



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



SHEYLA SANTA ISABEL MARQUES

**MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA GERAÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS: USO DA VINHAÇA COMO ALTERNATIVA DE
REDUÇÃO DE CUSTOS E CONTRIBUIÇÃO À SUSTENTABILIDADE**

Salvador
2012

SHEYLA SANTA ISABEL MARQUES

**MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA GERAÇÃO DE
BIOCOMBUSTÍVEIS: USO DA VINHAÇA COMO ALTERNATIVA DE
REDUÇÃO DE CUSTOS E CONTRIBUIÇÃO À SUSTENTABILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Paulo Fernando de Almeida
Orientadora: Dr^a. Iracema Andrade Nascimento

Salvador
2012

M357 Marques, Sheyla Santa Isabel

Microalgas como matéria-prima para geração de biocombustíveis: uso da vinhaça como alternativa de redução de custos e contribuição à sustentabilidade/ Sheyla Santa Isabel Marques. – Salvador, 2012.

48 f.

Orientadores: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida / Prof^a Dr^a Iracema Andrade Nascimento

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Microalgas. 2. Vinhaça. 3. Biocombustíveis. 4. Sustentabilidade
I. Almeida, Paulo Fernando. II. Nascimento, Iracema Andrade. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 582.26



TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**MICROALGAS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA GERAÇÃO
DE BIOCOMBUSTÍVEIS: USO DA VINHAÇA COMO
ALTERNATIVA DE REDUÇÃO DE CUSTOS E
CONTRIBUIÇÃO À SUSTENTABILIDADE**

Elaborada por:

SHEYLA SANTA ISABEL MARQUES.

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

MESTRE EM BIOTECNOLOGIA

Salvador, Bahia, 14 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Paulo Fernando de Almeida
Orientador
Universidade Federal da Bahia

Dra. Iracema Andrade Nascimento
Co-orientadora
Universidade Federal da Bahia

Dr. Fábio Alexandre Chinalia
Universidade Federal da Bahia

Dra. Iracema de Oliveira Moraes
Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello

A
Ninha e Dj, meus queridos pais

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Ninha e Dj, e irmão, Jr., obrigada pelo incentivo, carinho e inúmeros conselhos. Por sempre terem tido paciência quando queria explicar o trabalho que fazia no laboratório (rssss) e entenderem o motivo da minha ausência nos diversos encontros familiares. Por sempre acreditarem em mim. Amo vocês!

A meu “namorado”, Paulo Ubiratan, que me enrola há 10 anos (rsssss), mas é um namorado perfeito, além de ser um ótimo amigo. Te amo!

A minha família e amigos pelo constante apoio.

A professora Iracema Nascimento por ter me dado a oportunidade de estar inserida na sua equipe, no LABIOMAR e neste projeto maravilhoso. Obrigada por me fazer crescer profissionalmente.

Ao professor Paulo Almeida, por ter aceitado a orientação deste trabalho.

Ao professor Fábio Chinalia. Obrigada por ter aceitado compor a banca de avaliação deste trabalho, e pela disponibilidade em ajudar e solucionar problemas durante o experimento.

A professora Iracema Moraes, por ter aceitado compor a banca de avaliação deste trabalho.

A Iago Cabanelas (Caba), grande companheiro de trabalho por 3 anos!!! Aprendi muito com você! Longas conversas sobre inúmeros experimentos e sobre os nossos, altos papos durante centrifugações de alga, nossa! Além da companhia em inúmeros finais de semana que trabalhávamos. Obrigada por tudo, você é um amigo muito especial!

As professoras Maria Bernadete e Solange Pereira, pelas conversas e conselhos, além de terem sido os pivôs da minha entrada no LABIOMAR. Se não fosse por vocês, talvez não tivesse a chance incrível de conhecer a professora Iracema.

A Juliana, Ana Karen, tia Eliane, Andréa e Cristina pelos conselhos, companheirismo, amizade e apoio em diversas ocasiões.

A todos os “Labiomarianos”: Gabi, Lari, Juti, Aristela, Jacson, Edson e Leandro que estavam sempre dispostos a ajudar.

À AGROVALE (Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A.) por ter cedido a vinhaça. À EMBASA, Empresa Baiana de Águas e Saneamento, pelo apoio prestado nas figuras de Professor Virgílio Guimarães (Diretor de Operações) e de Sr. Cazumbá (operador da ETE) e pela cessão das amostras dos efluentes domésticos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa (Projeto 574712/2008-9) e pela bolsa de mestrado concedida (Projeto 551134/2010-0).

MARQUES, Sheyla Santa Isabel Marques. Microalgas como matéria-prima para geração de biocombustíveis: uso da vinhaça como alternativa de redução de custos e contribuição à sustentabilidade. 48f. 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

RESUMO

Em vista das estimativas de aumento da demanda global por energia, se intensificaram as previsões relativas à insustentabilidade de uso dos combustíveis fósseis, não apenas devido à possível diminuição do suprimento de petróleo, mas ao aumento das emissões de gases de efeito estufa. Em nível mundial, o Brasil está entre os maiores produtores de biocombustíveis de primeira geração; entretanto, o uso desta tecnologia envolve a exigência de maior extensão das culturas de oleaginosas e alterações no uso da terra, o que possibilita o retorno de CO₂ à atmosfera, a partir do carbono retido no solo. A produção de microalgas como matéria-prima é indicada como uma solução mais eco-compatível; porém, a diminuição dos custos de produção exige o uso de restos industriais ou domésticos, como fornecedores de nutrientes. A industrialização da cana para a produção do etanol resulta na geração de grande quantidade de vinhaça. A utilização deste efluente industrial após o tratamento anaeróbio é sugerido como uma opção a ser testada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da vinhaça tratada, como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo de microalgas, visando o suprimento da cadeia produtiva de biocombustíveis. O desenvolvimento do trabalho está inserido em um artigo científico elaborado com os dados experimentais. No artigo é avaliado o crescimento de *Chlorella vulgaris* em vinhaça como fonte alternativa de nutrientes. Com resultados satisfatórios, o presente trabalho indica a viabilidade do tratamento anaeróbio da vinhaça em gerar um efluente capaz de suprir as necessidades para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. Com isso, é possível a integração do cultivo à usina sucroalcooleira, no que diz respeito ao aproveitamento do resíduo tratado, além do CO₂ gerado. O trabalho mostra resultados que fecham o ciclo de produção da microalga. A alga é cultivada em efluente de reator anaeróbio (vinhaça tratada), após colheita e este meio pode ser utilizado para diluir a própria vinhaça para um novo processo de tratamento anaeróbio; e a biomassa, após seca e com os produtos de interesse extraídos, pode ser utilizada na alimentação de reatores anaeróbios que tratarão a vinhaça. A digestão da vinhaça com a biomassa irá gerar CO₂ que também pode ser utilizado para crescimento do cultivo, além da produção de metano, como outra fonte de energia renovável.

Palavras-chave: vinhaça, digestão anaeróbia, microalga, biocombustíveis

MARQUES, Sheyla Santa Isabel Marques. Microalgae as a feedstock for producing biofuels: use of vinasse as alternative to reduce costs and contribution to sustainability. 48 pp. 2012. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Taking into consideration that the current estimations are predicting the increase of global demand for energy, it is ever more clear the unsustainable continuity of using fossil fuels in the future. It is not only because petrol sources are limited, but it is also because of the dangerous increase in greenhouse gases in the atmosphere. Brazil figures in the world stage as one of the greatest producer of first generation biofuels; however, the spread of such technology result in the vast extension of agricultural land use. This activity alters land management and increases the CO₂ release into the atmosphere from carbon sources stored within the soil. The production of microalgae as feedstock for biofuels is identified as a more eco-sustainable solution; however, it is necessary to reduce the production costs by using industrial and domestic wastes, particularly as nutrient sources for microbial cultivation. Ethanol production from sugarcane generates significant amounts of industrial effluent, the vinasse. After an anaerobic digestion treatment, such effluent may be a rich source of nutrients. This research aimed to testing the potential of the anaerobic treated vinasse as an alternative source of nutrients for culturing microalgae with the goal of supplying the biofuel industrial chain with algal biomass and oil. The data produced in this research have been compiled in a scientific manuscript, which appears included in this dissertation. In this paper, it is reported the differences in the growth of *Chlorella vulgaris* at distinct concentrations of vinasse. The results indicate that the process is viable when using anaerobic digestion as means of treating the vinasse before its use. Thus, the results show that it is possible to integrate the culturing of microalgae with the sugarcane industry. There is also the advantageous possibility of using by-products of the anaerobic digestion such as methane and CO₂. This integration completes the industrial production cycle by means of using waste effluent for microalgae biomass production and industrial effluents for supporting this process. Furthermore, the dilution of vinasse may also be achieved with the water used for cultivating microalgae, after the separation of the biomass. And, after the extraction of lipids from the microalgae, the biomass may also be used for incrementing the production of methane within the anaerobic digester used for treating the vinasse.

Palavras-chave: vinasse, anaerobic digestion, microalgae, biofuel

LISTA DE NOMENCLATURA

DQO: Demanda Química de Oxigênio

DQO_b: Demanda Química de Oxigênio bruta

DQO_f: Demanda Química de Oxigênio filtrada

CO₂: Dióxido de Carbono

CH₄: Metano

Pdwt: Produtividade da biomassa

LT: Lipídios Totais

PL: Produtividade Lipídica

μ: Taxa de crescimento específico

VD: Vinhaça Digerida. Efluente do digestor anaeróbio.

VD-T01: Efluente do digestor anaeróbio sem diluição.

VD-T02: Efluente do digestor anaeróbio diluído para 50% com água destilada.

VD-T03: Efluente do digestor anaeróbio diluído para 25% com água destilada.

VND: Vinhaça não-digerida. Afluente do digestor anaeróbio.

VND-T01: Afluente do digestor anaeróbio sem diluição.

VND-T02: Afluente do digestor anaeróbio diluído para 50% com água destilada.

VND-T03: Afluente do digestor anaeróbio diluído para 25% com água destilada.

HCO³⁻: Bicarbonato de sódio.

COV: Carga Orgânica Volumétrica.

TRH: Tempo de Retenção Hidráulica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Etanol e seus impactos ambientais	10
2.2. Digestão anaeróbia como meio de redução da carga poluidora da vinhaça, e uso como fonte de nutrientes	14
2.3. Algas cultivadas em águas residuárias: redução de custos no processo de produção.....	14
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1. Objetivos específicos	17
4. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS	18
Avaliação do crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> em vinhaça como fonte alternativa de nutrientes	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
6. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

Em vista das estimativas de aumento da demanda global por energia (IEA, 2010), se intensificaram as previsões relativas à insustentabilidade de uso dos combustíveis fósseis (RÖTTIG et al., 2010), não apenas devido à possível diminuição do suprimento de petróleo, mas ao aumento das emissões de gases de efeito estufa, causando crescentes problemas ambientais e econômicos (CHISTI, 2007). Há estimativas (IPCC, 2007) projetando a concentração atmosférica do dióxido de carbono como capaz de ultrapassar, até 2056, o dobro do valor pré-Revolução Industrial (560ppm), equivalendo a cerca de 1,2 trilhões de toneladas de carbono no ar. Estas estimativas levaram ao estabelecimento de níveis de redução de emissões de CO₂ na faixa de 10 a 20% até 2020. Como, da demanda bruta por energia, no mínimo 60% é absorvida pelo setor de transportes (SCHENK, 2008), a substituição dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis é tida como alternativa para redução de emissões poluidoras. Os biocombustíveis apresentam vantagens por serem biodegradáveis e reduzirem as principais emissões presentes nos gases de exaustão, com exceção dos óxidos de nitrogênio (no caso do biodiesel).

Estudos (IPCC, 2007), apontam que, mesmo se conseguida a redução nos níveis de emissão de CO₂ nos percentuais propostos (10 a 20% até 2020), a concentração de CO₂ na atmosfera ainda não estará estabilizada em níveis aceitáveis (445-490 ppm), capazes de evitar sérios desastres ambientais. Para esta finalidade, seria necessária uma redução em torno de 60% sobre os valores previstos de liberação até aquela data, o que exige o urgente desenvolvimento de tecnologias não apenas CO₂-neutras, mas que também sejam capazes de sequestro do CO₂-preexistente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etanol e seus impactos ambientais

O Brasil foi um dos primeiros países a criar um programa de produção de etanol, acoplado às usinas de açúcar, com a finalidade de diminuir a preocupante dependência do petróleo e a de reanimar a economia rural. O objetivo de reduzir a quantidade cada vez maior de CO₂ lançada no ar foi possível com o avanço do programa PROÁLCOOL e o desenvolvimento, pela indústria automobilística, dos veículos flex, hoje constituindo 85% da

frota nacional de automóveis. Estimativas apontam que a produção e a queima do etanol de cana geram de 55 a 90% menos dióxido de carbono do que a gasolina (KURKI et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2011).

Apesar desses benefícios, a industrialização da cana resulta na geração de grande quantidade de resíduos como bagaço, cinzas, vinhaça, outros resíduos líquidos e emissões gasosas (VACCARI et al., 2003), a maioria com alto teor de matéria orgânica que, se tratada adequadamente, pode resultar em fonte potencial de energia (RAJESHWARI et al., 2000; RIBAS, 2006).

A vinhaça, efluente originado do processo de destilação do álcool (Figura 1), é atualmente um dos maiores causadores de poluição ambiental. Sua carga poluidora sempre elevada varia em função das características da usina e da eficiência do processo de produção. Possui composição complexa, com características variáveis de parâmetros não controlados como: tipo de solo onde é plantada a cana-de-açúcar, tipo de cultivo e manejo da lavoura, formas de colheita, dentre outros fatores. Em média, esse efluente tem elevado teor orgânico (aproximadamente 45g/L, expressa em DQO, demanda química de oxigênio), baixo pH (em torno de 4,5) e elevada temperatura (90°C). Contudo, apresenta ainda grande quantidade de sais minerais, com destaque ao potássio (em torno de 5,0g/L (WILKIE et al., 2000; RIBAS, 2006; CABELLO et al. 2009; CRUZ et al., 2007). Para Nogueira (1996), os diferentes processos industriais de produção do etanol dificultam a definição de uma composição específica para a vinhaça, uma vez que os nutrientes são consumidos apenas pelo crescimento microbiano; quantidades excedentes estarão disponíveis no efluente do processo, tornando esse material atrativo à fertirrigação.

No Brasil, na safra 2011/2012, foram produzidos cerca de 300 bilhões de litros desse resíduo (CONAB, 2011), considerando-se uma média de 13L de vinhaça para cada 1L de etanol produzido. Lançada em solos adjacentes às usinas como fertilizante para aproveitamento dos minerais (CABELLO et al. 2009; CRUZ et al., 2007), a sua utilização apresenta muitos benefícios, tais como o aumento da produtividade, melhoria das condições físicas do solo, devolução de nutrientes ao solo, entre outros. Por outro lado, também pode causar sobrecarga no solo quando aplicada por longos períodos, provocando poluição ambiental decorrente do excesso de sais, especialmente sais de potássio, e acúmulo de

matéria orgânica, o que representa risco de contaminação potencial para lençol freático e rios (SPRINGER & GOISSIS, 1988; RIBAS, 2006). Devido a sua elevada carga orgânica, seu poder de poluição se equipara a cerca de cem vezes o poder poluente do esgoto doméstico (CABELLO et al., 2009). Esses efeitos poluidores da atividade podem ser minimizados com tratamento prévio, visando posterior descarte no ambiente. Dependendo do processo empregado, o tratamento da vinhaça pode resultar no aproveitamento de carga orgânica contida nesse resíduo agroindustrial para geração de energia (RIBAS, 2006).

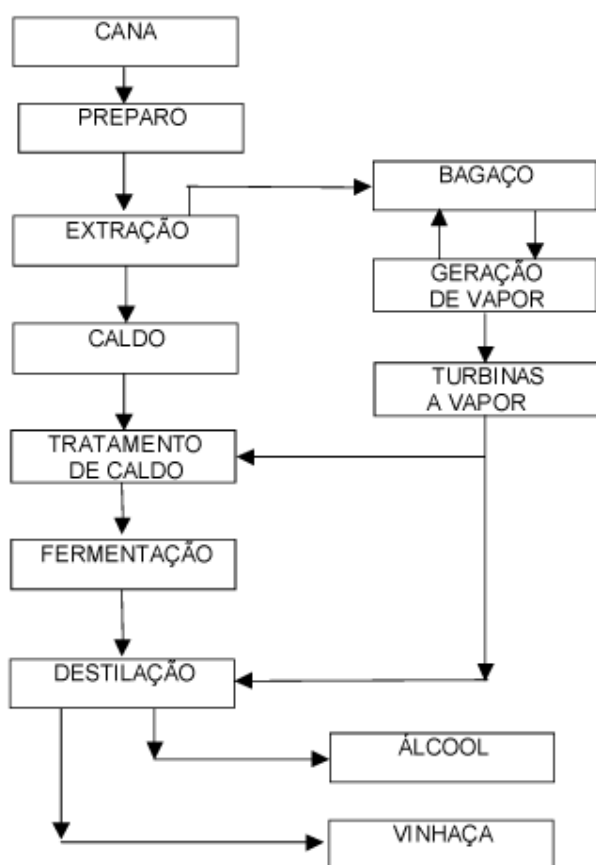


Figura 1. Diagrama simplificado básico para a produção de álcool.
Fonte: Xavier, 1970

A classificação padrão da vinhaça é feita segundo os componentes do mosto, ou seja, em melaço, caldo ou misto (Tabela 1). Portanto, uma usina pode, em uma mesma safra, apresentar vinhaça dos 3 tipos: originado do melaço, do caldo, ou da mistura dos dois anteriores (caldo + melaço), denominada misto (GRACIANO, 2007).

Tabela 1. Composição química da vinhaça em função do tipo de mosto

Parâmetros	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 – 100	80 – 100
DBO (mg l ⁻¹ O ₂)	25.000	6.000 – 16.500	19.800
DQO (mg l ⁻¹ O ₂)	65.000	15.000 – 33.000	45.000
Sólidos totais (mg l ⁻¹)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg l ⁻¹)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg l ⁻¹)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg l ⁻¹)	450 – 1610	150 – 700	480 – 710
Fósforo (mg l ⁻¹)	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Potássio (mg l ⁻¹)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340 – 4.600
Cálcio (mg l ⁻¹)	450 – 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
Magnésio (mg l ⁻¹)	420 – 1.520	200 – 490	580 – 700
Sulfato (mg l ⁻¹)	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
Carbono (mg l ⁻¹)	11.200 – 22.900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg l ⁻¹)	63.400	19.500	3.800
Subs. Redutoras (mg l ⁻¹)	9.500	7.900	8.300

Fonte: Schultz, 2009.

Com o intuito de promover a remoção desta carga orgânica contida na vinhaça, antes de usá-la para a fertirrigação, disponibilizando os nutrientes e diminuindo seu potencial poluidor, utiliza-se como alternativa o tratamento anaeróbio. Ao comparar os processos aeróbios com os anaeróbios, Chernicharo (2007), verificou mais vantagens, com o uso deste último processo, envolvendo: pouca produção de sólidos, baixa demanda de nutrientes e energia (ou até a possibilidade de produzi-la), produção do gás metano, e compatibilidade com operação a temperaturas elevadas. Enquanto grande parte deste resíduo é utilizada como fertilizante nas próprias lavouras de cana, outra grande parte, sem uma utilização, é mantida em zonas de sacrifício.

2.2 Digestão anaeróbia como meio de redução da carga poluidora da vinhaça, e uso como fonte de nutrientes

O processo anaeróbio é eficiente na transformação de matéria orgânica em metano e nutrientes e funciona como um método de tratamento de efluentes, sejam estes domésticos e/ou industriais. Durante a digestão anaeróbia, através de diferentes tipos de microrganismos, os compostos orgânicos complexos do efluente são convertidos em produtos mais simples como gás carbônico (CO₂) e metano (CH₄) (FORESTI et al., 1999). Dentre os microrganismos presentes, as bactérias correspondem ao grupo de maior quantidade e importância no tratamento anaeróbio (VON SPERLING, 1996). Normalmente, a matéria orgânica que se encontra na fase líquida é removida para a fase gasosa, produzindo, principalmente, o metano, que possui baixa solubilidade no meio líquido (FORESTI et al., 1999), sobrando na fase líquida, os nutrientes.

2.3 Algas cultivadas em águas residuárias: redução de custos no processo de produção

Para superar os riscos ambientais e econômicos, decorrentes da baixa eficiência dos processos de biocombustíveis de primeira geração (como o etanol, a partir da cana-de-açúcar), os sistemas de segunda e de terceira geração de biocombustíveis (estes, usando microalgas) estão evoluindo para um novo mercado, cuja expansão tem valores estimados, para 2050, em torno de US\$ 500 bilhões (STERN, 2006). Enquanto os sistemas de primeira geração se baseiam em processos tecnológicos de transformação de óleos ou açúcares em biocombustíveis, os de segunda geração envolvem o uso da biomassa, incluindo a lignocelulósica, que leva ao aproveitamento de podas de vegetação, restos de madeira, material fibroso, e outros resíduos; neste caso, os processos de produção envolvidos têm custos ainda não competitivos, e dependentes de ajustes tecnológicos, de modo que se acredita que esta alternativa não será economicamente viável antes de 2020 (GIBBS et al., 2008; OECD, 2008). Apesar dos biocombustíveis de segunda geração representarem um avanço tecnológico sobre os de primeira geração, a produção em grandes volumes poderia acarretar os mesmos problemas relacionados à extensão das culturas e uso do solo (REIJNDERS e HUIJBREGTS, 2008).

A terceira geração de biocombustíveis é relacionada a avanços feitos na fonte (produção de biomassa), tecnologia que está sendo viabilizada através do cultivo de microalgas. A proliferação destes sistemas depende de recursos tecnológicos possivelmente menos exigentes

que os sistemas de segunda geração e, portanto, alcançáveis em mais curto prazo e a menores custos, quando comparáveis com os processos de quarta geração, envolvendo modificações genéticas nas espécies produtoras de óleo.

Apesar das vantagens das microalgas como matéria-prima para biocombustíveis, em comparação com plantas, os custos dos sistemas de cultivo, que podem chegar a 50% dos custos totais (COZZA, 1999; BENEMANN, 2009; CHISTI, 2008), sobretudo dos sistemas fechados, podem determinar um balanço energético negativo, a não ser que insumos como CO₂ e nutrientes, produzidos industrialmente como restos, sejam aproveitados. A quantidade de vinhaça produzida no Brasil desde o início do PROALCOOL gerou a necessidade de se desenvolverem meios viáveis de utilização e tratamento da mesma. Sua utilização para o cultivo de microalgas torna-se, assim, uma opção economicamente aconselhável e ambientalmente sustentável (SOUZA, 2007).

Dentre os meios de culturas alternativos utilizados para a produção de biomassa de microalgas destacam-se: esgoto doméstico esterilizado (PIPES e GOTAAS, 1960), efluente de biodigestores (RODULFO et al., 1980), lodo digerido (WONG E LAY, 1980), despejos industriais purificados (JUSSIÁK et al., 1984), vinhaça de cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 1988), águas residuais da produção de azeite de oliva (SÁNCHEZ et al., 2001) e resíduos da suinocultura (RODRIGUES, 2000; TRAVIESO et al., 2006).

Como a fonte de nutrientes consiste em um dos principais componentes do custo de produção de microalgas em larga escala, a utilização deste efluente industrial após o tratamento anaeróbio é considerado como uma opção viável; este tipo de iniciativa deverá agregar valor ao processo de tratamento, (RODRIGUES E BELLI, 2004), através da geração de bioprodutos de interesse comercial, como por exemplo, pigmentos (DUFOSSÉ et al., 2005; ARAD E YARON, 1992), ácidos graxos (PRATOOMYOT et al., 2005) e biocombustíveis.

Existe um grande potencial para a produção de biocombustíveis a partir da biomassa de microalgas (MORAIS; COSTA, 2008; MARTINS et al., 2008). Estudos recentes demonstram que apenas 0,3% da área do planeta seria suficiente para cultivar microalgas com 50% de lipídios totais em peso seco, cuja biomassa poderia produzir biodiesel capaz de repor todo o combustível usado em transporte no mundo. Além disto, a terra utilizada para o cultivo de microalgas pode ser desértica (TEIXEIRA, 2006), com baixo valor econômico para outros usos

e com alta irradiação solar, podendo ainda ser utilizados resíduos de outros processos produtivos, como o CO₂, oriundo de processos industriais (BENEMANN, 1997) e resíduos orgânicos (VICHEZ, 1997) para acelerar o desenvolvimento dos cultivos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da vinhaça tratada como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo de microalgas, visando suprimento da cadeia produtiva de biocombustíveis.

3.1 Objetivos específicos

- Adaptar lodo anaeróbio à vinhaça efluente de uma usina sucroalcooleira;
- Estabelecer uma carga orgânica mínima de vinhaça que seja capaz de promover alta eficiência na remoção de DQO e produção de metano/DQO_{consumida} nos digestores anaeróbios;
- Testar o efluente da digestão anaeróbia em diferentes concentrações no cultivo de *Chlorella vulgaris*;
- Comparar os parâmetros biológicos: taxa de crescimento específico (μ), produtividade da biomassa (P_{dwt}), lipídios totais (LT) e produtividade lipídica (PL), nos diferentes tratamentos (VD-T01, VD-T02, VD-T03, VND-T01, VND-T02, VND-T03);
- Avaliar composição celular (lipídios totais, carboidratos e proteínas) nas diferentes condições.

4. RESULTADOS E PRODUTOS GERADOS

O artigo a seguir é resultado do presente trabalho e está em processo de finalização (tradução para o inglês e adequação às normas da revista na qual deverá ser publicado)

Avaliação do crescimento de *Chlorella vulgaris* em vinhaça diluída como fonte alternativa de nutrientes

Sheyla Santa Isabel Marques¹, Iracema Andrade Nascimento¹, Paulo Fernando de Almeida², Fábio Alexandre Chinalia²

¹Laboratório de Biologia Marinha (LABIOMAR), Universidade Federal da Bahia/Brasil

²Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microorganismos (LABEM), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia/Brasil

Contato: sheyla.isabel@gmail.com

Palavras-chave: vinhaça, digestão anaeróbia, microalga, biocombustíveis

RESUMO

A demanda de energia, em nível mundial, deverá aumentar em 57% até 2025 para suprir a exigência de consumo da população em crescimento. Isto evidencia a necessidade de substituição de fontes fósseis por renováveis. As microalgas são uma possibilidade versátil para a geração de: combustíveis líquidos (biodiesel, etanol, bioquerosene), bioplásticos, e intermediários químicos do setor petroquímico. O processo ainda é limitado por alguns fatores relacionados aos custos de produção envolvidos na composição do meio e na disponibilidade de água. Neste sentido, uma boa alternativa seria aliar a produção com o tratamento de águas residuárias. Uma das atividades industriais que mais produzem efluentes é a indústria sucroalcooleira. Para cada litro de etanol são gerados 13 litros de vinhaça. O processo de digestão anaeróbia como método de tratamento e reaproveitamento desse efluente, ainda não foi viabilizado para propiciar o cultivo de microalgas. O objetivo deste trabalho foi testar esta possibilidade utilizando a microalga local *Chlorella vulgaris* cultivada em vinhaça diluída, tratada anaerobicamente e não tratada, como uma alternativa para o barateamento dos custos de produção. A primeira etapa do trabalho consistiu na diluição da vinhaça com esgoto tratado, até atingir concentração de 2gDQO/L. Os reatores contendo a vinhaça diluída foram operados com uma carga orgânica volumétrica (COV) de $1 \text{ Kg m}^3 \text{ d}^{-1}$ e tempo de retenção hidráulica (TRH) de 24h. O desempenho do processo anaeróbio foi avaliado através do cálculo cinético da taxa de produção de metano por regressão linear, aplicada à fase exponencial na curva de acúmulo de metano ($R^2 > 90\%$). A segunda etapa do trabalho consistiu no crescimento de microalgas que foram realizados em 3 tratamentos (VD-T01, VD-T02, VD-T03) e os seus respectivos controles (VND-T01, VND-T02 e VND-T03). Para os ensaios de crescimento foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris*. O crescimento foi monitorado a cada 24h, com base no peso seco da biomassa (g l^{-1}). As pesagens da matéria seca foram registradas em função do tempo e utilizadas para estimar a cinética de crescimento. Os parâmetros biológicos calculados foram a taxa de crescimento específico (μ), produtividade da biomassa (P_{dwt}), lipídios totais (LT) e produtividade lipídica (PL). A vinhaça diluída digerida pelo processo anaeróbio, VD-T01, propiciou o melhor resultado em crescimento ($0,76 \text{ d}^{-1}$), o que favoreceu uma melhor produtividade em biomassa ($70 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e maior produtividade lipídica. Os resultados do presente trabalho são uma evidência da viabilidade da utilização deste efluente industrial como fonte de nutrientes em cultivo da espécie *Chlorella vulgaris*. Em virtude das similaridades no metabolismo de microalgas em geral, sobretudo das Chlorophyta, os resultados também sugerem a possibilidade de uso deste resíduo para o cultivo de outras espécies.

INTRODUÇÃO

A demanda de energia, em nível mundial, deverá crescer em 57% até 2025 para suprir a exigência de consumo da população em crescimento (IEA, 2007). Esta demanda tem um aumento estimado em cerca de 474 Exajoules anuais, sendo que os biocombustíveis representam uma contribuição de 11%. Em todas as projeções recentemente feitas (IPCC, 2007), o setor de transportes se apoia basicamente em combustíveis fósseis, fato preocupante em vista das incertezas de sua disponibilidade futura. A necessidade de segurança no suprimento de energia e de produzi-la e utilizá-la de uma forma ambientalmente sustentável tem direcionado, em nível mundial, a busca de alterações nas matrizes energéticas de cada País, visando à substituição das fontes fósseis, por renováveis, especialmente no setor de transportes (OECD, 2009). Espera-se, portanto, que o desenvolvimento de novas biotecnologias, envolvendo combustíveis renováveis, tais como a produção de biodiesel e metano, seja solução para estimular o aumento da contribuição dos biocombustíveis para 80%, até 2050 (IPCC, 2011).

Visando a substituição do diesel fóssil, tem-se aumentado a produção de biodiesel baseada em óleos vegetais e gorduras. No entanto, essa prática exige uma significativa extensão de terras que não apenas intensifica os problemas ambientais causados pelo uso indevido da terra, mas, também, compete com a agricultura para produção de alimento. A necessidade da busca por matéria-prima oleaginosa, cuja produção não utilize terras agriculturáveis, tornou-se uma prioridade. Desde então as microalgas têm sido indicadas como matéria-prima para biodiesel (WIJFFELS e BARBOSA, 2010).

A produção de energia renovável a partir do cultivo de microalgas pode ser caracterizada como um processo de terceira geração desde que, da biomassa algal, pode-se gerar, além do biodiesel, etanol, bioquerosene, bioplásticos, e intermediários químicos do setor petroquímico (CHISTI, 2006; BENEMANN, 2009; NASCIMENTO et al., 2011). Algumas espécies do gênero *Botryococcus*, por exemplo, produzem um bio-óleo, rico em hidrocarbonetos muito semelhantes aos contidos no petróleo, que pode ser diretamente convertido em biocombustível para avião (BANERJEE et al., 2002; METZER, LARGEAU, 2005; NASCIMENTO et al., 2011). Embora possam ser identificadas inúmeras vantagens do cultivo de microalgas sobre as oleaginosas terrestres, esse processo ainda é limitado por alguns

fatores relacionados aos custos de produção (BENEMANN, 2009) envolvidos na composição do meio e pela disponibilidade de água (CHISTI, 2007). Em relação aos custos totais de produção, os gastos com CO₂ e nutrientes para o meio de cultura (10% de N e pelo menos, 1% de P) podem representar cerca de 50% (CHISTI, 2008). Esses cálculos ainda não levam em consideração o gasto energético necessário para a fabricação desses fertilizantes (N e P) que podem ser estimados em 10kWh/Kg (LARDON et al., 2009). Uma boa alternativa seria buscar uma fonte de nutriente mais econômica e disponível e um delas é aliar a produção de biocombustíveis com o tratamento de águas residuárias. Dessa forma os custos com disponibilização de nutrientes podem ser expressivamente reduzidos. Essa alternativa tem sido sugerida e explorada em literatura como meio de viabilizar o cultivo de microalgas em larga escala (RODOLFI et al., 2008; BENEMANN, 2009; XIN et al., 2010; BONINI, 2012). O processo mais indicado tem sido a digestão anaeróbia, um processo biológico no qual o tratamento dos resíduos é aliado à produção de energia na forma de metano. Portanto, além de melhorar a qualidade do resíduo final do tratamento, essa interação entre processos mostra ainda a vantagem de gerar uma quantidade significativa de energia renovável (RODRIGUES E BELLI, 2004). O emprego de processos biológicos anaeróbios oferece outras vantagens quando comparados aos processos aeróbios, entre as quais, menor consumo e energia, menor produção de lodo e, além disso, requer menor área de implantação (WEBER, 2006; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

O processo anaeróbio é eficiente na transformação de matéria orgânica em metano e nutrientes e funciona como um método de tratamento de efluentes, sejam estes domésticos e/ou industriais. Uma das atividades industriais que mais produzem efluentes é a indústria sucroalcooleira. Para cada litro de etanol são produzidos 13 litros de efluente residual denominado de “vinhaça”. No Brasil, na safra 2011/2012, foram produzidos cerca de 300 bilhões de litros desse resíduo (CONAB, 2011). Como método de reaproveitamento, muito dessa vinhaça tem sido utilizada para irrigação de lavouras em um processo conhecido como fertirrigação, cujo objetivo consiste em diminuir o uso de fertilizantes comerciais (CABELLO et al. 2009; CRUZ et al., 2007). No entanto, existem vários problemas relativos ao uso da vinhaça como fertirrigação, por exemplo, por sua elevada carga orgânica (Tabela 1); seu poder de poluição se equipara a cerca de cem vezes o do esgoto doméstico (CABELLO et al., 2009). Em consequência desses fatores, muitos autores têm sugerido a digestão anaeróbia

como método de tratamento e reaproveitamento desse efluente (PANT E ADHOLEYA, 2007; SATYAWALI E BALAKRISHNAN 2008, MOHANA et al. 2009).

Tabela 1. Composição química da vinhaça em função do tipo de mosto

Parâmetros	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 – 100	80 – 100
DBO (mg l ⁻¹ O ₂)	25.000	6.000 – 16.500	19.800
DQO (mg l ⁻¹ O ₂)	65.000	15.000 – 33.000	45.000
Sólidos totais (mg l ⁻¹)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg l ⁻¹)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg l ⁻¹)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg l ⁻¹)	450 – 1610	150 – 700	480 – 710
Fósforo (mg l ⁻¹)	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Potássio (mg l ⁻¹)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340 – 4.600
Cálcio (mg l ⁻¹)	450 – 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
Magnésio (mg l ⁻¹)	420 – 1.520	200 – 490	580 – 700
Sulfato (mg l ⁻¹)	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
Carbono (mg l ⁻¹)	11.200 – 22.900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg l ⁻¹)	63.400	19.500	3.800
Subs. Redutoras (mg l ⁻¹)	9.500	7.900	8.300

Fonte: Schultz, 2009.

A meta deste trabalho foi a de avaliar o potencial uso do efluente de um digestor anaeróbio (utilizado para tratar a vinhaça) como meio de cultura para cultivo de microalga. Dessa forma sugere-se uma integração de atividades entre setores distintos de produção. A proposição é que uma indústria sucroalcooleira possa associar a produção de álcool com a produção simultânea de metano e biodiesel de algas a partir de resíduos gerados na própria indústria. O objetivo deste trabalho foi testar o cultivo da microalga local *Chlorella vulgaris* em vinhaça diluída tratada anaerobicamente e não tratada, como uma alternativa para o barateamento dos custos de produção.

METODOLOGIA

Digestão da vinhaça em reatores anaeróbios

Para os experimentos de digestão anaeróbia foram utilizados dois efluentes, (i) a vinhaça e (ii) o dejetto líquido de esgoto tratado. Com o intuito de facilitar o processo de digestão anaeróbia, a vinhaça foi diluída com o efluente de esgoto doméstico tratado para atingir uma DQO final de 2 g l^{-1} .

A vinhaça foi coletada na empresa Agrovale (Agro-Indústrias do Vale do São Francisco S.A.) situada na região do Sub-Médio São Francisco, em Juazeiro, Estado da Bahia – Brasil. O efluente de esgoto tratado foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Empresa Baiana de Água e Saneamento S A (EMBASA), Salvador. A Tabela 2 resume os valores de algumas variáveis físico-químicas que caracterizam os distintos efluentes e o lodo anaeróbio utilizado como inóculo. Destaca-se o fato de que a carga orgânica do efluente de esgoto tratado ($0,071 \text{ g l}^{-1}$) foi aproximadamente 325 vezes menor do que os valores encontrados para a vinhaça ($23,17 \text{ g l}^{-1}$). Bicarbonato de sódio foi adicionado ($\text{HCO}_3^-/\text{DQO} = 0,5$) à mistura, para correção de pH ($\pm 7,0$). Uma porção dessa mistura foi utilizada como afluente dos digestores anaeróbios, e outra parte reservada para os experimentos de cultivo da microalga. Dessa forma foi possível obter um parâmetro de controle do processo de tratamento anaeróbio (Figura 1). A mistura foi dividida em pequenos volumes e estocada em freezer -70°C durante o período antes do seu uso.

Tabela 2. Caracterização do lodo, esgoto tratado e vinhaça utilizados nesta pesquisa.

	Lodo	Esgoto tratado	Vinhaça
DQOb (g l^{-1})	14,583±0,729	0,071±0,004	23,179±1,156
Nitrato (g l^{-1})	0,028±0,002	0,015±0,001	0,026±0,002
Nitrito (g l^{-1})	<LD	<LD	<LD
Amônia (g l^{-1})	0,192±0,013	0,005±0,000	0,010±0,001
Fosfato (g l^{-1})	0,022±0,001	0,010±0,000	0,045±0,002
Potássio (g l^{-1})	0,006±0,000	<LD	0,109±0,002
ST (g l^{-1})	48,99±1,52	0,466±0,03	14,362±0,60
SF (g l^{-1})	28,47±0,91	0,301±0,01	2,968±0,72
SV (g l^{-1})	20,52±0,60	0,165±0,02	11,394±1,31
pH	6,7±0,1	6,5±0,3	3,5±0,1

LD: low detection

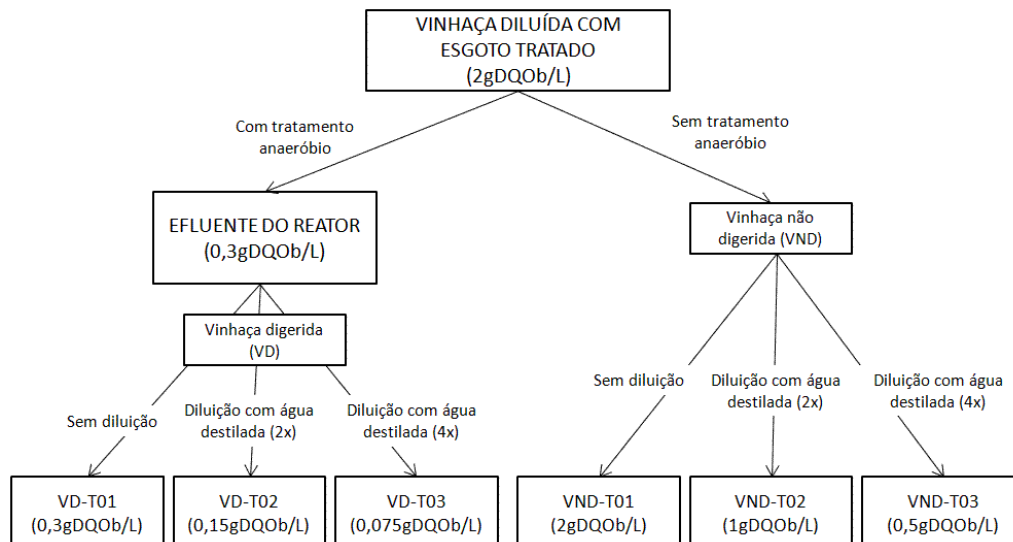


Figura 1. Esquema do processo para obtenção dos meios utilizados para o cultivo da *C. vulgaris*.

Foram operados digestores anaeróbios, em triplicata, com volume útil de 400 ml. Os ensaios foram realizados em reatores de volume total de 500 mL, montados em sistema AMPTS (Automatic Methane Potential Test System), da Bioprocess Control®. Este sistema é dividido em 4 unidades (A, B, C, D). A unidade “A” consiste em um banho-maria no qual os reatores com o material a ser digerido estão localizados. Frações dos gases CO₂ e H₂S, presentes no biogás produzido em cada reator, são capturadas em frascos (unidade “B”) que contém uma solução saturada de hidróxido de sódio (NaOH 3M), enquanto que o CH₄ produzido passa por esse sistema sem nenhuma alteração. É na unidade “C” onde ocorre a detecção do CH₄. Este dispositivo de medição funciona de acordo com o princípio do deslocamento de líquido, onde um pulso digital é gerado quando um volume de 10 ml de metano flui através do dispositivo, sendo automaticamente registrado no computador (unidade “D”).

Os digestores foram operados com uma carga orgânica volumétrica (COV) de 1 Kg m⁻³ d⁻¹ com um tempo de retenção hidráulica (TRH) de 24 horas. A temperatura de incubação foi controlada a 35°C com uma agitação intermitente (mistura total) de 1,0 e 0,5 min, ligado e desligado, respectivamente. Para evitar choque de temperatura, o afluente foi acondicionado a 35°C em banho-maria por 15 min antes da alimentação do reator. Durante

esse acondicionamento o afluente foi também aspergido com nitrogênio gasoso para garantir a remoção de oxigênio do meio.

A inoculação dos digestores foi feita com lodo proveniente de um reator anaeróbio da EMBASA apresentando as características descritas na Tabela 2. Foi utilizado 30% de inóculo para a partida dos digestores, que foram operados até alcançar o equilíbrio dinâmico entre o consumo de DQO e produção de CH_4 .

O desempenho do processo anaeróbio foi avaliado através do cálculo cinético da taxa de produção de metano, produtividade de metano por DQO consumida e remoção de DQO. A taxa de produção de metano foi calculada utilizando-se da técnica de regressão linear na fase exponencial na curva de acúmulo de metano ($R^2 > 90\%$). Os cálculos foram feitos individualmente para cada digestor e para cada ciclo de operação em batelada.

Aplicação do efluente dos digestores anaeróbios para o cultivo de *Chlorella vulgaris*

A partir do 19º dia de operação dos digestores anaeróbios (Figura 4), os efluentes de todos os digestores foram coletados, misturados e filtrados em malha de 20 μm e estocados em freezer -70°C . Os experimentos de crescimento de microalgas foram realizados em 3 tratamentos e os seus respectivos controles: (i) efluente do digestor anaeróbio, não diluído (VD-T01), (ii) efluente do digestor anaeróbio, diluído para 50% com água destilada (VD-T02) e (iii) efluente do digestor anaeróbio, diluído para 25% com água destilada (VD-T03). Os controles correspondem a experimentos com: (iv) afluente do digestor anaeróbio sem tratamento, sem diluição posterior (VND-T01), (v) afluente do digestor anaeróbio, diluído para 50% em água destilada (VND-T02) e (vi) afluente do digestor anaeróbio, diluído para 25% em água destilada. Vale ressaltar que o afluente do digestor anaeróbio é uma mistura de vinhaça com esgoto doméstico com uma DQO de 2 g l^{-1} . A tabela 3 mostra a caracterização físico-química do afluente e efluente dos digestores anaeróbios. Essas variáveis foram determinadas de acordo com os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2005) e a turbidez foi determinada com turbidímetro LaMotte® (Modelo 2020).

Tabela 3. Características do afluente e efluente dos reatores anaeróbios

	Afluente	Efluente
DQOb (g l ⁻¹)	2,008±0,040	0,300±0,006
Fosfato (g l ⁻¹)	0,016±0,001	0,014±0,001
Potássio (g l ⁻¹)	0,034±0,005	0,038±0,007
Nitrato (g l ⁻¹)	0,009±0,000	0,002±0,000
Amônia (g l ⁻¹)	0,003±0,000	0,020±0,004
Turbidez (NTU)	650±5,2	100±6,8
pH	6,8±0,1	6,7±0,1

Para os ensaios de crescimento foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris*. Os testes em triplicata foram realizados em frascos de Erlenmeyer contendo 400mL de meio (distintas misturas de afluente e efluentes dos digestores anaeróbios com água destilada) com suplementação de 20% de inóculo algal, coletado na fase exponencial de crescimento (0,1g l⁻¹). Os frascos foram mantidos sob agitação (90rpm) e temperatura constante (25±2°C). Foi realizada aeração com ar atmosférico enriquecido de 2% de CO₂. A cultura foi mantida sob intensidade luminosa de 173μE/m²/s e fotoperíodo 12h/12h. O crescimento foi monitorado a cada 24h, com base no peso seco da biomassa (g l⁻¹). As pesagens da matéria seca foram registradas em função do tempo e utilizadas para estimar a cinética de crescimento. As variáveis abióticas analisadas foram pH, turbidez; concentração inicial e final de nutrientes (fosfato, potássio, nitrato, nitrito, amônia) e variações na DQO inicial e final. Os parâmetros biológicos calculados foram a taxa de crescimento específico (μ), conforme Levasseur et al., 1993 (Eq.01), produtividade da biomassa (P_{dwt}), lipídios totais (LT) determinado pela técnica descrita por Freeman et al. (1957) e produtividade lipídica (PL) estimada de acordo com Griffiths e Harrison, 2009 (Eq. 02).

$$\mu = \ln(N_y/N_x)/(t_y - t_x) \quad (\text{Eq.01})$$

onde, N_y e N_x corresponde a biomassa seca (N) no início (t_x) e fim (t_y) da fase logarítmica de crescimento.

Para a determinação do peso seco, a cultura foi centrifugada durante 5 minutos a 5000g. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com água destilada e liofilizado, o peso seco foi determinado gravimetricamente de acordo com Ranga Rao et al. (2007).

$$PL = P_{dwt} \times LT \quad (\text{Eq. 02})$$

Os cálculos de produtividade de biomassa e coeficiente de crescimento foram feitos através de ajuste de curva linear na fase exponencial (2-6 dias) com $R^2 \geq 90\%$, com exceção do VND-T03 ($R^2 = 48\%$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Digestão anaeróbia da vinhaça

O cultivo de microalgas como a *Chlorella vulgaris* tem sido associado a um grande potencial para produção de biocombustíveis. Uma das limitações para a produção de microalgas em larga escala é a disponibilidade de suplementos nutricionais de baixo custo (CHISTI, 2007; BENEMANN, 2009). Portanto, tem-se sugerido que o cultivo de microalgas deve ser associado com outras atividades industriais, como uma estratégia para baratear o processo de produção (BENEMANN, 2009). Esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do efluente de um digestor anaeróbio contendo uma mistura de vinhaça diluída em dejetos de esgoto tratado para servir como meio para o cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Ryan et al (2009) identificaram que as indústrias bioprodutoras de etanol tem um gasto considerável com o tratamento e/ou destinação da vinhaça. Apesar de a vinhaça poder ser utilizada no processo de fertirrigação, os custos com o transporte desse material para o local de destino podem ser altos. Os autores ainda destacam que, no processo de fertirrigação, existe também um limite de volume de vinhaça para cada tipo de solo receptor. Como conclusão, os autores identificaram a digestão anaeróbia da vinhaça como alternativa de tratamento e também para produção de energia renovável, na forma de metano.

Trabalhando com um reator do tipo UASB operado a temperaturas de 55-57°C, Souza et. al (1992) reportaram uma produção de metano de $0,22 \text{ m}^3 \text{CH}_4 \text{ kgDQO}^- \text{ consumida}$ (ou $220 \text{ ml CH}_4 \text{ gDQO}^- \text{ consumida}$) com uma carga orgânica volumétrica de vinhaça de $25\text{-}30 \text{ Kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$. A Figura 2A mostra que no presente trabalho, a média dos últimos 5 dias de operação do digestor mostra uma produção de metano equivalente a $0,116 \text{ m}^3 \text{CH}_4 \text{ kgDQO}^- \text{ consumida}$, resultante de uma carga volumétrica de vinhaça de $1 \text{ Kg DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$. Apesar dos

altos valores reportados por Souza et al (1992), muito dos trabalhos revisados mostram resultados significativamente inferiores. Turkdogan-Aydino & Yetilmezsoy (2010), que trabalharam com a mesma configuração de reator, observaram que, variando a carga orgânica volumétrica entre 1,9 e 16 Kg DQO m⁻³ dia⁻¹, obtiveram uma produtividade de metano com valores aproximados de 0,05 a 0,11 m³CH₄ kgDQO⁻_{consumida}. Estes últimos são valores mais próximos do observado nesta pesquisa.

Geralmente os digestores operados com altas cargas orgânicas volumétricas apresentam instabilidade no processo. Mohana et al (2009) e Goodwin et al (2001), por exemplo, sugerem que os digestores anaeróbios devem ser operados inicialmente com uma carga orgânica volumétrica entre 4,8 e 5,46 Kg DQO m⁻³ dia⁻¹ para evitar essa falha no sistema, que é comumente associada a produção de ácidos. Apenas quando o biofilme anaeróbio está adaptado é que a carga volumétrica pode ser gradativamente aumentada para ir então alcançando outro equilíbrio dinâmico na eficiência de produção de metano. Por outro lado, Viana (2006) recomenda a partida de digestores anaeróbios com uma carga orgânica volumétrica de vinhaça de 0,73 Kg DQO m⁻³ dia⁻¹.

Apesar de existirem vários trabalhos tratando da digestão anaeróbia da vinhaça, este é ainda um processo novo e que requer melhorias em sua eficiência. O alto teor de compostos orgânicos recalcitrantes presentes na vinhaça muitas vezes dificulta o processo anaeróbio (WILKIE et al., 2000) e comumente são reportados longos períodos de retenção hidráulica durante o tratamento (JIMÉNEZ et al., 2003; CHEN et al., 2008). Para solucionar esse problema muitos autores têm estudado um pré-tratamento da vinhaça antes da digestão anaeróbia. Siles et al (2011) testou o processo de fluxionar a vinhaça com ozônio para reduzir a quantidade de compostos tóxicos como fenóis. A taxa de produção de metano aumentou em 41%. Até mesmo o bagaço da cana, quando digerido por peroxidases, pode ser utilizado para aumentar a produção de metano (RABELO et al, 2011).

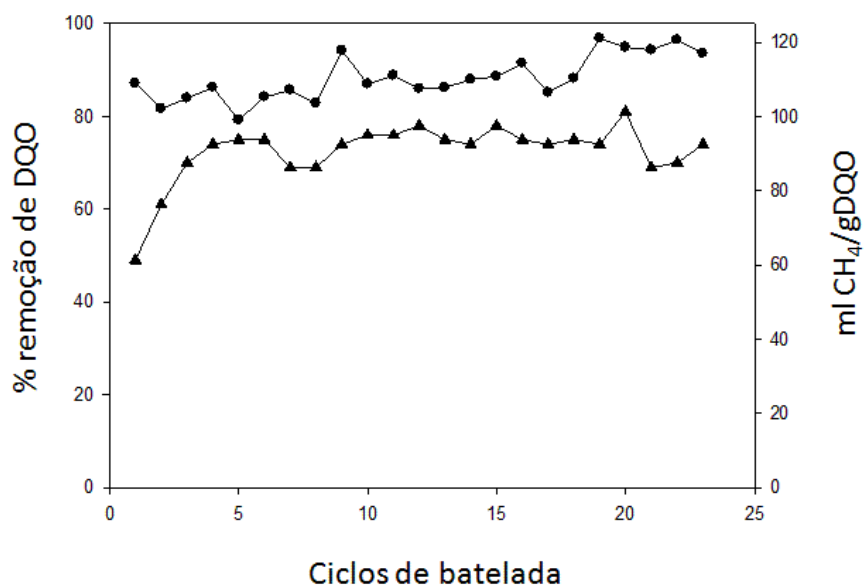
A eficiência do processo de digestão anaeróbia é medida não apenas pela quantidade de biogás ou metano produzido por quantidade de matéria orgânica consumida (mICH₄/gDQO), mas, também, pela rapidez do processo que está relacionado com o tempo de retenção hidráulica (TRH). Todas essas variáveis são o produto direto da qualidade do biofilme anaeróbio que se desenvolve dentro do digestor. Uma biomassa melhor adaptada

às condições do afluente e do tipo de digestor é fator principal que define a eficiência do processo. Portanto, neste trabalho foi avaliado o tempo de adaptação da biomassa anaeróbia dos digestores, através da comparação da produção de metano por DQO, ao longo de 23 ciclos de operação dos digestores em bateladas de 24 horas. A Figura 1B mostra adaptação a partir do 17º ciclo de 24h, enquanto Ribas et al (2009) reportam que o tempo de adaptação da biomassa anaeróbia à vinhaça ocorreu no final de 39 ciclos de 48 horas.

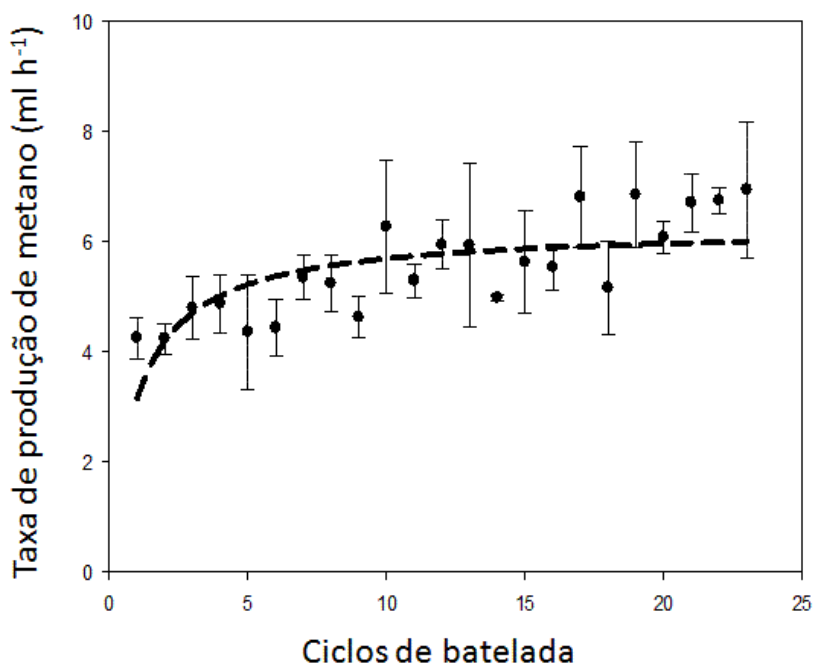
No presente experimento, os reatores foram mantidos a 35°C. Segundo Lettinga et al. (1996), existem três faixas de temperatura associadas ao crescimento microbiano: psicrófila (0 a 20°C), mesófila (20 a 45°C) e termófila (45 a 70°C). Na faixa mesófila, a temperatura ótima para a atividade metanogênica situa-se entre 30 e 35°C e, para valores de temperatura acima desta faixa, observa-se a inibição da metanogênese (ARAGÃO et al., 1999). Outra questão de grande importância diz respeito ao sistema ácido/base. A faixa de pH ótima para o desenvolvimento de diferentes tipos de microorganismos depende de suas próprias características e também do tipo de substrato metabolizado. Os microorganismos formadores de metano se desenvolvem satisfatoriamente em uma faixa de pH bem mais restrita (pH entre 6,6 e 7,4) que outros grupos, tais como os acidogênicos, capazes de tolerar valores de pH abaixo de 5,0 (CHERNICHARO, 1997).

Foi observada no presente trabalho uma eficiência de remoção de DQO_b de até 80% (Figura 2A). Resultados semelhantes foram encontrados por Manresa et al. (2000) no tratamento de vinhaça apresentando DQO de 79g l⁻¹. Trabalhando com dois reatores de leito fluidizados de bancada, operados por 120 dias, com tempo de retenção hidráulica (TRH) de 8h, obtiveram uma eficiência de remoção de DQO entre 75 a 78%. Em um segundo reator, com TRH de 11h e concentrações de 56g/L e 83g/L para a DQO, os autores obtiveram eficiência de remoção superior a 80%. Entretanto, Cabello et al. (2009), com tempo de operação de 14 dias, carga orgânica de 19,5 kg DQO m⁻³ d⁻¹, TRH de 1 dia, utilizando 17g l⁻¹ a 28g l⁻¹ de DQO obtiveram uma eficiência máxima na operação de 57,1% e produção de gás de 46 mL d⁻¹. Considerando que o metano corresponde a, aproximadamente, 65% da composição do biogás, Cabello et al. (2009) obtiveram uma produção bem inferior (1,25mLCH₄ h⁻¹) à conseguida no presente trabalho (em média, 6,5mLCH₄ h⁻¹). O volume acumulado de metano, produzido a partir de uma COV de 1KgDQOm⁻³ d⁻¹ de vinhaça, mostrou estabilidade a partir da 17ª batelada (ajuste com p≤0,005); entretanto, a colheita

do material foi feita a partir da 19ª batelada seguindo até a 23ª (Figura 2B). Nestas condições foram produzidos cerca de 116mlCH₄/gDQO_{vinhaça}.



A



B

Figura 2. A. Acompanhamento da produção de metano em mlCH₄/gDQO (●), em cada ciclo, por percentual de remoção de DQO (▲). B. Variação da taxa de produção de metano em batelada para reatores operados com vinhaça com carga de 2gDQO/L (cada batelada corresponde a um ciclo de 24h).

O tratamento anaeróbio é eficiente para a diminuição da carga orgânica (PANT E ADHOLEYA, 2007; SATYAWALI E BALAKRISHNAN, 2008; MOHANA et al., 2009). Com esse processo, é esperada uma remoção de 90% de DQO e recuperação de 85 a 95% da energia como biogás (PANT E ADHOLEYA, 2007). A produção de metano está diretamente relacionada à redução da DQO e, dependendo da água residuária a ser tratada, aproximadamente 90 a 95 % da DQO é convertida a CH₄ (MC CARTY, 1966; BOENING e LARSEN, 1982; LAQUIDARA BLANC e SHANGHNESSY, 1986; SPEECE, 1996).

No presente trabalho a digestão anaeróbia possibilitou uma expressiva redução na turbidez e nos teores de nitrato de, aproximadamente, 85% e 78%, respectivamente (Tabela 5). Não ocorreram variações significativas nos valores de pH das amostras do afluente e efluente do reator anaeróbio, evidenciando que o sistema se encontrava em estado de equilíbrio entre a fase acetogênica (produção de ácidos) e seu consumo para a produção de metano (metanogênese).

Crescimento de *Chlorella vulgaris* em culturas utilizando diferentes concentrações de vinhaça

A vinhaça efluente do processo anaeróbio possibilitou o crescimento da *Chlorella vulgaris*, nos seguintes tratamentos: VD-T01, VD-T02, VD-T03; enquanto que, na vinhaça afluente do digestor anaeróbio, somente no tratamento VND-T03 foi observado crescimento.

Nas demais concentrações houve perda de biomassa, além da formação de “grumos” que favoreceram a aderência e sedimentação da microalga, apesar da agitação. Esta resposta pode estar associada a compostos complexos de difícil degradação pela alga, presentes como compostos fenólicos, e à elevada cor e turbidez da vinhaça. Esses resultados indicam que nas condições VND-T01 e VND-T02 há, possivelmente, algum efeito inibidor da vinhaça sobre o crescimento da microalga. A vinhaça, um dos mais ricos resíduos industriais em nutrientes, apresenta uma cor escura devido à presença de melanoidina, o que dificulta sua utilização como meio de cultura de microalgas. As melanoidinas, polímeros de alto peso molecular, formados pela reação de Maillard e compostos fenólicos (ácido tânico e húmico), são frequentemente indicadas como tóxicas para os microorganismos propícios aos biotratamentos de efluentes, e altamente recalcitrantes, além de possuírem propriedades

antioxidantes (MIGO et al., 1993; MOHANA ET AL., 2009; PANT E ADHOLEYA, 2007); são de difícil degradação através de tratamento anaeróbio e, desta forma, tratamentos aeróbio e físico-químico são utilizados para refinar o processo (WILKIE et al. 2000). Kalavathi (2001) obteve degradação de 5% da melanoidina utilizando a cianobactéria *Oscillatoria boryana*; descobriu que o organismo liberava peróxido de hidrogênio, íons hidroxila e oxigênio molecular durante a fotossíntese, resultando em uma descoloração de 60% em vinhaça diluída. Esse estudo também sugeriu que se poderia usar melanoidina como fonte de nitrogênio para cianobactérias. Mas também é possível o consórcio entre espécies como relatado por Valderrama (2002), onde o tratamento combinado da *Chlorella vulgaris*, seguido por *Lemma minuscula*, resultou na remoção de 52% na cor da vinhaça.

O perfil do crescimento e a composição celular da *Chlorella vulgaris* cultivada em vinhaça nas diferentes condições pode ser visto nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para carboidratos. Os valores encontrados para proteínas e lipídios totais não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos VD-T01, VD-T02 e VD-T03, embora tenha sido observada diferença significativa destas condições em relação ao tratamento VND-T03; entretanto, foi no tratamento VD-T03 que um maior acúmulo de proteínas e lipídios totais foi observado, enquanto que em VND-T03 o acúmulo de carboidratos foi favorecido.

Os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a cinética do crescimento e a produtividade volumétrica lipídica nas diferentes condições de cultivo com a vinhaça podem ser observados na Tabela 4.

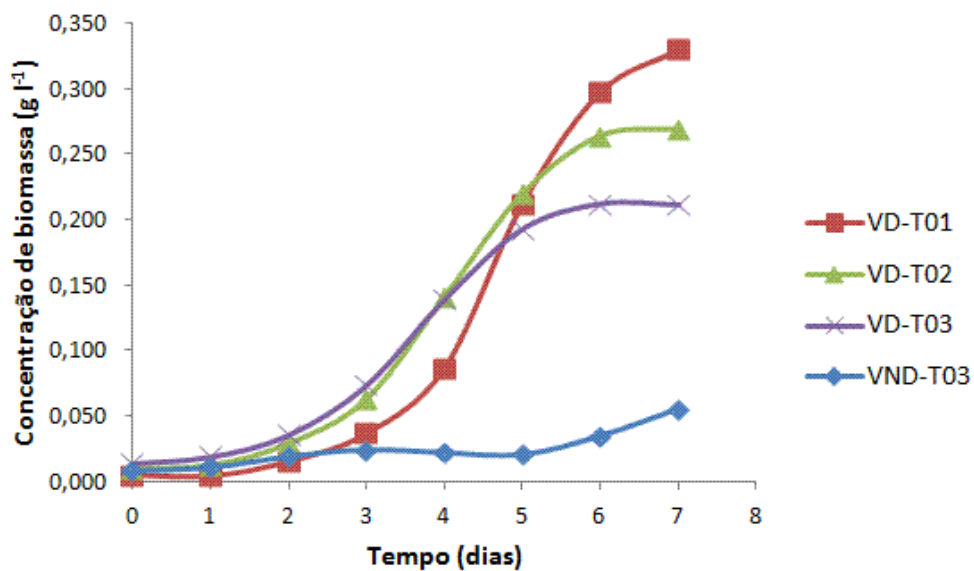


Figura 3. Crescimento de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

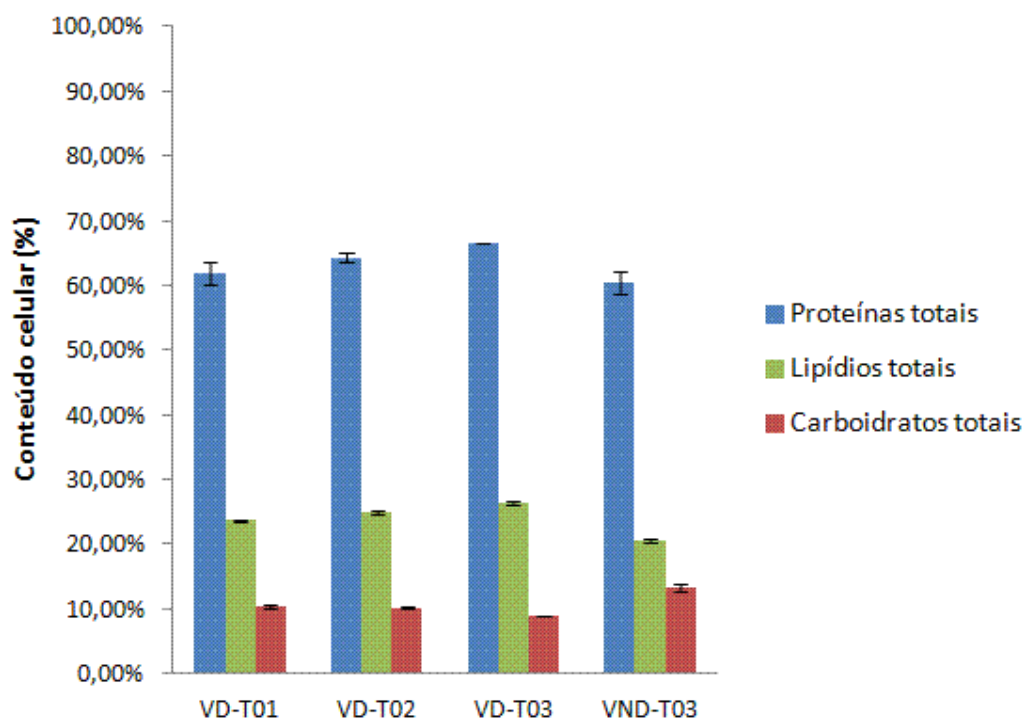


Figura 4. Composição celular de *Chlorella vulgaris* em vinhaça

Tabela 4. Parâmetros cinéticos comparando o crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de meio: efluente do digestor anaeróbio (VD-T01, VD-T02, VD-T03) e afluente do digestor anaeróbio (VND-T01, VND-T02, VND-T03),

	VD-T01	VD-T02	VD-T03	VND-T01	VND-T02	VND-T03
Pdwt (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	70	62	47	0	0	3
μ (d ⁻¹)	0,76	0,56	0,45	0	0	0,1*
Conteúdo lipídico (%)	23,68	24,95	26,45	20**	20**	20,53
Lipídio total (mg l ⁻¹)	75	64	54	0	0	11
Produtividade Lipídica (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	17	15	12	0	0	0,5*

* R²= 0,48

** Valor estimado

O melhor resultado em termos de produtividade em biomassa e lipídica foram respectivamente 70 mg l⁻¹ d⁻¹ e 17 mg l⁻¹ d⁻¹, obtido na condição VD-T01. Apesar do melhor rendimento, este resultado não diferiu significativamente nos demais tratamentos de vinhaça digerida (VD-T02 e VD-T03), porém diferiu significativamente da VND-T03. Dentre os tratamentos de vinhaça digerida, foi a condição VD-T03 que proporcionou o maior percentual de lipídios totais (26,45%). Andrade (2010) observou um melhor desempenho com relação ao crescimento da *Chlorella sp* utilizando 0,20% de vinhaça, em dias alternados, no enriquecimento do meio de cultivo, tamponado com 10g/L de bicarbonato de sódio. Nestas condições, a *Chlorella sp* apresentou 5x10⁶ cel/mL, rendimento de 0,08g/L e 17% de lipídios totais. Mas não houve sucesso na adaptação da cianobactéria *Spirulina platensis* ao meio enriquecido com a vinhaça, condição em que a cultura desta microalga entrou rapidamente na fase de declínio. Barrocal et al. (2010) demonstraram que, no cultivo em batelada, a espécie *Spirulina maxima* foi capaz de crescer em meio Schlösser contendo até 5g/L de vinhaça diluída, resultante da fermentação da beterraba. Concentrações de biomassa variando de 3,5 e 4,8 g/L, com produtividades de 0,15-0,24 (g l⁻¹ d⁻¹) e taxas específicas de crescimento de cerca de 0,1d⁻¹ foram conseguidas.

Os resultados do presente trabalho vêm confirmar dados de literatura (HU et al., 2008; REINHER, 2003), indicando que, sob estresse nutricional (muitas vezes representado pela escassez de nitrogênio no meio), ocorre um redirecionamento metabólico voltado para a produção de lipídios de estocagem, na maioria dos casos, representados por triacilgliceróis (TAG). O nitrogênio, importante elemento para o metabolismo das microalgas, contribui

para a formação de proteínas, essencial para a reprodução celular e crescimento das culturas em biomassa. Estudos mostram que a biossíntese e acúmulo de lipídios é aumentada em culturas com privação ou limitação de nitrogênio (THOMPSON, 1996; RICHMOND, 2004). A redução na quantidade de nitrogênio no meio de cultura possibilita que lipídios e carboidratos sejam sintetizados preferencialmente (REINHER, 2003).

Quando os níveis de nitrogênio da célula caem, a fotossíntese continua, embora a uma taxa reduzida. O fluxo de carbono, fixado na fotossíntese, é então desviado da rota de síntese de proteínas, para a síntese lipídica ou de carboidratos.

Dentro do mesmo gênero *Chlorella* algumas cepas encontradas acumularam grandes quantidades de amido, na ausência de nitrogênio, enquanto que outras acumularam lipídios neutros (RICHMOND, 1986). Comportamento semelhante pode ser observado em situações de privação ou limitação de fósforo (RICHMOND, 2004; MAHASNEH, 1997; HU et al., 2008).

Cultivo de *Chlorella*, contendo $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ de fosfato apresentou 15,7% de proteína e, com aumento dessa concentração para $0,50 \text{ mg l}^{-1}$ a quantidade de proteína alcançou 37% (MAHASNEH, 1997). Entretanto, no presente trabalho foi observado acúmulo de 66% de proteínas na biomassa, em meio contendo 4 mg l^{-1} de fosfato (VD-T03) (Tabela 5).

A *Chlorella vulgaris* não conseguiu resistir às condições oferecidas nos tratamentos VND-T01 e VND-T02. Vale ressaltar que a vinhaça foi diluída com esgoto de saída de uma estação de tratamento e que nenhum nutriente foi adicionado, diferentemente do experimento elaborado por Öztürk e Demir (2001) que testaram 7 concentrações de vinhaça (0; 1; 2; 2,5; 3; 5; 10%) sobre o crescimento da *Chlorella* sp. Beijerinck e *Tetraselmis suecica*. Eles observaram que há aumento no conteúdo de pigmento fotossintético, proteínas e concentração celular, ocorrendo o decréscimo nos valores destes parâmetros em concentrações acima de 3% de vinhaça, quando comparado com meio de cultura padrão. Chegando a resultados semelhantes, Kadioğlu e Algur (1992) observaram aumento de pigmentos fotossintéticos e favorecimento do crescimento celular em baixas concentrações da vinhaça (1-5%) em *Chlamydomonas reinhardtii*, enquanto que, em concentrações acima de 10% observaram uma redução significativa na concentração celular, quando comparada com o uso de um meio padrão.

Bonini (2012) estudando os efeitos do cultivo mixotrófico e heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em meios com adição de fontes de carbono orgânico e em vinhaça, selecionou, em ensaios mixotróficos, concentrações ótimas de 25 e 12,5g/L de glicose, 0,5 e 1,25g/L de acetato de potássio e 0,46 e 0,92g/L de glicerol, como ideais para o cultivo de *Aphanothece* e *Chlorella*, respectivamente, se refletindo em velocidade específicas de crescimento entre 0,173d⁻¹ e 1,03d⁻¹. Nos ensaios heterotróficos, verificou taxas específicas de crescimento iguais ou superiores para ambas as microalgas em todas as fontes de carbono avaliadas, com reduções entre 30,4 e 90% da concentração inicial dos substratos. Os ensaios com vinhaça demonstraram a possibilidade de utilização deste resíduo como meio de cultivo para ambas as microalgas, com alta conversão em biomassa pela *Aphanothece*. Nestas condições, foram verificadas remoções de 55,5% de glicose, 60,8% de DQO e 13% de potássio para a cianobactéria, e de 83,7% de glicose, 25% de DQO e 13,8% de potássio para *Chlorella*.

Tabela 5. Variáveis físico-químicas (inicial e final) nas diferentes condições utilizadas para o cultivo de *Chlorella vulgaris*.

	VD-T01	VD-T02	VD-T03	VND-T03
DQO _f (gL ⁻¹)				
Inicial	0,200±0,014	0,100±0,007	0,050±0,004	0,325±0,023
Final	0,119±0,008	0,070±0,005	0,027±0,002	0,083±0,006
Fosfato (gL ⁻¹)				
Inicial	0,014±0,001	0,007±0,001	0,004±0,001	0,004±0,0002
Final	0,0	0,0	0,0	0,0
Potássio (gL ⁻¹)				
Inicial	0,038±0,002	0,019±0,001	0,010±0,001	0,008±0,001
Final	0,030±0,002	0,015±0,001	0,009±0,001	0,012±0,001
Nitrato (gL ⁻¹)				
Inicial	0,002±0,0	0,001±0,0	0,000	0,002±0,0
Final	0,0	0,0	0,0	0,0
Amônia (gL ⁻¹)				
Inicial	0,020±0,0	0,010±0,0	0,005±0,0	0,000±0,0
Final	0,0	0,0	0,0	0,0
Turbidez (NTU)				
Inicial	85±1,31	43±0,95	21±0,38	65±1,14
Final	0,8±0,06	0,4±0,03	0,2±0,02	0,8±0,06
pH				
Inicial	6,7±0,1	6,7±0,1	6,7±0,1	6,7±0,1
Final	7,0±0,1	7,5±0,1	7,3±0,1	7,0±0,1

VD: vinhaça digerida

VND: vinhaça não digerida

A digestão anaeróbia produziu um efluente que possibilitou o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. Após a colheita da biomassa do meio é possível utilizá-lo na própria diluição da vinhaça afluente em um novo processo de digestão, bem como, em uma etapa subsequente à extração de compostos de interesse (a exemplo de lipídios, pigmentos, carboidratos, dentre outros), é possível utilizar a própria biomassa algal para alimentar o reator anaeróbio para a digestão da vinhaça (Figura 5). Chisti (2007) reporta uma qualidade do biogás de $16,2\text{-}30,6\text{MJ m}^{-3}$, além de mostrar um rendimento de: $0,15\text{-}0,65\text{m}^3 \text{Kg}^{-1}_{\text{biomassa seca}}$ na digestão da biomassa algal.

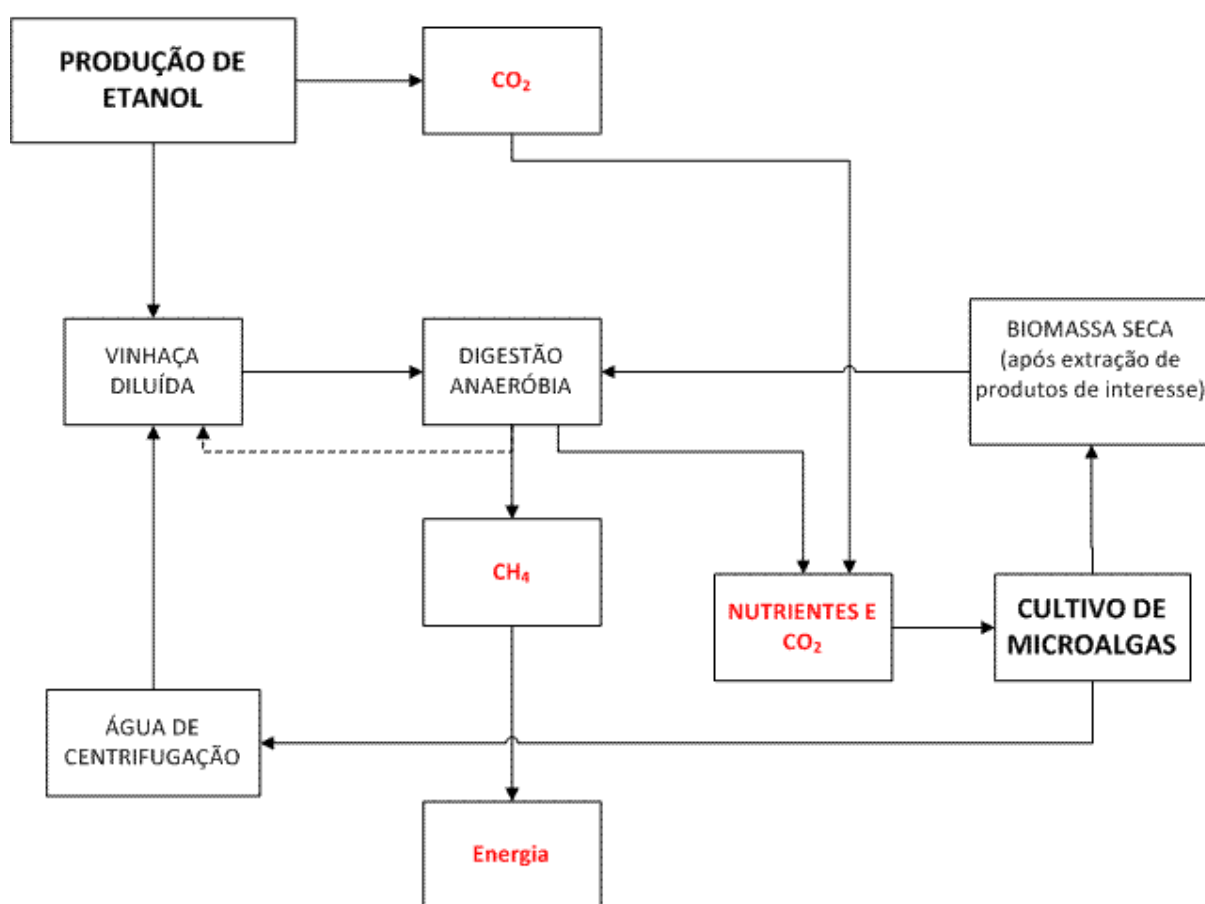


Figura 5. Ciclo de produção do cultivo de microalgas a partir de integração com uma usina sucroalcooleira.

CONCLUSÕES

O uso da vinhaça diluída (com esgoto a uma concentração final de 2gDQOb/L) não digerida nas condições VND-T01 e VND-T02 não propiciou o crescimento de *C. vulgaris*, possivelmente, em virtude da presença de concentrações ainda tóxicas de compostos fenólicos. Apesar do crescimento na condição VND-T03, foi observada baixa taxa de crescimento de *C. vulgaris* ($0,1 \text{ d}^{-1}$) que se refletiu na baixa produção em biomassa ($3 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e baixa produtividade lipídica ($0,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ dia}^{-1}$).

A vinhaça diluída (com esgoto tratado à concentração final de 2gDQOb/L) digerida (anaeróbia) VD-T01, propiciou o melhor resultado em crescimento ($0,76 \text{ d}^{-1}$), o que favoreceu uma melhor produtividade em biomassa ($70 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e uma maior produtividade lipídica em relação aos demais tratamentos.

Em vista do exposto e da possibilidade de formação de metano que contribui para agregar valor ao processo de digestão da vinhaça para uso como fonte de nutrientes em cultivos de microalgas, este resíduo industrial pode vir a ser um importante fator de viabilidade econômica para cultivos de microalgas em escala, visando a produção de biocombustíveis, cujos custos ainda não são competitivos em relação aos combustíveis fósseis.

Os resultados do presente trabalho são uma evidência da viabilidade da utilização deste efluente industrial como fonte de nutrientes em cultivo da espécie *Chlorella vulgaris*. Em virtude das similaridades no metabolismo de microalgas em geral, sobretudo das Chlorophyta, os resultados também sugerem a possibilidade de uso deste resíduo para o cultivo de outras espécies.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L.N. Utilização da vinhaça como meio de cultivo para a microalga *Chlorella sp* e para cianobactéria *Spirulina platensis*. 49f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
- ARAGÃO, J.M.S.; JUCÁ, J.F.T.; MARIANO, M.O.H. Temperatura como um dos parâmetros no monitoramento ambiental do aterro da Muribeca, Recife – PE. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, 1999.
- BANERJEE A., SHARMA R., CHISTI Y., BANERJEE, U. C. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Crit. Rev. Biotechnol.** 22(3): 245-279, 2002.
- BARROCAL, V M; GARCÍA-CUBERO M T; GONZÁLEZ-BENITO G; COCA M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **N Biotechnol.** Dec 31;27(6):851-6. Epub Jul 7, 2010.
- BENEMANN J.R. Microalgal biofuels: a brief introduction. **Benemann Associates and MicroBio Engineering**, Inc. 13pp, 2009.
- BOENING, P. H. & LARSEN, V. F. Anaerobic fluidized bed whey treatment. **Biotechnology and bioengineering**, XXIV: 2539-56, 1982.
- BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça. 96f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2012
- CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. Presidente Prudente: Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 321-338, jan/abr 2009.
- CHEN, Y., CHENG, J. J., CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. **Bioresource Technology** 99:4044-4064, 2008.
- CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA, UFMG, 246p, 1997.
- CHISTI Y. Microalgae as sustainable cell factories. **Environmental Engineering and Management Journal**, 5(3):261-274, 2006.
- CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnonology Advances**, 25:294-306, 2007.
- CHISTI Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends Biotechnol. Biofuels**, 26:126-131, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011. Disponível em: www.conab.com.br. Acessado em: 10 jul 2012.

CRUZ, J. I. da; HOJDA, A.; PORTUGAL, R. de S. Atuação do comitê da bacia hidrográfica do rio pardo na problemática da contaminação de águas subterrâneas pela vinhaça: carência de informações e ações. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte, 2007.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. 2011. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Manag Res.** Disponível em: <http://wmr.sagepub.com/content/early/2011/01/14/0734242X10387313>. Acesso em 04 out 2011.

FREEMAN, N. F. T., LINDGREN, Y. C., N, NICHOLS, A. V. Serum lipid analysis by chromatography and infrared spectrophotometry. **J Biol Chem** 277:449-464, 1957.

GOODWIN JAS, FINLAYSON JM AND LOW EW. A futher study of the anaerobic biotreatment of malt whisky distillery pot ale using an UASB system. **Bioresource Technology** 78: 155–160, 2001.

GRIFFITHS MJ, HARRISON STL. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **J Appl Phycol** 21:493-507, 2009.

HU, Q; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54, p. 621-639, 2008.

IEA. INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (França). **World Energy Outlook**. Paris, IEA 2007.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE. WMO/UNEP/IPCC. **Fourth Assessment Report (AR4 Synthesis Report)**. [S.l.]: 52 p, IPCC 2007.

JIMÉNEZ, A.M., BORJA, R., MARTIN, A. Aerobic-anaerobic biodegradation o beet molasses alcoholic fermentation wastewater. **Process Biochem.** 38, 1275–1284, 2003.

KADIOĞLU, A.; ALGUR, O.F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for possible reduction in vinasse pollution, *Bioresource Technology* 41, p.1-5, 1992.

KALAVATHI DF, Uma L and Subramanian G. Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. **Enzyme and Microbial Technology** 29: 246–251, 2001.

LARDON, L., HÉLIAS, A., SIALVE, B., STEYER, J. P., BERNARD, O. 2009. Life-cycle Assessment of Biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43(17):6475-6481.

LAQUIDARA, M.J.; BLANC, F.C.; & SHANGHNESSY, J.C. Development of biofilm, operating characteristics and operational control in the anaerobic rotating biological contator process. **Journal WPCF**, 58 – 107-14, February, 1986.

LETTINGA, G. et al. Use of the upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnology and bioengineering*, v.22, p. 699-734. 1996.

LEVASSEUR, M., THOMPSON, P. A., HARRISON, P. J. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources. *J. Phycol* 29:587-595, 1993.

MAHASNEH, I. A. Production of single cell protein from five strains of the microalga *Chlorella* sp (Chlorophyta). *Cytobios*, v.90, p.153-161, 1997.

MANRESA, F.N.; MORENDA F.F-P F.; MARTÍNEZ S.J.M.; LAVIN D.T. Uso del carbon activado la zeolita natural com materiales de soporte, en reactores anaerobios de lecho fluidizado, para el tratamiento de vinaza. *Anais...*, VI Oficina e Seminário Latino-Americano de Digestão Anaeróbia – Pernambuco-Br Vol 1. p. 14-21, 2000.

MC CARTY, P.L. Anaerobic treatment of soluble wastes. For presentation at the special lecture series advances in water quality improvement, The University of Texas, April 4 – 7, 1966.

METZGER P., LARGEAU, C. 2005. *Botryococcus braunii* a rich source for hydrocarbons and related Esther lipids. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 66:486-496.

MIGO, V.P., MATSUMARA, M., ROSARIO, E.J.D., KATAOKA, H. Decolorization of molasses wastewater using an inorganic flocculant. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 75 (6), 438–442, 1993.

MOHANA S, ACHARYA BK AND MADAMWAR D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials* 163: 12–25, 2009.

NASCIMENTO, I. A., CABANELAS, I. T. D., MARQUES, S. S. I., PEREIRA, S. A., VICH, D. V., DOS SANTOS, J. N., GUERRIERI, Y. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: uma opção eco-compatível para o aumento de eficiência na indústria sucroalcooleira. *Foro Iberoam. Rec. Mar. Acui. III* (2011): 47-65.

OECD/FAO. Agricultural Outlook 2009-2018. Organization for Economic Cooperation and Development; Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Report.** 95pp, 2009.

ÖZTÜRK, L; DEMIR, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. *Fresenius Environmental Bulletin* 10 (10), pp.766-771, 2001.

PANT, D., ADHOLEYA., A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource Technology* 98: 2321-2334, 2007.

RABELO, SC., CARRERE, H., MACIEL-FILHO, R. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 102: 7887-7895, 2011.

RANGA RAO, A., SARADA, R., RAVISHANKAR, G. A. Influence of CO₂ on growth and hydrocarbon production in *Botryococcus braunii*. **Journal Microbiol Biotechnol**, n.3, p.414-9, mar.17, 2007.

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, FURG, Rio Grande, 2003.

RIBAS, M.M.F.; CHINALIA, F.A.; POZZI, E.; FORESTI, E. Microbial Succession Within an Anaerobic Sequencing Batch Biofilm Reactor (ASBBR) Treating Cane Vinasse at 55oC. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.52, n. 4, p. 1027-1036, July-August, 2009.

RICHMOND, A. Microalgae of economic potential. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture* (ed. A. Richmond), pp. 199–243. CRC Press, Inc. Boca Raton, Flórida, 1986.

RICHMOND, A. (ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, UK, 566p, 2004.

RODOLFI, L. ET AL. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 102:100-112, 2008.

RYAN, D., GADD, A, KAVANAGH, J., BARTON, G.W. Integrated biorefinery wastewater design. **Chemical engineering Research and Design** 87: 1261-1268., 2009.

SATYAWALI, Y., BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. **Journal of Environmental Management** 86:481-497, 2008.

SCHULTZ, N. Efeito residual da adubação em cana planta e adubação nitrogenada em cana de primeira soca com aplicação da vinhaça. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SILES, JA; GARCIA-GARCIA, I., MARTIN, A., MARTIN, MA. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. **Journal of Hazardous Materials** 188: 247-253, 2011.

SOUZA , ME, FUZARO, G, POLEGATO, AR. Thermophilic anaerobic digestion of vinasse in pilot plant UASB reactor. *Water science and Technology* 25: 191-200, 1992.

SPEECE, R. E. *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Ed. Archae. Press, p.394, 1996.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. **American Public Health Association**, Washington, D.C. 1995.

THOMPSON, Jr. G.A. Lipids and membrane function in green algae. *Biochem. Biophys. Acta*, 1302, 17–45, 1996.

TURKDOGAN-AYDINOL F AND YETILMEZSOY K. A fuzzy-logic-based model to predict biogas and methane production rates in a pilotscale mesophilic UASB reactor treating molasses wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 10.1016/j.jhazmat.2010.06.054, 2010.

VALDERRAMA, L.T., DEL CAMPO, C.M., RODRIGUEZ, C.M., BASHAN, L.E., BASHAN, Y., Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Res.* 36, 4185–4192, 2002.

VIANA, A.B. Tratamento anaeróbio da vinhaça em reator UASB operado em temperatura na faixa termofílica (55°C) e submetido ao aumento progressivo de carga orgânica. Dissertação (mestrado em Hidráulica e Saneamento) Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

WEBER, M. I. Avaliação da eficiência de um reator anaeróbio de leito fluidizado para o tratamento de resíduos líquidos da indústria de refrigerantes. Dissertação (Mestrado) – programa de pós-graduação em engenharia de recursos hídricos e ambiental, universidade federal do Paraná. Curitiba. 184f, 2006.

WIJFFELS RH, BARBOSA MJ. An outlook on Microalgal Biofuels. *Science* 329:796-799, 2010

WILKIE, A.C., RIEDESEL, K.J., OWNES, J.M., Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass Bioenergy*. 19, 63–102, 2000.

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

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com resultados satisfatórios, o presente trabalho indica a viabilidade do tratamento anaeróbio da vinhaça em gerar um efluente capaz de suprir as necessidades para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. Com isso, é possível a integração do cultivo à usina sucroalcooleira, no que diz respeito ao aproveitamento do resíduo tratado, além do CO₂ gerado.

O trabalho mostra resultados que fecham o ciclo de produção da microalga (Figura 5). A alga é cultivada em efluente de reator anaeróbio (vinhaça tratada), após colheita; este meio pode ser utilizado para diluir a própria vinhaça para um novo processo de tratamento anaeróbio; e a biomassa, após seca e com os produtos de interesse extraídos, pode ser utilizada na alimentação de reatores anaeróbios que tratarão a vinhaça. A digestão da vinhaça com a biomassa irá gerar CO₂ que também pode ser utilizado para crescimento do cultivo, além da produção de metano como outra fonte de energia renovável.

6. REFERÊNCIAS

- ARAD, S. (MALIS); YARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, p. 92-97, 1992.
- BENNEMAN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 475-479, 1997.
- BENEMANN J.R. Microalgal biofuels: a brief introduction. **Benemann Associates and MicroBio Engineering**, Inc. 13pp. 2009.
- CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leite fluidizado. Presidente Prudente: Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 321-338, jan/abr 2009.
- CHERNICHARO, C.A. de L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Reatores Anaeróbios. 2.ed. Belo Horizonte: Departamento de engenharia Sanitária e Ambiental, 2007.
- CHISTI, Y. 2007. Biodiesel from Microalgae. **Biotechnology Advances** 25: 294-306.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalagae beats bioethanol. **Trends Biotechnol. Biofuels**, n. 26, p. 126-131, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011. Disponível em: www.conab.com.br. Acessado em: 10 jul 2012.
- COZZA, K.L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais Rio Grande. 204p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 1999.
- CRUZ, J. I. da; HOJDA, A.; PORTUGAL, R. de S. Atuação do comitê da bacia hidrográfica do rio pardo na problemática da contaminação de águas subterrâneas pela vinhaça: carência de informações e ações. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. Belo Horizonte, 2007.
- DUFOSSE, L.; GALAUP, P.; YARON, A. ET AL. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology** 16:389–406, 2005.
- FORESTI, E. ET AL. Fundamentos do tratamento anaeróbio, In: CAMPOS, J.R. (Coord.). Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo. Rio de Janeiro: ABES/PROSAB, p.29-52, 1999.
- GIBBS, HOLLY K. ET AL. Carbon payback times for crop-based biofuel expansion in the tropics: the effects of changing yield and technology-**Environmetal Research Letters**,v.3,p.034001, 2008.

IPCC. Intergovernmental Panel of Climate Change. **Fourth Assessment Report (AR4 Synthesis Report)**. [S.l]: 52p, 2007.

JUSSIAC, M. P.; DUSZOTA, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, v.18, p.1-7, 1984.

KURKI, A., HILL, A., MORRIS, M. 2006. Biodiesel: the sustainability dimensions. Driscoll, P. ed. **National Center for Appropriate technology (NCAT)/ ATTRA**, USA. 11pp

MARTINS, G. et al. *Chlorella sp* cultivada sob diferentes concentrações de nutrientes, In: X Encontro de Pós-Graduação. Universidade Federal do Rio Grande – FURG, 2008.

MORAIS, M.G; COSTA, J.A.V. In: Ciências e Agrotecnologia, vol.32 nº4 Lavras Jul/Ago. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono, 2008.

NASCIMENTO, I. A., CABANELAS, I. T. D., MARQUES, S. S. I., PEREIRA, S. A., VICH, D. V., DOS SANTOS, J. N., GUERRIERI, Y. Microalgas como matéria-prima para biocombustíveis: uma opção eco-compatível para o aumento de eficiência na indústria sucroalcooleira. **Foro Iberoam. Rec. Mar. Acuí. III** (2011): 47-65.

OECD, ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS(OECD/ FAO). Agricultural Outlook 2008-2017 Report 75 p. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esc/en/2/3/highlight_550.html > OECD-FAO, 2008. Acesso em 10 ago.2011.

OLIVEIRA, H. T. Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris*. São Carlos, 146 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, 1988.

PIPES, W. O.; GOTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. **Applied Microbiology**, v.8, p.163-169, 1960.

PRATOOMYOT, J.; SRIVILAS, P.; NOIRAKSAR, T. Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin **J. Sci. Technol.**, 2005, 27(6) : 1179-1187.

RAJESHWARI, K.V.; BALAKRISHNAN, M.; KANSAL, A.; LATA, K.; KISHORE, V.V.N. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 4, p. 135 – 156, 2000.

RIBAS, M.M.F. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbico operado em batelada sequencial contendo biomassa imobilizada sob condições termofílicas e mesofílicas. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 198f. 2006.

RODRIGUES, J. B. R. Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura – valorização e tratamento. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais). 118 p. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

RODULFO, B. R; MARMOL, N. H. R.; EMRALINO, G. A. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manurebiogas digester. **Phillipp Journal Science**, v.109, p.51-58, 1980.

RÖTTIG, ANNIKA & LEONIE WENNING & DANIEL BRÖKER & ALEXANDER STEINBÜCHEL. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. **Appl Microbiol Biotechnol** 85:1713–1733, 2010.

SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, M. E.; ESPEJO, M. T. PACHECO, R.; ESPINOLA, F.; HODAIFA, G. Mixotrophic culture of *Chlorella pyrenoidosa* with olive-mill wastewater as the nutrient medium. **Journal of App. Phycology**, v. 13, p.443–449, 2001.

SCHENK, P. M, THOMAS-HALL, S.R., STEPHENS, E., MARX, U. C. , MUSSGNUG, J.H. POSTEN, C., KRUSE, O., HANKAMER, B. 2008. Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 1:20-43.

SCHULTZ, N. Efeito residual da adubação em cana planta e adubação nitrogenada em cana de primeira soca com aplicação da vinhaça. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SPRINGER, A.; GOISSIS, G. Design of pond systems for treatment of ethanol plant effluents. *Biological Wastes* 23, p.143-152, 1988.

STERN, N. The economics of climate change: the Stern Review. London: Cambridge University Press, Cambridge, 2006. Disponível em: <<http://www.fnu.zmaw.de/fileadmin/fnu-files/reports/sternreview.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2011.

TEIXEIRA, C. M., MORALES, M. E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. Anais do I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. P. 91-96, 2006.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTÍN, A.; COLMENAREJO, M. F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological Engineering**, 2006.

VACCARI, G.; TAMBURINI, E.; SGUALDINO, G.; URBANIEC, K.; KLEMES, J. Overview of the environmental problems in beet sugar processing: possible solutions. *Journal of Cleaner Production* 13 (5), p.499-507, 2003.

VICHEZ, C.; GARBAYO, I.; LOBATO, M.V.; VEGA, J.M. Microalgae-mediated chemicals production and waste removal. *Enzyme Microbial Technology* 20, p.562-572, 1997.

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Princípios Básicos do Tratamento de Esgoto. Belo Horizonte: Departamento de engenharia Sanitária e Ambiental, 1996.

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

WONG, M. H.; LAY, C. C. The comparison of soybean wastes using tea leaves and sewage sludge for growing *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Pollution*, v.23, p.247-259, 1980.

XAVIER, S. Álcool como Carburantes Razões da sua Utilização. *Brasil Açucareiro*, Vol. 76 n.º 5, p. 16-20, nov/1970.