



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA – UFPB
CENTRO DE ENERGIAS ALTERNATIVAS E RENOVÁVEIS – CEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIAS RENOVÁVEIS – PPGER

ÁDSON BRUNO COSTA PEREIRA

**MICROALGAS BIORREMEDIADORAS: TRATAMENTOS BIOLÓGICOS E
VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

JOÃO PESSOA – PB
FEVEREIRO/2019

ÁDSON BRUNO COSTA PEREIRA

**MICROALGAS BIORREMEDIADORAS: TRATAMENTOS BIOLÓGICOS E
VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis do Centro de Energias Alternativas e Renováveis, área de concentração em energias renováveis, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Prof^a. Dra. Marta Célia Dantas Silva

JOÃO PESSOA – PB

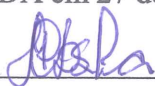
FEVEREIRO/2019

ÁDSON BRUNO COSTA PEREIRA

**MICROALGAS BIORREMEDIADORAS: TRATAMENTOS BIOLÓGICOS E
VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Energias Renováveis do
Centro de Energias Alternativas e Renováveis,
área de concentração em energias renováveis, para
a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.



Prof.ª. Dra. Marta Célia Dantas Silva – UFPB (Presidente)

Prof.ª. Dra. Joelda Dantas – UFPB (Membro interno)



Prof.ª. Dra. Sayonara Andrade Eliziário – UFPB (Membro externo)

Orientadora

Prof.ª. Dra. Marta Célia Dantas Silva

JOÃO PESSOA – PB

FEVEREIRO/2019

P436m Pereira, Ádson Bruno Costa.

"MICROALGAS BIORREMEIADORAS: TRATAMENTOS BIOLÓGICOS E
VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL" /
Ádson Bruno Costa Pereira. - João Pessoa, 2019.
57 f.

Orientação: Marta Célia Dantas Silva Silva.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CEAR.

1. Biocombustíveis. 2. Biomassa. 3. Microalgas. 4.
Bioetanol. I. Silva, Marta Célia Dantas Silva. II.
Título.

UFPB/BC

Dedico aos meus pais, pela
confiança e apoio, e ao meus irmãos e
amigos que sempre acreditaram e
incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, pelos valores que me ensinaram, pelos esforços que fizeram para que eu aqui estivesse, por me proporcionar tudo que tenho e sou.

Agradeço aos meus familiares, irmãos e avós, pela atenção, conselhos e lição de vida.

Em especial agradeço a professora orientadora Dra. Marta Célia Dantas Silva, pela oportunidade, paciência e confiança no decorrer da pesquisa e principalmente por ter acreditado no projeto. Só tenho a agradecer por ter me acolhido. Muito obrigado!

Ao professor Dr. Roberto Sassi, por ter proporcionado e viabilizado as pesquisas em laboratório, contribuindo grandemente com a sua sabedoria e experiência. Muito obrigado!

Aos meus amigos e companheiros de pesquisas, pois os meus dias se tornaram muito mais gratificante e inspiradores com a contagiante alegria de vocês.

Agradeço ao LARBIM – Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas - UFPB e a todos que fazem parte dele, pois tiveram uma importante participação na construção do meu conhecimento prático. Obrigado a todos que participaram dessa importante etapa.

A todos que participaram da pesquisa e contribuíram de forma relevante para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

À Universidade Federal da Paraíba, em especial aos professores que participam e incentivam a construção do conhecimento, disponibilizando tamanha experiência.

Aos laboratórios de Saneamento e Bioengenharia da UFPB e aos técnicos de laboratório. Muito obrigado!

Obrigado a todos que de forma direta ou indireta tiveram sua contribuição somada a esse trabalho. Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Considerado como um dos biocombustíveis mais promissores, o bioetanol se mostra como uma fonte de energia alternativa e atrativa atualmente. Os altos preços do petróleo e seus derivados, a elevada demanda energética e intensos debates ambientais exercem influência decisiva no estímulo às pesquisas sobre fontes alternativas de energia. Além disto, há uma intensa demanda por estudos que avaliem a influência dos resíduos da composição dos diversos efluentes na produtividade de biomassa. Os biocombustíveis produzidos a partir de microalgas podem ser uma atraente opção devido a sua taxa de crescimento rápido, alto teor de biomassa, baixa utilização de terrenos cultiváveis e alta taxa de absorção de dióxido de carbono, além de uma boa aceitação no cenário atual. Diante disso, objetivou-se produzir bioetanol a partir de biomassa microalgal cultivada em efluentes domésticos e analisar a eficiência na biorremediação durante o cultivo. No desenvolvimento da pesquisa, foi possível perceber que a cepa D467WC obteve uma curva de crescimento mais acentuada nas diluições a 25% e a 50% de efluente doméstico (ED) em relação às outras espécies estudadas, porém, o crescimento mostrou-se mais promissor na diluição a 25% de ED. Observa-se a redução dos parâmetros do efluente quando se compara as análises feitas antes do cultivo, a uma diluição de 25%, e depois do cultivo, atestando que a microalga reduz os níveis de nutrientes do ED, o que contribuiria no tratamento antes do lançamento em corpos hídricos. No acompanhamento por contagem celular foi possível obter uma densidade celular equivalente a 43×10^5 células mL⁻¹, um número maior de células em tempo mais curto no cultivo em efluente doméstico na diluição a 25% se comparado ao número obtido no cultivo realizado no meio de cultura sintético WC. O peso seco da biomassa obtida foi correspondente 0,200 g.L⁻¹ e o teor de açúcares totais foi de 35,04 %, que ao ser extraído pelo método de hidrólise ácida obteve-se 55,6 % de glucose. A partir dos resultados obtidos no cultivo e das análises de açúcares da biomassa microalgal é possível ocorrer a produção de bioetanol a partir da fermentação do hidrolisado com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Biomassa, Microalgas, Bioetanol.

ABSTRACT

Considered as one of the most promising biofuels, bioethanol is an alternative and attractive energy source for the future. The high prices of oil and its derivatives, high energy demand and intense environmental debates have a decisive influence in stimulating research on alternative sources of energy. In addition, there is an intense demand for studies that evaluate the influence of the residues of the composition of the various effluents on the biomass productivity. Biofuels produced from microalgae can be an attractive option due to their rapid growth rate, high biomass content, low utilization of arable land and high rate of carbon dioxide absorption, and a good acceptance in the current scenario. Therefore, the objective was to produce bioethanol from microalgal biomass grown in domestic effluents and to analyze the efficiency in bioremediation during cultivation. It was possible to observe that the D467WC strain showed a more pronounced growth curve in the 25% and 50% dilutions of domestic effluent (ED) in relation to the other species studied, however, the growth shown to be more promising in the 25% dilution of ED. The reduction of effluent parameters is observed when comparing the analyzes done before the cultivation, at a 25% dilution, and after the cultivation, attesting that the microalga reduces the levels of ED nutrients, which would contribute to the treatment before water bodies. Cell counting resulted in a cell density equivalent to 43×10^5 cells mL⁻¹, a larger number of cells in the shortest time in the culture in domestic effluent at 25% dilution when compared to the number obtained in the culture in the medium of synthetic WC culture. The dry weight of the obtained biomass was 0.200 g.L⁻¹ and the total sugar content was 35.04%, which when extracted by the acid hydrolysis method yielded 55.6% glucose. From the results obtained in the cultivation and analysis of sugars of the microalgal biomass it is possible to produce bioethanol from the fermentation of the hydrolyzate with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Biofuels, Biomass, Microalgae, Bioethanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de biocombustíveis a partir de microalgas.....	18
Figura 2. Esquema simplificado do processo para produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal.....	24
Figura 3. Processos de produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal.....	24
Figura 4. Processo contínuo simplificado demonstrando as etapas realizadas desde o cultivo de microalgas até a produção de bioetanol.....	28
Figura 5. Comparação de crescimento por fluorescência entre as cepas 577, 467, 498, 338 e 464 cultivadas em tubos de ensaios contendo 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C.....	39
Figura 6. Comparação de crescimento por fluorescência entre as cepas 577, 467, 498, 338 e 464 cultivadas em tubos de ensaios contendo 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C.....	40
Figura 7. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D464WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	40
Figura 8. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D338WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	41
Figura 9. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D467WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	41
Figura 10. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D498WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	42
Figura 11. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D577WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	42
Figura 12. Microalga <i>Actinastrum hantzshii</i> vista ao microscópio óptico com aumento de 400X, 630X e 1000X.....	43

Figura 13. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D467WC cultivada em balões de 6 litros na diluição de 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.....	44
Figura 14. Comparação de crescimento por contagem celular em microscópio óptico com hemocitômetro com a cepa D467WC cultivada em balões de 6 litros na diluição de 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C sob aeração constante.....	45
Figura 15. Teores de açúcares redutores (glucose) por tipo de extração de açúcares no hidrolisado.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação de fontes diferente de biomassa no rendimento de bioetanol por área cultivada e por tempo.....	19
Tabela 2. Composição de açúcares de diferentes espécies de microalgas.....	20
Tabela 3. Composição bioquímica da biomassa de diferentes tipos de algas e microalgas.....	20
Tabela 4. Métodos utilizados para o rompimento da parede celular microalgal.....	23
Tabela 5. Espécies de microalgas selecionadas para o cultivo em efluente doméstico e procedência.....	29
Tabela 6. Reagentes utilizados.....	30
Tabela 7. Meio de cultura sintético WC.....	31
Tabela 8. Composição do meio MC.....	38
Tabela 9. Teores de açúcares da biomassa seca da cepa D467WC por meio de cultivo..	46
Tabela 10. Parâmetros físico-químicos do meio de cultura utilizado com a cepa D467WC na diluição a 25% de efluente doméstio antes e depois do cultivo.....	48
Tabela 11. Parâmetros de crescimento da microalga <i>Actinastrum hantzshii</i> cultivadas em meio padrão WC e em ED a 25%.....	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC – Antes do cultivo

ATP – Trifosfato de adenosina

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DC – Depois do cultivo

DQO - Demanda química de oxigênio

ED – Efluente doméstico

ETE – Estação de tratamento de esgotos

FBRs – Fotobiorreatores

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

K – Taxa de crescimento

LARBIM – Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas

MC – Meio de cultura

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

PB – Produtividade de biomassa

PVC – Policloreto de vinila

RB – Rendimento em biomassa

Rmax - Taxa máxima de crescimento populacional

RPM – Rotação por minuto

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

WC – Meio de cultura sintético

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1 Microalgas.....	17
3.2 Produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal	17
3.3 Processos de produção de bioetanol de terceira geração.....	21
3.3.1 Obtenção da biomassa	21
3.3.2 Processamento das microalagas.....	22
3.3.3 Hidrólise	22
3.3.4 Fermentação	23
3.4 As microalgas como biorremediadoras no tratamento de efluentes.....	25
3.5 Cultivo de microalgas.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Microrganismos	28
4.1.1 Microalgas	28
4.1.2 Efluente doméstico.....	29
4.1.3 Reagentes	29
4.1.4 Crescimento das microalgas	30
4.1.4.1 Preparação dos meios de cultivo.....	30
4.1.4.2 Monitoramento do crescimento por fluorescência.....	31
4.1.4.3 Cultivo da microalga da espécie (D467WC) - <i>Actinastrum hantzshii</i>	32
4.1.4.4 Análise do cultivo da microalga D467WC.....	32
4.1.4.5 Determinação do peso seco do cultivo da microalga D467WC	32
4.1.4.6 Obtenção da biomassa úmida por decantação.....	33

4.1.4.7 Análise da biorremediação do efluente	33
4.1.4.8 Obtenção da biomassa seca por liofilização.....	34
4.1.4.9 Produtividade da biomassa.....	34
4.1.5 Análise de carboidratos totais da microalga (D467WC) - <i>Actinastrum hantzshii</i>	35
4.1.6 Bioetanol a partir da microalga <i>Actinastrum hantzshii</i>	35
4.1.6.1 Biomassa.....	35
4.1.6.2 Processo para ruptura da parede celular e extração dos açúcares da microalga (D467WC) - <i>Actinastrum hantzshii</i>	36
4.1.6.3 Determinação do teor em açúcares redutores.....	36
4.1.6.4 Ruptura da parede celular e extração dos açúcares da biomassa da microalga (D467WC) - <i>Actinastrum hantzshii</i>	37
4.1.6.5 Desintoxicação do hidrolisado	37
4.1.6.6 Fermentação.....	37
4.1.6.6.1 Crescimento da levedura.....	37
4.1.6.6.2 Fermentação do hidrolisado	38
4.1.6.7 Destilação	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Avaliação do crescimento das cepas no cultivo em tubos de ensaios e determinação da melhor diluição do Efluente Doméstico (ED).....	38
5.2 Microalga selecionada para o cultivo e produção de biomassa.....	42
5.3 Avaliação do cultivo da cepa selecionada D467WC - <i>Actinastrum hantzshii</i>...	43
5.4 Peso seco da biomassa produzida no cultivo da cepa D467WC - <i>Actinastrum hantzshii</i>	45
5.5 Teores de açúcares totais na biomassa seca da microalga <i>Actinastrum hantzshii</i>.....	45
5.6 Teores de açúcares redutores no hidrolisado por método de extração	46
5.7 Biorremediação através do cultivo da microalga <i>Actinastrum hantzshii</i>	47
5.8 Parâmetros de crescimento da microalga	48
5.9 Obtenção de bioetanol.....	49
6 CONCLUSÕES	50
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	51
8 REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

O constante crescimento na demanda de biocombustíveis aliado com a preocupação em relação aos altos níveis de impactos ambientais são os principais motivadores na busca por novas alternativas de energias renováveis. Diante disso, os biocombustíveis podem ser uma substituição eficaz dos combustíveis tradicionais apenas quando os custos de produção forem inferiores ou energeticamente equivalentes aos custos de perfuração e refinação de petróleo (SILVA; BERTUCCO, 2016). Souza et al. (2012), afirmam que a seleção de tecnologias plausíveis deve ser bastante minuciosa, a fim de que se possam criar novos processos de produção de biocombustíveis, bem como otimizar aqueles já existentes.

Considerado como um dos biocombustíveis mais promissores, por ser menos tóxico, de fácil biodegradação e menor emissão de poluentes em relação aos combustíveis de fontes fósseis, o bioetanol é uma fonte de energia alternativa e atrativa. Os altos preços do petróleo e seus derivados, a elevada demanda energética e intensos debates ambientais são alguns dos vários fatores que, integrados, exercem influência decisiva no estímulo às pesquisas sobre fontes alternativas de energia. (TANGO, 2015). Neste sentido, o cultivo de microalgas para a produção de biomassa aliado a tecnologias de produção de biocombustíveis pode se tornar uma fonte promissora para a produção de bioetanol.

Em decorrência da grande variação de efluentes, há uma intensa demanda por estudos que avaliam a influência dos resíduos da composição dos diversos efluentes no cultivo e produtividade de biomassa. Segundo Ortenzio (2015) “alguns desses resíduos possuem potencial para ser reutilizados em outros processos industriais”, no qual alguns resíduos ricos em matéria orgânica podem ser usados como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas. A utilização de meios alternativos, como os efluentes, para o cultivo de microalgas pode reduzir consideravelmente os custos na produção de biomassa, além de biorremediar e tornar a composição do efluente mais próxima dos padrões estabelecidos para o lançamento nos rios conforme a resolução 430 de 2011 do CONAMA.

No cultivo de microalgas, o nitrogênio reduzido e fósforo, são importantes elementos para o metabolismo das espécies, além de permitir, principalmente, a síntese de lipídios e carboidratos (MARGARITES; COSTA, 2014). Durante o cultivo desses microrganismos várias características interessantes são apresentadas, entre elas a maior eficiência fotossintética se comparado à cultura dos vegetais superiores, além de possuírem condições de serem cultivadas em situações adversas a culturas convencionais. Diante disso, as microalgas surgem como a

uma alternativa sustentável devido à elevada produtividade e à possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para culturas alimentares e de utilização de águas não potáveis para a produção de biomassa (MIRANDA, 2011).

Pesquisas estão sendo conduzidas para investigar a viabilidade da utilização de microalgas como matéria-prima energética em aplicações desenvolvidas no âmbito da produção de biodiesel e bioetanol. A produção de biocombustíveis de primeira geração resultou em uma série de problemas relacionados às culturas alimentares, preços dos alimentos, uso do solo, e emissões de carbono (SIMS et al., 2011), já a produção de biocombustíveis de segunda geração enfrenta barreiras relacionadas com custos e eficácia, barreiras tecnológicas e com a demanda das redes de coleta e de estoque (NIGAM; SINGH, 2011). Diante disso, os biocombustíveis produzidos a partir de microalgas podem ser uma atraente opção devido a sua taxa de crescimento rápido, alto teor de biomassa, baixa utilização de terrenos cultiváveis e alta taxa de absorção de dióxido de carbono CO₂, além de uma boa aceitação nos últimos anos no cenário atual (EL-DALATONY et al., 2016)

Outras vantagens ambientais na produção de biocombustíveis a partir de microalgas estão relacionadas à utilização de fontes renováveis para este fim e ao potencial desenvolvimento de uma nova indústria de produção de energia baseada na biorrefinação de substâncias extraídas da biomassa produzida (DANTAS, 2013), além disto, as células de algas aquáticas são flutuantes, evitando a necessidade de biopolímeros como hemicelulose e lignina que são essenciais para o maior crescimento vegetal em meio terrestre, ou seja, a ausência absoluta ou quase ausência de lignina torna simples a hidrólise enzimática da celulose de algas (SINGH; OLSEN, 2011), o que torna o processo de produção do bioetanol mais simples se comparado com as fontes vegetais, eliminando algumas etapas químicas e de pré-tratamentos enzimáticos (JOHN et al., 2011).

A produção do bioetanol a partir de biomassas com altos teores de carboidratos, podem ser encontrados em diversas matérias-primas, com destaque para a produção a partir de microalgas, foco deste trabalho. Vale ressaltar que apesar do grande potencial das microalgas na produção de biocombustíveis, a produção de bioetanol por esta biomassa ainda está em fase de pesquisa e a tecnologia ainda não tem comercialização. Este tipo de aplicação com as microalgas ainda necessita de muito desenvolvimento com relação às técnicas a serem aplicadas e aprimoradas, como também os fatores econômicos envolvidos. Com relação à diminuição de impactos ambientais, a produção de bioetanol a partir de microalgas se intensifica por não

disputar terrenos cultiváveis com as culturas alimentares, pelo alto índice de captação de dióxido de carbono e pelo cultivo em terrenos considerados impróprios (MIRANDA, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a viabilidade da produção do bioetanol a partir de biomassa microalgal cultivada em efluentes domésticos e analisar a eficiência da espécie na biorremediação durante o cultivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um modelo para cultivar microalgas biorremediadoras em efluentes domésticos;
- Caracterizar a biomassa microalgal utilizada;
- Monitorar o crescimento de cinco espécies de microalgas cultivadas em efluentes domésticos para a identificação da espécie de maior crescimento;
- Monitorar a eficiência de microalgas na biorremediação de efluentes domésticos;
- Obter determinações do teor de carboidratos da microalga de maior crescimento em efluentes domésticos;
- Verificar a viabilidade da produção do bioetanol a partir de processos físico-químicos de tratamento e fermentação dos carboidratos provenientes do metabolismo da microalga com maior crescimento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares classificados em diferentes filos. São organismos fotossintéticos que muitas vezes contribuem para fixação de CO₂ e liberação de O₂ no ambiente (RODRIGUES et al., 2015). A fotossíntese é um processo vital que impulsiona a síntese de todos os biocombustíveis, convertendo a energia da luz em biomassa, a exemplo dos carboidratos e lipídios e uma pequena quantidade de H₂ (SILVA; BERTUCCO, 2016). Esses microrganismos fotossintéticos podem ser uma fonte promissora de bioenergia devido ao seu crescimento mais rápido em relação às espécies de plantas e a não necessidade de grandes áreas para obter a biomassa desejada (BCHIR et al., 2016). Microalgas são resistentes e incluem muitas espécies cultiváveis ricas em lipídios e carboidratos. Elas crescem rapidamente e são capazes de produzir uma biomassa média diária de 20 g/m² de cinza seca em sistemas de lagoa aberta, tornando-as a biomassa ideal como matéria-prima para produção de biocombustíveis (BOROWITZKA et al. 2010). Esta produtividade média da biomassa microalgal é equivalente a um rendimento anual de 7,3 mg/km² e é comparável ao das culturas de cana-de-açúcar, que foram relatados entre 7,0 mg/km² para 7,7 mg/km²; a maior safra de energia colhida para bioetanol (BALAT et al., 2009 e GAUDER et al., 2011)

3.2 Produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal

O consumo do bioetanol tem desencadeado forte interesse devido à alta dos preços e aos impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis (SANTOS, 2012). Diante dos recursos finitos e insustentáveis de fontes fósseis, busca-se criar novos processos de produção de biocombustíveis, bem como otimizar aqueles já existentes (SOUZA et al., 2012). Diante disso, necessita-se de novas tecnologias aliadas com ideias sustentáveis e com a capacidade de aproveitamento de resíduos, além de pesquisas e investimentos voltados para utilização de fontes alternativas e menos poluentes de geração de energia e produção de combustíveis.

Embora os biocombustíveis de microalgas tenham o potencial de ser muito superiores aos biocombustíveis derivados de plantas terrestres, além de terem o potencial para serem produzidos de forma sustentável (CHISTI, 2008), são necessárias melhorias importantes na eficiência, estrutura de custos e capacidade de aumentar o crescimento de algas e a extração de

compostos orgânicos para produzir biocombustíveis comercialmente viáveis (SINGH; OLSEN, 2011).

Para a produção de bioetanol (Figura 1), especificamente, as microalgas são o recurso renovável mais promissor, uma vez que as microalgas crescem mais rapidamente e corrigem o CO_2 a uma taxa maior do que as plantas terrestres, além da ausência de lignina (EL-DALATONY et al., 2016; CHEN et al., 2013). Em comparação com os esforços no desenvolvimento em outras fontes de biomassas como resíduos lignocelulósicos, uma revisão da literatura mostrou um progresso mínimo nos últimos 30 anos para fermentar a biomassa para bioetanol a partir de biomassa microalgal renovável. Como resultado, a pesquisa nesta área está realmente em seu estágio formativo no que diz respeito a produção comercial viável e necessita de investimentos em tecnologias para melhorar a eficiência na produtividade e nos processos de tratamento (DOAN et al., 2012).

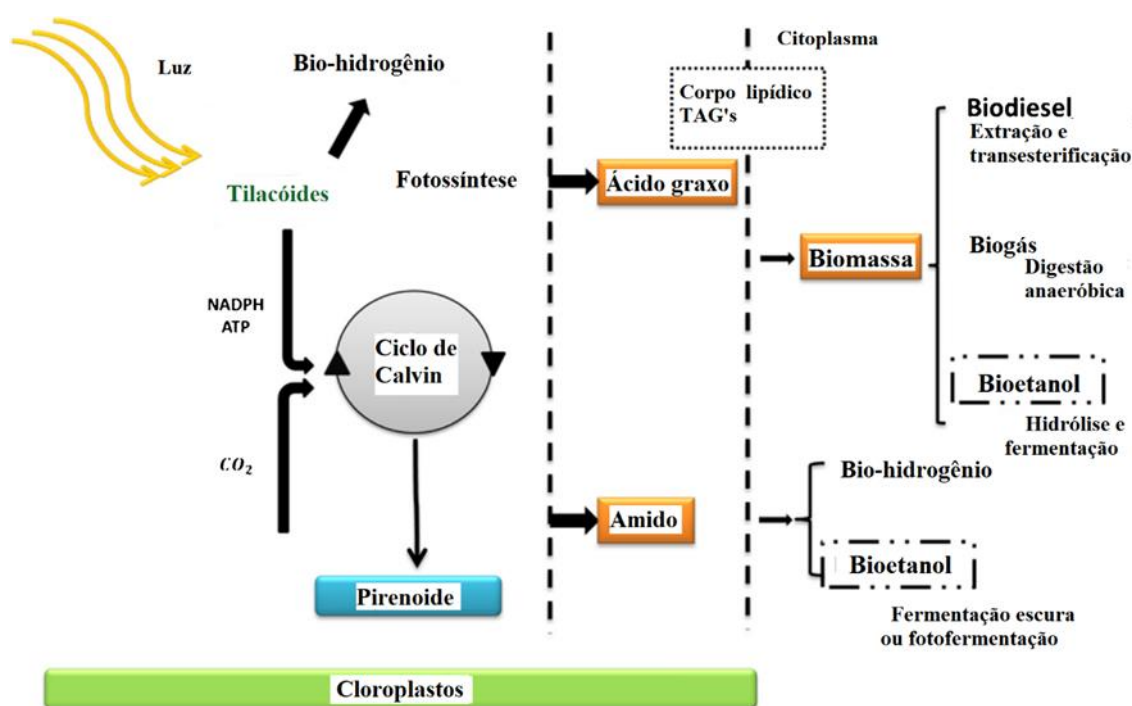


Figura 1. Produção de biocombustíveis a partir de microalgas. **Fonte:** adaptado de (SILVA e BERTUCCO, 2016).

A produção de bioetanol a partir de microalgas e cianobactérias é um desenvolvimento tecnológico viável, pois apresentou maior produtividade do que determinadas culturas como a cana-de-açúcar e o milho (SILVA; BERTUCCO, 2016). Segundo Klein (2013) uma importante vantagem relacionada à utilização de carboidratos de biomassa microalgal, produzidos por algumas espécies, para produção de bioetanol de terceira geração, consiste no fato de que a produtividade de bioetanol (em litros por hectare e por ano) pode ser algumas ordens de

grandeza maior que a produtividade de matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol de primeira e segunda gerações (Tabela 1).

Fonte de biomassa	Rendimento de bioetanol (L ha ⁻¹ ano ⁻¹)
Palha de milho	1050-1400
Trigo	2590
Mandioca	3310
Sorgo doce	3050-4070
Milho	3460-4020
beterraba	5010-6680
Cana-de-açúcar	6190-7500
<i>Panicum virgatum</i> (switchgrass gramínea de crescimento rápido)	10760
Microalgas	46760-140290

Tabela 1. Comparação de fontes diferente de biomassa no rendimento de bioetanol por área cultivada e por tempo. **Fonte:** adaptado de MUSSATO et al., 2010

O potencial para produção de bioetanol a partir de microalgas é relevante haja vista que esses microrganismos apresentam um alto anabolismo fotossintético, além de uma enorme biodiversidade e variabilidade em sua composição bioquímica, advindos de sua biomassa (SOUZA et al. 2012). Por serem organismos autotróficos, as microalgas convertem energia solar em energia química em sua estrutura unicelular que pode ter organização procariótica ou eucariótica. Os produtos dessa transformação bioquímica podem ser aproveitados comercialmente para a obtenção de biomassa na produção de biocombustíveis e de outros produtos com aplicação comercial. Carboidratos à base de microalgas ocorrem principalmente na forma de amido e celulose sem lignina, o que os tornam mais fáceis de converter em unidades de monossacarídeos oferecendo uma vantagem abrangente em relação a outras matérias-primas de biomassa tais como materiais lignocelulósicos (GNANSOUNOU e RAMAN, 2016).

As microalgas como *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Spirulina* são conhecidas por uma grande quantidade (> 50% do peso seco) de amido, celulose e glicogênio, que são matérias-primas para a produção de etanol (CHEN et al., 2009 apud SINGH, 2011, p. 3550) (Tabela 2), porém as microalgas também podem ser ricas em outros compostos bioquímicos (Tabela 3).

Espécie	Açúcares (% m.m⁻¹)
Anabaena cylindrica	25 - 30
Chlamydomonas reinhardtii	21
Chlorella vulgaris	12 - 17
Dunaliella salina	32
Porphyridium cruentum	40 - 57
Scenedesmus obliquus	10 -17
Spirulina máxima	13 - 16
Synechococcus sp.	15
Chlorella pyrenoidosa	26
Spirogira sp.	33 - 64

Tabela 2. Composição de açúcares de diferentes espécies de microalgas. **Fonte:** (SPOLAORE et al., 2006)

Algas e microalgas	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	13.1	45.2	5.2
<i>Aphanothece microscopica Nägeli</i>	0.176±0.15	0.079±0.08	0.493±0.01
<i>Chlorella fusca</i>	19±1	1.5±0.3	52±2.2
<i>Chlorella</i> sp.	9.46±0.25	28.82±0.72	43.22±0.33
<i>Dunaliella salina</i>	16.0±0.2	7.9±0.3	29±1
<i>Sargassum kushimonte</i>	42.89	0.12	6.37
<i>Sargassum cristaeifolium</i>	46.78	0.17	5.09
<i>Spirulina</i> sp.	15±1	5.9±0.1	52±2

Tabela 3. Composição bioquímica da biomassa de diferentes tipos de algas e microalgas. **Fonte:** (SOUZA et al. 2012).

Para Miranda (2011) torna-se necessário a seleção de espécies de microalgas capazes de reservar elevados teores de açúcares de forma natural, identificar processos de indução de produção e acumulo de açúcares e identificar os melhores métodos para sacarificar a biomassa. O referido autor ainda ressalta que a fermentação alcoólica por meio de leveduras ainda não foi bem explorada em biomassa microalgais, isto devido aos açúcares contidos que precisam ser extraídos para posterior fermentação.

3.3 Processos de produção de bioetanol de terceira geração

As etapas para a produção de bioetanol segundo Harun et al., (2010) são: o pré-tratamento, para quebrar a parede celular da biomassa microalgal; hidrólise da celulose e hemicelulose para obter-se açúcares simples e fermentação da celulose e hemicelulose para posterior produção do bioetanol.

O amido, biomassa contida nas células de microalgas, pode ser colhido a intervalos regulares a partir de fotobiorreatores ou lagoas rasas (SINGH; OLSEN, 2011) e sua extração das células pode acontecer de forma mecânica (ultra-som, desintegração explosiva, cisalhamento mecânico, entre outras) ou pela dissolução das paredes celulares utilizando enzimas (JOHN, 2011). Após esta etapa o amido é então separado por extração com água ou um solvente orgânico e em seguida encaminhado para ser utilizado na etapa de fermentação e consequente produção de bioetanol, os processos de sacarificação e fermentação podem ser realizados simultaneamente (SINGH; OLSEN, 2011).

3.3.1 Obtenção da biomassa

A recuperação da biomassa microalgácea contida no cultivo, requer o emprego de diferentes operações de separação sólido-líquido (KLEIN, 2013) que segundo Brennan e Owende (2010), a seleção da técnica de colheita mais apropriada necessita do conhecimento de características como diâmetro e concentração de células no cultivo das microalgas, além do valor agregado dos produtos desejados, uma vez que o valor da colheita pode corresponder de 20 a 30% do custo total do processo de produção de biomassa a partir de microalgas.

A recuperação de microalgas envolve dois estágios sequenciais: separação inicial da biomassa do meio de cultivo e espessamento. O primeiro estágio da colheita opera com fatores de concentração de 100 a 800 vezes para atingir concentrações de matéria sólida de 2 a 7% (KLEIN, 2013). A concentração inicial da biomassa no cultivo e a técnica empregada são fatores que interferem intensamente nesta etapa. Utiliza-se as técnicas de floculação, flotação e a sedimentação por gravidade.

3.3.2 Processamento das microalgas

Por serem perecíveis, as microalgas devem ser processadas logo após a etapa de recuperação. Caracteriza-se por ser uma etapa de preparação para o rompimento da parede celular das microalgas, que consiste no primeiro passo para destruir a parede celular microalgal para recuperar açúcares no meio extracelular. O uso de celulase e pectinase é, portanto, uma maneira de desestruturar a parede celular de microalgas resistentes (BCHIR et al., 2016). A desidratação ou secagem pelo método da liofilização é um dos processos de desidratação mais utilizados em laboratório, porém apresentam um custo mais elevado, especialmente em operações em larga escala (BRENNAN e OWENDE, 2010). Uma possível solução para a redução no gasto energético nesse processo seria a utilização da energia solar com a construção de estufas com fluxo de ar e controle de temperatura.

3.3.3 Hidrólise

A produção de etanol a partir de biomassa de algas requer pré-tratamento para reduzir a recalcitância do substrato e aumentar a acessibilidade do amido para microorganismos fermentativos para a produção de bioetanol (GALLEGO et al., 2015). Para obtenção dos carboidratos que encontram-se no interior das paredes celulares das microalgas, deve-se romper este envoltório celular para liberação do amido contido e consequente produção de bioetanol de terceira geração (HARUN e DANQUAH, 2011). Na hidrólise da biomassa de microalgas é extraído os açúcares fermentescíveis, substrato que será fermentado para obtenção do bioetanol. Segundo Brennan e Owende (2010) os métodos para a hidrólise da biomassa ou sacarificação são: homogeneizadores de alta pressão; autoclavagem ou adição de ácido clorídrico (HCl); hidróxido de sódio e lise alcalina. A Tabela 4 resume alguns dos principais métodos utilizados para rompimento da parede celular das microalgas.

Métodos	Descrição
Choque térmico	As células são ressuspensas em água destilada, autoclavadas durante 20 min a 120 ° C e imediatamente imersas em banho de gelo durante 15 min.
Trituração manual	As células são suspensas em 5 mL de água destilada, trituradas manualmente com auxílio de grãos rígidos e em seguida adicionada 70 mL de água destilada e mantidas durante 1 h a 37 ° C para melhorar a difusão de compostos intracelulares no meio.
Tratamento ácido	As células são suspensas em 75 mL de solução de H ₂ SO ₄ a 1% e tratadas na autoclave a 120 ° C durante 20 minutos.
Tratamento básico	As células são suspensas em 75 mL de solução de NaOH 0,75% e tratadas na autoclave a 120 ° C durante 20 minutos.
Digestão enzimática	As células são suspensas em tampão acetato (0,1 M, pH 4) adicionado com a mistura de enzimas Sumizyme AP2 (0,1-0,2% em relação à matéria seca). A incubação realizada a 65 ° C durante 4 h. A reação é interrompida por imersão em água fervida durante 15 min. 3% da solução de cloranfenicol é adicionada antes da conservação para assepsia.

Tabela 4. Métodos utilizados para o rompimento da parede celular microalgal. **Fonte:** (Adaptada de BCHIR et al. 2016).

3.3.4 Fermentação

A fermentação é um dos métodos mais utilizados para a produção do bioetanol e as microalgas fornecem carboidratos e proteínas que podem ser usadas como fontes de carbono para a fermentação (HARUN et al., 2010). A fermentação alcoólica é a conversão dos açúcares da biomassa, advindos do amido ou celulose, em etanol. Esta biomassa é convertida em açúcares e o fermento quebra-o e converte-o em etanol (MCKENDRY, 2002b) (Figuras 2 e 3). A conversão de açúcares microalgais para o bioetanol dependerá da eficiência da sua extração e capacidade de qualquer método etanológico escolhido e dos microrganismos que serão utilizados (DOAN et al., 2012).

Um fermento comercial liofilizado *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado por Bchir et al. 2016 para fermentação em que, um grama de levedura foi ressuspensa assepticamente em 9 mL de água destilada e mantida a 30 °C durante 15 min, em seguida foi adicionada ao meio Sabouraud líquido e incubada a 30 °C durante à noite sob agitação para constituir a pré-cultura de levedura. Segundo Bchir et al. 2016 para cada 50 mL de cada sobrenadante para fermentação foi adicionado 5 mL de pré-cultivo após a sua autoclavagem, isto com o pH ajustado para $7 \pm 0,1$ e as condições anaeróbicas asseguradas por borbulhamento de nitrogênio para direcionar o metabolismo para a produção de etanol por fermentação que durou 48 h a 30 °C sob condições

de agitação. Após a fermentação, um processo de destilação foi necessário para remover a água e outras impurezas no álcool diluído com uma concentração de 10-15% de etanol (BRENNAN; OWENDE, 2010). O etanol obtido da purificação deverá ter uma concentração de volume de 95,1 a 96,0 % e pode ser usado como aditivo ou substituto da gasolina em automóveis.

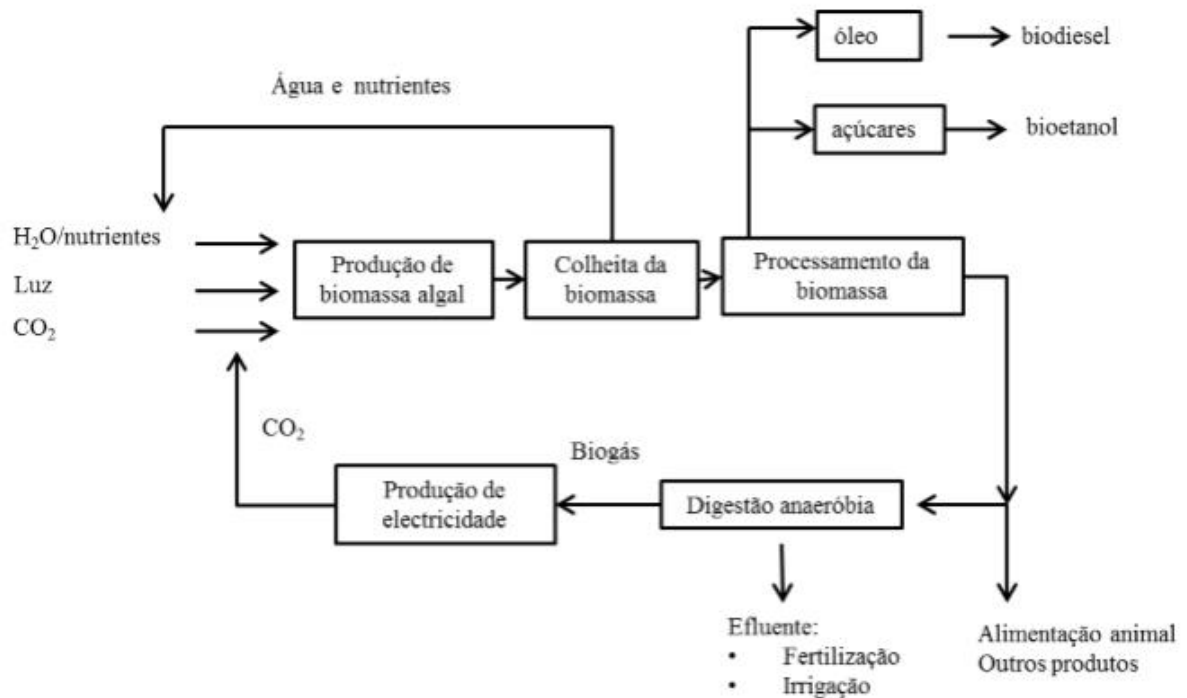


Figura 2. Esquema simplificado do processo para produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal. **Fonte:** (CHISTI, 2008).

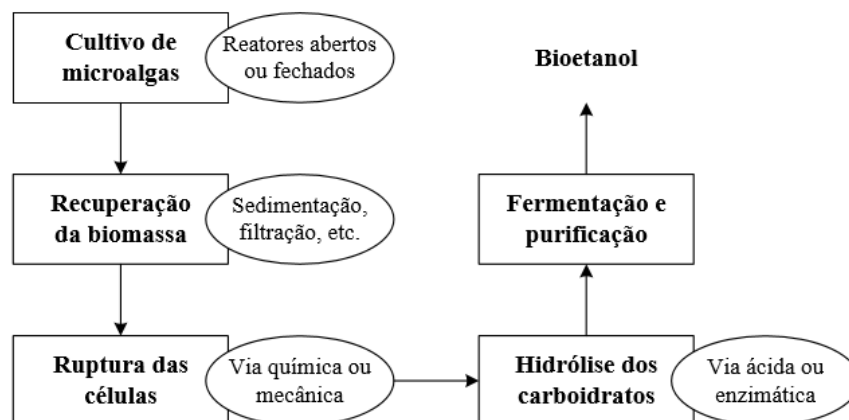


Figura 3. Processos de produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal. **Fonte:** adaptado de (MUSSATO *et al.*, 2010).

Em pesquisas realizadas por Miranda (2011), um dos métodos utilizados, consistiu em selecionar a microalga da espécie *Scenedesmus obliquus* para o estudo da obtenção de açúcares. A microalga foi mantida em meio de cultura Bristol com valor de pH 7, cultivadas em um

fotobiorreator de coluna de bolhas em PVC com 10 L de capacidade e com iluminação artificial, já os ensaios de fermentação foram realizados com leveduras das estirpes *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae I-uvarum*, *Saccharomyces carlbergensis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia stipitis*.

Para Mckendry (2002a) as tecnologias de conversão para a utilização de biomassa de microalgas pode ser dividida em duas categorias básicas: conversão termoquímica e conversão bioquímica, o que pode influenciar a escolha do processo de conversão é o tipo e a quantidade de matéria-prima de biomassa, a escolha da forma de energia utilizada, aspectos econômicos, as especificidades do projeto e a forma final desejada do produto. Na conversão bioquímica, um processo biológico de conversão de energia da biomassa em outros combustíveis, incluem digestão anaeróbia, fermentação alcoólica e produção de hidrogênio fotobiológico (USDOE, 2002).

3.4 As microalgas como biorremediadoras no tratamento de efluentes

Pesquisas têm sido desenvolvidas na busca por meios de cultura para diferentes cultivos de microalgas. A utilização de meio sintético pode representar altos custos com relação aos nutrientes e assim ser um fator limitante para a produção. Uma alternativa de cultivo a ser estudada está relacionada com um dos maiores problemas enfrentados pela sociedade moderna, que é a produção de uma grande demanda de resíduos domésticos e de efluentes derivados de processos industriais. Ao serem lançados sem tratamento no ambiente trazem muitas consequências indesejáveis. Para reduzir esses impactos, os diversos efluentes requerem tratamentos adequados e eficazes.

A técnica de biorremediação utiliza de microorganismos e outros aspectos do ambiente natural para tratar águas residuais de seus nutrientes. As microalgas, em particular, podem ser usadas no tratamento secundário de esgoto para limpar a água contaminada, promovendo a eliminação, atenuação ou transformação de substâncias poluentes ou contaminantes pela aplicação de processos biológicos. (KSHIRSAGAR, 2013; DIVYA et al., 2015; THOMAS et al., 2016).

Os compostos orgânicos presentes nos diversos tipos de efluentes são essenciais para o crescimento das microalgas, estas por sua vez favorecem a biorremediação das águas residuais com a subtração de elementos como nitrogênio e fósforo presentes em quantidades consideráveis nos efluentes. O cultivo de microalgas dispõe da possibilidade eficiente de lidar

com esses efluentes devido à capacidade desses microrganismos de remover muitas substâncias tóxicas e capturar nutrientes de ambientes aquosos para produzir biomassas úteis (KOTHARI et al., 2013). Para Harun et al. (2010) as microalgas proporcionam vantagens para o tratamento de efluentes através do aumento no desempenho da degradação e remoção de rejeitos, além de metais pesados em águas residuais industriais, contribuindo na captação de gás carbônico e na consequente redução e equilíbrio da concentração desse gás na atmosfera. Essa capacidade de remoção de nutrientes através do cultivo de microalgas e sua eficiência na biorremediação já havia sido demonstrada em vários tipos de efluentes como esgoto doméstico, resíduos industriais e resíduos agrícolas (LIM et al., 2010).

3.5 Cultivo de microalgas

As microalgas necessitam de fatores abióticos para a produção primária dos compostos orgânicos que as constituem, portanto, são fortes bioindicadoras da qualidade da água de onde retiram nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Atualmente, um dos métodos mais eficientes para o tratamento de efluentes é usá-los como fontes de nutrição de baixo custo para o cultivo de microrganismos, incluindo microalgas (CHEN et al., 2015). Estas microalgas acumulam o nitrogênio e o fósforo presentes no ambiente, assimilando-os em quantidades maiores que as necessárias ao seu crescimento e posteriormente os convertem em substâncias de reservas (biomassa) que podem ser transformadas em produtos com valor comercial (DANTAS, 2013).

O cultivo de microalgas pode ser desenvolvido por alguns tipos de processos: autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. No cultivo autotrófico, as microalgas utilizam luz e carbono inorgânico (CO_2) como fonte de carbono para sintetizar energia química através da fotossíntese (CARDOSO et al. 2011). Para Dantas (2013), é importante verificar alguns parâmetros que devem ser analisados para a viabilidade do cultivo e consequente obtenção da biomassa: o fácil cultivo em larga escala; adaptação do sistema de cultivo em condições artificiais; a melhor condição de síntese do composto de interesse; potencial e elevada taxa de crescimento, uma vez que o ciclo de vida das microalgas é curto, permitindo que a população seja duplicada em curto tempo; além da minimização de custo de produção e outros aspectos a serem analisados no decorrer do processo.

As microalgas requerem condições de cultivo adequadas que possam conduzir a uma elevada taxa de crescimento e produtividade (FERNANDEZ et al., 2013). Alguns fatores

limitantes ao crescimento e a potencial produção de biomassa pelas microalgas fotossintetizantes estão relacionadas ao fornecimento de nutrientes, luz e fontes de carbono. A falta de um ou alguns desses fatores, como também o cuidado para que todas as microalgas tenham acesso de forma homogênea a essas condições, são cruciais para a obtenção de uma biomassa nutritiva (DANTAS, 2013).

Desta forma, para o cultivo das microalgas, são utilizados fotobiorreatores, estes podem ser classificados em: sistemas abertos e sistemas fechados. Para Cardoso et al. (2011) os sistemas de tanques abertos são os mais indicados para o cultivo de microalgas de forma autotrófica devido ao seu baixo custo de operação e, concomitantemente, pode-se utilizar águas residuárias para o cultivo de microalgas por conter nutrientes abundantes como fontes de nitrogênio, fósforo e carbono, os quais são necessários para o crescimento das microalgas. Os sistemas híbridos também podem ser utilizados, estes combinam dois estágios separados de crescimento. O primeiro envolve o cultivo em Fotobiorreatores (FBRs) até que se atinja uma quantidade de células que reduzam os efeitos de contaminação por espécies indesejadas e bactérias (KLEIN, 2013). O segundo estágio envolve a transferência das microalgas para as lagoas abertas.

As lagoas artificiais do tipo *raceway* são as mais empregadas, devida às lagoas circulares serem menos atrativas por apresentarem alto custo nas estruturas em concreto, consumo elevado de energia para agitação, complexidade mecânica para injeção de CO₂ e uso ineficiente da terra (KLEIN, 2013). Existem desvantagens relacionadas ao cultivo autotrófico das microalgas, que é considerado lento devido às limitações na captação de luz impostas pela alta densidade celular feita em cultivos de grande escala e desvantagens relacionadas à inibição da fotossíntese pelo excesso de luz em dias de muita insolação sobre os sistemas abertos, além de maior risco de contaminação (CARDOSO et al., 2011). Em nível laboratorial é possível controlar esses efeitos e superar as desvantagens quando o cultivo é feito em pequena escala, mas necessita-se de pesquisas no intuito de melhorar a eficiência dos cultivos abertos que trazem vantagens com relação ao controle da temperatura, menos agentes oxidantes, menos danos às células e alto custo dos sistemas fechados para produção em grande escala.

Algumas das limitações dos sistemas abertos levaram ao desenvolvimento de FBRs, definido como um reator projetado para o crescimento fotoautotrófico de microrganismos, de forma isolada do meio externo. Os principais designs de FBRs incluem fotobiorreatores tubulares, que maximizam a captura da luz solar; o de placas paralelas, que possuem uma grande área de superfície exposta à iluminação solar e alcança altas taxas de densidades de

células e o fotobiorreator de coluna, que apresenta agitação eficiente, maiores taxas volumétricas de transferência de massa e as condições facilitadas de crescimento e controle (KLEIN, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia proposta neste estudo, consistiu em uma abordagem quali-quantitativo do tipo pesquisa experimental, na qual foi desenvolvida nas seguintes etapas (Figura 4). A sequência demonstra o fluxo de atividades realizadas no decorrer das pesquisas experimentais e apresentam uma sequência lógica para o alcance dos objetivos do trabalho.

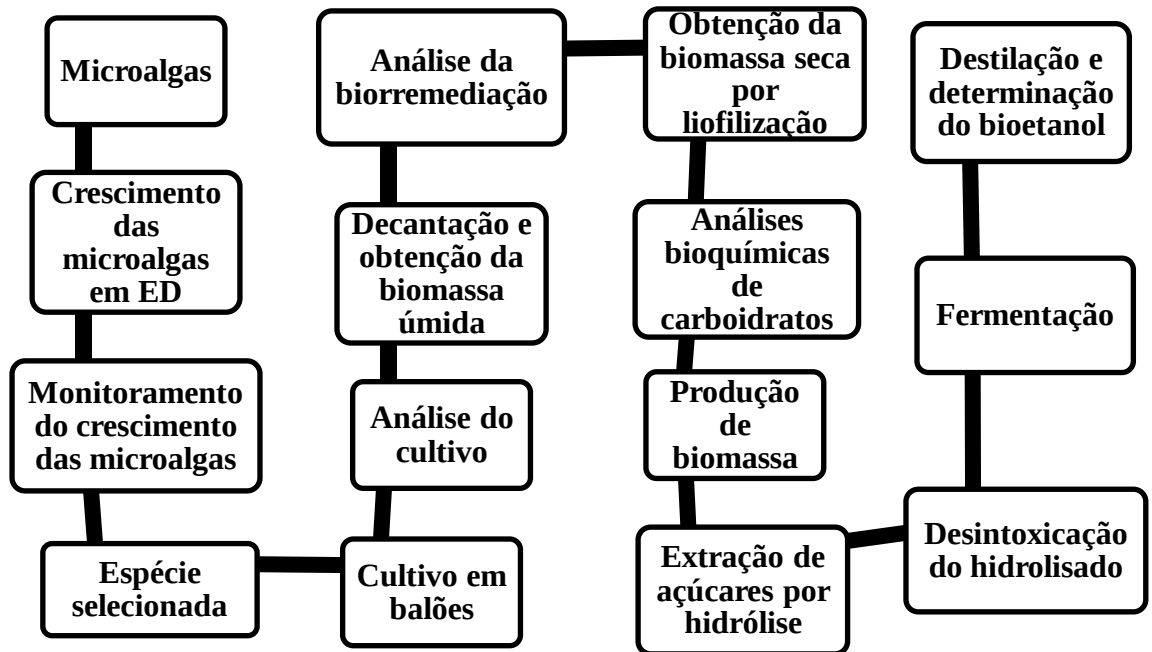


Figura 4. Processo contínuo simplificado demonstrando as etapas realizadas desde o cultivo de microalgas até a produção de bioetanol

4.1 Microrganismos

4.1.1 Microalgas

Para o estudo foram selecionadas cinco cepas do banco de dados do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) que obtinham um maior percentual de carboidratos e uma melhor taxa de crescimento (Tabela 5). As cepas de microalgas (D338); (D464); (D467); (D577); (D498) foram inoculadas em meio de cultura

sintética (WC) (Tabela 7), sob temperatura a 25°C e iluminação artificial para favorecer o crescimento.

Código	Espécie	Procedência
D338	<i>Oocysttis solitaria</i>	Bebedouro das galinhas – Bayeux (PB)
D464	<i>Geminella</i> sp.	Aldeia Tramataia – Viveiro Seco – Poça 2 (PB)
D467	<i>Actinastrum hantzshii</i>	Fontes dos milagres – Parque nacional – (PI)
D577	<i>Chroococcus</i> sp.	Lagoa do Paraíso – (CE)
D498	<i>Kirchneriella</i> sp.	Açude Fazenda Panati – (PB)

Tabela 5. Espécies de microalgas selecionadas para o cultivo em efluente doméstico e procedência.

4.1.2 Efluente doméstico

O efluente doméstico (ED) foi coletado na ETE- Estação de tratamento de esgotos de Mangabeira – João Pessoa, no módulo 1, já na fase de pré-despejo no rio Cuiá localizado em João Pessoa/PB. Em seguida foi colocado em um balão de vidro de 3 litros para ser encaminhado para a autoclave a uma temperatura de 120°C por 30 minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, o efluente foi filtrado em bomba de vácuo com papel filtro unifil 125 mm, espessura 0,20 mm e retenção de partículas de 7 a 12 µm, e em seguida refrigerado a 2°C de temperatura. Uma amostra foi retirada e encaminhada ao Laboratório de Saneamento na Universidade Federal da Paraíba para as análises físico-químicas descritas no item 4.1.4.7.

4.1.3 Reagentes

Os reagentes químicos utilizados ao longo do trabalho experimental estão especificados na Tabela 6 a seguir.

Reagentes	PM	Fórmula	Pureza	Marca
Ácido sulfúrico 3N	98,08	H ₂ SO ₄	p.a.	EMSURE
Ácido nítrico 65 %	63,01	HNO ₃	p.a.	EMSURE
Hidróxido de cálcio	74,09	Ca(OH) ₂	96%	Riedel-deHaën
Ácido 3,5-dinitrossalicílico,	228,12	C ₇ H ₆ O ₅ .H ₂ O	puro	Merck
Hidróxido de sódio	40,04	NaOH	Puro	JMS
Tartarato duplo de sódio e potássio	282,23	C ₄ H ₄ KNaO ₆ .4H ₂ O	p.a.	Panreac
D-Glucose anidra	180,16	C ₆ H ₁₂ O ₆	p.a.	Pronalab
Fenol a 4 %.	94,11	C ₆ H ₆ O	p.a.	Merck

Tabela 6. Reagentes utilizados

4.1.4 Crescimento das microalgas

Foi utilizado efluente doméstico para o cultivo de cinco espécies de microalgas para acompanhar e avaliar, por meio de análise de fluorescência, as cepas que mais cresciam. Os critérios de seleção das cepas que foram obtidas do banco de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) esteve relacionado às microalgas com maiores teores de carboidratos e melhores índices de crescimento (Tabela 5).

Foram utilizados tubos de ensaios, previamente esterilizados, contendo 6 mL do meio de cultivo para cada espécie nas diluições de 25% e 50%, todos em triplicata conforme o item 4.1.4.1.

4.1.4.1 Preparação dos meios de cultivo

Para a preparação dos meios de cultivo em tubos de ensaio preparou-se duas soluções com diluições de 25% e 50 % para o efluente doméstico (ED). Foi inoculado 6 mL da diluição de 25% (ED + água destilada) em 15 tubos de ensaios e em seguida 6 mL da diluição de 50% (ED + água destilada) em outros 15 tubos de ensaios. Para cada uma das cinco cepas monitoradas, um meio controle foi utilizado em triplicatas nos tubos de ensaios que continham o meio sintético WC (Tabela 7) e a microalga. Em triplicatas, cada cepa das cinco espécies de microalgas foi inoculada nos tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% (ED + água destilada + cepa).

Para inocular as cepas nos tubos de ensaios contendo as diluições de efluentes domésticos e nos tubos de ensaios contendo o meio controle (WC) foi realizada a contagem

celular de cada espécie de microalga após inocular cada cepa nos tubos de ensaios. A contagem foi feita em microscópio óptico com um aumento total de 100X. Um hemocitômetro da marca Albert Sass - Fuchs-Rosenthal, contendo marcações de forma a montar 16 quadrados maiores e, dentro desses, 16 quadrados menores de mesmo tamanho, auxiliou na contagem das células, que de acordo com o número obtido é multiplicado por um fator e se obtém a quantidade de células por mililitro. A quantidade a ser inoculada nos tubos de ensaios deve estar entre 10.000 e 15.000 mil células por mililitro após a multiplicação pelo fator correspondente.

Parâmetros	Valores
NO_3^- (mg L ⁻¹)	42,6
NO_2^- (mg L ⁻¹)	0,0117
NH_4^+ (mg L ⁻¹)	<0,01
PO_4^- (mg L ⁻¹)	2,8
Rigidez parcial – Ca ²⁺ (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	0,2
Rigidez parcial – Mg ²⁺ (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	0,6
Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	46
Condutividade elétrica (mS cm ⁻¹)	0,297
Total de sólidos dissolvido (mg L ⁻¹)	193
Turbidez (NTU)	4,63
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	36

Tabela 7. Meio de cultura sintético WC. **Fonte:** modificado de (CALIXTO, 2016).

4.1.4.2 Monitoramento do crescimento por fluorescência

O monitoramento do crescimento foi feito por análises da fluorescência — “in vivo” das amostras em um fluorômetro Turner Design, modelo 10005R, até a fase estacionária. Os tubos de ensaios com o cultivo foram mantidos a 25 ± 1 ° C e um sistema de luz artificial ($4,5 \pm 0,3$ kLux) por um fotoperíodo de 12 horas.

O acompanhamento foi realizado em dias alternados por um período de 13 (treze) dias, contabilizados 7 (sete) registros. Através deste monitoramento, foi possível plotar os valores obtidos nas medições no equipamento de fluorescência e os respectivos fatores de multiplicação correspondentes em cada leitura, e assim identificou-se a cepa que obteve o maior crescimento na diluição correspondente.

Após a seleção da espécie que obteve o maior crescimento correspondente à diluição do meio de cultivo, iniciou-se a 2ª etapa de cultivo.

4.1.4.3 Cultivo da microalga da espécie (D467WC) - *Actinastrum hantzshii*

A espécie (D467WC) - *Actinastrum hantzshii*, selecionada na primeira etapa de cultivo, foi inoculada em balões de fundo redondo com capacidade de 6 L contendo o efluente doméstico na proporção de 25 % e a água destilada na proporção de 75%, ambos esterilizados. O teste foi feito em triplicata e os balões contendo a cepa e o meio de cultivo na concentração de 25%, como também os balões do meio controle (cepa e meio WC) foram mantidos em uma câmara de cultura nas condições de crescimento de 25 ± 1 ° C, um sistema de luz ($4,5 \pm 0,3$ kLux) e um fotoperíodo de 12 horas, com pH entre 7 e 8 e aeração contínua por injeção de ar a pressão padrão (2,0 mL / min) usando um mini compressor Resun AOC2. Antes de inocular no meio de cultivo, uma amostra do meio foi encaminhado ao laboratório de saneamento – UFPB para análise dos seguintes parâmetros: condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, sólidos totais voláteis, sólidos totais fixos, turbidez, pH, fosfato, nitrato, nitritos, demanda química de oxigênio (DQO) e metais pesados (Alumínio). As técnicas utilizadas tiveram como base a literatura do Standard Methods 22ª edição – For the Examination of water and wastewater (RICE et al., 2012) e Manual de Análises Físico-Químicas de Águas de Abastecimento e Residuárias (SILVA; OLIVEIRA, 2001).

4.1.4.4 Análise do cultivo da microalga D467WC - *Actinastrum hantzshii*

Em dias alternados, foi feita a análise de fluorescência e contagem celular em hemocitômetro da marca Albert Sass - Fuchs-Rosenthal no microscópio óptico com um aumento total de 100X, para a obtenção das curvas de crescimento até a fase estacionária. Com a contagem celular foi possível obter a densidade celular. Após esta fase, interrompeu-se o cultivo e encaminhou as amostras para a etapa de decantação e em seguida centrifugação.

4.1.4.5 Determinação do peso seco do cultivo da microalga D467WC

A análise do peso seco da biomassa consiste em um método gravimétrico que foi realizado em triplicata ao final do cultivo. Para a realização dessa análise foi utilizada balança analítica da marca Shimadzu, modelo ATY224 verificada pelo INMETRO nº 059/2014. Os dados de biomassa são expressos em g.L⁻¹. Para determinação do peso seco do cultivo de microalgas foi filtrado 5 mL do volume da cultura em filtros de fibra de vidro de 47mm de

diâmetro e poro de 0,45 µm, previamente lavados com água destilada, secos a 80 °C durante 1,5 h e tarados. Após a filtração, os filtros contendo a biomassa ficaram a 80 °C por 1,5 h na estufa e em seguida foram pesados novamente. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo do peso seco da biomassa (SILVA, 2014).

$$Bs(g.L - 1) = \frac{F2-F1}{V} \quad (1)$$

Em que:

Bs = biomassa seca da amostra (g.L⁻¹),

F1 = massa do microfiltro seco (g),

F2 = massa do microfiltro com biomassa seca (g)

V = volume de cultivo filtrado (L)

4.1.4.6 Obtenção da biomassa úmida por decantação

Para o processo da decantação do cultivo da cepa D467WC contendo o efluente doméstico na concentração de 25% e o cultivo do grupo controle, foi necessário manter o material de estudo em um freezer sob 9 °C por um período de 72 horas para decantação. Após este processo, separou-se o sobrenadante por meio de um passador de borracha. Para a obtenção da biomassa úmida, o material decantado foi colocado na centrífuga refrigerada marca Novatecnica, modelo NT 825 a 10 °C durante 15 minutos, com rotação de 3100 rpm. Após o processo da centrifugação, as amostras foram congeladas a -30 °C e posteriormente, liofilizadas.

4.1.4.7 Análise da biorremediação do efluente

O meio contendo o efluente doméstico na concentração de 25% com água destilada que foi utilizado para o crescimento das microalgas da cepa D467WC, foi esterilizada e em seguida foi encaminhado ao laboratório de saneamento – UFPB para análise dos parâmetros descritos no item 4.1.4.3. Os resultados obtidos serão comparados com as análises realizadas antes do cultivo.

4.1.4.8 Obtenção da biomassa seca por liofilização

As amostras das biomassas congeladas foram liofilizadas em um liofilizador modelo LD1500, marca TERRONI, por 24 horas, para que o processo da desidratação fosse completo. Em seguida, pesou-se as amostras e armazenou-as congeladas a -30 °C.

4.1.4.9 Produtividade da biomassa

Após a biomassa centrifugada ter sido liofilizada até a obtenção de peso constante, foi possível determinar o rendimento em biomassa (RB) (g L⁻¹). A produtividade da biomassa (PB) é a biomassa seca produzida em gramas por litro que é determinada como o produto da taxa de crescimento específica (μ) e concentração de biomassa (X), na fase de crescimento exponencial (GRIFFITHS e HARRISON, 2009).

Analizou-se os parâmetros relacionados ao crescimento das microalgas: tempo de cultivo; taxa de crescimento (k), que representa a taxa de duplicação diária das células, calculada pela equação descrita por Fogg e Thake (1987) – (Equação 2) e taxa máxima de crescimento populacional (Rmax), que corresponde ao número máximo de células obtidas ao final de cada experimento, subtraindo a densidade celular inicial do inóculo. Para determinação da PB, as amostras foram coletadas no final da fase exponencial e calculadas de acordo com a Equação 3.

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) \cdot (t - t_0)^{-1} \quad (2)$$

Em que:

μ = velocidade específica de crescimento

N_0 = número inicial de células. mL⁻¹

t_0 = tempo inicial

N = número final de células. mL⁻¹

t = tempo t

$$P = \frac{BS_f - BS_i}{t \cdot x \cdot v} \quad (3)$$

Em que:

P = produtividade (g·L⁻¹·dia⁻¹)

BS_i = biomassa seca no dia zero de cultivo (g·L⁻¹)

BS_f = biomassa seca no último dia de cultivo (g·L⁻¹)

t = tempo decorridos em dias entre a BS_i e a BS_f

v = volume em litros

4.1.5 Análise de carboidratos totais da microalga (D467WC) - *Actinastrum hantzshii*

Os teores de açúcares totais foram determinados pelo método do reagente fenol-sulfúrico de Derner, 2006 adaptado (KORCHERT, 1978).

Uma curva padrão de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose anidra de concentração igual a 300 µL/mL, com um gradiente de concentração que variou de 0 a 240 µL/mL. Foi pesado 5 mg da amostra liofilizada e em seguida submetida à hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1,0N a 100 °C em banho maria por 1 hora. Em temperatura ambiente as amostras foram resfriadas em seguida centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Após a extração, 500 µL do extrato alcalino foi transferido para um tubo de ensaio no qual foi adicionado 1 mL de NaOH 1 N e 500 µL de fenol a 4 %. Esta solução ficou em repouso durante 30 minutos. Após o repouso, adicionou-se 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado. Após esfriar a temperatura ambiente foi lida a absorbância da amostra em espectrofotômetro U2M Quimis a 485 nm.

4.1.6 Bioetanol a partir da microalga *Actinastrum hantzshii*

4.1.6.1 Biomassa

A biomassa microalgal necessária para a produção de bioetanol foi cultivada em balões de fundo redondo de 6 L, contendo o efluente doméstico na concentração de 25 % e 75% de água destilada. Foram cultivados 240 L de forma alternada em balões que foram mantidos em uma câmara de cultura nas condições de crescimento de 25 ± 1 ° C, um sistema de luz (4,5 ± 0,3 kLux) e um fotoperíodo de 12 horas, aeração contínua por injeção contínua de ar a pressão padrão (2,0 mL / min) usando um mini compressor Resun AOC2 e pH entre 7 e 8, no período de 08 de agosto de 2018 a 02 de janeiro de 2019 (Figura 11). O processo simplificado para a produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal consta na Figura 12.

4.1.6.2 Processo para ruptura da parede celular e extração dos açúcares da microalga (D467WC)

- *Actinastrum hantzshii*

Os carboidratos intracelulares devem estar disponíveis para a fermentação, assim, o primeiro passo consiste em destruir a parede celular microalgal para recuperar açúcares no meio extracelular. Para isso, 1 g de biomassa liofilizada foi utilizada nesta etapa. Dois métodos para ruptura celular e extração de açúcares da biomassa microalgal foram aplicados: tratamentos físicos por sonicação e associação de tratamentos químicos e físicos (ataque ácido e alcalino sob pressão e temperatura). Os ensaios foram feitos em duplicata.

Para o método de sonicação a amostra de 0,5 g de biomassa seca foi colocada num tubo de ensaio de plástico, ao qual foi adicionado 5 mL de água destilada (proporção 1:10). A sonicação da amostra foi realizado no aparelho SoniClean 6 – Sanders, com frequência de 40 KHz a 500 W, durante 30 s. Em seguida, foi resfriado durante 10 min. Para cada amostra, repetiu-se o procedimento cinco vezes para possibilitar o rompimento da parede celular.

Na associação de tratamentos químicos e físicos da biomassa, adicionou-se 5 mL de solução 3 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4), às amostras de 0,5 g biomassa seca (relação 1:10). Após agitação no agitador de vortex, os tubos de ensaio com batoque e cobertos com papel alumínio, foram colocados na autoclave previamente aquecido a 100 °C. Ao marcar 120 °C na autoclave e pressão de 1,2 bar, iniciou-se a contagem de 30 minutos e após o resfriamento, abaixo de 100 °C, que durou aproximadamente 60 minutos, as amostras foram retiradas da autoclave.

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em microfiltros em fibra de vidro Unifil de 0,35 mm de espessura diâmetro e porosidade 0,60 µm. Após filtração, foram identificados os açúcares presentes por determinação do teor em açúcares redutores.

4.1.6.3 Determinação do teor em açúcares redutores

Para determinação do teor dos açúcares redutores foi usado o método DNS (MILLER, 1959). Para preparação do reagente foi necessário dissolver em 1 L de água destilada 10 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 16 g de hidróxido de sódio e 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio. A solução foi, por fim, filtrada e conservada em um frasco escuro. Cerca de 1mL da amostra hidrolisada foi misturada com 2 mL do reagente de DNS, colocados em banho maria a

100 °C durante 10 min e adicionou-se 7 mL de água destilada. A absorbância foi medida a 540 nm usando espectrofotômetro U2M Quimis (OK *et al.* 2018).

4.1.6.4 Ruptura da parede celular e extração dos açúcares da biomassa da microalga (D467WC) - *Actinastrum hantzshii*.

Após a etapa de seleção do método mais eficiente para ruptura da parede celular iniciou-se a extração dos açúcares fermentescíveis da biomassa microalgal. Diante disso, 50 g da biomassa seca (Figura 12) foi utilizada para ruptura da parede celular e extração dos açúcares pela associação de tratamentos químicos e físicos. Preparou-se 500 mL de solução 3 N de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e adicionou-o à biomassa seca (relação 1:10). Após agitação em um Erlenmeyer de 1 litro, tampados com batoque e papel alumínio, a amostra foi encaminhada a autoclave previamente aquecido a 100 °C. Ao marcar 120 °C na autoclave e pressão de 1,2 bar, iniciou-se a contagem de 30 minutos e após o resfriamento, abaixo de 100 °C, que durou aproximadamente 60 minutos, o hidrolisado foi retirado e centrifugado por 15 minutos e o sobrenadante filtrado em papel filtro Unifil 4-7 μm .

4.1.6.5 Purificação do hidrolisado

Para reduzir a concentração de sulfato e inibidores, adicionou-se ao hidrolisado, sob temperatura ambiente, quantidades sucessivas de hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$ que correspondeu a 60 g/L, a 200 rpm por 1 hora. No final, o hidrolisado foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min e o valor de pH ajustado para 5,3 pela adição de ácido nítrico.

4.1.6.6 Fermentação

4.1.6.6.1 Crescimento da levedura

Os ensaios de fermentação foram realizados com leveduras seca industrial das estirpes *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras foram tratadas em meio de cultura (MC) – (Tabela 8) em um Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio de cultura tapados com rolhas de algodão, a 30 °C e 200 rpm, mantidos numa incubadora do tipo shaker da marca Logen Scientific por 10 horas.

Para inocular o hidrolisado utilizou-se leveduras em crescimento exponencial provenientes de pré-culturas que, em geral, situa-se entre as 3 e as 11 horas (MIRANDA, 2011). As leveduras no pré-inóculo foram recolhidas por centrifugação durante 10 min a 3500 rpm e as células foram ressuspensas em água destilada esterilizada com volume necessário para obter uma concentração final de biomassa de 10 g.L⁻¹.

Nutriente	Concentração (g.L⁻¹)
Extrato de malte	3
Peptonas	5
Dextroses	10
Extracto de levedura	3

Tabela 8. Composição do meio MC. Fonte: (LEE et al., 2011)

4.1.6.6.2 Fermentação do hidrolisado

Para preparar o inóculo para a fermentação em duplicata, 350 mL do hidrolisado foram transferidos para um Enrlemeyer de 500 mL e uma quantia equivalente a 15 g/L da suspensão de levedura foram adicionados e encaminhados a uma incubadora do tipo shaker da marca Logen Scientific a 150 rpm e 32 ° C. Ao inocular e, periodicamente, porções de 1 mL foram retiradas para a verificação do grau Brix e acompanhamento da fermentação. Desta forma, o hidrolisado permaneceu na incubadora por 72 h.

4.1.6.8 Destilação

Após 72 horas de fermentação, o caldo de cultura resultante foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min e destilado com unidade de destilação fracionada a 75 ° C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento das cepas e determinação da melhor diluição do Efluente Doméstico (ED)

Após o cultivo das cinco espécies de microalgas feito em tubos de ensaios que foram mantidas a 25°C e iluminação artificial e com as análises de fluorescência realizadas com as cepas durante o cultivo, foi possível perceber que a cepa (D467WC) - *Actinastrum hantzshii*

obteve uma curva de crescimento mais acentuada nas diluições a 25% e a 50% de efluente doméstico (ED) (Figuras 5 e 6) em relação às outras espécies estudadas, porém, o crescimento mostrou-se mais promissor na diluição a 25% de ED como é possível observar na Figura 5. Também foi possível verificar que o cultivo da cepa D467WC em efluente doméstico a uma diluição de 25% foi mais favorável ao crescimento desta microalga se comparado ao grupo controle contendo o meio de cultivo WC (Figura 9) no qual a composição do meio consta na Tabela 7. As cepas D338WC, D464WC, D577WC e D498WC evidenciaram um crescimento consideravelmente inferior nas diluições a 25% e a 50% de efluente doméstico quando comparadas a cepa D467WC na diluição a 25% de ED e aos grupos controles contendo o meio de cultivo WC (Figuras 7, 8, 10 e 11). Pode-se perceber na análise dos gráficos que a microalga com a menor curva de crescimento foi a D577WC, tanto na diluição a 25% quanto na diluição a 50% de ED (figura 11). A cepa D498WC também obteve uma curva de crescimento satisfatória na diluição a 25% de ED, mas o crescimento foi inferior quando comparado ao cultivo no meio WC (Figura 10). Calixto et al. (2016), em sua pesquisa, afirma que as maiores respostas obtidas no acompanhamento do crescimento, especialmente no esgoto doméstico municipal na mesma diluição de 25%, foram observadas com *Chlorella* sp. (D101Z), *Chlamydomonas* sp. (D132WC) e *Lagerheimia longiseta* (D133WC).

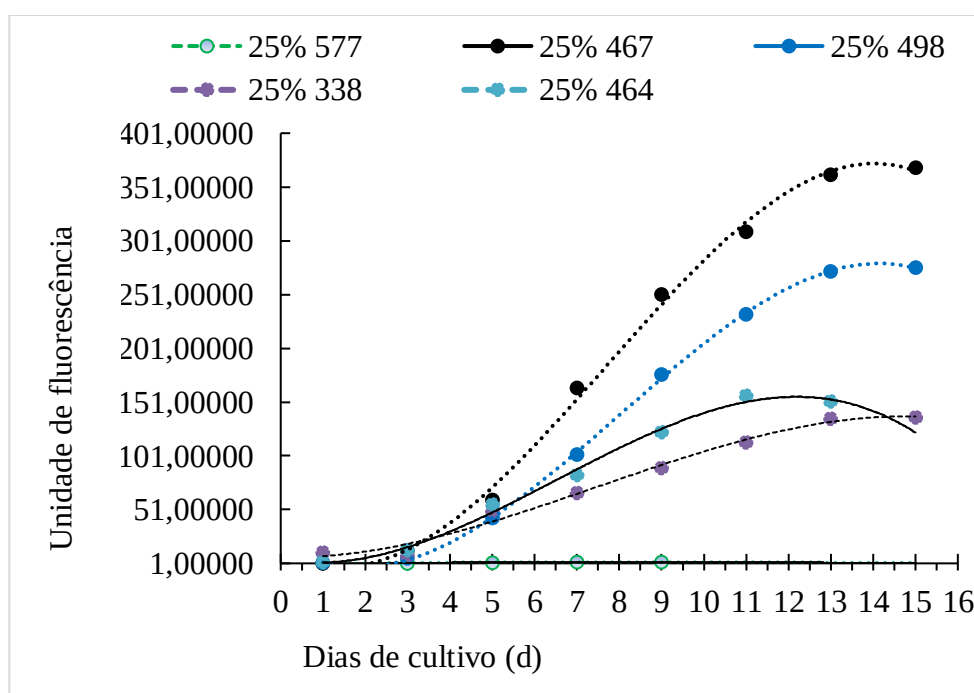


Figura 5. Comparação de crescimento por fluorescência entre as cepas 577, 467, 498, 338 e 464 cultivadas em tubos de ensaios contendo 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C.

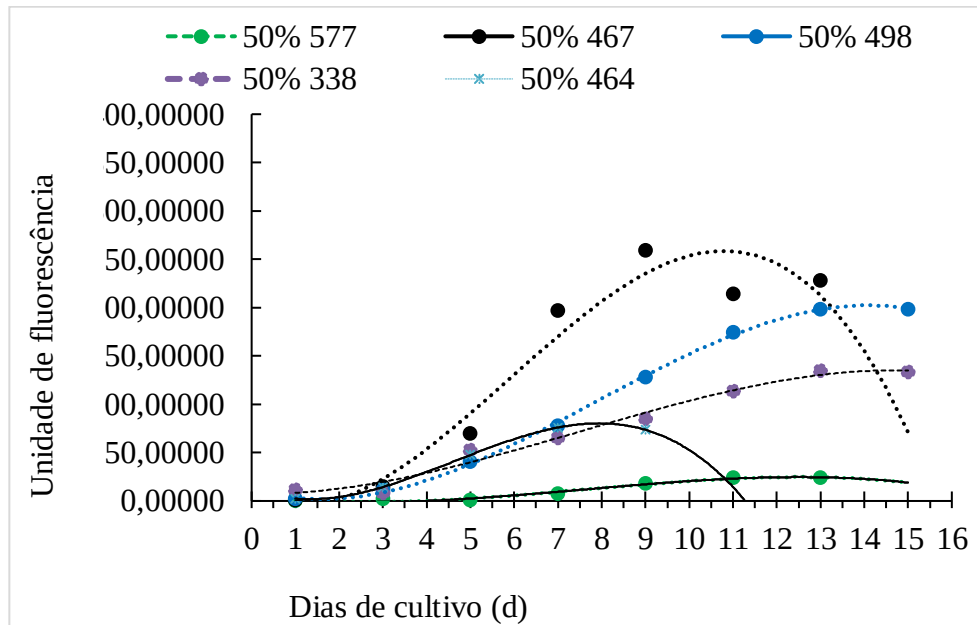


Figura 6. Comparação de crescimento por fluorescência entre as cepas 577, 467, 498, 338 e 464 cultivadas em tubos de ensaios contendo 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C.

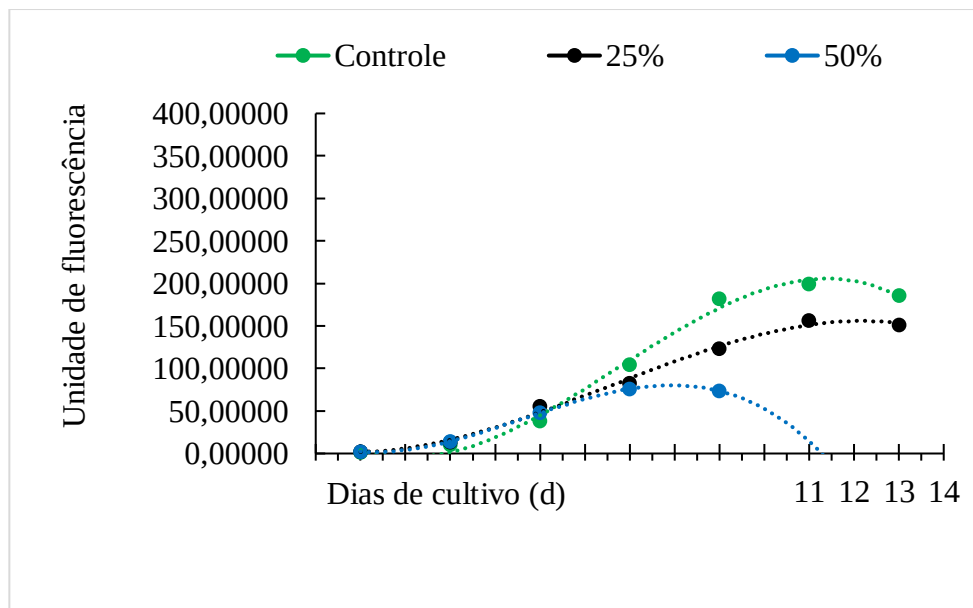


Figura 7. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D464WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

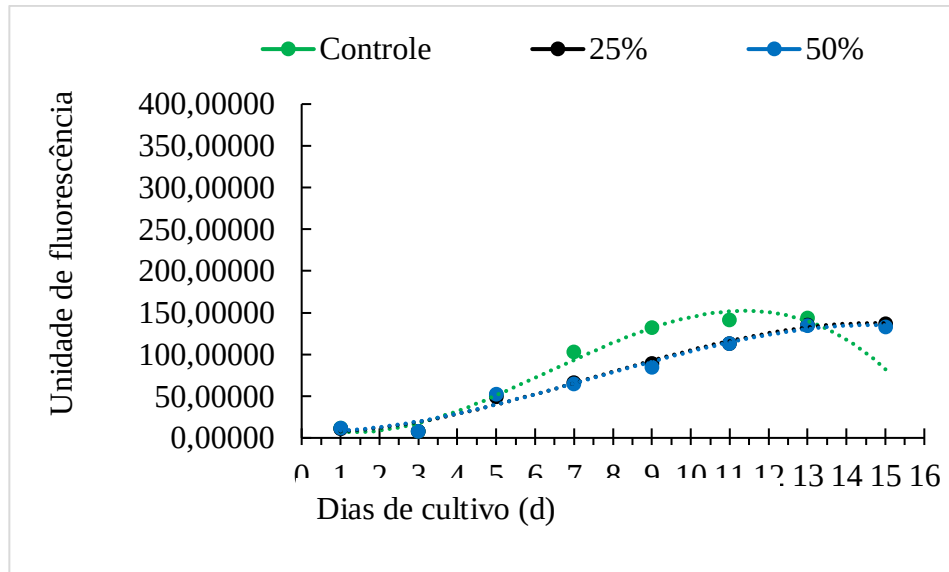


Figura 8. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D338WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

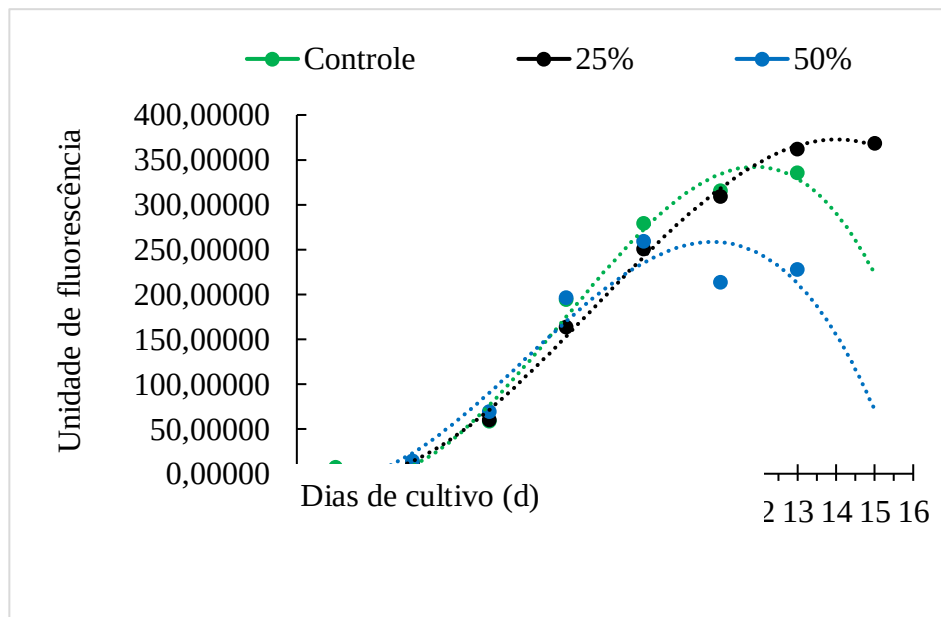


Figura 9. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D467WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

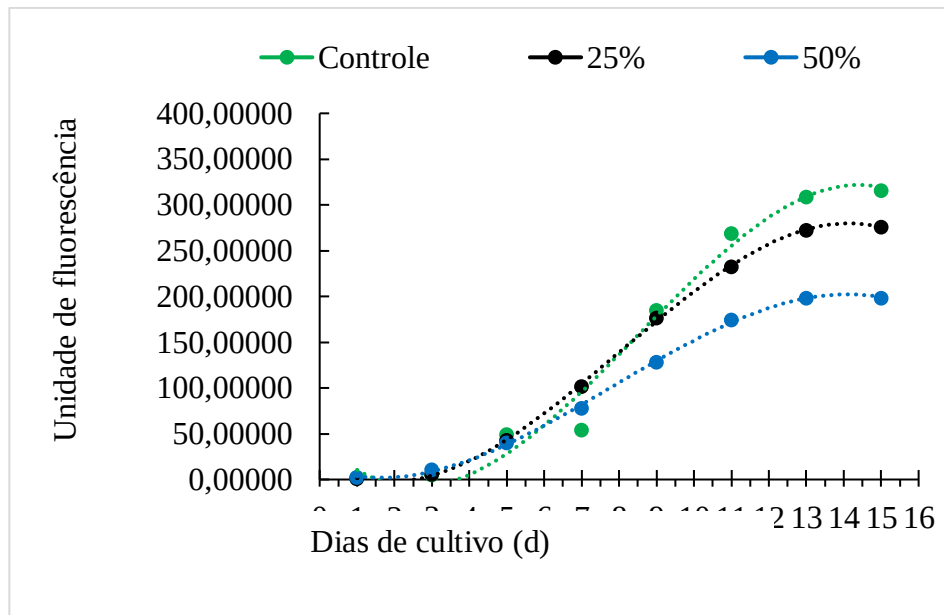


Figura 10. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D498WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

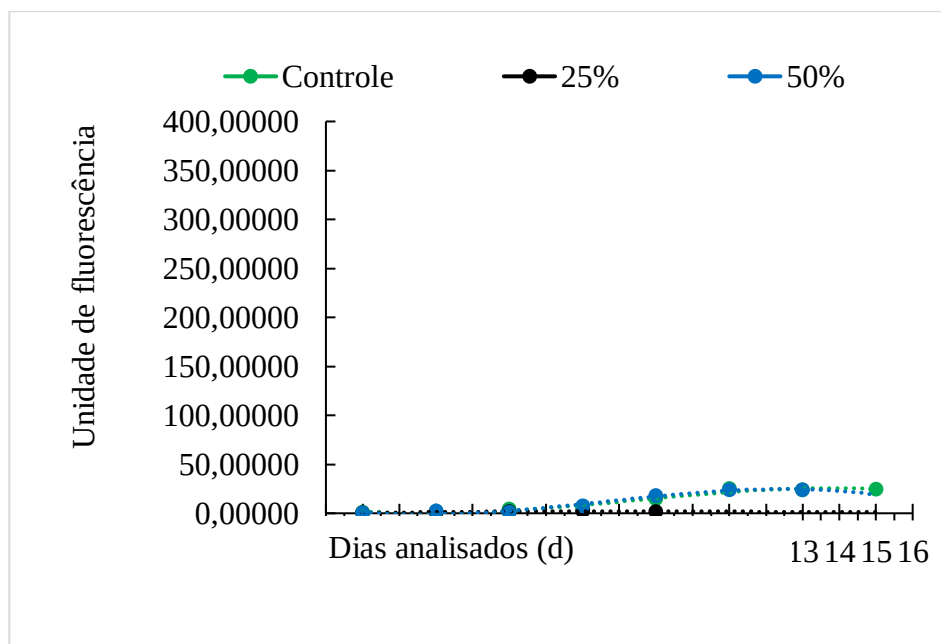


Figura 11. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D577WC cultivada em tubos de ensaios nas diluições de 25% e 50% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

5.2 Microalga selecionada para o cultivo e produção de biomassa

A microalga D467WC - *Actinastrum hantzshii*, foi a que obteve a melhor adaptação no meio (ED) na diluição a 25% com relação ao crescimento e tempo de cultivo (Figura 12).

A espécie de microalga *Actinastrum hantzshii* pertence a Divisão *Chlorophyceae*, Ordem *Chlorococcales* e Família *Coelastraceae*. Possuem o formato de Cenóbios estrelados,

formados por 4-8 células radiando de um centro comum e suas células cilíndricas e afilando gradualmente em direção ao ápice, com tamanho de 2-4 μm diâmetro e 16 - 30,7 μm comprimento de cloroplasto único, parietal e 1 pirenóide na região mediana da célula (SANT'ANNA et al. 2012).

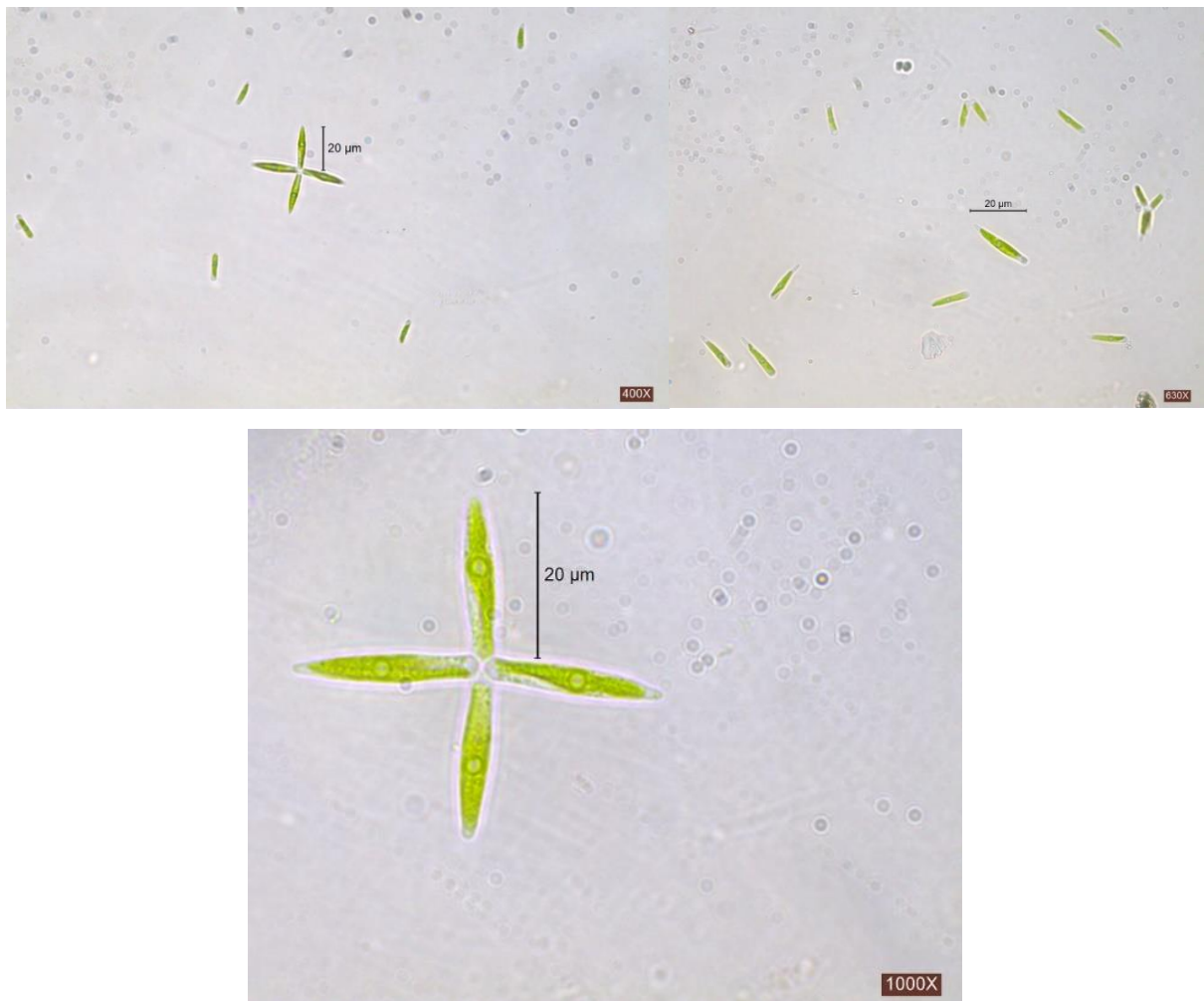


Figura 12. Microalga *Actinastrum hantzshii* vista ao microscópio óptico com aumento de 400X, 630X e 1000X respectivamente.

5.3 Avaliação do cultivo da cepa selecionada D467 - *Actinastrum hantzshii*

No acompanhamento do crescimento em fluorescência do cultivo da microalga *Actinastrum hantzshii* - (D467WC) em balões de fundo redondo com 6 litros de capacidade, mantidos sob iluminação artificial e a 25 °C, foi possível perceber que ocorreu um crescimento mais acentuado e em menor tempo no efluente doméstico se comparado ao cultivo do controle com o meio padrão WC (Figura 13). Este resultado pode estar relacionado a uma melhor

adaptação da cepa às condições nutricionais disponíveis no efluente doméstico na diluição a 25%. No crescimento por contagem celular ao microscópio óptico com o hemocitômetro (Figura 14) foi possível obter um número maior de células em tempo mais curto no cultivo em efluente doméstico na diluição a 25% se comparado ao número obtido no cultivo realizado no meio controle com WC. A fase estacionária no cultivo em efluente doméstico foi alcançada após aproximadamente 9 dias, quando a espécie cultivada no meio controle WC ainda estava na fase de crescimento exponencial. Apesar disto, o número de células na fase estacionária em ambos os cultivos foi aproximado. Em uma análise de fluorescência de microalgas com as espécies D173WC - *Monoraphidium contortum*, D77WC - Clorófitica não identificada, D136Z - *Chlorococcum* sp. e D124WC - *Ankistrodesmus* sp. apresentaram os melhores desempenhos nas culturas em água de lavagem de biodiesel com um tempo de cultivo médio entre 12 e 14 dias Sassi, et al. (2016).

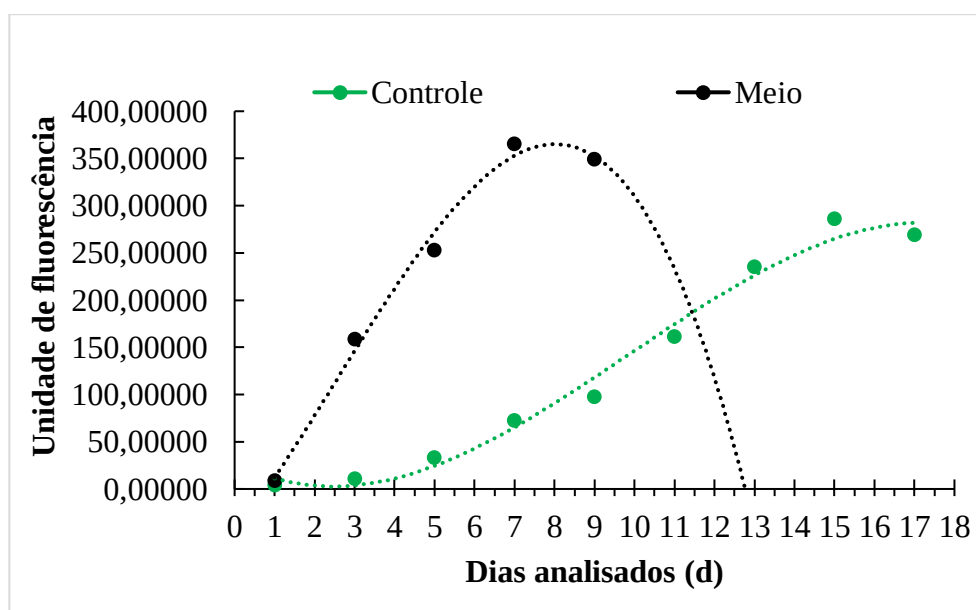


Figura 13. Comparação de crescimento em fluorescência com a cepa D467WC cultivada em balões de 6 litros na diluição de 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial e a 25°C.

Na contagem celular do cultivo com a cepa D467WC - *Actinastrum hantzshii* pode-se comparar a densidade celular (células mL⁻¹) da microalga cultivada em meio controle (WC) e em ED. Uma maior densidade celular, equivalente a 43×10^5 células mL⁻¹, foi obtida no cultivo em ED realizado durante 11 dias, já no cultivo em WC a densidade celular foi equivalente a 39×10^5 células mL⁻¹ realizado durante 13 dias (Figura 14). Diante do crescimento observado da microalga em ED e no meio controle WC, torna-se possível a substituição do meio sintético pelo efluente analisado na devida concentração. Em comparação com um estudo realizado por

Silva (2013) para um cultivo em ED com a espécie *Scenedesmus* sp. que se iniciou com uma concentração celular de 202×10^4 células mL^{-1} , o melhor resultado de densidade celular obtido com a mesma diluição de 25% foi de $1573 \pm 12 \times 10^4$ células mL^{-1} .

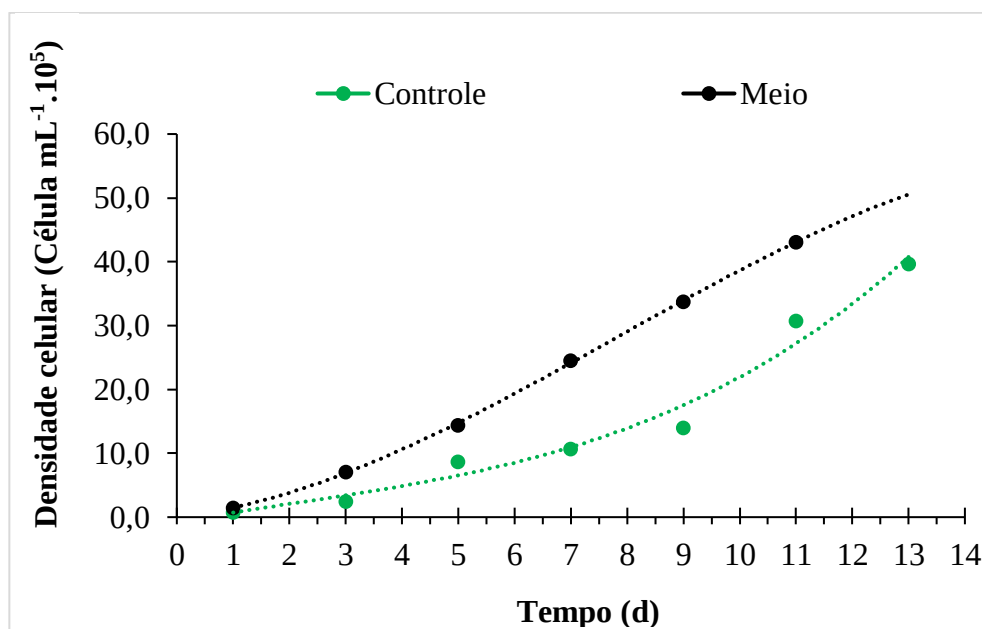


Figura 14. Comparação de crescimento por contagem celular em microscópio óptico com hemocítmetro com a cepa D467WC cultivada em balões de 6 litros na diluição de 25% de efluente doméstico mantidos sob iluminação artificial a 25°C e aeração constante.

5.4 Peso seco da biomassa produzida no cultivo da cepa D467WC - *Actinastrum hantzshii*

Ao final do cultivo pôde-se obter o peso seco da biomassa que foi correspondente a $0,200 \text{ g.L}^{-1}$. Este valor é bem superior ao encontrado por Calixto (2016) no cultivo da espécie *Pediastrum tetras* para a diluição de 25% de ED que foi de $0,062 \text{ g.L}^{-1}$.

5.5 Teores de açúcares totais na biomassa seca da microalga *Actinastrum hantzshii*

Para a produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal, que é utilizada como matéria-prima, a produtividade de carboidratos na célula deve ser alta. Pesquisadores afirmam que o gênero de *Chlorella* possui um elevado teor de carboidratos, especialmente as espécies de *Chlorella vulgaris*, com um teor carboidratos que variam entre 37% - 55% do seu peso seco (BRENNAN; OWENDE, 2010; DRAGONE et al., 2011). Os teores de açúcares totais encontrados na biomassa seca da cepa D467WC, cultivadas em WC e no ED foram, respectivamente, 27,36 % e 35,04 % (Tabela 8). Nos estudos realizados por Machado (2011)

com o cultivo da microalga *Ankistrodesmus* sp. em água residuária, os dados mostram que o teor de açúcares totais foi de 35,74%, um valor muito próximo do obtido com a espécie *Actinastrum hantzshii* avaliada nesta pesquisa.

Nota-se que houve uma produção maior de açúcares na microalga cultivada em ED, o que pode estar relacionado às quantidades de nutrientes disponíveis (Tabela 9). Segundo Markou (2012), se um nutriente é limitado ou omitido do meio de cultivo, as microalgas alteram sua taxa metabólica como estratégia, resultando na alteração da sua composição de biomassa. Diante disso, na maioria dos casos, a alteração da composição da biomassa está relacionada com o acúmulo de carboidratos ou lipídios, mas isto varia de acordo com a espécie. Estudos relacionados ao acúmulo de carboidratos relataram que em culturas de *Chlorella vulgaris*, com deficiência de nitrogênio, houve um acúmulo de carboidratos que variou entre 38-41% (BRÁNYIKOVÁ et al., 2011). Na análise físico-química do meio ED (Tabela 10), verificou-se que os teores de nitrato e nitrito estavam relativamente baixos, em contrapartida, os teores de amônio foram mais representativos. Essa limitação de nutrientes pode ter ocasionado o aumento no teor de açúcares totais da microalga cultivada em ED, porém necessita-se de estudos mais intensos para se confirmar ou descartar esta hipótese.

Meio de cultivo	Açúcares totais (% (g eq _{glu} .g bs-1))
Controle (WC)	27,36
Meio (ED)	35,04

Tabela 9. Teores de açúcares da biomassa seca da cepa D467WC por meio de cultivo.

5.6 Teores de açúcares redutores no hidrolisado por método de extração

Os teores de açúcares redutores obtidos no hidrolisado por sonicação e por hidrólise com H₂SO₄ 3N foram, respectivamente, 2,68 mg/mL e 15,56 mg/mL. O método de extração por sonicação mostrou-se ineficiente para extração de açúcares, já o método por hidrólise ácida extraiu cerca de 55,6 % de glucose (Figura 15). Miranda (2011) confirmou em seus trabalhos que uma boa eficiência no processo de extração representa a obtenção de cerca de 60% de glucose do total de monossacáridos. Os tipos de carboidratos mais abundantes nas microalgas são a glicose, ramnose, xilose e manose (MARKOU et al. 2012). Os carboidratos obtidos por Lee et al. (2015) em um estudo com *Chlorella* sp. foi de 36,1% do peso seco em células inteiras,

já os teores de glucose, galactose, xilose, arabinose e ramnose foram, respectivamente, 82,8%, 5,5%, 0,9%, 5,3% e 5,4% do peso. Portanto, a quantidade de açúcares fermentáveis foi de 82,8% do total de monossacarídeos, sugerindo que *Chlorella* sp. é adequado para bioetanol fermentação (LEE et al. 2015).

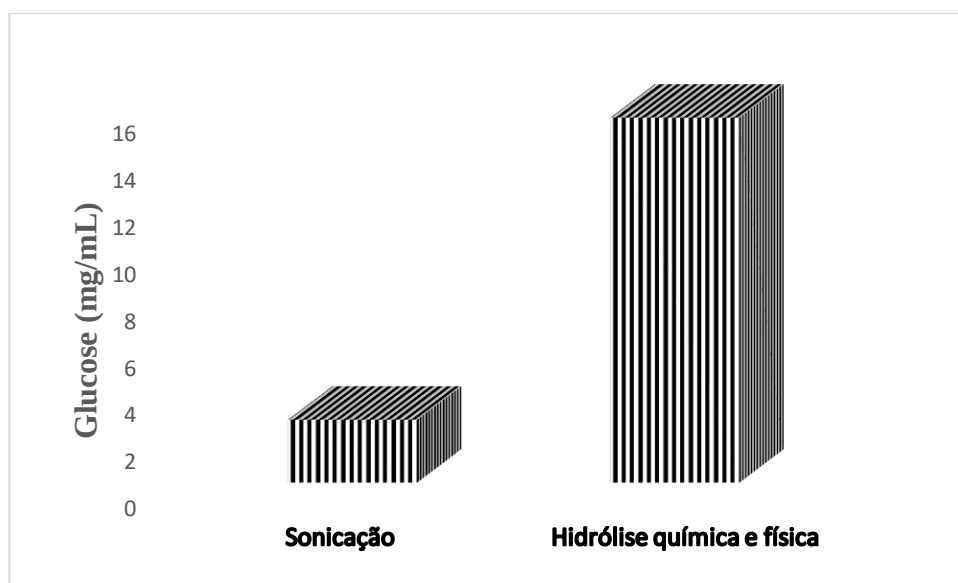


Figura 15. Teores de açúcares redutores (glucose) por tipo de extração de açúcares no hidrolisado.

5.7 Biorremediação através do cultivo da microalga *Actinastrum hantzshii*

Para avaliar a biorremediação, foram realizadas análises físico-químicas do meio antes e depois do cultivo da cepa D467WC - *Actinastrum hantzshii*, com base nos parâmetros de condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, sólidos totais voláteis, sólidos totais fixos, turbidez, pH, fosfato, nitrato, nitritos, amônio, demanda química de oxigênio (DQO) e metais pesados (Tabela 10). Segundo Cai et al. (2013), o esgoto municipal possui concentrações de nitrogênio que variam entre 15 e 90 mg L⁻¹ e de fósforo entre 5 e 20 mg L⁻¹.

Observa-se a redução dos parâmetros quando se compara as análises feitas antes do cultivo, a uma diluição de 25% e depois do cultivo, atestando que a microalga reduz os níveis de nutrientes do ED, o que contribuiria no tratamento antes do lançamento em corpos hídricos. Uma resolução do CONAMA nº 430 de 2011 institui que o parâmetro de nitrogênio amoniacal não ultrapasse 20 mg NH₃-N.L⁻¹ e 120 m.L⁻¹. Após a biorremediação, foi possível reduzir em 98,4% o parâmetro amônio. Silva (2014) obteve uma taxa de remoção de 36% no parâmetro DQO no cultivo de *Scenedesmus* sp. em esgoto sanitário, um valor inferior ao obtido que foi

de 70,5% de remoção. Com relação ao valor do fosfato após o cultivo, nota-se que foi correspondente a quantidade presente em água potável após o tratamento convencional realizado por Freitas (2013) que foi de 0,25 mg.L⁻¹. O nitrogênio é um dos principais nutrientes, necessário para o crescimento das microalgas, diante disto, o valor de nitrato antes do cultivo (0,047 mg.L⁻¹) foi bem inferior ao obtido por Calixto et al. (2016), que foi de 40 mg.L⁻¹, já o valor de amônio (6,77 mg.L⁻¹) foi mais próximo ao teor identificado pelo mesmo autor, que foi de 8,7 mg.L⁻¹.

Parâmetros/média	Antes do cultivo (AC)	Depois do cultivo (DC)
pH	7,52	7,07
NO_3^- (mg.L ⁻¹)	0,047	0,0012
NO_2^- (mg.L ⁻¹)	0,008	0,004
NH_4^+ (mg.L ⁻¹)	6,77	0,44
PO_4^- (mg.L ⁻¹)	4,518	0,25
Condutividade elétrica (mS.cm ⁻¹)	188,8	129,7
Sólidos totais dissolvidos (mg.L ⁻¹)	349	123
Sólidos totais voláteis (mg.L ⁻¹)	148	110
Sólidos totais fixos (mg.L ⁻¹)	201	13
Turbidez (NTU)	6,3	3,6
DQO (mg.O ₂ L ⁻¹)	131,86	38,82
Alumínio (mg.L ⁻¹)	0,01	0,01

Tabela 10. Parâmetros físico-químicos do meio de cultura utilizado com a cepa D467WC na diluição a 25% de efluente doméstico antes e depois do cultivo.

5.8 Parâmetros de crescimento da microalga

A concentração máxima de biomassa e a produtividade de biomassa foram obtidas por meio dos dados de peso seco do cultivo em fase estacionária, ambos em triplicatas (Tabela 11).

Em um cultivo para a produção de biomassa com a microalga *Dunaliella tertiolecta* os rendimentos de cultura foram de 153 mg.L⁻¹ de biomassa (VARELA-BOJÓRQUEZ et al., 2016). Um valor bem inferior ao obtido no cultivo em ED, que foi de 200 mg.L⁻¹, e próximo ao obtido no cultivo em WC que foi de 155 mg.L⁻¹. Estes valores são comparáveis ao potencial produtivo da cana-de-açúcar irrigada com efluente de esgoto que está em 148,48 mg.ha⁻¹ (FREITAS et al. 2013).

Parâmetros	Cultivo em WC	Cultivo em ED
K (dia ⁻¹)	0,17 ± 0,04	0,28 ± 0,10
Rmax (células mL ⁻¹ .10 ⁵)	39,53	42,99
Concentração máxima de biomassa (mg.L ⁻¹)	155	200
Produtividade de biomassa (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	9,11	22,22

Tabela 11. Parâmetros de crescimento da microalga *Actinastrum hantzshii* cultivadas em meio padrão WC e em ED a 25%.

5.9 Obtenção de bioetanol

Após a fermentação do hidrolisado foi possível a obtenção de uma solução hidroalcoólica com sinais sensoriais que podem evidenciar a presença de etanol. A partir da quantidade de açúcares obtidos por meio das análises (Tabela 8 e Figura 24), é viável obter o bioetanol a partir da fermentação do hidrolisado nas condições de fermentação descritas no item 4.1.6.7, porém, devido a quantidade reduzida de açúcares presentes no hidrolisado não é possível obter, por destilação, uma quantidade representativa de etanol que forneça dados sobre o rendimento da fermentação, tornando-se necessário a quantificação por HPLC. Klein (2013), afirma que devido ao rápido consumo de glicose (24 h), não foi possível a análise dos parâmetros de cultivo uma vez que as análises de açúcares e etanol geraram resultados abaixo do limite de detecção das curvas de calibração do HPLC. Já em um trabalho, com a espécie *Dunaliella tertiolecta*, a biomassa sacarificada foi fermentada durante 66 h, e a concentração máxima de etanol ocorreu entre 30 e 33 h de incubação, com uma eficiência de $0,6158 \pm 0,06$ ml de etanol.g⁻¹ de biomassa, igual a $0,48 \pm 0,05$ g de de etanol.g⁻¹ de biomassa (VARELA-BOJÓRQUEZ et al. 2016). Produção de bioetanol a partir da biomassa residual de *Chlorella* sp. resultou em uma concentração de etanol e rendimento de 5,9 g / L e 79,3%, respectivamente. (LEE et al. 2015).

No caldo de fermentação do hidrolizado de microalgas utilizando *S. cerevisiae*, o rendimento máximo de etanol registrado com o caldo combinado de fermentação de hidrolizado de ácido e enzima foi de 0,23 g. L⁻¹ (OK et al. 2018), em contrapartida, o processo de fermentação alcoólica do hidrolizado da microalga *Scenedesmus obliquus* com as leveduras *K. marxianus*, *S. bayanus* e *S. carlsbergensis* não foi muito eficiente na conversão dos açúcares em etanol, tendo-se obtido concentrações muito baixas de produto que variou entre 9,0 e 11,7 g.L⁻¹ (MIRANDA, 2011).

Neste contexto da pesquisa realizada e em comparação com os esforços no desenvolvimento em outras fontes de biomassas como resíduos lignocelulósicos, uma revisão da literatura mostrou um progresso mínimo nos últimos 30 anos para fermentar a biomassa para bioetanol a partir de biomassa microalgal renovável (MAGRO et al., 2016). Em decorrência da grande variação de efluentes, há uma intensa demanda por estudos que avaliem a influência dos resíduos da composição dos diversos efluentes na produtividade de biomassa, como também, estudos que atestem a viabilidade econômica, uma vez que a pesquisa nesta área está realmente em seu estágio formativo e muito longe da produção comercial viável. A espécie *Actinastrum hantzshii* demonstra boa adaptabilidade ao cultivo em efluente doméstico pelo seu crescimento em um tempo relativamente curto e por ter proporcionando uma considerável biorremediação do efluente que é produzido em grande escala em todo o mundo, confirmando o importante potencial das microalgas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis. A quantidade e a fermentabilidade dos carboidratos que compõem a biomassa de *Actinastrum hantzshii* a tornam adequada para a produção de bioetanol, mas torna-se necessários estudos que conduzam a microalga a uma maior produção de biomassa e acúmulo de carboidratos fermentescíveis, como também estudos futuros que estejam relacionados às condições de hidrólise, de maneira a disponibilizar uma quantidade adequada de açúcares fermentescíveis para conversão em etanol e a remoção de inibidores da fermentação. Outro ponto importante que deve ser explorado em novos estudos é a relação entre a quantidade de substrato e o inóculo previamente adaptado, como também o tempo de fermentação etanólica ideal.

6 CONCLUSÕES

A microalga D467WC - *Actinastrum hantzshii* demonstra boa adaptabilidade ao cultivo em efluente doméstico, pelo seu crescimento, em um tempo relativamente curto, e por ter proporcionado uma considerável biorremediação no mesmo em relação a diversos parâmetros analisados, confirmando o importante potencial ambiental das microalgas e também como matéria-prima abundante para a produção de biocombustíveis. Verificou-se que o cultivo da cepa D467WC em efluente doméstico a uma diluição de 25% foi mais favorável ao crescimento desta microalga, que ocorreu em menor tempo se comparado ao grupo controle contendo o meio de cultivo WC, tornando-se possível a substituição do meio sintético pelo efluente analisado na devida concentração. Após a biorremediação, foi possível reduzir em 98,4% o parâmetro amônio, já o de fosfato, a redução chegou ao teor de 0,25 mg.L⁻¹, valor próximo ao encontrados

em água potável. Também ocorreu a redução significativa dos parâmetros de condutividade elétrica, sólidos totais dissolvidos, sólidos totais voláteis, sólidos totais fixos, turbidez, pH, nitrato, nitritos e DQO após o cultivo. A quantidade de carboidratos obtidos por hidrólise da biomassa microalgal cultivada em ED, a partir da associação de tratamentos químicos e físicos, foi satisfatória. Houve uma produção maior de açúcares na microalga cultivada em ED, o que pode estar relacionado às quantidades de nutrientes disponíveis no meio alternativo. O método de hidrólise por associação de tratamentos químicos e físicos extraiu cerca de 55,6 % de glucose e torna viável o processo de fermentação e, consequentemente, produção do bioetanol. É viável obter o bioetanol a partir da fermentação do hidrolisado, porém, devido a quantidade reduzida de açúcares presentes no hidrolisado não foi possível quantificar por destilação, tornando-se necessário a quantificação por HPLC.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se que pesquisas no âmbito da viabilidade de produção do bioetanol sejam exploradas em trabalhos futuros para esclarecer lacunas existentes nos trabalhos desenvolvidos. Necessita-se de investigações mais intensas no que diz respeito às formas de cultivo de microalgas que possam potencializar o aumento na densidade celular e, consequentemente, da produtividade de biomassa, diminuindo o tempo de cultivo. Testes com outros meios alternativos para cultivo e estresse celular com o intuito de aumentar a síntese de compostos de interesse, a exemplo dos carboidratos, também podem ser relevantes. Outros estudos relacionados com a eficiência no processo de hidrólise de maneira a disponibilizar uma quantidade adequada de açúcares fermentescíveis para conversão em etanol são necessários, além da monitorização da remoção de inibidores do hidrolisado. Testes com outras espécies de leveduras para fermentação também devem ser investigados com a intenção de verificar o comportamento desta em relação aos inibidores contidos no hidrolisado e assim tornar mais eficiente este processo. Outro ponto importante que deve ser explorado em novos estudos é a relação entre a quantidade de substrato e do inóculo previamente adaptado, como também o tempo de fermentação etanólica ideal.

8 REFERÊNCIAS

- BALAT, M; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**; n. 86, p. 2273-2282, 2009.
- BOROWITZKA, M, MOHEIMANI, N. Sustainable biofuels from algae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**. n. 7, 2010.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº430 de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 92, p. 89, 16 mai. 2011.
- BRÁNYIKOVÁ, I. et al. Microalgae novel highly efficient starch producers. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108, n. 8, p. 766–776, 2011.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sustain Energy Ver.** n. 14. p. 557–77, 2010.
- BCHIR, F. S.; FALLEH, A. E.; GHABBAROU, E.; HAMDI, M. 3rd Generation Bioethanol Production from Microalgae Isolated from Slaughterhouse Wastewater. **Waste Biomass Valor, Springer Science Business Media Dordrecht**, n. 7, p. 1041–1046, 2016.
- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.
- CAI, T., PARK, S.Y., LI, Y.B. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. 19, 360–369, 2013.
- CALIXTO, D. C.; SANTANA, J. K. S.; LIRA, E. B.; SASSI, P. G. P.; ROSENHAIM, R.; SASSI, C. F. C. CONCEIÇÃO, M. M.; SASSI, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**. v. 221, p. 438–446, 2016.
- CHENG, Y-S.; ZHENG, Y.; LABAVITCH, J. M.; VANDERGHEYNST, J. S. Virus infection of *Chlorella variabilis* and enzymatic saccharification of algal biomass for bioethanol production. **Bioresource technology**. v. 137, p. 326–331, 2013.
- CHEN, G.; ZHAO L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: a critical review. **Applied Energy** v. 137, p. 282–291, 2015.
- CHISTI, Y. Response to Reijnders: do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?. **Trends Biotechnol.**, v. 26, n. 7, p. 351-352, 2008.
- DANTAS, Danielli Matias de Macêdo. Atividade biológicas das preparações obtidas das clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas. **Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco**. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas. Recife – PE, 127 f, 2013.

DERNER, Roberto Bianchino. Efeitos de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaeotoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados. IN: **Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência dos alimentos. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, 140 f, 2006.

DIVYA, M.; AANAND, S.; SRINIVASAN, A.; AHILAN, B. Bioremediation – An eco-friendly tool for effluent treatment: A Review. **International Journal of Applied Research**; v. 1, n. 12, p. 530-537, 2015.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, n. 28 v. 3, p. 350-356. doi:10.1021/ac60111a017.9. 1956.

EL-DALATONY, Marwa M.; KURADE, Mayur B.; ABOU-SHANAB, Reda A.I.; KIM, Hoo; SALAMA, El-Sayed; JEON, Byong-Hun. Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, Elsevier, n. 219, p. 98–105, 2016.

FERNÁNDEZ, A. F. G.; FERNÁNDEZ S. J. M.; MOLINAG. E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, p. 131–15, 2013.

FERNANDES, M. C. et al., Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. **Bioresour. Technol.** v. 186, p. 309–315, 2015.

FOGG, G.E.; THAKE, B. *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*, third ed. **The University of Winsconsins Press Ltd**, London. 1987.

FREITAS, C. A. S. et al., Efluente de esgoto doméstico tratado e reutilizado como fonte hídrica alternativa para a produção de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande – PB. v.17, n.7, p.727–734, 2013.

GALLEGO, L.J.; ESCOBAR, A.; PEÑUELA, M.; PEÑA, J.D.; RIOS, L.A. King grass: a promising material for the production of second-generation butanol. **Fuel**, n. 143, p. 399–403, 2015.

GAUDER, M; GRAEFF-HONNINGER, S; CLAUPEIN, W. The impact of a growing bioethanol industry on food production in Brazil. **Applied Energy**, n. 88, p. 672-679, 2011.

GNANSOUNOU, E.; RAMAN, J.K. Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products. **Applied. Energy**, n. 161, p. 300–308, 2016.

GRIFFITHS, M.J.; HARRISON, S.T.L., 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **J. Appl. Phycol.** 21, 493–507.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

HARUN, R.; JASON, W.S.Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M.K.; Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 85, p.199-203, 2010.

HARUN, R., DANQUAH, M. K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 304-309, 2011.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. **Bioresour Technol.** Vol. 102. p. 186–93, 2011.

KLEIN, B. C. Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração. Dissertação de Mestrado - **Universidade Estadual de Campinas**, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP: [s.n.], 2013.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D.P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. **Bioresource Technology**. v. 144, p. 499–503, 2013.

KSHIRSAGAR, A. D. Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**. v. 2, n. 3, p. 340-346, 2013.

LEE, S.J. et al. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 164, p. 878–888, 2011.

LEE, O. K.; OH Y.K.; LEE E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained from lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresour Technol.** v. 196, p. 22-27, 2015.

LIM, S. L.; CHU, W. L.; PHANG, S. M. Use *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 7314– 7322, 2010.

MAGRO, F. G.; DECESARO, A.; BERTICELLI, R.; COLLA, L. M. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: Uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, , v. 37, n. 1, p. 159-174, Londrina, 2016.

MARGARITES, A. C. F.; COSTA, J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **Journal of Engineering Research and Applications**. vol. 4, p. 80-86, 2014.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I. GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Springer-Verlag**. DOI 10.1007/s00253-012-4398-0. 2012

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresource Technology**. vol. 83, p. 37–46, 2002a.

MCKENDRY, P. Energy production from biomass (part 2): conversion technologies. **Bioresource Technology**; vol. 83, p. 47–54. 2002b.

MILLER, T. Use of DNS reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1959.

MIRANDA, João Ricardo Pereira de Cabral. Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus*. Dissertação de mestrado. **Universidade Nova de Lisboa. Lisboa**, 2011.

MUSSATTO, S. I., DRAGONE, G., GUIMARÃES, P. M. R., SILVA, J. P. A., CARNEIRO, L. M., ROBERTO, I. C., VICENTE, A., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 817830, 2010.

NIGAM, P.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 37. p. 52–68, 2011.

OK, A.; , IG, N. GO, A. Saccharification and Bioethanol Fermentation of Carbohydrate-Extracted Microalgal Biomass by Genetically Identified Organisms. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**. v. 8, n. 1, 2018.

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

RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; CLESCERI, L. S. Standard Methods For the Examination of water and Wastewater. ed. 22, 2012.

RODRIGUES, Cíntia Simas *et al.* Microalgae for economic applications: advantages and perspectives for bioethanol. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 14, p. 4097–4108, 2015.

SANTOS, Danielle da Silveira. Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Escola de Química, Rio de Janeiro, 218 p.: il. 2012

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL, S.R.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGUG, J.H.; POSTEN, C. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Res**. v. 1. p. 20–43, 2008.

SILVA, S. A.; OLIVEIRA, R. Manual de Análises Físico-Químicas de Águas de Abastecimento e Residuárias. Campina Grande – PB, 266 p., 2001.

SILVA, E. O.; SILVA, A. M. B. Arranjos para geração de energia elétrica utilizando biogás. **8º EnTec – Encontro de Tecnologia da UNIUBE. Universidade de Uberaba (UNIUBE)**, Uberaba – MG, 2012.

SILVA, D. A. Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biocombustíveis. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2014.

SILVA, C. E. F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. **Process Biochemistry**. n. 51 p. 1833–1842, 2016.

SANT’ANNA, C. L. et al. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**. São Paulo, Instituto de Botânica, 2012.

SINGH, A; OLSEN, S.I. Critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Appl Energy**. v. 88. P. 3548-3555, 2011.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresour Technol**. v. 101. p. 1570–80, 2011.

SOUZA, M. P.; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, V. A.; MORAES, M. S. A. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis parte I: bioetanol. **Tecno-lógica**, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 2, p. 108-116, 2012.

SPOLAORE, P. C.; JOANNIS-CASSAN, DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101. n. 2. p. 87-96. doi:10.1263/jbb.101.87. 2006.

TANGO, Mariana Daniel. Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa – MG, 2015.

THOMAS, D. G.; MINJ, N., MOHAN, N.; RAO, P. H. Cultivation of Microalgae in Domestic Wastewater for Biofuel Applications – An Upstream Approach. **Journal of Algal Biomass Utilization**. v. 7, n 1, 62-70, 2016.

USDOE. Roadmap for biomass technologies in the United States. U.S. Department of Energy, **Office of Energy Efficiency and Renewable Energy**; 2002.

VARELA-BOJÓRQUEZ, N. et al. Production of bioethanol from biomass of microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)**. v. 2, n. 2, p. 110-116, 2016.