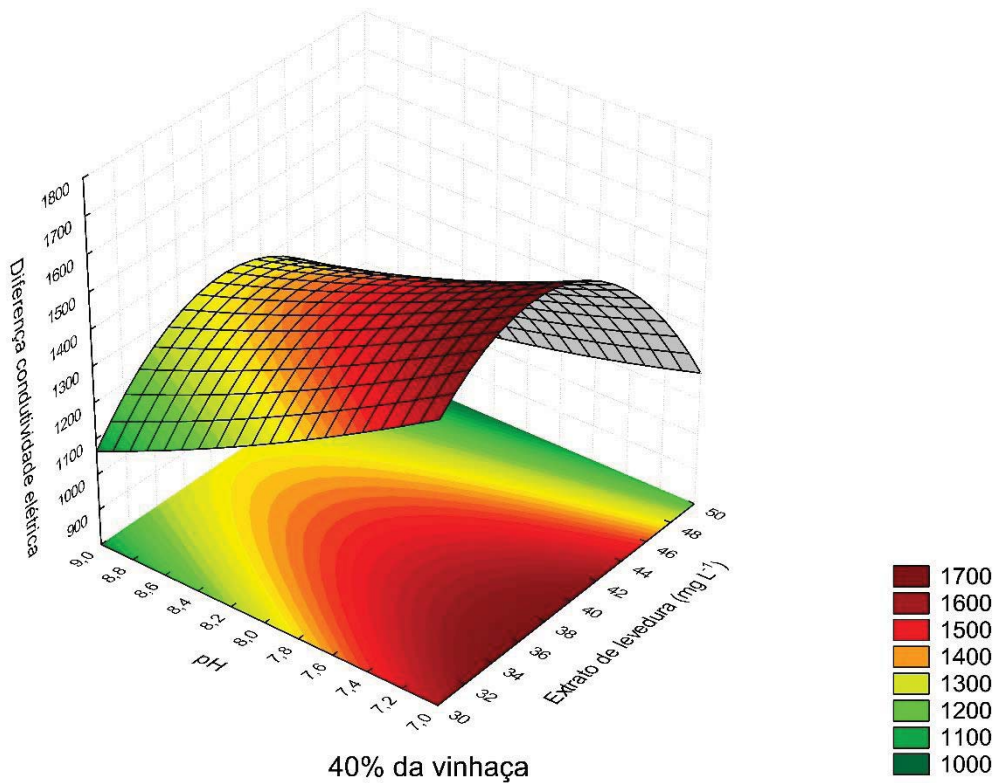
A partir do resultado da superfície de resposta conclui-se que, nas concentrações de vinhaça acima de 30% e com pH na faixa de 7,0 a 8,0, foram observados valores acima de $1200 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C (Figura 21a). Desta forma foi gerada a superfície de resposta com a concentração de vinhaça a 40% (Figura 21b), onde foi possível verificar que a maior diferença da CE está em pH 7 e adição de 40 mg L^{-1} de extrato de levedura. O menor resultado está com pH 9,0 e 50 mg^{-1} de extrato de levedura.

Figura 21 - Superfície de resposta para diferença da condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C) em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura *S. cerevisiae* fixo em 30 mg L^{-1} , variação no pH e concentração da vinhaça, (b) variação do pH e do extrato de levedura *S. cerevisiae* na concentração de 40% de vinhaça.

(a)



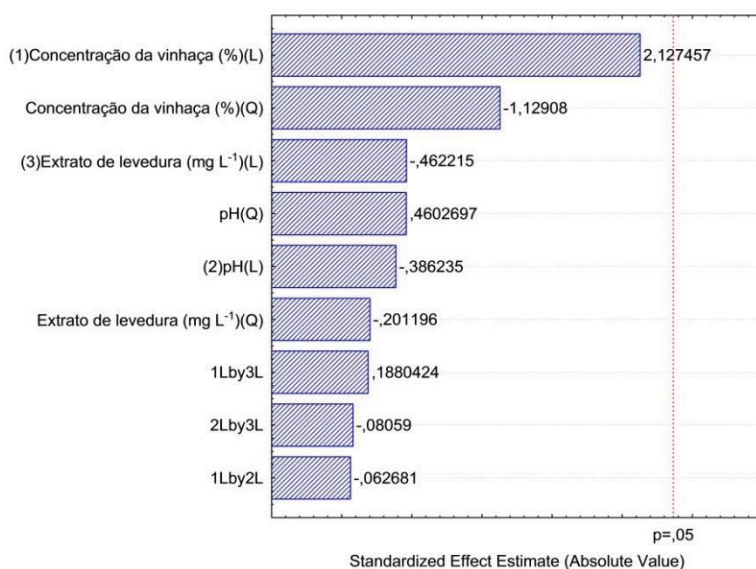
(b)



5.5 pH FINAL DO MEIO DE CULTIVO DA *C. VULGARIS*

A análise do pH final do meio de cultivo da microalga *C. vulgaris* pela análise estatística não indicou significância ($p < 0,05$) em nenhuma das variáveis (Figura 22). Os efeitos com maior influência e suas interações podem ser visualizados pelo gráfico de Pareto Figura 22, no qual o comprimento da barra é proporcional à importância do efeito, ultrapassado o nível de significância mínimo de 5%, valor mínimo do erro experimental.

Figura 22 - Representação gráfica do diagrama de Pareto para os efeitos dos parâmetros analisados sobre o pH final em 20 dias de cultivo.



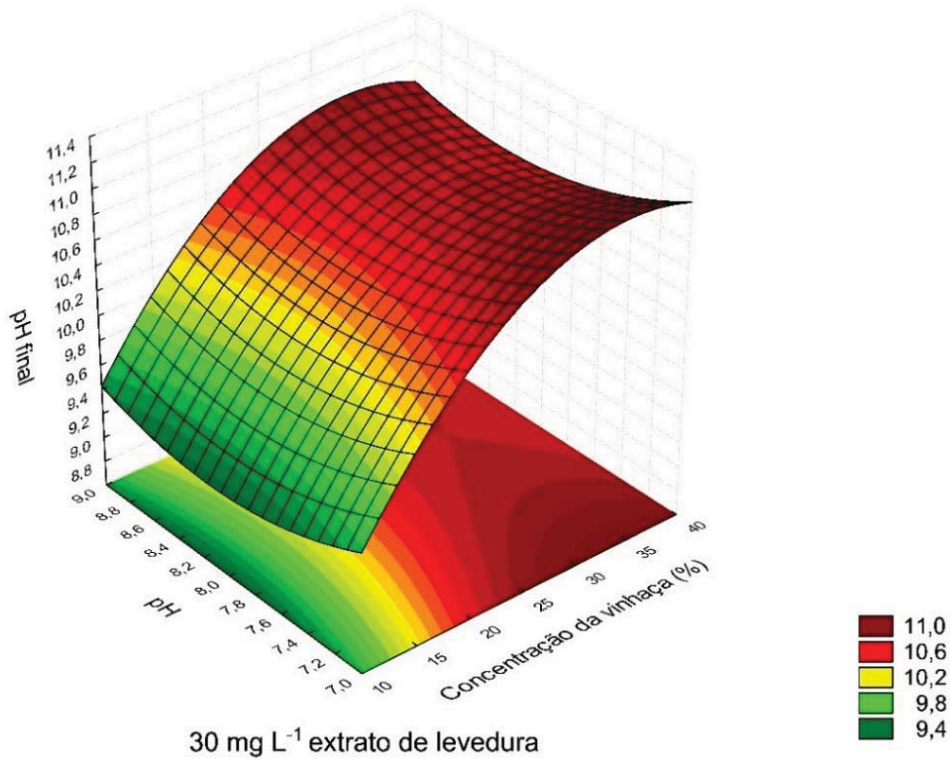
A superfície de resposta (Figuras 23a e b) descreve o comportamento do pH final do meio após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*, em função das variáveis analisadas. Para as variáveis a concentração de 40% de vinhaça e o pH 7,0 e o extrato de levedura fixo em 30 mg L⁻¹ é possível observar que pH final chegou a 11,4. O menor valor do pH final foi de 9,4 na faixa de concentração de 10% de vinhaça e o pH entre de 7,0 a 9,0 (Figura 23a).

Com base no resultado da otimização foi gerado o gráfico de superfície de resposta com a concentração de vinhaça a 40% fixa (Figura 23b), que descreve o comportamento do pH final após 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*, podendo observar que pH final chegou a 11,2, correspondendo a concentração de 40 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH 7. O menor valor de pH final em função das variáveis

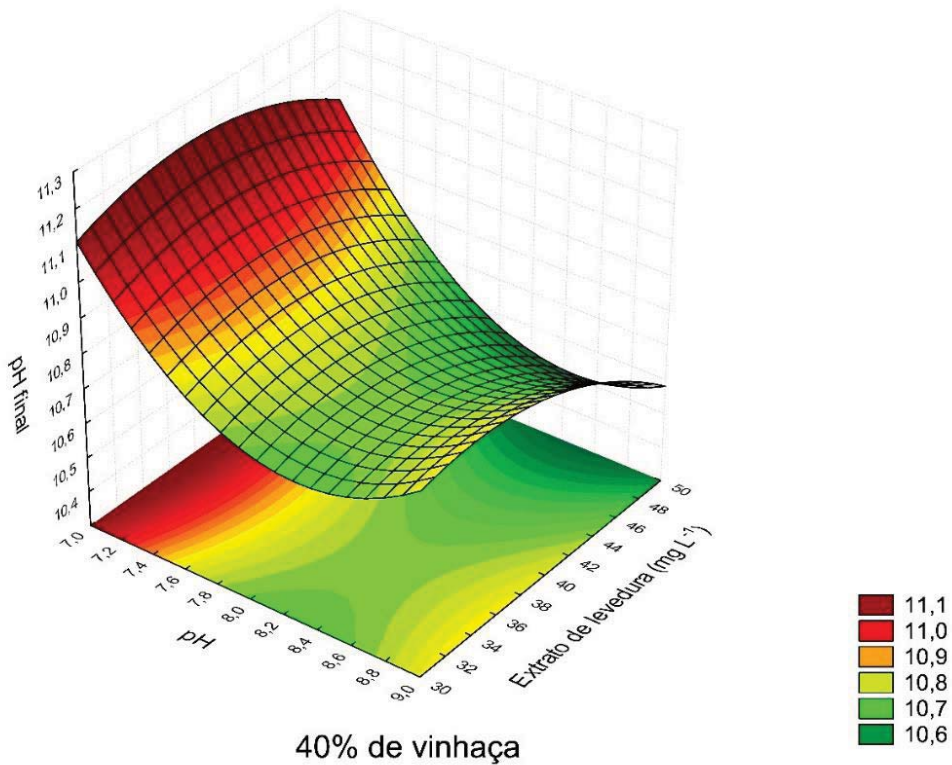
analisadas foi obtido na concentração de 50 mg L^{-1} de extrato de levedura *S. cerevisiae* e pH 8,4.

Figura 23 - Superfície de resposta pH final em 20 dias de cultivo, (a) extrato de levedura *S. cerevisiae* fixo em 30 mg L^{-1} e variação do pH e concentração da vinhaça, (b) vinhaça fixa em 40% e variação do pH e do extrato de levedura (*S. cerevisiae*).

(a)

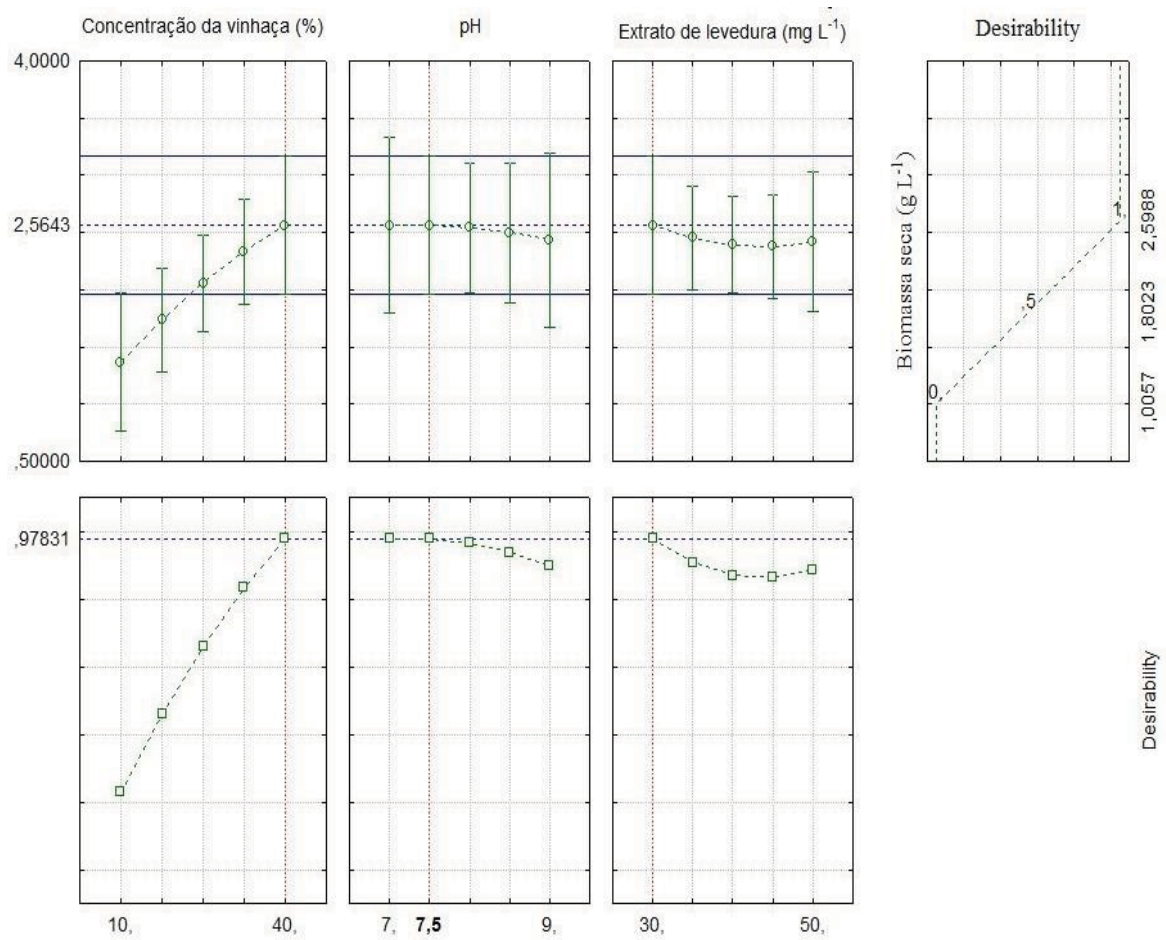


(b)



Para a produção de biomassa da microalga *C. vulgaris*, utilizando vinhaça, extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e o pH ideal. O ponto ótimo para estes parâmetros para realização do experimento é indicado na Figura 24, sendo 40% de vinhaça, 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH entre 7,0 e 7,5, indicando a confiabilidade da produção de biomassa seca *C. vulgaris* por g L⁻¹.

Figura 24 - Parâmetros desejáveis para pontos ótimos na produção de biomassa seca de *C. vulgaris*.



5.6 OTIMIZAÇÃO DO PLANEJAMENTO FATORIAL

5.6.1 Caracterização de Macro e Micronutrientes do Meio de Cultivo Inicial e do Meio de Cultivo Final no cultivo da *C. vulgaris* em 20 dias.

A Tabela 16 mostra as concentrações de macro e micronutrientes do meio (MH) no início e no final de 20 dias do cultivo da *C. vulgaris*.

Tabela 16 - Caracterização química do meio de cultivo (MH) inicial com 40% de vinhaça 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura em pH 7.0, do meio no final dos 20 dias de cultivo e consumo de nutrientes pela *C. vulgaris* em 20 dias.

Parâmetros	Concentração Inicial	Concentração Final	Consumo
Nitrogênio (N) mg L ⁻¹	125,76 ± 3,42	30,8 ± 5,13	94,96
Fósforo (P) mg L ⁻¹	40,32 ± 1,55	12,35 ± 0,62	27,97
Potássio (K) mg L ⁻¹	2033,74 ± 39,52	1855,90 ± 28,22	177,84
Cálcio (Ca) mg L ⁻¹	148,66 ± 7,88	73,49 ± 1,95	75,17
Magnésio (Mg) mg/L ⁻¹	51,30 ± 0,63	38,18 ± 3,82	13,12
Ferro (Fe) mg L ⁻¹	22,02 ± 0,45	7,35 ± 0,62	14,95
Manganês (Mn) mg L ⁻¹	2,24 ± 0,02	0,40 ± 0,03	1,84
Cobre (Cu) mg L ⁻¹	0,020 ± 0,005	0,00 ± 0,00	0,020
Zinco (Zn) mg L ⁻¹	1,049 ± 0,15	0,59 ± 0,008	0,451

Nas Figuras 25 e 26 é possível verificar as concentrações de nutrientes em (mg L⁻¹) do meio (MH) antes e após o cultivo e consumo de macros e micronutrientes pelo cultivo em *C. vulgaris* em 20 dias. Dos nutrientes analisados, apenas o cobre (Cu) foi consumido totalmente.

Figura 25 - Consumo de macro e micronutrientes em mg L⁻¹ no cultivo da *C. vulgaris* no experimento de otimização.

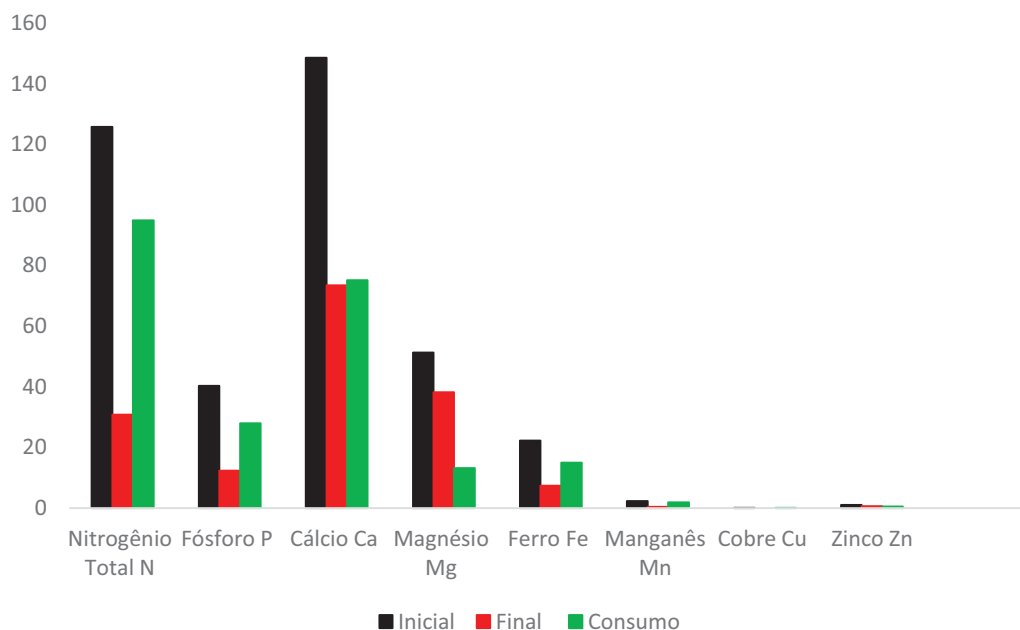
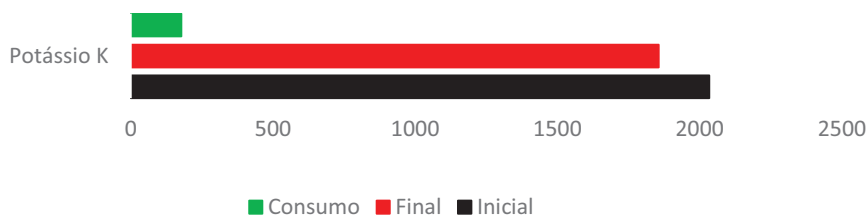


Figura 26 - Consumo de Potássio (K) mg L⁻¹ no cultivo da *C. vulgaris* no experimento de otimização.



A Tabela 17 apresenta a caracterização dos macros e micronutrientes da biomassa produzida a partir do cultivo da microalga *C. vulgaris* em vinhaça e extrato de levedura (*S. cerevisiae*).

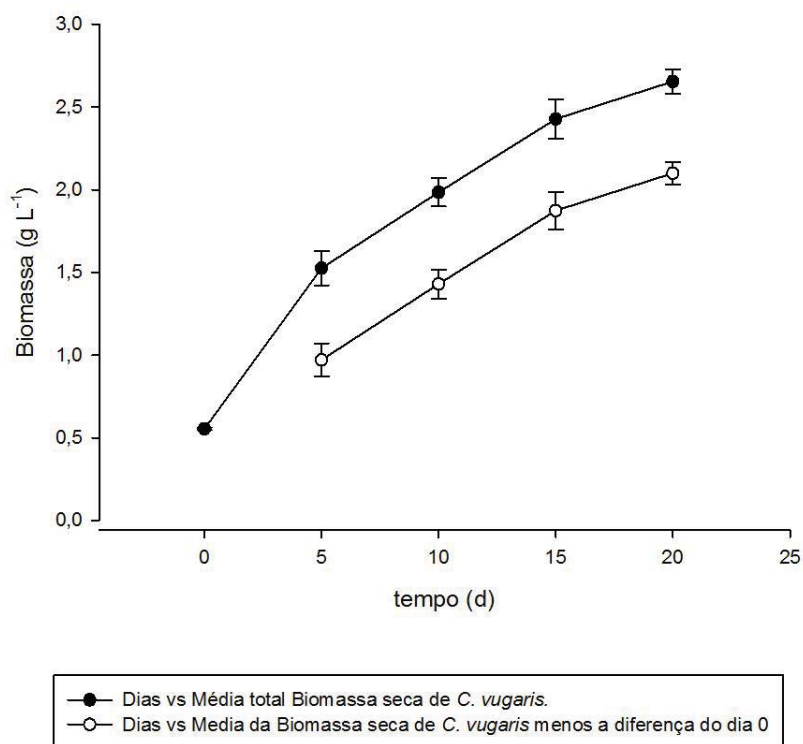
Tabela 17 - Caracterização macro e micronutrientes da biomassa seca da *C. vulgaris*.

Parâmetros	Concentração
Nitrogênio (N) g Kg ⁻¹	29,64
Fósforo (P) g Kg ⁻¹	20,17
Potássio (K) g Kg ⁻¹	122,86
Cálcio (Ca) g Kg ⁻¹	49,54
Magnésio (Mg) g Kg ⁻¹	6,22
Ferro (Fe) mg Kg ⁻¹	1477,30
Manganês (Mn) mg Kg ⁻¹	1730,50
Cobre (Cu) mg Kg ⁻¹	59,00
Zinco (Zn) mg Kg ⁻¹	752,50

5.6.2 Produção de Biomassa Seca

A Figura 27 mostra o comportamento da produção de biomassa seca de *C. vulgaris*, no experimento durante os 20 dias de cultivo, assim é possível verificar que a maior produção de biomassa obtida após os 20 dias de cultivo foi de $2,09 \text{ g L}^{-1} \pm 0,06$.

Figura 27 - Biomassa seca de *C. vulgaris* (g L^{-1}) em 20 dias de cultivo.



A diferença da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* nos intervalos de tempo analisado, do dia 0 até o dia 5, foi de $0,971 \text{ g L}^{-1}$. Do dia 0 até o dia 10 uma média de $0,451 \text{ g L}^{-1}$ foi observada. Do dia 10 até o dia 15 a produção de biomassa seca foi de $0,443 \text{ g L}^{-1}$ e do dia 15 até o dia 20 foi de $0,226 \text{ g L}^{-1}$. Estes resultados mostram que a maior produção biomassa seca de *C. vulgaris* foi verificado no intervalo de 0 a 5 dia.

No intervalo do dia 0 ($0,5545 \text{ g L}^{-1}$) ao 5 dia ($1,5255 \text{ g L}^{-1}$), a média da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* em dias foi de $0,194 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

(Eq. 3)

$$P_x = \frac{1,5255 - 0,5545}{5(\text{d})}$$

No intervalo do dia 0 (0,5545 g L⁻¹) aos 10 dias (1,984 g L⁻¹), a média da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* foi de 0,142 g L⁻¹ d⁻¹.

(Eq. 3)

$$P_x = \frac{1,984 - 0,5545}{10(d)}$$

No intervalo do dia 0 (0,5545 g L⁻¹) ao 15 dia (2,4275 g L⁻¹), a média da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* foi de 0,124 g L⁻¹ d⁻¹.

(Eq. 3)

$$P_x = \frac{2,4275 - 0,5545}{15(d)}$$

No intervalo do dia 0 (0,5545 g L⁻¹) ao 10 dia (2,654 g L⁻¹), a média da produção de biomassa seca de *C. vulgaris* foi de 0,104 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa de *C. vulgaris*.

(Eq. 3)

$$P_x = \frac{2,6540 - 0,5545}{20(d)}$$

Para o primeiro experimento, o cálculo da produtividade de biomassa seca de *C. vulgaris*, utilizando o melhor resultado no qual a biomassa inicial foi de 2,59 g L⁻¹ e a final de 3,1463 g L⁻¹ quando subtraindo a massa inicial de 0,5475 g L⁻¹, mostra que foram produzidos 0,129 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa seca de *C. vulgaris* na otimização.

(Eq.3)

$$P_x = \frac{3,1463 - 0,5475}{20(d)}$$

No segundo experimento na otimização, a maior produção de biomassa seca de *C. vulgaris* foi de 2,10 g L⁻¹, em 20 dias. A produtividade por dia foi de 0,104 g L⁻¹ d⁻¹ g L⁻¹ d⁻¹ no intervalo de 20 dias e de 0,194 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa seca de *C. vulgaris* no intervalo de 0 a 5 dias de cultivo. Na literatura, há relatos de cultivo bem-sucedido do cultivo de algumas estirpes de microalgas usando vinhaça. Marques *et al.*, (2013) cultivou *C. vulgaris* em 100% de vinhaça biodigerida de cana de açúcar e obteve um resultado de 0,07 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa seca. Ramirez *et al.*, (2014) cultivou *Scenedesmus sp.* em meio Guillard Suplemento médio com vinhaça in natura de cana de açúcar (50%) 0,024 g L⁻¹

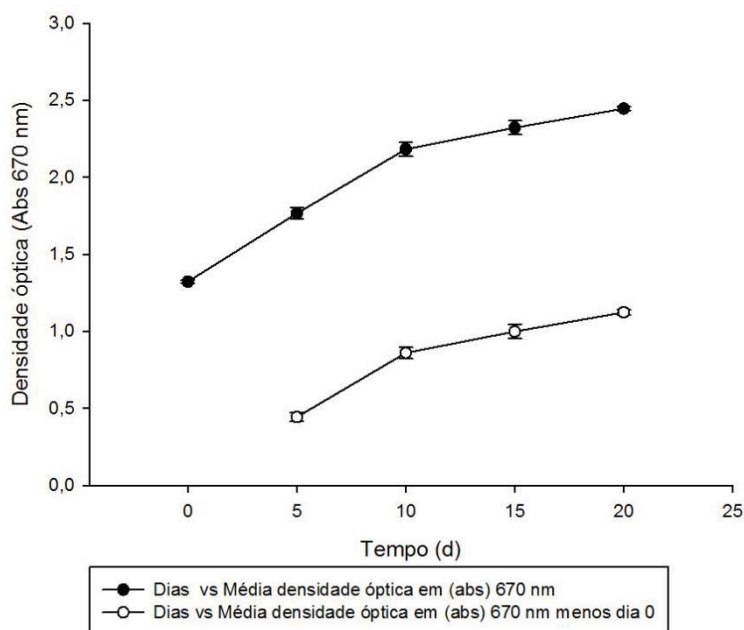
d⁻¹ de biomassa seca. Barrocal *et al.*, (2010) cultivou *Spirulina maxima* (SAG 49.88) em meio Schlösser suplementado com vinhaça de beterraba (5 g L⁻¹) e foi observado produtividade de biomassa seca de 0,150 g L⁻¹ d⁻¹.

Dos Santos *et al.*, (2016) cultivaram *Spirulina maxima* em meio AO suplementado com vinhaça de cana-de-açúcar a (1%) e obteve 0,047 g L⁻¹ d⁻¹ de biomassa seca. Santana *et al.*, 2017 cultivaram *Micractinium sp.* Embrapa|LBA32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 em vinhaça a 50% diluída em Água centrifugada a 4800 RCF durante 10 min e obtiveram 0,1777 g L⁻¹ d⁻¹ e 0,182 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, de biomassa seca. Santana *et al.*, (2017) cultivaram *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Micractinium sp.* Embrapa|LBA32 em 100% Vinhaça clarificada e obtiveram 0,222 gL⁻¹ d⁻¹ e 0,1644 gL⁻¹ d⁻¹, respectivamente, de biomassa seca.

5.6.3 Densidade Óptica *C. vulgaris* (Abs_{670 nm})

A Figura 28 mostra o comportamento da densidade óptica (Abs 670 nm) no experimento durante os 20 dias de cultivo. É possível verificar que o maior valor em (Abs) 670 nm foi obtido com 20 dias 1,02 ± 0,02. Nos intervalos de (0 a 5), (5 a 10), (10 a 15) e (15 a 20) as médias de (Abs) foram de 0,44 ± 0,02, 0,85 ± 0,03, 0,99 ± 0,04 e 1,02 ± 0,02, respectivamente.

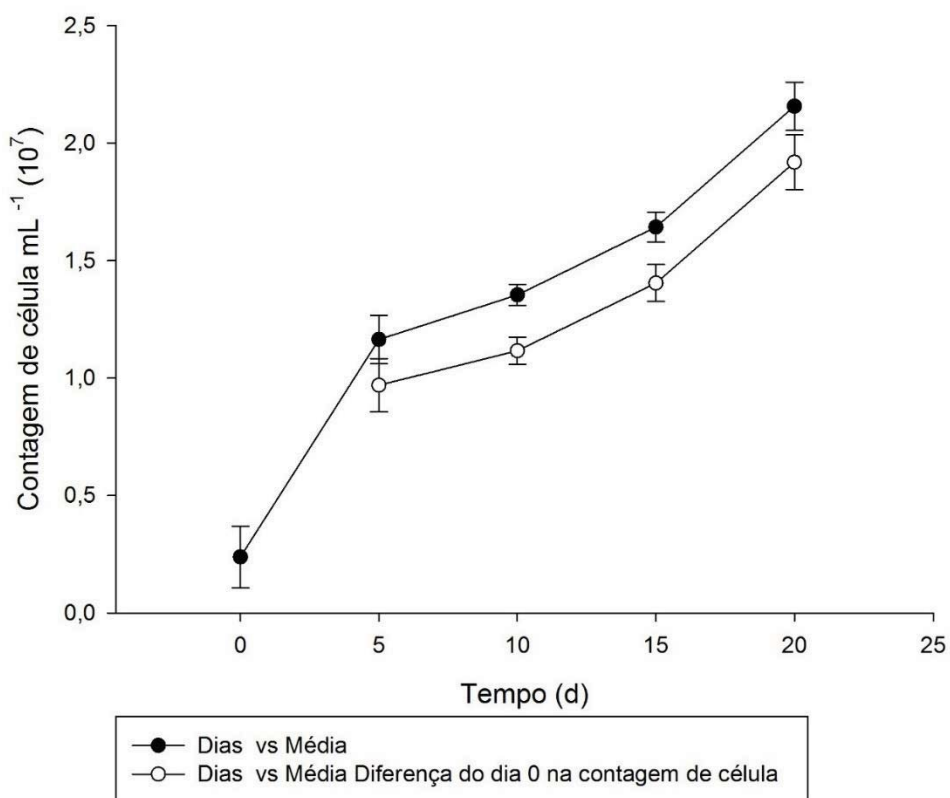
Figura 28 - Densidade óptica (Abs_{670nm}) da *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo.



5.6.4 Contagem de Célula *C. vulgaris*

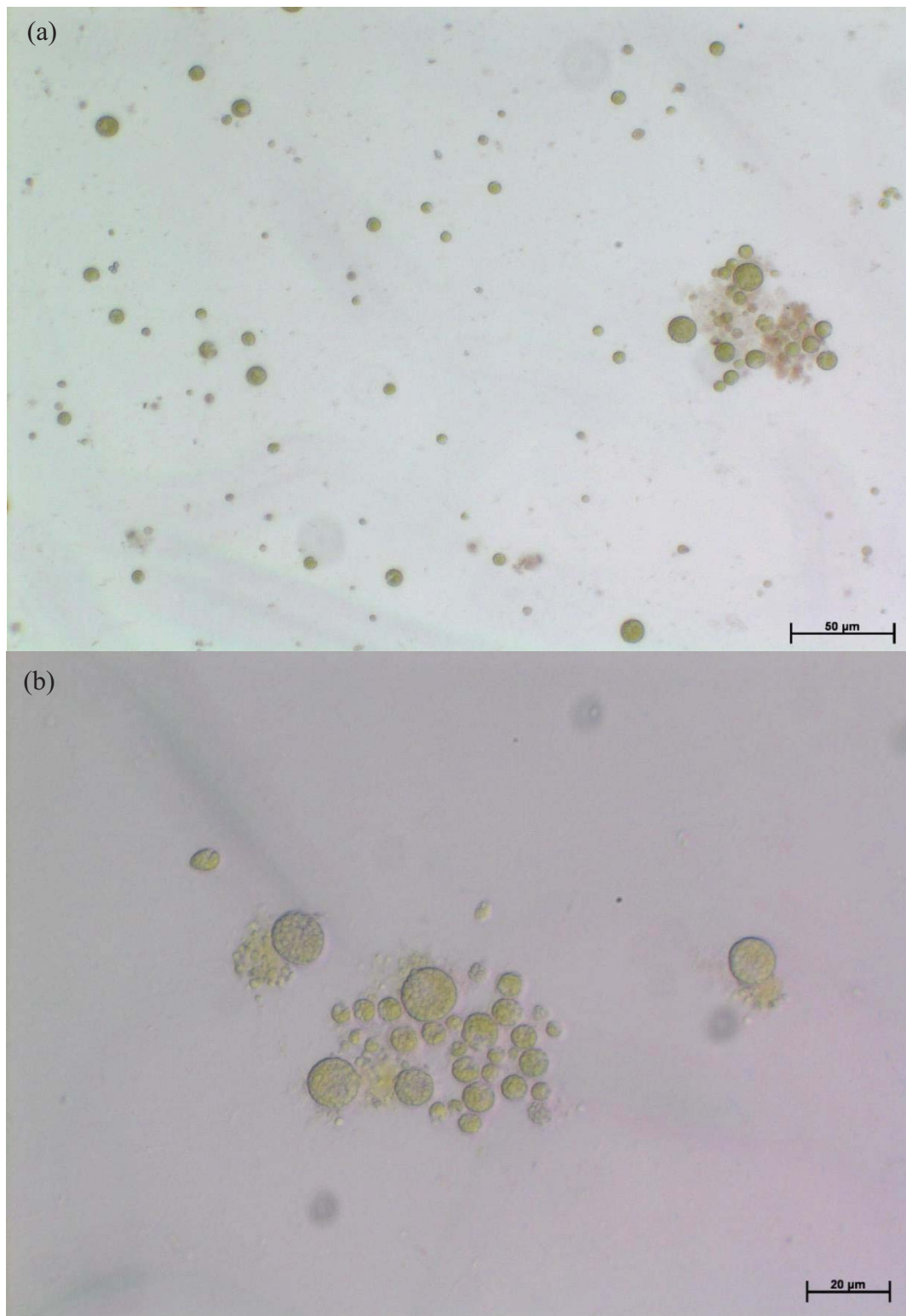
A Figura 29 mostra o comportamento da contagem de células da *C. vulgaris* mL⁻¹ durante os 20 dias de cultivo. O crescimento, em número de células mL⁻¹ de *C. vulgaris* nos intervalos de (5 a 10), (10 a 15) e (15 a 20) dias de cultivo, foi de 0,19 10⁷; 0,28 10⁷ e 0,51 10⁷, respectivamente. A contagem de célula foi superior no intervalo de 0 ao 5 dias, com média de aproximadamente 0,96 10⁷ células mL⁻¹. O intervalo em que ocorreu o maior acréscimo no número de células foi verificado de 0 a 5 dias.

Figura 29 - Número de células de *C. vulgaris*, contagem a cada 5 dias, durante 20 dias de cultivo.



A maior densidade celular foi verificada no 20º dia de cultivo com 2,15 10⁷ células mL⁻¹, na Figura 30, é possível visualizar as células do 20º dia de cultivo com auxílio de um microscópio óptico com aumento visual, de 20x e 50x, respectivamente.

Figura 30 - Fotomicrografia óptica das células *C. vulgaris* no vigésimo dia, em meio de cultivo otimizado, nas concentrações de 40% de vinhaça, 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura *S. cerevisiae* em pH 7,0 utilizando um microscópio óptico marca ZEISS modelo AX10 nas objetivas (a) de 20X e (b) 50X.



A Tabela 18 mostra os parâmetros de crescimento da *C. vulgaris* durante os 20 dias de cultivo.

Tabela 18 - Parâmetros de crescimento da *C. vulgaris* em 20 dias de cultivo.

Parâmetros de crescimento da <i>C. vulgaris</i>	Intervalo de tempo em (dias)				
	0	0-5	0-10	0-15	0-20
Densidade celular (10^7 células mL ⁻¹)	0,197	1,164	1,354	1,642	2,156
Tempo de duplicação T _d	-	1,95	3,59	4,90	5,79
Duplicação k	-	0,512	0,277	0,203	0,172
Taxa instantânea de crescimento μ d ⁻¹	-	0,354	0,192	0,141	0,119
Rendimento celular máximo R (10^7 células mL ⁻¹)	-	0,966	1,156	1,444	1,959

A taxa de crescimento específico r da *C. vulgaris* no experimento representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo em dia. Diferente de outros microrganismos, como as bactérias que podem se duplicam e espaço de tempo muito pequenos, em horas ou minutos, as microalgas apresentam velocidade de crescimento menor. Para microalgas, as duplicações geralmente acontecem em várias horas ou até em dias, isso dependendo das suas características fisiológicas e do tamanho das células (LOURENÇO, 2006; BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

O intervalo de tempo em dias é a forma mais comum de expressar a taxa de crescimento das microalgas. Isso mesmo nos casos de estirpes de microalgas que tem taxa de crescimento muito rápida ou muito lenta. Visto que o crescimento de microalgas resulta em divisão binária da célula mãe, é bastante conveniente expressar o crescimento de população de microalgas em logaritmos de base 2, dado que os números absolutos são nominalmente grandes, dada a variação exponencial de grandeza. Além disso a taxa de crescimento instantâneo pode ser convertida em duplicações por dia, variável representada por k (LOURENÇO, 2006; BARSANTI, L; GUALTIERI, 2014).

Entretanto, frequentemente o crescimento exponencial é muito mais intenso e pode haver duplicação populacional em intervalos de tempo menores do que um dia, a unidade básica de expressão de crescimento em cultivos de microalgas. Para melhor avaliar o processo de desenvolvimento das culturas, pode ser interessante estimar o tempo necessário para que a população duplique sua densidade. O tempo de duplicação (T_d), corresponde ao intervalo de tempo necessário para que ocorra a formação de uma nova

geração inteira de células no cultivo, ou seja, a duplicação da população (LOURENÇO, 2006; BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Neste trabalho, o melhor resultado para taxa de crescimento da *C. vulgaris* no experimento foi no intervalo de 0 a 5 dias, de 0,35 d⁻¹ valor similar aos encontrados na literatura para o crescimento de microalgas em vinhaça.

Matos e Bastos cultivaram *Desmodesmus* sp. em vinhaça e conseguiram uma taxa de crescimento específica de 0,15 h⁻¹, ao passo que, Marques *et al.*, (2013) relatam crescimento específico de 0,76 dia⁻¹ quando cultivaram a *C. vulgaris* em vinhaça biodigerida na concentração de 100%. Olguín *et al.*, (2015), cultivou *Neochloris oleoabundans* em um efluente biodigerido de vinhaça 6% e suplementando o meio com NaHCO₃ a 1 g L⁻¹, conseguiram taxa de crescimento de 0,28 d⁻¹.

Bonini (2016) fez um tratamento que reduz a turbidez e a toxicidade da vinhaça, e obteve uma taxa de crescimento específico de 1,24 d⁻¹ e 1,0 d⁻¹, em vinhaça a 30 e 40% com e sem adição de nutrientes, respectivamente. Candido e Lombardi (2017) cultivaram *C. vulgaris* em vinhaça filtrada biodigerida e conseguiram taxas de crescimento específico em vinhaça filtrada convencional 60% *C. vulgaris* de 1,6 d⁻¹ e em vinhaça biodigerida filtrada 80% de 1,5 d⁻¹.

5.6.5 Demanda Química de Oxigênio no Cultivo de *C. vulgaris*

Foi realizado a análise da DQO da vinhaça pura, do meio com sais hidropônicos puro, do meio inicial de cultivo utilizado na otimização com 40% de vinhaça, 30 mg L⁻¹ de estrado de levedura *S. cerevisiae* em pH 7 e do meio final dos 20 dias de cultivo (sobrenadante). Os resultados das análises da DQO estão na Tabela 19.

Tabela 19 - Resultados das análises de DQO.

Amostras analisadas	Concentração da DQO em mg L ⁻¹
Vinhaça	21805,56 ± 481,48
Meio com sais hidropônicos	420,56 ± 14,81
Meio inicial usado na otimização	5122,22 ± 74,07
Meio final do cultivo (Sobrenadante)	1427,78 ± 51,85

A redução percentual da redução do substrato da DQO da vinhaça quando diluída em 40% ao meio de cultivo utilizado na otimização foi de 76,50% conforme a equação.

$$E - S = \frac{21805,56 - 5122,22}{21805,56} \times 100 = 76,50\% \quad (\text{Eq. 2})$$

A redução percentual do substrato (DQO) do meio de cultivo otimizado com 40% de vinhaça, 30 mg L⁻¹ *S. cerevisiae* em pH 7 após o tratamento com o cultivo da *C. vulgaris* em 20 dias foi de 72,12% conforme a equação.

(Eq. 2)

$$E - S = \frac{5122,22 - 1427,78}{5122,22} \times 100 = 72,12\%$$

A redução percentual da DQO da vinhaça após o cultivo com o meio otimizado contendo 40% de vinhaça, 30mg L⁻¹ *S. cerevisiae* em pH 7 em 20 dias foi de 93,45% conforme a equação.

(Eq. 2)

$$E - S = \frac{21805,56 - 1427,78}{21805,56} \times 100 = 93,45\%$$

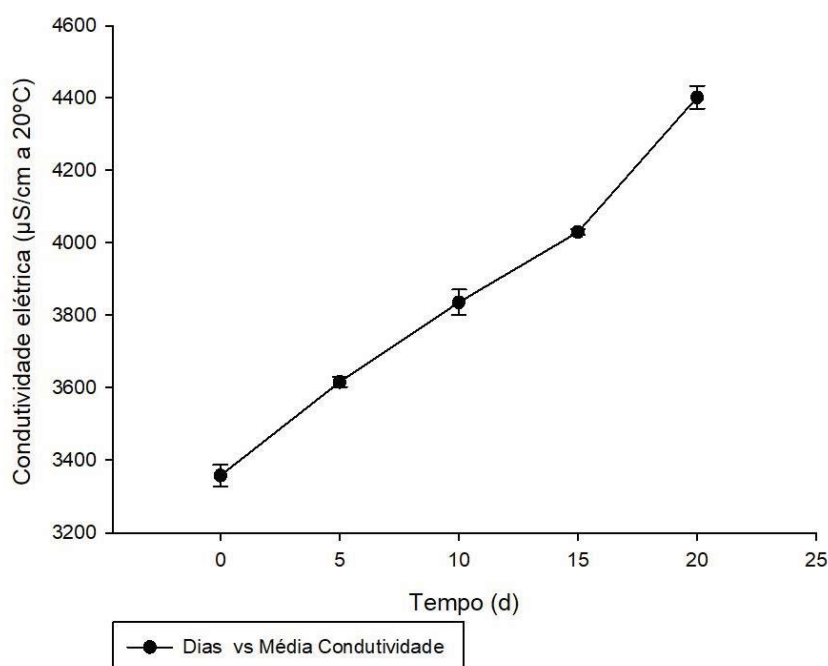
O resultado da análise da DQO mostra que o tratamento da vinhaça através do cultivo de *C. vulgaris* em meio com sais hidropônicos, 40% de vinhaça, 30mg L⁻¹ de extrato de levedura *S. cerevisiae* em pH 7 foi eficiente, reduzindo em aproximadamente 93,45% da DQO inicial da vinhaça.

De acordo com vários trabalhos o cultivo de microalgas reduz a DQO. Matos e Bastos (2015) cultivaram *Desmodesmus. sp.* em vinhaça e conseguiram uma taxa de remoção da DQO de 36,2 % em 30 horas de cultivo. Enquanto Feng *et al.*, (2011), avaliando a produção de lipídios por *Chlorella vulgaris* cultivada em água residuária sintética verificaram que, houve remoção de 86% de DQO. Candido e Lombardi (2017) cultivaram *C. vulgaris* vinhaça filtrada biodigerida e vinhaça filtrada convencional em 6 dias de cultivo, e conseguiram com o uma remoção total da DQO vinhaça de 77,22% e 83,28% respectivamente. Também com *C. vulgaris* cultivada em meio LC Oligo com 20% de vinhaça em 96 h, Souza (2016) observou uma remoção da DQO vinhaça de 24%. Bonini (2012) cultivou *Aphanothece microscopica Nägeli* e *C. vulgaris* em vinhaça por 30 h obteve uma remoção da DQO de 60,7% e 25% respectivamente.

5.6.6 Condutividade Elétrica

A condutividade representa a presença de concentrações iônicas, o aumento da variável indica que houve trocas iônicas entre o meio e as microalgas existentes. A Figura 31 mostra o comportamento da condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C do experimento durante os 20 dias de cultivo, assim é possível verificar que o maior valor foi obtido com 20 dias foi de $4.400 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C de CE, e a variação entre os intervalos de tempo analisado foi de 200 de CE no período do dia 0 ao 5, do 5 a 10 e do 10 a 15 dia. O maior acréscimo foi verificado no intervalo de 15 a 20 dias com CE de 400 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C . O aumento da condutividade indica que o meio de cultivo ainda apresenta sais e nutrientes disponíveis, possibilitando a reutilização do meio.

Figura 31 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C) do meio em durante 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*.



Bonini, (2016) cultivou *C. vulgaris* em vinhaça não se verificou uma tendência de redução ou aumento da condutividade elétrica, com oscilação dos valores durante o período total de cultivo. Ainda segundo Bonini, (2016) a redução da condutividade elétrica em função do tempo nos cultivos de *C. vulgaris* era esperada, visto que com o crescimento microalgal há consumo dos nutrientes do meio. Porém, nos

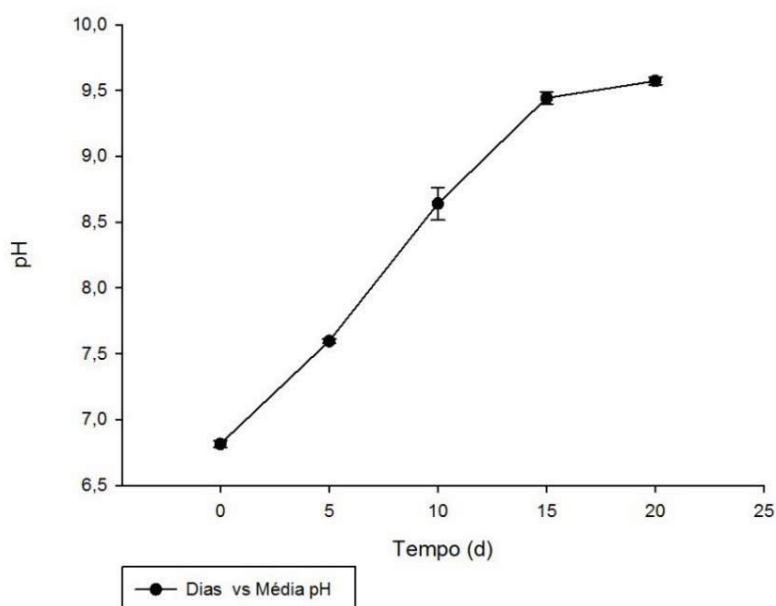
cultivos *C. vulgaris* em vinhaça, a não houve a redução da condutividade, fato que segundo Bonini pode ser atribuído ao consumo e produção de íons pela microalga.

Candido e Lombardi (2017) cultivaram a *C. vulgaris* em vinhaça convencionais e biodigerida tratadas por filtração e por centrifugação e observaram que nos experimentos, a condutividade permaneceu constantes em todos os tratamentos ao longo do período experimental. Ainda segundo os autores os meios com maior concentração de vinhaça consequentemente com maior de condutividade podem inibir o crescimento *C. vulgaris*, onde nos tratamentos com 90 e 100% vinhaça houve uma redução no crescimento celular e condutividade chegou a condutividade foi 12.500 13.000 mS cm⁻¹.

5.6.7 pH da *C. vulgaris*

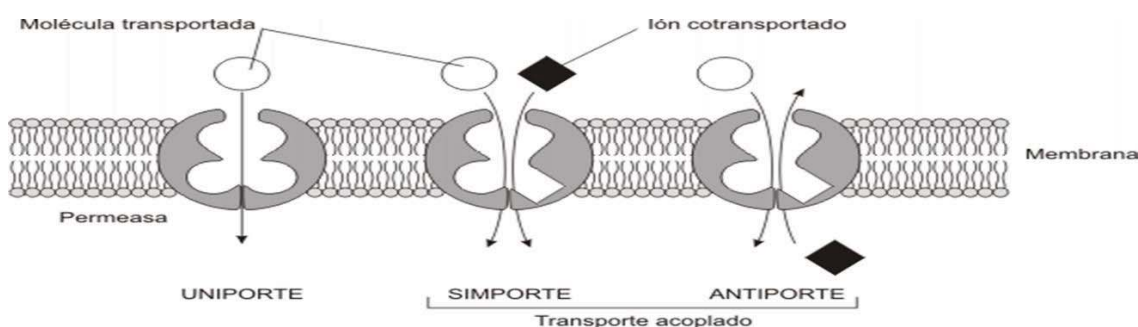
A Figura 32 mostra o comportamento do pH do experimento durante os 20 dias de cultivo, assim é possível verificar que o pH variou de pH 6,81 ± 0,03 até pH 9,57 ± 0,02 valor obtido após os 20 dias de cultivo. O comportamento do pH do dia 0 a até o dia 20 foi crescente tendendo a pH básico de acordo com o crescimento no número de células de *C. vulgaris* no cultivo.

Figura 32 - Valores de pH do meio durante 20 dias de cultivo da *C. vulgaris*.



A variação do pH básico pode ter relação com transporte ativo de alguns carboidratos específicos através da membrana celular pelo sistema simporte. Este sistema promove a alcalinização dos meios por uma absorção de prótons, acompanhada de transporte de carboidratos, diminuindo a concentração de H^+ livre no meio e, assim, a alteração do pH. Isso sugere que a vinhaça ou o extrato de levedura apresentam moléculas orgânicas específicas e *C. vulgaris* foi capaz de consumir material orgânico (MATOS, BASTOS, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2007).

Figura 33 - Proteínas transportadoras, sistema simporte.



Fonte: <http://proteinas-aminoacidos.blogspot.com.br/>

A relação entre nitrogênio nítrico $N-NO_3^-$ e amoniacal $N-NH_4^+$ no meio pode interferir no valor do pH durante o desenvolvimento da microalga. Quando a *C. vulgaris* consome somente o $N-NO_3^-$ como fonte de nitrogênio, o pH da solução tende a ficar básico. Entretanto, quando a fonte de nitrogênio é somente $N-NH_4^+$ o pH do meio tende a ficar ácido isso porque quando as microalgas, absorvem os íons do meio de cultivo (cátions) ocorre a liberação de outros íons, como H^+ e, desse modo, acidificam a solução. Agora quando absorvem ânions, as microalgas liberam HCO_3^- , deixando o pH da solução básico (COSTA, BARBOSA, GOMES, GATTI, 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa demonstrou que é possível a produção de biomassa a partir do cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça como meio nutricional. A partir das análises dos gráficos de superfície de resposta da produção de biomassa seca, fica nítido que a variável que mais influenciou no experimento foi a concentração da vinhaça em %.

A produção otimizada da biomassa da *C. vulgaris*, utilizando o planejamento fatorial com o cultivo em meio com sais hidropônicos contendo 40% de vinhaça e 30 mg L⁻¹ de extrato de levedura (*S. cerevisiae*) e pH entre a faixa e 7.0 a 7.5. As análises da condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C indicaram uma interação de troca iônica entre a biomassa da *C. vulgaris* com o meio em 20 dias de cultivo. A análise da condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C indica um aumento nos 20 dias, entretanto, as análises de macro e micronutrientes do meio de cultivo otimizado inicial e o meio de cultivo otimizado no final indicam o consumo dos nutrientes pela *C. vulgaris*, mostrando que esse aumento da condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C está relacionada às interações de troca iônica da *C. vulgaris* com o meio de cultivo.

No segundo experimento, as análises de contagem de células e de biomassa seca, indicam o crescimento constante da *C. vulgaris*, não havendo o término da fase log e a presença de nutrientes, após os 20 dias de cultivo. A otimização da produção de biomassa de *C. vulgaris* utilizando a vinhaça foi eficiente. Entretanto, as variáveis de pH não foram significativas para o experimento, tendo em vista que a *C. vulgaris* teve crescimento próximo em ambos os pHs 7, 8 e 9. Além disso, o ajuste do pH realizado com o reagente KOH a 1 molar, deixou o meio de cultivo muito escuro e adicionou mais potássio em um meio que já era rico desse nutriente. As análises de pH realizadas nos dois experimentos em 20 dias, mostram uma tendência do meio em alcalinizar, fato que pode estar relacionado a capacidade da *C. vulgaris* em consumir compostos orgânicos presentes na vinhaça ou no extrato de levedura a través do sistema simporte, processo que absorve os prótons, acompanhado do transporte dos carboidratos pela membrana celular da *C. vulgaris*, diminuindo a concentração de H⁺ livre no meio.

Outra questão importante para o cultivo de *C. vulgaris* em efluentes líquidos, é a redução total da DQO, com uma mitigação de 93,45% na DQO da vinhaça, possibilitando simultaneamente a produção de biomassa de *C. vulgaris* e o tratamento desse efluente. Assim, o cultivo da *C. vulgaris* em vinhaça é uma alternativa promissora,

possibilitando a redução dos custos com produção de biomassa, contribuindo com o tratamento do efluente, melhorando ainda mais a qualidade e a sustentabilidade da indústria sucroenergética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C.; v.1. **Potencialidades e desafios do cultivo - v.2. Produção de biomassa e coprodutos - v.3. Coleção IPR de microalgas. Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo.** Londrina-PR IAPAR, 2014.

ANP.; **Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis**, Boletim mensal de combustíveis renováveis, 2017.

ANTUNES, R.; SILVA, I. C.; **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis.** 2010. Instituto nacional da propriedade industrial INPI. Portugal, 2010.

APHA. **Standard methods. 19th Edition. American Public Health Association**, Washington, DC. 2005.

ARANDA, D. A. G., GOMES, M., VIEGAS, C. V.; **Microrganismos em agroindústria: Microrganismos para agroenergia são estudados em diversas unidades da Embrapa.** Embrapa agroenergia em revista, n. 5, 2012.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **General overview. In: Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology.** Boca Raton: Taylor & Francis, Second edition. 2014. p. 1-34.

BELL, T. A. S.; PRITHIVIRAJ, B.; WAHLEN, B. D.; FIELDS, M. W. PEYTON, B. M. A Lipid-Accumulating Alga Maintains Growth in Outdoor, Alkaliphilic Raceway Pond with Mixed Microbial Communities. **Journal Frontiers in Microbiology**, v. 6 p. 1480, 2016.

BEN. **Balço energético nacional.** Consumo de energia nos transportes – matriz, Síntese do relatório final 2017.

BHOLA, V., DESIKAN, R., SANTOSH, S. K., SUBBURAMU, K., SANNIYASI, E., BUX, F.; Effects of parameters affecting biomass yield and thermal behaviour of *Chlorella vulgaris*. **Journal Biosci Bioeng**, 2011;111:377–82.

BONINI, M. A.; **Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos Toxicológicos e microbiológicos.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. São Carlos -sp, 2016.

BONINI, M. A.; **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nögeli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como requisito para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente. Araras-sp, 2012.

BOROWITZKA, M. A. **Culturing Microalgae in Outdoor Ponds**. In ANDERSEN, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*, cap. 14. p. 205-216, 2005.

BRASIL.; Lei 11097, de 13 de fevereiro de 2005. **Presidência da República**. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos, Brasília (DF), 2005.

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. **Diário Oficial da União, Brasília**, DF, 2016.

BRENNAN, L., OWENDE, P.; Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 14, 557–577. 2010

CANDIDO, C; LOMBARDI, A.T.; LIMA, M.I.S.; Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça filtrada. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, 35:55–62, 2015.

CANDIDO, C; LOMBARDI, A.T.; Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, Vol. 29, Ed 1, pp 45–53. 2017.

CETESB.; Dispõe sobre a homologação da 2ª versão da 3ª edição da **Norma Técnica P 4.231 - Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola – outubro/2014**. Decisão de diretoria Nº 045/2015/C, de 12 de fevereiro de 2015.

CHAGAS, M. F., CAVALETT, O., KLEIN, B. C., MACIEL FILHO, R., BONOMI. A.; Life cycle assessment of technologies for greenhouse gas emissions reduction in sugarcane biorefineries. **Journal Chem Eng Trans**, 50:421–6. 2016.

CHIARAMONTI, D. **Overview of current technology routes for algae-derived bioenergy products. Integration with wastewater treatment**. State of Technology Review. *Algae Bioenergy*. Cap. 3.5 Task 39. 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Journal Biotechnol Adv**, 2007; 25: 294–306.

CHRISTOFOLETTI, C. A., ESCHER, J.P., CORREIA, J.E., MARINHO, J.F.U., FONTANETTI, C.S., Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Journal Waste Manag.** 33 (12), 2752–2761, 2013.

CONAB **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. – v. 1 – Brasília: Conab, 2016 v.

COSTA, A.; BARBOSA, G. M. C.; GOMES, P. C.; GATTI, I. C. A.; **Potencialidades e limitações do uso de resíduos agroindustriais no cultivo de microalgas para produção de biodiesel**. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C.; (Ed.) *Microalgas de águas continentais: Produção de biomassa e coprodutos*. ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). Londrina: IAPAR, Cap. 2 v.2, 2014

DOS SANTOS, R. R., ARAUJO O de, Q., DE MEDEIROS, J. L., CHALOUB, R. M., Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Journal Bioresour Technol**, 204, 38–48, 2016.

DUTTA, S.; NETO, F.; COELHO, M. C.; Microalgae biofuels: A comparative study on techno-economic analysis & life-cycle assessment. **Journal Algal Research**, v 20 p. 44-52, 2016.

EIA. U.S. **Energy Information Administration**. International Energy Outlook 2016. Disponível em: <[http://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484\(2016\).pdf](http://www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2016).pdf)>. Acessado em 01 Jan. 2017.

EPE.; **Empresa de Pesquisa energética**; Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis 2015. Ministério de minas energia 2017.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S.; Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v.36, n.3, p.437-448. 2013.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 101–105, 2011.

GROBBELAAR, J. U. **Algal nutrition: Mineral nutrition**. RICHMOND, A. (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 97-113.

KAJIWARA, S., YAMADA H., NARUMASA O., Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942, **Journal Energy Conversion and Management**, n.38, p.529–532, 1997.

KLEIN, B. C., BONOMI, A., MACIEL FILHO, R.; Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v 82 p. 1376-1392. 2017

LARDON, L., HÉLIAS A., SIALVE, B., STEYERS, J.P., BERNARD, O. (2009) Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. **Journal Environ Sci Technol**, 43, 6475-6481.

LAURENS, L. M. L.; CHEN-GLASSER,; **Overview of Current Technology Routes for Algae-Derived Bioenergy Products**. State of Technology Review. Algae Bioenergy. Cap. 3.1 – 3.6. Task 39. 2017.

LAURENS, L. M. L.; CHEN-GLASSER, M.; McMILLAN, J. D.; A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. **Journal Algal Research**, v 24 p. 261-264. 2017.

LIMA, L. F.; MAROUBO, L. A.; VIEIRA, A. L.; **Produção de biomassa e coprodutos. Vantagens e desafios da produção de biodiesel de microalgas**. ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: IAPAR, v.2, 2014.

LOURENÇO, S. O.; **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, 2006.

MARQUES, S. S. I., Nascimento, I. A., de Almeida, P.F., Chinalia, F.A., 2013. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Journal Appl. Biochem. Biotechnol**, 171 (8), 1933–1943.

MARCHELLO, A.E.; LOMBARDI, A.T.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; SOUZA, C.W.O. (2015). Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, 46 (1), 75-84.

MATTOS, L. F. A., BASTOS, R. G.; COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Journal Desalination and Water Treatment**, V 57 p. 1-9 2015.

NETO, A. E.; **Estado da Arte da Vinhaça**. UNICA. p. 1-31, Piracicaba-SP, 2016.

OLIVÉRIO, J, L., BARREIRA, S.T., RANGEL. S. C. P.; **Integrated biodiesel production in barralcool sugar and alcohol mill**. In Luis Augusto Barbosa Cortez (Coord.). Sugarcane bioethanol - R&D for Productivity and Sustainability, São Paulo: Editora Edgard Blücher, p. 661-678, 2014.

OLGUÍN, E. J.; DORANTES, E.; CASTILLO, O. S.; HERNÁNDEZ-LANDA, V. J.; Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of Applied Phycology**, 2015.

PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA M. E. V.; Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n 3, 1998.

PEREIRA, E. B, MARTINS, F. R, ABREU, S. L, RÜTHER, R.; **Brazilian atlas of solar energy**, 1st ed.. São José dos Campos: INPE; 2006.

QUEIROZ, M. I.; LOPES, E. J.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. G.; GOLDBECK, R.; The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, **Journal Bioresour. Technol**. 98 (2007) 2163–2169.

RAMALHO, F. M. P.; **Avaliação Ambiental do uso de Microalgas na Produção de Biodiesel: Revisão Bibliográfica Sistemática**. Dissertação para obtenção de título Mestre em Energia e Bioenergia Lisboa, 2013.

RAMIREZ, N. N. V., FARENZENA, M., TRIERWEILER, J. O., 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Journal Braz. Arch. Biol. Technol**. 57 (5), 630–635.

RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture**. Biotechnology and applied phycology. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 125-178.

RICHMOND, A.; **Handbook of microalgal culture: Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. Mass Cultivation and Processing of Microalgae. Applied phycology and biotechnology /** edited by Amos Richmond and Qiang Hu. – Second edition, 2014.

ROGERS, J. N.; ROSENBERG, J. N.; GUZMAN, B. J.; OH VICTOR, H.; MIMBELA, L. E.; GHASSEMI, A.; BETENBAUGH, M. J.; OYLER, G. A. DONOHUE, M. D.; A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algal biofuel production at commercial scales. **Journal Algal Research** v.4, p. 76-88, 2014.

SANTANA, H.; CEREIJO, C.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R. C.; SOARES, I. P.; SILVA, F. C. P.; SABAINI, A. P. S.; SIQUEIRA, F. G. BRASIL, B. S. A. F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Journal Bioresource Technology**. 133–140. (228) 2017.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SILVA, F. C da. **Manual de Análises Químicas do Solo, Plantas e Fertilizantes**. EMBRAPA. 1999.

SILVA, H. R.; **Aplicação de métodos para concentração da biomassa de microalgas cultivadas em meio líquido**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

SILVA, H. R. **Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemas de cultivo**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Londrina, 2016.

SILVA, H. R., PRETE, C. E. C.; ZAMBRANO, F.; MELLO, V. H.; TISCHER, C. A and ANDRADE, D. S.; Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. **Journal AMB Express**, p. 1-11, 2016.

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

SOUZA, 2016, A. C. M.; **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes de luz**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ecologia e Recursos Naturais. São Carlos -sp, 2016.

STATSOFT, I. **Statistica** (data analysis software system), version 7. 2007.

- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, p. 3-19. 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre. Artmed. 12. ed. Cap. 12 p. 320-336. 2017.
- UNICA. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**: Respostas as questões mais frequentes. São Paulo, SP. 2007.
- UNICA.; 2016. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2015/2016**. UNICA, 2016.
- UGGETTI, E.; PASSOS, F.; SOLÉ, M.; GARFI, M.; FERRER, I.; Recent Achievements in the Production of Biogas from Microalgae. **Journal Waste Biomass Valor**, v 8 p.129-139, 2017.
- WINCK, F. V.; RIAÑO-PACHÓN, D. M.; FRANCO, T. T.; Editorial: Advances in Microalgae Biology and Sustainable Applications. **Journal: Frontiers in Plant Science**. v 7, 2016.
- ZITTELLI, G. C., BIONDI, N., RODOLFI, L., TREDICI, M. R.; Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. Mass Cultivation and Processing of Microalgae. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology** / edited by Amos Richmond and Qiang Hu. –Second edition, 2014.

ANEXO I

O coeficiente de regressão para a diferença da condutividade elétrica é ($R^2 = 0,76266$) Tabela 20, corresponde que 76,26% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 20 - Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta diferença de condutividade da *C. vulgaris*.

Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração da vinhaça (%) L+Q ⁽¹⁾	1,797	2	0,898	6,498	0,055
pH L+Q ⁽²⁾	0,022	2	0,011	0,080	0,924
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) L+Q ⁽³⁾	0,400	2	0,200	1,448	0,336
1*2	0,060	1	0,060	0,433	0,546
1*3	0,016	1	0,016	0,122	0,744
2*3	0,024	1	0,024	0,173	0,698
Lack of Fit	0,163	3	0,054	0,394	0,764
Pure Error	0,553	4	0,138		
Total SS	3,020	16	0,898		

$R^2 = 0,76266 / R^2 \text{ adj} = 0,4575$

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

A Equação 14 descreve a modelagem de superfície de resposta para a diferença da condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 20°C (CE) final em 20 dias de cultivo com extrato de levedura fixo em 30mg L⁻¹ em 20 dias de cultivo. Onde z= Diferença na CE; x= concentração de vinhaça em % e y= pH. ($Z = -1,81 \cdot 10^{-1} + 8,34 \cdot 10^{-3} \cdot x + 6,02 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 5,23 \cdot 10^{-2} \cdot y + 2,3 \cdot 10^{-3} \cdot y^2 - 8,16 \cdot 10^{-4} \cdot x \cdot y - 4,33 \cdot 10^{-5} \cdot 30x + 7,7510^{-4} \cdot 30y + 2,79 \cdot 10^{-1}$) Apresentada nas Figura 21a.

A Equação 15 descreve a modelagem de superfície de resposta para a diferença da condutividade elétrica (CE) final em 20 dias de cultivo, com concentração de vinhaça fixa em 40%. Onde z= Diferença na CE; x= extrato de levedura e y= pH. ($Z = -1,81 \cdot 10^{-1} - 5,23 \cdot 10^{-2} \cdot y + 2,3 \cdot 10^{-3} \cdot y^2 + 1,83 \cdot 10^{-2} \cdot x - 2,99 \cdot 10^{-4} \cdot x^2 - 8,16 \cdot 10^{-4} \cdot 40y - 33 \cdot 10^{-5} \cdot 40x + 7,75 \cdot 10^{-4} \cdot y \cdot x + 4,30 \cdot 10^{-1}$) Apresentada nas Figura 21b.

O coeficiente de regressão para análise de pH ($R^2 = 0,47869$) Tabela 21, corresponde que 47,86% da variabilidade pode ser explicado pelo modelo e melhor previsão de resposta (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 21 - Análise de variância ANOVA de acordo com a resposta para o pH final da *C. vulgaris*.

Factor	SS ^a	d.f. ^b	MS ^c	F - value	p - value
Concentração da vinhaça (%) L+Q ⁽¹⁾	7,234	2	3,617	2,966	0,162
pH L+Q ⁽²⁾	0,450	2	0,225	0,184	0,838
Extrato de levedura (mg L ⁻¹) L+Q ⁽³⁾	0,316	2	0,158	0,129	0,881
1*2	0,004	1	0,004	0,004	0,952
1*3	0,044	1	0,044	0,036	0,858
2*3	0,008	1	0,008	0,006	0,938
Lack of Fit	3,853	3	1,284	1,053	0,461
Pure Error	4,876	4	1,219		
Total SS	16,74	16			
$R^2 = 0,47869 / R^2 \text{ adj} = 0,0$					

^a Soma dos quadrados; ^b Graus de liberdade; ^c Quadrado Médio.

A Equação 16 descreve a modelagem de superfície de resposta para a análise de pH final em 20 dias de cultivo com extrato de levedura fixo em 30mg L⁻¹ em 20 dias de cultivo. Onde z= pH final; x= concentração de vinhaça em % e y= pH. ($Z = 22,44 + 1,83 \cdot 10^{-1} \cdot x - 2,73 \cdot 10^{-3} \cdot x^2 - 3,92 \cdot y + 2,505 \cdot 10^{-1} \cdot y^2 - 2,33 \cdot 10^{-3} \cdot x \cdot y + 7 \cdot 10^{-4} \cdot 30x - 4,5 \cdot 10^{-3} \cdot 30y + 1,65$) Apresentada nas Figura 23a.

A Equação 17 descreve a modelagem de superfície de resposta para a análise de pH final em 20 dias de cultivo, com concentração de vinhaça fixa em 40%. Onde z= pH final; x= extrato de levedura e y= pH. ($Z = 22,44 \cdot 9,22 \cdot 10^{-1} \cdot x + 2,50 \cdot 10^{-1} \cdot x^2 + 8,78 \cdot 10^{-2} \cdot y - 1,09 \cdot 10^{-3} \cdot y^2 - 2,33 \cdot 10^{-3} \cdot 40x + 7 \cdot 10^{-4} \cdot 40y - 4,5 \cdot 10^{-3} \cdot x \cdot y + 2,95$) Apresentada nas Figura 23b.

ANEXO II

ANEXO A - Resumo expandido VI SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA SIMBBTEC 20 a 22 de setembro de 2017, Londrina-PR.

Doi > 10.17648/Simbbtec-2017-80834.

Cultivo de *Chlorella vulgaris* em Tanque Aberto com Meio de Cultivo Suplementado com Fonte Nitrogenada

Helder Rodrigues da Silva¹, Francino Costa Palhares da Silva¹ Kawana Silva Bortolato¹, Carmen Luísa Barbosa Guedes¹, Diva Souza Andrade², Cassio Egídio Cavenaghi Prete¹

¹ Universidade Estadual de Londrina
Centro de Ciências Agrárias (CCA) e Centro de Ciências Exatas (CCE). CEP 86057-970.
Londrina, PR. Email: heldersrodrigues2@gmail.com

² Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR Caixa postal 481- 86047-902- Londrina, PR.

RESUMO

As microalgas têm sido muito estudadas em várias pesquisas em todo o mundo, pois possuem capacidade de produzir metabólitos de grande importância biotecnológica em curto tempo de crescimento. O objetivo deste trabalho foi produzir biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* em tanque aberto com a suplementação de MAP (Mono amônio fosfatado) e KNO₃ (Nitrato de Potássio) como fonte nitrogenada no meio de cultivo. O experimento foi realizado por 30 dias e a maior produção de biomassa seca foi de 0,8 g L⁻¹, a densidade óptica foi de 1,31 de absorvância. O cultivo em tanque aberto de baixo custo foi eficiente e desta forma é possível obter a biomassa de microalga *C. vulgaris*, que possui potencial para produção de biocombustíveis e coprodutos.

Palavras-chave: microalgas, energia renovável, biocombustíveis, biomassa.

INTRODUÇÃO

As microalgas são microrganismos que estão classificadas em dois grupos: procariontes e eucariontes, sendo que os procariontes são conhecidos como algas azuis, cianobactérias, cloroxibactérias ou cianófitas, já os eucariontes se diferenciam das microalgas procariontes por possuírem núcleo e organelas envolvidas por membranas, cromossomos complexos e células individuais geralmente maiores do que as cianobactérias (TORTORA; FUNKE; CASE 2017).

As microalgas integram um grupo muito diversificado de microrganismos predominantemente aquáticos, normalmente microscópios unicelulares, que podem formar colônias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular, também são classificadas de acordo com a forma de obtenção de energia pela célula, podendo ser: fotoautotrófica,

heterotróficas, mixotróficas ou fotoheterotróficas (TOMASSELLI, 2004; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Nos últimos anos, as microalgas têm sido muito estudadas em diversas pesquisas com amplo interesse, pois possuem a capacidade de produzir metabólitos de grande interesse biotecnológico e com curto tempo de crescimento. A biomassa gerada a partir das microalgas pode ser aplicada como matéria prima para a produção de biocombustíveis, alimentação humana, produção de fármacos, ração animal, entre outros metabólitos (SILVA et al., 2014).

As microalgas necessitam para seu desenvolvimento de macronutrientes como (C, N, O, P, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Co, Cu, Zn, Se e B), os nutrientes limitantes para o seu desenvolvimento são: N e P, embora o C seja apontado como o macronutrientes mais importante (JONES, 2004).

A conversão fotossintética de CO₂ em luz solar ou luz artificial ajustada com nutrientes pode produzir lipídios, carboidratos e proteínas, processo conhecido como crescimento ou cultivo fototrófico usando sistemas de produção abertos ou fechados (LAURENS, CHEN-GLASSER, 2017).

As microalgas podem ser cultivadas em dois sistemas em fotobiorreatores de forma fechada e em tanques ao ar livre (RICHMOND, 2004). O cultivo de microalgas em tanque aberto possui menor custo quando comparados com fotobiorreatores fechados, porém o projeto de tanque aberto (raceway) deve atender a alguns critérios básicos como: a profundidade do tanque em torno de 20 a 50 cm, sistema de homogeneização utilizando pás giratórias ou bombas, e a principal demanda relacionada a construção e manutenção que devem ser baixos custos e que propicie o crescimento das microalgas (BOROWITZKA, 2005).

Embora algumas espécies de microalgas, principalmente cianobactérias, consigam fixar o nitrogênio do ar, na maioria dos casos, há um predomínio das estirpes de microalgas que requerem uma fonte de nitrogênio na forma solúvel, como ureia ou amônia, necessitando a complementação desse nutriente no cultivo (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017; LEE, 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em tanque aberto suplementado com fonte nitrogenada.

MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo da microalga *C. vulgaris* foi realizado em tanques abertos (raceway) com capacidade de 1000 L instalados na Universidade Estadual de Londrina-UEL no Departamento de Agronomia - CCA, as análises físico químicas para as determinações de parâmetros como: pH, biomassa seca, condutividade elétrica, densidade óptica e outras, foram realizadas no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética de Elétrons - LAFLURPE. A estirpe de *Chlorella vulgaris* foi cedida pela Dra. Ana Teresa Lombardi da Universidade Federal de São Carlos- UFSCAR.

O inóculo inicial foi obtido através de cultivo em bolsa plástica em casa de vegetação. O meio de cultivo utilizado foi o MH com sais hidropônicos (MAP: Mono Amônia Fosfatada) - (NH₄H₂PO₄) 0,19 g L⁻¹, CaCl₂ - 0,025 g L⁻¹, KNO₃-0,12 g L⁻¹, MgSO₄ - 0,075 g L⁻¹, solução de micronutrientes Yara Vita® (11,6% de K₂O, 1,28% de S, 0,86% de Mg, 2,1% de B, 0,36% de Cu, 2,66% de Fe, 2,48% de Mn, 0,036% de Mo e 3,38% de Zn)

- 0,03 g L⁻¹ (SILVA, 2016), com adição de 300 mg L⁻¹ de extrato de levedura no primeiro dia e repetido a cada intervalo de sete dias. No quarto dia de experimento, foi acrescentado 190 mg L⁻¹ de MAP e 120 mg L⁻¹ de KNO₃, também com intervalo de sete dias para cada aplicação.

Para realizar as análises de pH, condutividade elétrica, biomassa seca e densidade óptica, foram coletadas três amostras de 50 ml cada durante 30 dias. As análises de densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 670nm (Genesys 10UV). Para análise de pH foi utilizado um pHmetro de marca Metrohm modelo 827 pH lab. Na análise de condutividade elétrica, foi utilizado um condutivímetro, de marca Tecnon, modelo Mca-100, versão 6.2.

Para determinação de biomassa seca, foram centrifugadas três amostras de 50 mL por dia, a 11,536 g por 10 minutos, a 25 °C (Model Z383 126 HERMLE K), sendo o sobrenadante descartado e o pellet formado seco em estufa a 50 °C e quantificada a biomassa seca em g L⁻¹. Foram realizadas as médias das três repetições de cada dia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O inoculo inicial da microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivado em bolsa plástica de polietileno de baixa densidade e apresentou as seguintes características: densidade óptica de 0,35 em absorbância, pH de 6,4 e concentração de biomassa seca de 0,10 g L⁻¹.

Na Figura 1, é possível visualizar o tanque de microalgas com capacidade de 1000 L no 30º dia de cultivo.

Figura 1. Tanque com cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.



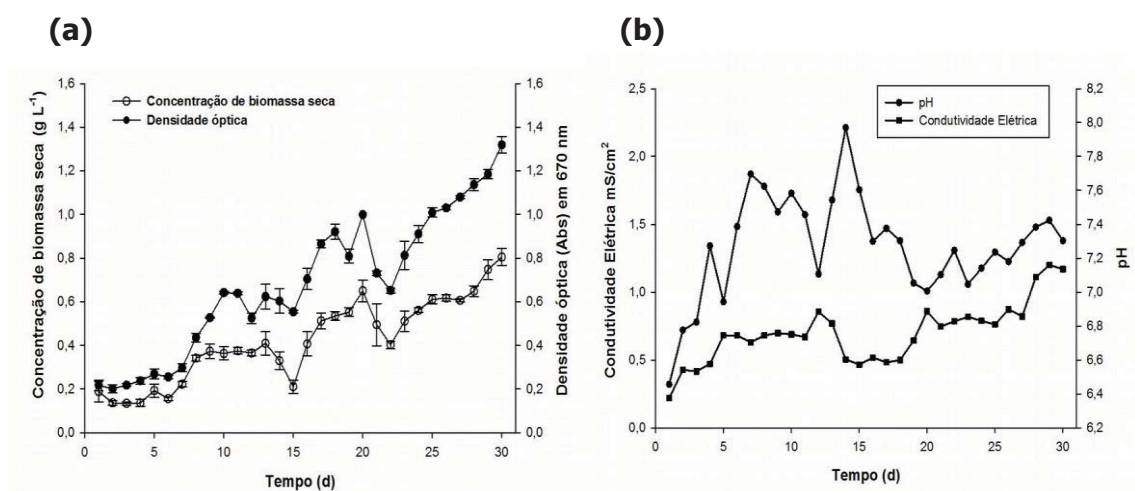
A maior produção de biomassa seca da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em tanque aberto foi de 0,8 g L⁻¹ em 30 dias de cultivo, mas com 13 dias de cultivo a produção de biomassa foi de 0,4 g L⁻¹ e com 20 dias de 0,6 g L⁻¹ (Figura 2a), estes resultados corroboram com os resultados publicados por Mata et al. (2010) que relatam a produtividade de biomassa de 0,02 - 0,2 g L⁻¹ dia para *C. vulgaris*. Desta forma é possível verificar que ocorreu o crescimento da microalga *C. vulgaris* no tanque aberto construído em material de baixo custo.

Os valores de densidade óptica podem ser visualizados na Figura 2a, onde o maior valor obtido foi de 1,31 de absorbância no 30º dia de cultivo e valores próximos a 1,0 de absorbância são evidenciados a partir do 16º dia de cultivo.

O pH inicial do cultivo foi de 6,7 e durante os 30 dias de cultivo ocorreram alterações no pH que podem ser visualizadas na Figura 2b, o maior valor de pH foi de 7,9 aos 14 dias de cultivo e no 30º dia de cultivo o pH foi de 7,30.

A condutividade elétrica no 1º do cultivo foi de 0,21 mS/cm² e ao final do 30º dias de cultivo foi de 1,17 mS/cm² Figura 2b.

Figura 2. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* durante 30 dias em tanque aberto, (a) produção de biomassa seca em g L⁻¹ e densidade óptica em 670 nm (Abs) e, (b) pH e condutividade elétrica do meio.



CONCLUSÕES

Os sistemas de cultivo em tanque aberto, avaliado neste estudo, possibilitou o rendimento máximo de biomassa de *C. vulgaris* de 0,8 g L⁻¹ no período de 30 dias, que corroboram com resultados da literatura, possibilitando a geração de matéria prima para produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse biotecnológico.

Agências de Fomento: CAPES e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

- BOROWITZKA, M. A. Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. In ANDERSEN, R.A. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**, cap. 14. p. 205-216, 2005.
- JONES, I. S. F. The Enhancement of Marine Productivity for Climate Stabilization and Food Security. RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 125-178.
- LAURENS, L. M. L.; CHEN-GLASSER, M. Overview of Current Technology Routes for Algae-Derived Bioenergy Products. **State of Technology Review Algae Bioenergy**. Cap. 3.1 – 3.6. Task 39. 2017.
- LEE, R.E.; **Phycology**. Cambridge University Press, New York, Cap. 2 p. 31-74, 2008.
- 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.

- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2007.
- RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, 2004. p. 125-178.
- SILVA, H. R. **Produção de microalga *Neochloris oleoabundans* em diferentes sistemas de cultivo**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia Londrina, 2016.
- SILVA, H. R.; GAVILANES, F. Z.; VASCONCELLOS, M. E. C.; ANDRADE, D. S. Estratégias de busca de artigos científicos com enfoque em microalgas para bioenergia. ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C.; (Ed.) **Microalgas de águas continentais: Produção de biomassa e coprodutos**. ANDRADE, D. S. e FILHO, A. C. (Ed.). Londrina: IAPAR, Cap. 1 v.2, 2014.
- TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Victoria: Blackwell Science, p. 3-19. 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre. Artmed. 12. ed. Cap. 12 p. 320-336. 2017.