

IVO ALBERTO BORGHETTI

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella minutissima*
EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
MANIPUEIRA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Profº Drº CARLOS RICARDO SOCCOL
Orientador

Profº Drº JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Co-orientador

Profº Drº JULIO CESAR DE CARVALHO
Co-orientador

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IVO ALBERTO BORGHETTI

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella minutissima*
EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
MANIPUEIRA**

CURITIBA

2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Ires Anna Borghetti e Severino Ivo Borghetti (*in memoriam*) que sempre apostaram e me apoiaram nesta nova etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, bênção e proteção.

À minha Família por me apoiar, compreender e mostrar que sem lutas, nenhum objetivo alcançado faz sentido.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela orientação, pelo estímulo e, sobretudo, pela confiança e pelas oportunidades. Sem a sua firmeza nos ensinamentos e principalmente sua amizade, certamente não haveria superado os diferentes obstáculos.

Ao co-orientador Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, meu co-orientador no início da pesquisa, pelas discussões iniciais e pelas sugestões em diversas fases do estudo.

Ao co-orientador Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, meu co-orientador na fase final da pesquisa, pelas discussões finais e pelas sugestões em diversas etapas do estudo.

A Prof. Dr. Vanete Soccol pela amizade, orientação e estímulo nos estudos.

Ao Prof. Dr. Jose Angel Rodriguez-Leon pela contribuição na produção de conhecimentos.

A todos os demais professores do Departamento de Engenharia de Processos Biotecnológicos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu especial agradecimento a todos os “colegas” da Universidade Federal do Paraná que colaboraram como sujeitos da pesquisa.

Ao amigo Msc. Wilerson Sturm, pelas críticas que propiciaram um maior aprofundamento na pesquisa com a utilização da parte instrumental.

Ao amigo Msc. Dorival da Costa, pelo incentivo e críticas que propiciaram um maior aprofundamento nas questões polêmicas.

A Empresa Podium Alimentos pelo envio da manipueira.

A ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca). Ao Prof. Dr. Paulo Sergio Foutoura pelas análises de proteína realizadas no laboratório de química analítica de alimentos da UFPR.

Ao amigo Jose Escorsin pelo apoio e amizade.

EPÍGRAFE

*"De tudo ficam três coisas:
A certeza de que estamos sempre recomeçando,
A certeza de que precisamos continuar,
E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.*

*Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um novo caminho,
Da queda um passo de dança,
Do medo uma ponte,
Da procura um encontro."
(Fernando Sabino)*

RESUMO

Esta pesquisa objetivou determinar as melhores condições de cultivo da microalga *Chlorella minutissima* LEB 108 com vistas a produzir biomassa algal em resíduo agroindustrial do processamento da mandioca. A cepa da microalga utilizada neste estudo foi isolada da lagoa de estabilização da estação de tratamento de efluentes industriais da Usina Termelétrica Presidente Médici, em Candiota-RS e gentilmente cedida pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG/RS). Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores do tipo tubulares (provetas) com capacidade de 2L, e equipados com sistema de retirada asséptica de amostras, bem como em fotobiorreatores do tipo Erlenmeyers com capacidade de 2L. Os cultivos foram mantidos em agitação constante com um fluxo de ar atmosférico de 0,3 L/min. A iluminância foi de 2500 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo “luz do dia”. A temperatura foi mantida constante em 30°C com fotoperíodo de 12h claro/escuro. Os cultivos iniciaram com concentrações celulares de 0,2 g.L⁻¹, e foram mantidos durante 15 dias. As características de crescimento da cepa estudada foram avaliadas sob os seguintes aspectos: concentração de biomassa, pH, teor de lipídios e proteínas, cianeto, DBO e DQO. Após o “experimento IV” os resultados demonstraram maior redução de cianeto nas condições 25% e 30% de manipueira diluída em água, cujo valor foi reduzido de 27,24 mg/L a 0,05 mg/L para as duas condições. A maior redução de DBO ocorreu através das condições 20% e 25% de manipueira, com valores reduzidos de 2.400 mg O₂/ a 182,00 mgO₂/L e uma maior redução de DQO na condição 15% de manipueira, com valor reduzido de 6180 mg O₂/L para 658,00 mgO₂/L, após cultivo algal. A maior produção de biomassa nos quatro experimentos foi obtida quando cultivada em erlenmeyer, utilizando-se meio MBM, experimento II, condição (5% de manipueira, 75% de meio MBM e 20% de inóculo) onde se obteve uma concentração máxima “X_{máx}” de 2,790 g.L⁻¹. Esse resultado foi superior ao obtido por outros autores com a mesma linhagem cultivada em meio MBM. A velocidade específica máxima de crescimento “μ_{máx}” nos quatro cultivos foi obtida no experimento III, condição (20% de manipueira – 60% de água – 20% de inóculo) que foi de 0,397 dia⁻¹. A produtividade máxima “P_{máx}” de 0,540 g.L⁻¹. dia⁻¹ foi obtida no experimento IV (20% de manipueira, 80% de água e 10% de inóculo). O maior teor de lipídio (11,08%) foi obtido no experimento IV, condição (15% de manipueira, 85% de água e 10% de inóculo). Esse valor é superior ao encontrado por outros autores, quando cultivaram *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* em meio MBM obtendo respectivamente 6,96% e 7,98% de lipídios na biomassa seca. Com relação ao maior teor protéico na biomassa da *Chlorella* o melhor resultado foi obtido no experimento IV (20% de manipueira, 80% de água e 10% de inóculo) com 55,11% de proteína seca. Esse trabalho apresenta grande potencial em termos econômicos e ambientais, pois permite um tratamento objetivo das águas residuárias do processamento da mandioca, assim como pela geração de novos produtos de interesse comercial a partir desse resíduo.

Palavras-chave: *Chlorella minutissima*. Cultivo de microalga. Resíduo líquido da industrialização da mandioca.

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the best conditions for microalga *Chlorella minutissima* LEB 108 cultivation in order to obtain algal biomass in agro industrial waste. The microalga strain used in this experiment was isolated from the stabilization pool of the Usina Termelétrica Presidente Medici's effluent treatment station, in Candiota/RS, and kindly donated by Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG/RS). The experiments were performed in 2 liter capacity tubular photobioreactors, supplied with aseptic system for sample withdrawal, and in 2 liter capacity Erlenmeyer flasks photobioreactors, as well. The culture were maintained in constant shaking with 0,3 L/min atmospheric air flow and illuminance of 2500 lux provided by "day light" fluorescent lamps. The temperature was maintained constant at 30°C with 12 hour light/darkness photoperiod. The culture was initiated with 0.2 g.L⁻¹ cell concentration and was kept growing for 15 days. The growth trait of the microalga strain studied was evaluated under the following aspects: biomass production; pH; lipid and protein content; cyanide reduction; OBD and OCD. After experiment IV the results showed greater reduction of cyanide in conditions with 25% and 30% of cassava waste water diluted with water, whose concentration was reduced from 27,24 mg/L to 0,05 mg/L. The biggest OBD reduction occurred through condition 20% and 25% of cassava waste water, with reduced rate from 2.400 mgO₂/L to 182,00 mgO₂/L and the biggest reduction in OCD in condition 15% of cassava waste water, with reduced rate from 6,180mgO₂/L to 658mgO₂/L after algal culture. The best biomass production in the four experiments was obtained when the alga cultivated in Erlenmeyer, using MBM medium, in experiment II, condition (5% cassava waste water - 75% MBM and 20% inoculant) where a maximum concentration was obtained "X_{máx}" of 2,790 g/L⁻¹. This result was better than the obtained one for other with the same ancestry in MBM medium. The best maximum specific growing velocity "μ_{máx}" in the four cultivations was obtained in experiment III, condition (20% cassava waste water - 60% water - 20% inoculant) that was μ_{máx}. 0,397 day⁻¹. The maximum productivity "P_{máx}" of 0,540g/L⁻¹ was obtained in experiment IV (20% cassava waste water - 80% water and 10% inoculant). The biggest lipid rate, (11,08%), was obtained in experiment IV, condition (15% de cassava waste water - 85% water and 10% inoculant). This value is better than the o found one for other authors, when they had cultivated *Chlorella vulgaris* and *Chlorella minutissima* in MBM medium obtaining, respectively, 6,96% and 7,98% of lipid in the dry biomass. With regard to the biggest protein content in the *Chlorella* biomass, it was obtained in experiment IV (20% cassava waste water – 80% water and 10% inoculant), with 55,11% of dry protein. This work presents great potential in economics and environmental terms; therefore it allows an objective treatment of residuary waters from the processing of the cassava, as well as for the generation of new products of commercial interest from this residue.

Key words: *Chlorella minutissima*. Microalgae culture. Waste liquid industrialization of cassava.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTOMICROGRAFIA DA MICROALGA <i>Chlorella minutissima</i>	27
FIGURA 2 - BIORREATOR ABERTO (FURG/RS).....	34
FIGURA 3 - BIORREATOR FECHADO (ERLENMEYERS)	34
FIGURA 4 - BIORREATOR CILÍNDRICO (PROVETAS).....	34
FIGURA 5 - TANQUES PEQUENOS (FURG/RS).....	34
FIGURA 6 - TANQUES GRANDES (FURG/RS).....	34
FIGURA 7 – EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE FÉCULA	49
FIGURA 8 – PRODUÇÃO BRASILEIRA DE AMIDO POR ESTADO – 2008	49
FIGURA 9 – PROCESSO PARA OBTENÇÃO DO AMIDO DA MANDIOCA	51
FIGURA 10 - PREPARO DE ERLENMEYERS.....	55
FIGURA 11 - FOTO DO CULTIVO ALGAL EM FOTOBIORREATOR ERLENMEYERS	57
FIGURA 12 A – FOTOBIORREATOR TUBULAR (INÍCIO DO CULTIVO)	57
FIGURA 12 B - FOTOBIORREATOR TUBULAR (FINAL DO CULTIVO).....	57
FIGURA 13 - ESTANTE COM FOTOPERÍODO PARA CULTIVO ALGAL	59
FIGURA 14 – CURVA PADRÃO DETERMINADA PARA <i>Chlorella minutissima</i> LEB 108 CULTIVADA EM MEIO MBM (Meio Bristol's Modificado)	61
FIGURA 15 - LIPÍDIOS EXTRAÍDOS PELO MÉTODO BLIGH AND DYER.....	63
FIGURA 16 - INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE PARA CULTIVO DA MICROALGA <i>Chlorella minutissima</i> EM MANIPUEIRA	66
FIGURA 17 – CONSUMO DE O ₂	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS DA <i>Chlorella sp</i> HA -1.....	28
TABELA 2 -	QUANTIDADE DE REAGENTES PARA O PREPARO DO MEIO MBM.....	36
TABELA 3 -	QUANTIDADE DE ÁGUA PARA CADA ERLLENMEYER PARA O PREPARO DO MEIO MBM.....	37
TABELA 4 -	QUANTIDADE DE SOLUÇÃO A ₅ PARA O MEIO MBM.....	37
TABELA 5 -	EVOLUÇÃO DA ÁREA COLHIDA, PRODUÇÃO, RENDIMENTO, PARTICIPAÇÃO E COLOCAÇÃO PARANÁ/BRASIL ENTRE 2000 – 2007 (MANDIOCA)	45
TABELA 6 -	ÁREA E PRODUÇÃO DE MANDIOCA POR REGIAO ADMINISTRATIVA DA SEAB/PR. – (SAFRA 2007)	46
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MANIPUEIRA, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES.....	53
TABELA 8 -	COMPOSIÇÃO DO MEIO MBM E MANIPUEIRA	56
TABELA 9 -	EXPERIMENTO I: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA DILUÍDA EM MEIO MBM PARA OS ENSAIOS DE ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM FOTOBIOREATOR DO TIPO TUBULAR (FBRT).....	67
TABELA 10 -	EXPERIMENTO II: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM MEIO MBM PARA OS ENSAIOS DE REFINAMENTO E ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM FOTOBIOREATOR DO TIPO ELENMEYER (FBRE).....	68
TABELA 11 -	EXPERIMENTO III: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM ÁGUA PARA OS ENSAIOS DE REFINAMENTO E ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM FOTOBIOREATOR DO TIPO ELENMEYER (FBRE).....	69
TABELA 12 -	EXPERIMENTO IV: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM ÁGUA PARA OS ENSAIOS OTIMIZADOS DA <i>Chlorella minutissima</i> EM FOTOBIOREATOR DO TIPO TUBULAR (FBRT).....	69
TABELA 13 -	RESULTADO DA X _{MÁX} ; P _{MÁX} E μ _{MÁX} do EXPERIMENTO I	71
TABELA 14 -	RESULTADO DA X _{MÁX} ; P _{MÁX} E μ _{MÁX} do EXPERIMENTO II.....	73

TABELA 15 -	RESULTADO DA $X_{MÁX}$; $P_{MÁX}$ E $\mu_{MÁX}$ DO EXPERIMENTO III.....	74
TABELA 16 -	RESULTADO DA $X_{MÁX}$; $P_{MÁX}$ E $\mu_{MÁX}$ DO EXPERIMENTO IV.....	75
TABELA 17 -	TEOR DE LIPÍDIOS, BIOMASSA E PROTEÍNAS PARA O EXPERIMENTO IV	76
TABELA 18 -	ANÁLISE DE DBO, DQO E CIANETO COM INÓCULO PARA O EXPERIMENTO IV	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu_{\text{máx}}$	- Velocidade Específica Máxima de Crescimento
ABAM	- Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca
ACECI	- Academia Cearense de Ciências
Art.	- Artigo
ATP	- Trifosfato de Adenosina
BMLP	- <i>Braslian Mariculture Linkage Program</i>
C1	- Concentração do Inóculo
C2	- Concentração do Experimento
CEPPA	- Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos
CETESB	- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CGF	- <i>Chlorella Growth Factor</i>
Chl a	- Clorofila a
Chl b	- Clorofila b
Chl c	- Clorofila c
Chl d	- Clorofila d
COP	- Conferência das Partes
CREs	- Certificados de Emissões Reduzidos
CTO	- <i>Column Temperature Oven</i>
DBO	- Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DQO	- Demanda Química de Oxigênio
EMATER	- Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural
FAO	- <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FBRE	- Fotobioreator Erlenmeyer
FBRT	- Fotobioreator Tubular
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
FEA	- Faculdade de Engenharia de Alimentos
FURG	- Fundação Universidade do Rio Grande do Sul
GEE	- Gases do Efeito Estufa
GLA	- Ácido gama-linolênico
GRAS	- <i>Generally Recognized as Safe</i>

HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEL	- Instituto Euvaldo Lodi
IPARDES	- Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
LC	- <i>Liquid Chromatography</i>
LEB	- Laboratório de Engenharia de Bioquímica
LEM	- Laboratório de Engenharia de Microalgas
MBM	- Meio Bristol's Modificado
MC	- Meio para <i>Chlorella sp.</i>
MDL	- Mecanismo de Desenvolvimento Limpo
NADPH	- Nicotinamidadifosfato
ONU	- Organização das Nações Unidas
PABA	- Ácido Para Aminobenzoico
PAR	- <i>Photosynthetically Active Radiation</i>
PFD	- <i>Photosynthetic Photon flux Density</i>
$P_{\text{máx}}$	- Produtividade Máxima
PPM	- Parte por milhão
PVDF	- Fluoreto de Polivinilideno
RID	- <i>Refraction Index Detector</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
SCP	- <i>Single Cell Protein</i>
SEAB	- Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
UEM	- Universidade Estadual de Maringá
UFC	- Universidade Federal do Ceará
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UV	- Ultravioleta
V/V	- Volume por volume
V1	- Volume do Inóculo
V2	- Volume do Experimento
$X_{\text{máx}}$	- Concentração Máxima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 CONCEITOS GERAIS.....	23
2.2 ALGAS.....	24
2.2.1 Características.....	24
2.2.2 Classificação.....	25
2.2.3 Morfologia.....	26
2.2.4 <i>Chlorella sp.</i>	27
2.2.4.1 Composição nutricional e efeitos terapêuticos	27
2.2.4.2 Nutrientes para o crescimento da <i>Chlorella sp.</i>	28
2.2.4.3 Cultivo da <i>Chlorella minutissima</i>	29
2.2.5 Ocorrência e distribuição.....	30
2.2.6 Importância econômica e ambiental.....	30
2.2.7 Temperatura do cultivo	31
2.2.8 pH do cultivo	31
2.2.9 Luminosidade nos cultivos.....	32
2.2.10 Agitação e aeração nos cultivos.....	32
2.2.11 Fotobiorreatores para cultivo de microalgas.....	33
2.2.12 Preparo do meio para cultivo.....	36
2.2.13 Pigmentos e composição química.....	37
2.2.14 Métodos de quantificação de biomassa.....	38
2.3 FOTOSSÍNTESE.....	38
2.3.1 Princípio.....	38
2.3.2 Importância.....	39
2.3.3 Pigmentos e a fotossíntese.....	40
2.4 FIXAÇÃO DO CARBONO.....	41
2.5 ASPECTOS LEGAIS RESOLUÇÃO CONAMA 357/05	43
2.6 CULTURA DA MANDIOCA.....	45
2.6.1 Características gerais	45
2.6.2 Produção de amido de mandioca	48
2.6.2.1 Processo para obtenção do amido de mandioca	50
2.6.3 Usos da manipueira.....	52
2.6.4 Composição da manipueira.....	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 INÍCIO DOS EXPERIMENTOS.....	54
3.2 MICROORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO	54
3.3 PREPARAÇÃO DA VIDRARIA	54
3.4 PREPARO DO INÓCULO	55
3.5 MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO	56
3.5.1 Produção de biomassa algal em meio de cultivo à base de manipueira	57
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO	58
3.6.1 Manutenção dos cultivos	58
3.7 ACLIMATAÇÃO PRÉVIA	59

3.8 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS	59
3.8.1 Determinação da concentração celular	60
3.8.2 Curva padrão de crescimento para <i>Chlorella minutissima</i>	60
3.9 DETERMINAÇÃO DO pH	61
3.9.1 Correção do pH	61
3.10 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E ILUMINÂNCIA	62
3.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS TOTAIS	62
3.12 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS	62
3.13 DETERMINAÇÃO DE DBO E DQO	64
3.14 DETERMINAÇÃO DE CIANETO.....	64
3.15 RESPIROMETRIA	65
3.15.1 Sensores de O ₂ e CO ₂	65
3.16 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	66
3.16.1 Efeitos de diferentes concentrações de manipueira diluída em meio MBM para cultivo da <i>Chlorella minutissima</i> LEB 108 usando fotobiorreator do tipo tubular - Experimento I (FBRT)	67
3.16.2 Efeitos de diferentes concentrações de manipueira diluída em meio MBM para cultivo da <i>Chlorella minutissima</i> LEB 108 usando fotobiorreator do tipo erlenmeyer - Experimento II (FBRE).....	67
3.16.3 Efeitos de diferentes concentrações de manipueira diluída em H ₂ O para cultivo da <i>Chlorella minutissima</i> LEB 108 usando fotobiorreator do tipo erlenmeyer - Experimento III (FBRT).....	68
3.16.4 Efeitos de diferentes concentrações de manipueira diluída em H ₂ O para cultivo da <i>Chlorella minutissima</i> LEB 108 usando fotobiorreator do tipo tubular - Experimento IV(FBRT)	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1 ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM MANIPUEIRA E MEIO MBM - EXPERIMENTO I	71
4.2 REFINAMENTO DA ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM MANIPUEIRA E MEIO MBM - EXPERIMENTO II	72
4.3 REFINAMENTO DA ADAPTAÇÃO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM MANIPUEIRA DILUÍDA EM ÁGUA - EXPERIMENTO III	73
4.4 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DA <i>Chlorella minutissima</i> EM MANIPUEIRA DILUÍDA EM AGUA - EXPERIMENTO IV	74
4.5 ANÁLISES DE DBO, DQO E CIANETO	76
4.6 RESPIROMETRIA	78
5 CONCLUSÃO	79
6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

A produção de alimentos para a população mundial deverá ser um dos maiores problemas que o homem enfrentará neste século. Os produtos oriundos da biotecnologia, principalmente a cultura de microalgas, têm crescido devido a características tais como: alta produtividade, uso da luz solar como fonte de energia e reduzido impacto ao meio ambiente. A biotecnologia através do cultivo de microalgas surge como uma alternativa para suplementação alimentar nas áreas mais carentes (ANDRADE, 2005). O cultivo mixotrófico¹ surge como uma excelente alternativa, para crescimento de microalgas, pois neste tipo de cultivo as microalgas dispõem simultaneamente de compostos orgânicos, luz e CO₂ como fonte de carbono e energia (YANG *et al.*, 2000). Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com microalgas, em relação a sua utilização como alimentos, na agricultura, no tratamento de águas residuais para a obtenção de compostos de alto valor agregado como: ácidos graxos e biofixação de CO₂ (COSTA *et al.*, 2006).

O cultivo algal é uma das formas mais eficientes de obtenção de proteínas e devem contribuir significativamente como alimentação suplementar mundial nos próximos anos. O uso de microalgas, por crescerem sob condições simples, de baixo custo e terem um metabolismo muito ativo vem sendo usado na biotecnologia (VICHEZ *et al.*, 1997). A produção de microalgas com aproveitamento de resíduos agroindustriais se baseia na utilização dos nutrientes, da matéria orgânica, bem como dos sais dissolvidos nestes resíduos, sendo uma prática não rotineira nos cultivos em escala comercial, que necessitam de uma formulação definida, tornando este tipo de cultivo extremamente caro.

A primeira vez que o ser humano usou microalgas foi a 2000 anos na China, onde a microalga *Nostoc* sp. foi utilizada como alimento para evitar à fome, contudo a biotecnologia de microalgas só teve início na metade do último século (SPOLAORE *et al.*, 2005). O Brasil recentemente deu início às pesquisas com microalgas (COZZA, 1999). A utilização de microalgas na alimentação humana remonta a tempos imemoriais, tendo sido usadas como fonte de proteínas por

¹ Mixotrófico – Quando um microrganismo aproveita a energia luminosa e assimila carbono orgânico de um determinado substrato ao mesmo tempo.

tribos indígenas no lago Chade e por Índios Aztecas, os quais as secavam em lamelas e depois a ingeriam (COLLA *et al.*, 2002).

Existem inúmeras aplicações do uso comercial de microalgas como: podem ser usadas para aumentar o valor nutricional de alimentos humanos e animais devido aos seus componentes químicos; tem um papel crucial para a aqüicultura e também podem ser incorporadas em cosméticos.

As microalgas começaram a ser cultivadas para fins comerciais nos anos 60 no Japão com a cultura de *Chlorella* sp. Seguida, nos anos 70 pelo cultivo de *Spirulina* sp. no México, Estados Unidos e China (RICHMOND, 1990). As indústrias de biotecnologia de microalgas cresceram e se desenvolveram nos últimos 30 anos. Os estudos com microalgas têm tomado espaço importante dentro da biotecnologia, sendo que países como Estados Unidos, Japão, Itália, Israel, França, Canadá, México, Austrália e Índia têm aprimorado os estudos nesta área.

O consumo de mandioca está associado ao Brasil desde o seu descobrimento. Planta-se mandioca em todas as unidades da federação, e o produto tem destacada importância na alimentação humana e animal, além de ser utilizado como matéria prima em inúmeros produtos industriais (CARDOSO, 2003).

O processamento da mandioca fornece a farinha e a fécula, entre tantos outros produtos próprios de determinadas regiões, como o biju, a tapioca, e a manipeba. Na produção da farinha, a raiz de mandioca é moída e espremida, formando uma massa úmida que é seca e torrada, enquanto que na produção de fécula é adicionada à massa úmida grande quantidade de água, gerando um volume extra equivalente a 60% da matéria-prima em resíduos líquidos. Este resíduo líquido, conhecido como manipueira, é um passivo ambiental que apresenta elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em seu tratamento.

A grande quantidade de matéria orgânica em suspensão e a toxicidade decorrente da presença do ácido cianídrico ocasionam toxicidade a peixes e plantas, porém o pré-tratamento deste efluente pode possibilitar a utilização do mesmo no cultivo de microorganismos aquáticos de grande valor protéico.

A utilização de resíduos agroindustriais para a produção de microalgas aparece como uma solução para reduzir custos de produção na composição dos meios de cultura. Os resíduos industriais na grande maioria das vezes são liberados no meio ambiente, sendo necessário dar-lhe uma determinada disposição. A fim de minimizar os efeitos causados pelas descargas residuárias,

vários processos podem ser empregados, como a recuperação de materiais através de processos biotecnológicos.

A manipueira, já citado, é considerado meio propício para proliferação de microrganismos em função de sua composição, que inclui carbono, sais, nitrogênio e fósforo (EFING, 1991).

Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção Nacional de mandioca, foi no ano de 2008 cerca de 26.336.652 toneladas de raízes e estimasse para a safra de 2009 uma produção de 26.317.538 toneladas. A área de colheita na safra de 2008 atingiu 1.860.800 ha e para 2009 estimasse uma colheita correspondente a uma área de 1.888.678 ha (IBGE, 2009).

Vários estudos têm sido objeto do tratamento e/ou aproveitamento do resíduo do processamento da mandioca. Já foram propostos tratamentos através da oxidação aeróbica e anaeróbica. O aproveitamento tem procurado utilizar todos os seus componentes, através da sua aplicação na agricultura como herbicidas, nematicidas e inseticidas.

O processamento da mandioca apresenta efluentes gerados com grande quantidade de nutrientes e de matéria orgânica. A utilização destes nutrientes vem sendo utilizada para a fertirrigação (CARNEIRO, 2006).

Microrganismos fotossintéticos como as microalgas têm sido utilizados em projetos de MDL (mecanismo de desenvolvimento limpo), através do seqüestro de CO₂ da atmosfera a fim de produzir biomassa e são responsáveis por 40% do carbono fotossintetizado no planeta (HENRIKSON, 1994). Fontes de carbono como o CO₂ ajudam no aumento de produtividade, minimizando assim custos com produção em escala laboratorial, onde se utilizam sais de alto custo (MORAIS, 2006). A biomassa algal pode ser usada como fonte de nutrientes animal e humana, corantes naturais, compostos farmacêuticos e produção de biocombustíveis, como gás hidrogênio, metano e biodiesel.

Se fôssemos fazer uma comparação com a produção de vegetais, no que diz respeito à produção de biomassa, os cultivos de microalgas apresentariam uma série de vantagens como, por exemplo, a duplicação da biomassa em intervalo de tempo muito curto utilizando espaço físico menor e gerando menos resíduo. É de conhecimento de quem trabalha com microalgas que fatores como: temperatura, iluminâncias e a composição de nutrientes do meio de cultivo influenciam nas

composições centessimais de microalgas, podendo-se manipular estas condições para obtenção de maior quantidade de um metabólito de interesse.

As microalgas podem crescer tanto à custa de energia luminosa quanto através de assimilação de carbono orgânico e a utilização por um microrganismo destes dois mecanismos dá-se o nome de mixotrofia. Quando o metabolismo baseia-se na utilização de energia luminosa e dióxido de carbono dá-se o nome de autotrofia e quando o microrganismo realiza seu metabolismo somente pela utilização apenas de fontes orgânicas de carbono o mecanismo chama-se heterotrofia, de acordo com a terminologia adotada por Ferraz, *et al.*, em 1983 (KNOERR, 2006).

Com o avanço do uso de nutracêuticos agregado ao consumo de produtos naturais, que na maioria das vezes não causam mal a saúde, surge o cultivo de microalgas para atender esta demanda como um excelente estímulo. As indústrias que produzem microalgas como a *Chlorella minutissima* têm um grande potencial na produção da mesma, uma vez que cresce em curto espaço de tempo e requer cuidados simples de cultivo. As microalgas levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem e também pela facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para a agricultura.

A cultura de microalgas possibilita a produção de vários compostos de interesse comercial, principalmente, de aplicar em alimentos, devido ao alto teor de proteínas e de substâncias como ácidos graxos, sais minerais, ficocianina, clorofila, beta-caroteno, biomassa, vitaminas, polissacarídeos, ácido γ -linolênico (GLA) e enzimas (COZZA, 1999). Estudos recentes têm explorado o uso de microalgas para obtenção de lipídios, principalmente os de maior valor comercial como o ácido γ -linolênico (COSTA, *et al.*, 2006)

Visando melhorar o tratamento biológico do resíduo proveniente do processamento da mandioca, foram definidos parâmetros tecnológicos para o tratamento da manipueira com a *Chlorella minutissima*. Foram determinadas condições operacionais iniciais propícias ao crescimento da microalga sob condições de fermentação, identificação da influência das variáveis como pH, temperatura e cianeto sobre o processo fermentativo, com vistas a obter a máxima produção de biomassa.

O uso inadequado de alimentos que não atendem às necessidades nutricionais básicas do ser humano aliado a desnutrição de países pobres faz com que se procurem compostos nutricionalmente ricos e de alto valor agregado, com custo relativamente baixo e mínima geração de resíduos. Para Colla *et al.*, (2002) estudos da FAO (*Food and Agricultural Organization*) a produção e descoberta de novas fontes para fins alimentícios não seguem o mesmo padrão de aumento da população mundial e, conseqüentemente, de suas necessidades alimentares. A biomassa microalgal pode ser utilizada como suplemento alimentar, sendo que os lipídios são um dos mais importantes componentes das microalgas e excelentes fontes de energia e de ácidos graxos essenciais.

Pode-se obter proteína unicelular SPC (*single cell protein*) de muitas espécies de microrganismos, incluindo fungos, bactérias e, em especial, microalgas (ANUPAMA *et al.*, 2000). As microalgas são excelentes fontes de nutrientes, corantes naturais e compostos farmacêuticos e ainda podem ser utilizados na aqüicultura, na produção de biocombustíveis e contribuem para o seqüestro de carbono da atmosfera (BENEMANN, 1997).

A *Chlorella minutissima* é uma alga verde, microscópica e de água doce que possui uma rígida parede celular, contém a maior concentração de clorofila então conhecida, em maior quantidade do que qualquer outra alga (MORAIS, 2006). Apresenta ainda elevadas concentrações de β -caroteno, mais que no espinafre, sendo um excelente antioxidante que pode proteger o organismo de radicais livres. A vitamina B₁₂ que é de difícil absorção através dos alimentos comuns, em *Chlorella* sp. está presente em quantidade superior a que é encontrada no bife de fígado, sendo comum a falta desta vitamina em dietas vegetais e macrobióticas. As vitaminas do complexo B, principalmente a B₁₂, são vitais na formação e regeneração das células sanguíneas que, juntamente com o ferro da *Chlorella minutissima* fazem desta um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia (MORAIS, 2006).

Outros bioprodutos, como pigmentos, significativa concentração de proteína, cerca de 60%, podem ser obtidos e isso significa possuir proporcionalmente mais proteína do que a soja, carne bovina e trigo. Os lipídios são um dos principais componentes das microalgas e desempenham um importante papel nutricional como fonte de energia e de ácidos graxos essenciais (MORAIS, 2006). Os ácidos graxos essenciais devem ser adicionados a dieta uma

vez que não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e contribuem para a prevenção de problemas cardíacos, controle de colesterol e ativação do sistema imunológico e do crescimento celular. Entre os benefícios da utilização da *Chlorella* sp. podemos citar: melhora do sistema digestivo e ajuda a remover metais pesados do corpo .

Uma particular propriedade da *Chlorella* sp. é seu fitonutriente (nutriente derivado de plantas) chamado CGF (*Chlorella Growth Factor*). O CGF é composto principalmente de um complexo de nucleotídeo-peptídeo encontrado no núcleo da célula que é excelente para a manutenção e rejuvenescimento das células. Por possuir muitas vitaminas e minerais, a *Chlorella* sp. pode nutrir o organismo e ao mesmo tempo, devido à alta concentração de clorofila e fibras, ajuda na desintoxicação do organismo (MERCHANT *et al.*, 2002).

A *Chlorella* sp., dentre as microalgas, é possivelmente a mais utilizada como alimento, e também a mais pesquisada nos últimos tempos, com milhares de artigos de pesquisa, de muitas universidades publicadas em revistas científicas. Esta microalga possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite um rápido crescimento. Para os japoneses que a descobriram, a *Chlorella* sp era e ainda é utilizada até hoje como complemento alimentar em saladas e sushis, devido a sua composição rica em nutrientes como a clorofila “a” e “b”, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais.

A *Chlorella* sp. possui o certificado G.R.A.S. (*Generally Recognized As Safe*) concedido pelo F.D.A. (*Food and Drug Administration*), que a libera para consumo humano nos Estados Unidos e que é aceito pela quase totalidade dos demais países, incluindo Japão e toda a Europa, sem risco a saúde (HENRIKSON, 1994).

É importante intensificar estudos com outras espécies de *Chlorella* sp., pois trabalhos sobre a fixação de CO₂ usam, esta microalga, devido a sua tolerância aos componentes dos gases de combustão (MORAIS, 2006).

As microalgas utilizam a fotossíntese para a obtenção de carbono orgânico reduzido a partir do carbono oxidado/CO₂, utilizando a energia solar e liberando oxigênio. Independente de a *Chlorella* sp., ser um microrganismo fotossintético, já foi testado a sua capacidade em utilizar resíduos agroindustriais para crescimento.

Pesquisas têm sido intensificadas no sentido de buscar novas fontes de nutrientes para minimizar custos de produção e a utilização da manipueira como substrato orgânico pode ser uma alternativa economicamente viável em comparação aos nutrientes preparados em laboratório.

Os programas de combate à erosão e controle da poluição implementados no meio rural são exemplos desta afirmativa. Os maiores avanços só ocorrem quando se integram tecnologias, instituições e a comunidade. A partir desta percepção, três condições são indispensáveis para o êxito do que se propõe com o projeto de cultivo de microalgas: 1) incentivo ao produtor de mandioca, disponibilizando apoio tecnológico de forma que os riscos e os custos sejam compartilhados entre os beneficiários, de forma globalizada; 2) capacitação e educação dos técnicos, produtores e da comunidade diretamente envolvida; e 3) uso da legislação como apoio e de forma adequada à realidade, respeitando as questões de aptidão das terras, e áreas de interesse ambiental.

As microalgas são apresentadas como uma alternativa energética ao petróleo, capaz de produzir energia de três formas: hidrogênio, bicombustível ou ainda biogás. As indústrias se voltam cada vez mais para o ramo de bicombustíveis à base de microalgas, pois estas oferecem um rendimento satisfatório em curto espaço de tempo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em diferentes concentrações de manipueira, avaliando o crescimento da população microalgal, a formação de biomassa e a biorremediação desse resíduo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Buscar soluções viáveis para uma melhor valorização da manipueira produzida pela agroindústria de mandioca; avaliar a influência de diferentes concentrações da manipueira no crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em fotobiorreatores fechados sob condições controladas; comparar os resultados obtidos da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) resultante dos cultivos em relação ao resíduo “in natura”; verificar a capacidade de síntese de lipídios para as condições de cultivo utilizadas; avaliar a detoxificação do resíduo em termos de redução de cianeto; verificar a capacidade de síntese de proteínas durante o cultivo da *Chlorella minutissima* em diferentes concentrações de manipueira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONCEITOS GERAIS

A cultura com algas teve início em 1919, com a introdução de *Chlorella* sp. verificando-se que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter 50% de proteína crua (BORZANI *et al.*, 2001). Os primeiros testes de produção ou massa foram realizados na Alemanha em 1942, mas o grande interesse no assunto instalou-se apenas nos anos 50 e progrediu rapidamente.

O primeiro cultivo unialgal foi realizado por Beijerinck em 1890 com *Chlorella vulgaris* (COLLA *et al.*, 2002). O cultivo em grande escala realmente começou a ser foco de pesquisa em Stanford, na Califórnia, de 1948 a 1950, com a finalidade de utilização de técnicas laboratoriais para o cultivo em escala comercial (BOROWITZKA, 1999). Durante a segunda Guerra Mundial a *Chlorella* sp. também foi investigada por pesquisadores Alemães devido ao potencial em duplicar sua biomassa algumas vezes por dia em laboratório com iluminação adequada, sendo que a mesma proporcionaria uma estocagem de fontes de alimentos, principalmente de proteínas. De acordo com Radmann *et al.*, (2004) a primeira planta piloto de *Chlorella* sp. foi construída e operada em 1951 na cidade de Cambridge, nos Estados Unidos. Nos anos 80 cerca de 46 fábricas de microalgas na Ásia produziam mais de 1000 kg de microalgas por mês e em 1996 e de acordo com Borowitzka (1999) cerca de 2000 toneladas/ano de *Chlorella* sp. foram produzidas comercialmente somente no Japão.

As preocupações com as questões ambientais sempre foram de interesse do homem, porém o potencial uso biotecnológico de microalgas para a biorremediação, tratamento de resíduos e a utilização da biomassa destes microorganismos na suplementação alimentar vêm sendo o foco dos estudos de muitos cientistas nos últimos anos, devido à identificação de diversas substâncias de alto valor nutricional que são sintetizadas por estes organismos.

A transformação da energia solar em compostos orgânicos pelas microalgas constitui-se como um dos mais eficientes sistemas fotossintéticos.

Assim como na agricultura, a utilização das microalgas em biotecnologia obedece aos mesmos pressupostos que serviram de base à agricultura terrestre, ou seja, usar a capacidade fotossintética com o objetivo de produzir biomassa, a qual é usada como fonte alimentar, energética ou de produtos químicos.

Os métodos agrícolas atuais comprometem grandes extensões de terra; aliado a este fato ocorre o esgotamento dos solos, contaminação das águas com corretivos e defensivos, conversão de regiões florestadas em desertos e alterações climáticas, quando praticada de forma desregrada e extensiva.

A produção e o fornecimento de alimentos por métodos não convencionais é o objeto de inúmeros estudos, entre eles o da produção de alimentos a partir de resíduos agrícolas com a finalidade de melhorar a qualidade do produto, assim como sua produtividade. Acredita-se que existam mais de 25.000 espécies de algas em todo o planeta, variando seu tamanho de uma única célula até espécies com 50 metros de comprimento (COZZA, 1999). As maiores são marinhas, macroscópicas e apresentam grande valor econômico. Aproximadamente 70 espécies estão envolvidas na produção de alimentos, aditivos alimentícios, rações animais, fertilizantes e produtos bioquímicos.

Os primeiros eucariontes surgiram há 2.3 milhões de anos com organelas voltadas às funções fotossintéticas e como precursoras dos seres mais complexos e evoluídos que lhes seguiram posteriormente (HENRIKSON, 1994).

2.2 ALGAS

2.2.1 Características

As algas são organismos pertencentes ao reino vegetal que compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizadores (SOUTH; HITTICK, 1987). São classificadas como talófitas, isto é, plantas inferiores, por apresentarem uma estrutura simples, não vascularizada, com ausência de raiz, caule e folhas.

As algas verdes são diversificadas na estrutura e inclui aproximadamente 17.000 espécies (RAVEN *et al.*, 1996). Embora a grande maioria ser de habitat

aquático existem uma variedade de outros locais onde as algas verdes se encontram como a superfície da neve, troncos de árvores, no solo em associação simbiótica com os fungos (constituindo os líquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados.

As espécies dos gêneros unicelulares *Chlamydomonas* e *Chloromonas* são encontradas na superfície da neve, e *Trentepohlia*, uma alga filamentosa que cresce sobre rochas e troncos ou ramos de árvores. Muitas algas verdes são microscópicas, apesar de algumas das espécies marinhas serem grandes. *Codium magnum* do México atingem até 25 centímetros de largura e um comprimento superior a 8 metros.

2.2.2 Classificação

Segundo Bicudo e Menezes (2006), há três tipos de básicos de sistemas de classificação em biologia: os artificiais, os naturais e os filogenéticos.

Os sistemas artificiais consideram os caracteres independentemente de sua origem e sem se preocupar com as possíveis afinidades e parentescos entre os indivíduos classificados. Os sistemas naturais levam em consideração toda a informação disponível sobre as espécies, incluindo caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, genéticos, citológicos, ultra-estruturais e o que mais houver disponível sobre cada espécie. Já os sistemas filogenéticos são os que mais se aproximam do ideal, uma vez que os táxons estão nele arranjados conforme seus diferentes graus de ancestralidade e descendência.

Esses conceitos levaram à proposição de um esquema bastante filogenético para as algas, o qual foi sintetizado no livro "*Algae: a introduction to phycology*", de autoria de Christiaan Van Den Hoek, David G. Mann e Hans M. Jahns no ano de 1995. Esse sistema inclui 11 divisões e 30 classes. Quando em um trabalho mais abrangente se envolve uma grande quantidade de gêneros, adota-se o sistema de Round do ano de 1965, aprimorado das *Chlorophytas* por ele próprio em 1971. De acordo com a classificação taxonômica dos dois autores podemos classificar a *Chlorella minutissima* da seguinte forma: pertencente à Divisão - *Chlorophyta*; Classe - *Chlorophyceae*; Ordem - *Chlorococcale*; Família -

Oocystaceae; Gênero – *Chlorella* e Espécie – *minutissima*.

2.2.3 Morfologia

As algas em geral podem variar enormemente em tamanho, morfologia e outras características e, ao contrário de outros microorganismos, contém clorofila. Em especial são as microalgas que apresentam grande interesse para os pesquisadores, devido à facilidade e velocidade de cultivo (SUNG *et al.*, 1999).

Muitas algas verdes unicelulares são móveis, em virtude da presença de atividade flagelar. Os tipos coloniais mostram-se como esferas, filamentos ou placas. Detalharemos a classe *Chlorophyceae* e a ordem *Chlorococcales* que é de interesse deste estudo. Os componentes desta classe podem ser unicelulares ou pluricelulares. Quando pluricelulares, não apresentam verticilos transversais de ramos ao longo de um eixo filamentosos principal, diferenciado em nós e entrenós. As células dos representantes desta podem ser solitárias ou unidas em colônias não filamentosas, com número definido ou indefinido de células (SMITH, 1955). Estas podem ser uninucleadas ou plurinucleadas, mas em caso algum se verifica divisão vegetativa.

A reprodução assexuada é feita por zoósporos ou aplanósporos, fissão e outros métodos assexuados ou por meios sexuais isogâmicos, anisogâmica ou oogâmica ou heterogâmicos. O gênero mais antigo das algas verdes são as *Chlamidomonas*.

A ordem *Chlorococcales* inclui cerca de 100 gêneros e 800 espécies. Quase todas vivem em água doce, mas muitas fazem apenas parte do plâncton de lagos e tanques.

A característica principal desta ordem é a ausência de divisões celulares vegetativas. As *Chlorococcales* constituem uma linha evolutiva, derivada diretamente das *Volvocales* unicelulares, que originou formas mais complexas destituídas de divisão celular nos estados vegetativos (SMITH, 1955). As únicas divisões do protoplasto das *Chlorococcales* são as que precedem imediatamente a formação de zoósporos, autósporos, gametas ou outros elementos reprodutores. A formação de colônias em algas de certos gêneros é devida à associação de todos

os zoósporos ou aplanósporos (autósporos) saídos duma célula mãe, ou ao fato das células formadas a partir de esporos permanecerem envolvidas por uma matriz comum, resultante da gelificação das membranas da célula mãe. Um dos gêneros mais importantes é o gênero *Chlorella* sp, que serviu de instrumento útil em muitas investigações sobre a fotossíntese e a produção de suplementos nutricionais (RAVEN *et al.*, 1996).

2.2.4 *Chlorella* sp.

A *Chlorella minutissima* LEB 108 (COSTA *et al.*, 2006) é uma microalga unicelular microscópica, eucariótica, esférica e com diâmetro variando entre 5-10 μm , que pode ser encontrada em tanques e lagos, com alta capacidade fotossintética (FIGURA 1). Para Morais (2006), a *Chlorella* sp. pertence a divisão *Chlorophyta* e ordem *Chorococcales*.

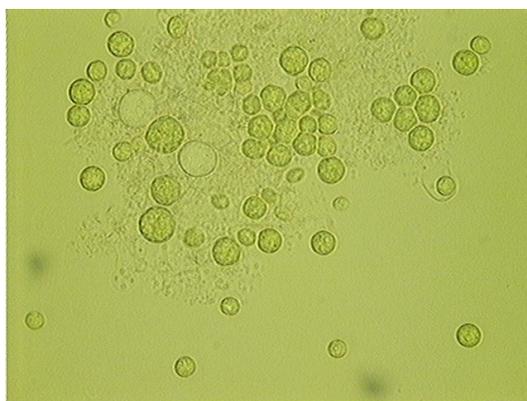


FIGURA 1 – FOTOMICROGRAFIA DA *Chlorella minutissima* LEB108 – AUMENTO DE 40 X

2.2.4.1 Composição nutricional e efeitos terapêuticos da *Chlorella* sp.

Foi descoberta pelos japoneses, tradicionais consumidores de algas, os quais a apreciam e a utilizam normalmente como complemento alimentar. É uma alga rica em nutrientes: contém aproximadamente, 60% de proteínas, mais que a

soja (37%), a carne bovina (45%) e o trigo (10%), clorofila; mais que 20 tipos de vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno (pró-vitamina A) e vitamina B₁₂ e todos os aminoácidos essenciais.

A *Chlorella* sp. é uma rica fonte de nutrientes concentrados. Sua análise nutricional é de tal forma impressionante, que ela é considerada como possuidora de elementos necessários para dar sustento à vida na. Uma de suas mais notáveis qualidades nutritivas é seu alto conteúdo protéico. A Tabela 1 mostra o conteúdo de aminoácidos da *Chlorella* sp.

TABELA 1 - CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS DA *Chlorella* sp. HA-1.

AMINOÁCIDOS	CONTEÚDO (%PESO SECO)
Isoleucina	2,01
Leucina	4,71
Lisina	3,98
Fenilalanina	2,69
Tirosina	2,40
Metionina	1,19
Cisteína	0,65
Treonina	2,46
Triptofano	1,04
Valina	3,03
Arginina	3,06
Histidina	2,18
Glicina	3,35
Serina	1,04
Alanina	4,55
Aspartato + Asparagina	4,66
Glutamato + Glutamina	5,78
Prolina	2,52

FONTE: (YANAGI, *et al.*,1995)

Os nutrientes da *Chlorella* sp. são melhor aproveitados pelo organismo quando as células da *Chlorella* sp, que são protegidas por uma parede celular, são desintegradas durante o processo de secagem, possibilitando que seus nutrientes sejam amplamente absorvidos pelo metabolismo (HENRIKSON, 1994 *apud* MORAIS, 2006).

Os valores nutricionais da *Chlorella* sp. podem apresentar variações dependendo do modo de cultivo, quantidade de energia solar, estação climática e outros fatores.

2.2.4.2 Nutrientes para o crescimento da *Chlorella* sp.

O crescimento das algas está relacionado diretamente às condições de cultivo, e entendendo essa relação é possível direcionar a produção em um determinado cultivo. Dentre os fatores que podem influenciar no crescimento da *Chlorella minutissima*, podemos citar: pH, salinidade, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, aeração, presença de íons bicarbonato, fonte de nitrogênio, tipo de biorreator, idade do inóculo, concentração inicial de biomassa, densidade populacional. O meio preparado para o cultivo influencia diretamente no crescimento celular, bem como na composição química da alga que está em estudo.

Os elementos nutritivos mais importantes são carbono, nitrogênio, fósforo, sais de magnésio, potássio e cálcio. Microelementos como manganês e cobalto atuam favoravelmente em suas atividades vitais. As fontes mais importantes de carbono são os carboidratos (LIMA *et al.*, 1999). O dióxido de carbono é a fonte de carbono que contribui para o crescimento fotossintético e autotrófico das algas. Em alguns cultivos se faz necessário a adição de CO₂, pois no ar existem somente 0,03% de CO₂.

A proporção de nitrogênio pode variar de 1 a 10% em peso seco, sendo que uma grande variedade de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para o cultivo de microalgas (RADMANN *et al.*, 2004). O nitrogênio é incorporado dentro do microorganismo na síntese de proteínas, sendo que sua ausência acarretaria a diminuição de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor protéico (REINEHR, 2003). Nos meios de cultivo MBM e MC usados para *Chlorella minutissima* usa-se 0,25 g.L⁻¹ de nitrato de potássio, sendo que este mesmo nitrato foi encontrado na manipueira na proporção de 11,7 g.L⁻¹.

2.2.4.3 Cultivo da *Chlorella minutissima*

As condições das quais a *Chlorella* sp. precisa para desenvolver-se são encontradas na natureza, mas podem ser reproduzidas artificialmente. A *Chlorella minutissima* se desenvolve em médias térmicas elevadas (25-26°C), porém Morais, (2006) cita Sakai *et al.*, (1995) que a *Chlorella* sp possui grande vantagem em

relação às outras microalgas por apresentar alta tolerância à temperatura e concentração de CO₂, mantendo crescimento a 42 °C e 40% de CO₂, pH neutro (6,5 – 7,5). Portanto, sua produção é simples e não necessita um meio de cultivo complexo e de custo elevado.

Sob condições naturais, muitas algas crescem em comunidades mistas, incluindo várias espécies e gêneros. Quando o objetivo é estudar ou cultivar espécies individuais, um meio que possibilite condições seletivas é indispensável para o cultivo (COLLA *et al.*, 2002). O cultivo de microalgas apresenta algumas vantagens como a simplicidade de nutrientes necessários, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico, como os ácidos graxos (COSTA, *et al.*, 2006).

2.2.5 Ocorrência e distribuição

A *Chlorella* pode ser encontrada em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese. As algas ocorrem, em grande abundância, nos oceanos, nos mares, nos lagos salgados, nos lagos de água doce, nos açudes e nas correntes (RAVEN *et al.*, 1996). Existem espécies isoladas de solos úmidos, de rochas e pedras, das cascas de árvores e de outras plantas e animais.

2.2.6 Importância econômica e ambiental

O comércio em grande escala de culturas de microalgas teve início perto de 1960 no Japão com a cultura de *Chlorella* sp. Num período de aproximadamente 30 anos a biotecnologia industrial de microalgas teve um crescimento significativo. Nos dias de hoje a produção de biomassa microalgal aproxima-se de 5000 t por ano (SPOLAORE *et al.*, 2005).

Atualmente, há numerosas aplicações comerciais de microalgas. Podem ser usadas para realçar o valor nutricional da alimentação humana bem como

serem usadas para a fabricação de ração animal devido à rica composição química. Representam função crucial na aqüicultura e podem ser incorporados aos cosméticos. Além disso, são cultivadas como fonte de alto valor molecular (gordura poliinsaturada). São adicionados para fórmulas para crianças e suplementos nutricionais além dos pigmentos que são importantes como corantes naturais. Futuras pesquisas devem focar-se no melhoramento dos sistemas de produção e modificação genética de raças (SPOLARE *et al.*, 2005). Produtos de microalgas deverão tornar-se mais diversificados e economicamente competitivos.

2.2.7 Temperatura do Cultivo

Um dos principais fatores para o crescimento de todos os organismos vivos é a temperatura que além de influenciar nas taxas de reações celulares afeta também a natureza do metabolismo, a concentração de biomassa, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa (FAINTUCH, 1989).

Dois fatores são os responsáveis pelo efeito da temperatura no crescimento e na atividade da biomassa: um é a ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (proteínas e lipídios) e o outro é uma relação dos coeficientes cinéticos com a temperatura, os quais dependem das energias de ativação das reações.

Segundo Fox (1996) a temperatura ideal para o cultivo de microalgas está entre 35°C e 37°C. Para Sakai *et al.* (1995) algumas algas como a *Chlorella* sp., podem suportar uma temperatura de até 42°C.

2.2.8 pH do cultivo

Dentre os fatores mais importantes no cultivo de algas, destaca-se o pH do meio de cultivo que também determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, o que, direta ou indiretamente, influencia o metabolismo das algas. O pH depende de vários fatores como composição e capacidade tamponante do

meio, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura (que determina a solubilidade do CO₂) e atividade metabólica das células (BECKER *et al.*, 1988). A variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólitos produzidos (GRIMA *et al.*, 1999).

O pH ótimo para o desenvolvimento de *Chlorella minutissima* é o pH 7. O pH da água influencia na forma como o CO₂ é encontrado, sendo que esta fonte pode-se apresentar da seguinte forma: H₂CO₃, HCO₃⁻¹ ou CO₃⁻² (RICHMOND, 1990).

2.2.9 Luminosidade nos cultivos

De acordo com Carioca e Arora (1984) a faixa de aproveitamento das radiações luminosas pelos vegetais situa-se entre 400 e 700 nm (radiações fotossinteticamente ativas). Elas correspondem a 50% da radiação solar, que se situa numa faixa de intensidade de 800 a 1.000 W.m⁻².

Kotzabasis *et al.* (1999) cultivaram *Chlorella minutissima* usando câmara de iluminação contínua com 13000 lux fertilizada com 0,25 g.L⁻¹ de meio e diferentes concentrações de metanol (de 0,05 a 5%) como fonte de carbono para otimizar o cultivo desta microalga. A função do metanol como fonte alternativa de carbono para o cultivo de microalgas causou impacto positivo na qualidade de produção de biomassa e no meio ambiente.

2.2.10 Agitação e aeração nos cultivos

A aeração é um fator muito importante para a homogeneização dos nutrientes e para evitar a sedimentação das microalgas. Em cultivos de grande escala é recomendada a injeção de CO₂ para contribuir ao processo de fotossíntese.

A concentração de O₂ nos tanques de cultura representa um bom parâmetro para se controlar a atividade fotossintética das microalgas, assim sendo

quando se aumenta a atividade fotossintética a concentração de O₂ pode aumentar rapidamente, inibindo o processo da fotossíntese, favorecendo a fotoxidação (RICHMOND, 1990) o que pode ocasionar danos na morfologia celular, bem como a morte da cultura em estudo (FAINTUCH, 1989).

A injeção de ar aos cultivos proporciona uma difusão efetiva dos nutrientes, um aporte parcial de CO₂ inorgânico, uma estabilidade do pH, a manutenção das algas em suspensão e o cultivo uniformemente distribuído (COLLA *et al.*, 2002). Estes mesmos autores afirmam que cultivos em volumes de um litro ou menos não necessitam aeração, basta que se realize uma agitação manual diariamente, porém nos cultivos de grande escala é recomendado o início da aeração na fase de indução, que corresponde ao período de até dois dias depois da inoculação.

A agitação, promovida por aeradores, também promove a aeração nos cultivos, além de oxigenarem o meio, provocam a mistura evitando a estratificação térmica, distribuindo as substâncias em suspensão por todo o cultivo e evitando o acúmulo de matéria orgânica no fundo do biorreator (BOYD; MARTINSON, 1984).

A aeração é um processo mecânico, por meio do qual se aumenta o nível de oxigênio dissolvido em um meio de cultivo. Fast e Boyd (1992) afirmam que a aeração mecânica se faz necessárias, principalmente, nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas não são saudáveis (enfermas ou muito velhas), o que origina uma menor produção de oxigênio e um alto risco de morte repentina de toda a biomassa; durante a falta ou carência de luz, pois com pouca radiação (solar ou artificial), diminui substancialmente a produção de oxigênio (inibição da fotossíntese).

2.2.11 Fotobiorreatores para cultivo de microalgas

Existem vários tipos de biorreatores que podem ser utilizados para o cultivo de microalgas: biorreator aberto em forma de tanque (FIGURA 2), biorreator fechado erlenmeyer (FIGURA 3) e biorreator cilíndrico provetas (FIGURA 4).

Estes cultivos podem ser realizados em tanques protegidos por uma estufa: biorreator aberto em forma de tanque pequeno (FIGURA 5) e biorreator aberto em

tanque grande (FIGURA 6). Para estes experimentos foram utilizados os biorreatores fechados erlenmeyers e provetas (FIGURAS 3 e 4).



FIGURA 2- BIORREATOR ABERTO (FURG/RS)



FIGURA 3 - BIORREATOR FECHADO (ERLENMEYERS)

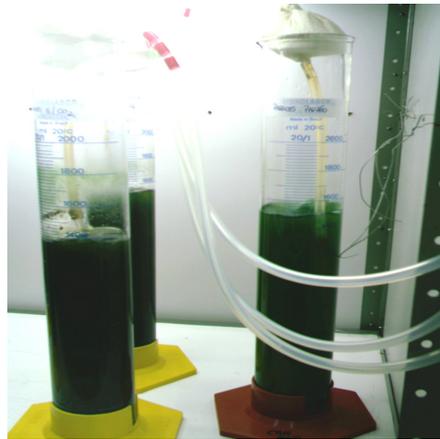


FIGURA 4 – BIORREATOR CILINDRICO (PROVETAS)



FIGURA 5–TANQUES PEQUENOS (FURG/RS)



FIGURA 6–TANQUES GRANDES (FURG/RS)

Os tipos e *design* dos biorreatores para cultivo em grande escala de microalgas representam um compromisso entre os custos do investimento em relação aos retornos esperados e também entre os esforços para o

estabelecimento de condições ótimas para a obtenção máxima de produtividade (COLLA *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos com fotobiorreatores fechados têm sido realizados, porém um dos tipos mais comuns são os biorreatores tubulares. Sato *et al.*, (2005) testaram no cultivo de microalgas biorreatores com forma tubular, cônico helicoidal e acharam uma produtividade de 0.68g/L/dia ou 21.5g/m²/dia de peso seco com iluminação de 12 horas por dia com *Chlorella* sp.

Existem vários tipos de biorreatores que podem ser utilizados para o cultivo de microalgas, porém os experimentos têm sido realizados através da utilização de dois tipos básicos de biorreatores: em tanques abertos e os de sistemas fechados (COLLA *et al.*, 2002). Dentre os biorreatores do tipo aberto (*outdoor*) distinguem-se:

Tanques alongados, também conhecidos como *raceways*, são os mais utilizados atualmente e são construídos em uma única unidade ou em várias unidades operadas em conjunto, sendo que a agitação pode ser provida por pás giratórias ou injeção de ar. São tanques abertos cuja profundidade varia de 15 a 30 cm e que tem a temperatura como principal fator limitante de produção, no caso do cultivo com *Spirulina* sp.

Tanques circulares com pás giratórias no centro foram utilizados para o cultivo de *Chlorella* sp. entre 1960 e 1970 no Japão e Taiwan. São economicamente inviáveis por possuírem uma estrutura reforçada de concreto e alto consumo de energia para a agitação contínua (RICHMOND, 1990). O princípio de ambos os sistemas consiste em diminuir o caminho da luz e aumentar o caminho disponível para cada célula. Apresentam as vantagens de operação em modos contínuos (BOROWITZKA, 1999).

Cultivos de *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. e *Dunaliella* sp., são viáveis em sistemas abertos por crescerem em ambientes altamente seletivos, tornando possível permanecerem relativamente livres de contaminação por outras algas e protozoários. Assim, *Chlorella* sp. cresce bem em meios contendo um meio rico em nutrientes - principalmente nitratos, *Spirulina* sp. requer alto pH e elevadas concentrações de bicarbonato e *Dunaliella salina* cresce em elevada salinidade (COLLA *et al.*, 2002).

Ainda para Colla *et al.* (2002) um dos sistemas abertos onde se consegue altas densidades celulares é o sistema em cascata utilizado para o cultivo de *Chlorella* sp. em Trebon, na República Tcheca. Neste sistema a profundidade do

cultivo é menor do que 1 cm e as densidades celulares chegam a 10 g.L^{-1} , podendo ser mantidas em altas velocidades de crescimento, porém é um sistema considerado caro por apresentar a superfície de vidro (BOROWITZKA, 1999).

Recentemente, alguns cultivos têm sido desenvolvidos em sistemas fechado em painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato. Nesses fotobiorreatores, é possível controlar as condições de cultivo (quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH etc.). Isto implica uma elevada produtividade, viabilizando a produção comercial de uma série de compostos de elevado valor (TREDICI, 2004).

2.2.12 Preparo do meio para cultivo

As condições de cultivo influenciam na composição das algas, sendo importante seu estudo a fim de que sejam obtidos os produtos para os quais o cultivo tem finalidade em quantidades máximas. O crescimento de *Chlorella* sp. é estimulado em meio suplementado e para o preparo e manutenção do inóculo, foi utilizado o meio MBM - Meio Bristol's Modificado (WATANABE, 1960), um dos meios padrão para o cultivo desta *Chlorophyta* (TABELAS 2 - 4).

TABELA 2 - QUANTIDADE (g) DE REAGENTES PARA O PREPARO DO MEIO MBM

ERLENMEYER	COMPONENTE	PARA 1L	PARA 2L	PARA 3L	PARA 5L	PARA 10L
1	KNO ₃	0,25	0,50	0,75	1,25	2,5
2	CaCl ₂	0,01	0,02	0,03	0,05	0,1
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075	0,15	0,225	0,375	0,75
4	K ₂ HPO ₄	0,075	0,15	0,225	0,375	0,75
5	KH ₂ PO ₄	0,175	0,35	0,525	0,875	1,75
6	NaCl	0,025	0,05	0,075	0,125	0,25
7	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02	0,04	0,06	0,1	0,2

FONTE: (WATANABE, 1960)

TABELA 3 – QUANTIDADE (mL) DE ÁGUA PARA CADA ERLLENMEYER PARA O PREPARO DO MEIO MBM

ERLENMEYER	PARA 1L	PARA 2L	PARA 3L	PARA 5L	PARA 10L
1	100	200	200	200	200
2	100	200	200	200	200
3	100	200	200	200	200
4	100	200	200	200	200
5	100	200	200	200	200
6	100	200	200	200	200
7	0	0	0	0	0
8 (H ₂ O p/Erlen 7)	100	200	200	200	200
Grande	300	600	1600	3600	8600

FONTE: (WATANABE, 1960)

TABELA 4 – QUANTIDADE (mL) DA SOLUÇÃO A5 PARA O MEIO MBM

SOLUÇÃO	PARA 500mL	PARA 1L	PARA 3L	PARA 5L	PARA 10L
A5	0,5	1,0	3,0	5,0	10,0

Solução A5: 2,86 g/L de H₃BO₃; 1,81 g/L de MnCl₂.4H₂O; 0,222 g/L de ZnSO₄.7H₂O; 0,079 g/L de CuSO₄.5H₂O; 0,015 g/L de MnO₄.

FONTE: (WATANABE, 1960)

2.2.13 Pigmentos e composição química

Raven *et al.*, (1996) descreve que os cloroplastos das diferentes divisões de algas, contendo pigmentos similares, parecem ter arranjos tilacóides também similares. A ultra-estrutura do cloroplasto e a química dos pigmentos têm sido utilizadas como indicadores da filogenia algácea. Há três tipos de pigmentos fotossintéticos nas algas: clorofilas, carotenóides e biliproteínas (ficobilinas). Existem cinco clorofilas: “a”, “b”, “c”, “d” e “e”. A clorofila “b” é encontrada nas *Euglenophycophyta* e *Chlorophycophyta*; a clorofila “c” é a mais distribuída e está presente nos membros das divisões *Bacillariophycophyta*, *Chrysophycophyta*, *Pyrrophyphyta*, *Cryptophycophyta* e *Phaeophycophyta*. A clorofila “d” parece estar presente apenas nas *Rhodophycophyta*. Enfim, a clorofila “e” é rara, pois foi identificada em apenas dois gêneros da divisão *Xanthophycophyta*.

Há dois tipos de carotenóides: carotenos e xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos lineares insaturados e as xantofilas são seus derivados oxigenados. As ficobilinas são pigmentos hidrossolúveis, ao passo que as clorofilas e os carotenóides são lipossolúveis.

Para Smith (1955) as *Chlorophyta* (algas verdes) possuem pigmentos fotossintéticos localizados em cromatóforos que são verdes ao predomínio das

clorofilas “a” e “b” sobre os carotenos e xantofilas. Há neles diferentes xantofilas que não ocorrem nas outras algas, sendo a luteína a mais abundante. As reservas fotossintéticas são, em geral, constituídas, por amido, cuja formação está intimamente associada a um pequeno órgão do cromatóforo, o pirenóide.

2.2.14 Métodos de quantificação de biomassa

A concentração de pigmentos fotossintetizantes é extremamente importante para se estimar a biomassa de algas, pois representa de 1 a 2% do peso seco. Existem praticamente três métodos para se determinar a concentração de clorofila “a”: espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia. A fluorimetria é mais sensível do que a espectrofotometria e requer um menor volume de amostra. O método de cromatografia é o mais preciso, porém não é recomendado para análises de rotina.

2.3 FOTOSÍNTESE

2.3.1 Princípio

A fotossíntese significa etimologicamente síntese pela luz. Excetuando as formas de energia nuclear, todas as outras formas de energia utilizadas pelo homem moderno provêm do sol. Cozza *et al.*, (1999) afirma que uma das formas mais utilizadas da energia solar é o processo fotossintético, não apenas pela sua natureza, mas pela sua distribuição de forma global. Convertida em energia química ela é armazenada sob a forma de carboidratos (monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos), proteínas, lipídios e até muitas vezes, combustíveis fósseis, fotossintetizados em épocas remotas.

A equação total da fotossíntese descreve uma reação de oxidação-redução onde a H₂O doa elétrons (como hidrogênio) para a redução do CO₂ até o

carboidrato (CH₂O); desta forma a reação global de fotossíntese pode ser assim descrita:



A reação de fotossíntese abrange dois processos, as reações luminosas, que ocorrem na presença de luz e as reações de fixação do carbono, também conhecida como reação no escuro, sendo assim os dois processos são distintos (LEHNINGER *et al.* 1995). Na reação luminosa, a clorofila e outros pigmentos absorvem a energia solar e a conservam na forma química de ATP e NADPH; simultaneamente o O₂ é produzido. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são usados para reduzir o O₂, que ocorre apenas na luz, e a redução do CO₂, que não requer luz, sendo assim os dois processos são distintos.

Raven *et al.*, (1996) cita que as reações de captação da luz ocorrem nas membranas internas, ou tilacóides, onde são encontradas a clorofila e outros pigmentos. Muitos tilacóides têm a forma de discos empilhados e o conjunto destes discos recebe o nome de grana. Os tilacóides de diferentes grana são interconectados pelos tilacóides do estroma. A série de reações nas quais a energia captada da luz é utilizada para a síntese de compostos contendo carboidratos ocorre no estroma, material que envolve os tilacóides.

2.3.2 Importância

Segundo Raven *et al.*(1996) a importância da fotossíntese na economia da natureza não havia sido reconhecida até um período relativamente recente. Cientistas como Aristóteles acreditavam que a vida dos animais era dependente dos alimentos, enquanto que as plantas obtinham seu alimento diretamente do solo.

A fotossíntese pode ser considerada como um dos processos biológicos mais importantes na Terra. Por liberar oxigênio e consumir dióxido de carbono, a fotossíntese transformou o mundo no ambiente habitável que conhecemos hoje. De uma forma direta ou indireta, a fotossíntese supre todas as nossas necessidades

alimentares e nos fornece inúmeras fibras e materiais de construção. Se pudermos entender e controlar o processo fotossintético, nós saberemos como aumentar a produtividade de alimentos, fibras, madeira e combustível, além de aproveitar melhor as áreas cultiváveis.

Os segredos da coleta de energia pelas plantas podem ser adaptados aos sistemas humanos para fornecer modos eficientes de aproveitamento da energia solar. Essas mesmas tecnologias podem auxiliar-nos a criar novos computadores mais rápidos e compactos, e ainda, a desenvolver novos medicamentos. Uma vez que a fotossíntese afeta a composição atmosférica, o seu entendimento é essencial para compreendermos como o ciclo do CO₂ e outros gases, que causam o efeito estufa, afetam o clima global do planeta (RAVEN *et al.*,1996).

2.3.3 Pigmentos e a fotossíntese

A fotossíntese ocorre pela absorção da luz na faixa de 400-700 nm por pigmentos fotossintéticos, quais sejam clorofila, carotenóides e em alguns casos as bilinas. Esta faixa do espectro, que é utilizada pelos vegetais como fonte de energia para as suas atividades metabólicas, é comumente chamada em fisiologia de plantas de Radiação Fotossinteticamente Ativa (PAR, do inglês "*Photosynthetically Active Radiation*"). A Densidade de Fluxo de Fótons (PPFD, do inglês (*Photosynthetic Photon Flux Density*), cuja unidade é $\mu\text{mol de fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, expressa a irradiância nesta faixa do espectro. Entretanto, outras unidades como Candela e Lux também são utilizadas em menor frequência (RAVEN, *et al.*,1996).

De acordo com Raven *et al.*(1996) a energia luminosa só pode ser utilizada depois de absorvida pelos pigmentos. O padrão de absorção da luz por um pigmento é conhecido como espectro de absorção de cada substância. A clorofila é o pigmento que torna as folhas verdes e absorve luz nos comprimentos de onda azul, violeta e também no vermelho, como reflete a luz verde, sua aparência é de cor verde.

Para Lehninger *et al.*(1995), além das clorofilas nas membranas dos tilacóides também são encontrados pigmentos acessórios que absorvem luz como os carotenóides e as ficobilinas. Os carotenóides têm a cor amarela, vermelha ou

púrpura, sendo o mais importante o β -caroteno que é o precursor da vitamina A nos animais e o carotenóide xantofila. E as ficobilinas são a ficoeritrina e a ficocianina.

Os pigmentos fotossintéticos presentes e a sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila “a” (Chl *a*) está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica. As bactérias fotossintetizantes são *desprovidas* de clorofila “a” e possuem em seu lugar a bacterioclorofila como pigmento fotossintético. A Chl “a” é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica, enquanto que os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios. Para Lehninger *et al.*(1995) os principais pigmentos acessórios são Chl “b” (plantas, algas verdes e algumas bactérias), Chl “c” (*Phaeophyta* e diatomáceas), Chl “d” (algas vermelhas), β -caroteno (maioria das plantas e algumas algas), luteína (plantas, algas verdes e vermelhas), violaxantina (plantas, algas verdes e marrons), fucoxantina (diatomáceas e algas marrons), neoxantina (*Chlorophyceae*), ficoeritrina (*Rhodophyceae* e algumas cianobactérias), ficocianina (cianobactérias e algumas *Rhodophyceae*), aloficocianina (cianobactérias e *Rhodophyceae*).

2.4 FIXAÇÃO DE CARBONO

Com relação à forma de utilização do CO₂, podemos distinguir dois tipos básicos de nutrição por microrganismos: autotróficos ou heterotróficos. Os autotróficos obtêm todos os elementos necessários para seu crescimento através de compostos inorgânicos, enquanto que os heterotróficos necessitam de substratos orgânicos sintetizados por outros organismos. Entre os autotróficos existem os fotoautotróficos, os quais obtêm energia para o metabolismo da luz e os heteroautotróficos ou quimioautotróficos, os quais obtêm energia para o metabolismo de compostos inorgânicos ou íons (COLLA *et al.*, 2002).

As algas crescem utilizando como fonte de carbono o CO₂ do ar que contém somente 0,03% de CO₂, muitas vezes sendo necessária à adição de CO₂ ao cultivo. Porém *Chlorella minutissima* pode crescer utilizando-se outras fontes

orgânicas de carbono. Os microrganismos mixotróficos são aqueles que utilizam energia derivada da fotossíntese e da oxidação química, mas requerem CO₂ e carbono orgânico para sustentar o crescimento (BECKER e VENKATARAMAN, 1994).

O crescimento de microalgas está diretamente relacionado com a taxa de fixação de CO₂ e utilização de energia luminosa. A mitigação de CO₂ por microalgas emprega as habilidades fotossintéticas destes organismos e pode ser um dos processos mais eficientes de remoção desse gás, sem a necessidade de mudanças radicais na matriz energética mundial e nas atividades produtivas (HOLLOWAY e FIORE, 2003).

Microalgas de água doce, que tem alta tolerância ao CO₂ foram isoladas e suas características foram investigadas. A linhagem ZY-1 foi identificada como do gênero *Chlorella* sp.. Foi demonstrado máximo crescimento a 10% (v/v) fluxo de ar enriquecido com CO₂ e uma taxa de crescimento ampla em condições físicas controláveis, incluindo concentrações de CO₂ até 70% (v/v), (YUE e CHEN, 2004). Essa linhagem foi cultivada sob contínua iluminação com diferentes concentrações de CO₂. A taxa máxima de crescimento foi encontrada na cultura com 10 e 20% CO₂, mas rápido crescimento e concentração celular foram mantidos com concentrações entre 30% e 50% de CO₂. Apesar da taxa de crescimento ser muito baixa em 70% CO₂, a linhagem ZY-1 continuou crescendo e alcançou 0.766 g.L⁻¹ depois de 6 dias de cultivo o que foi sete vezes mais alto que a massa celular do inóculo. Estes resultados indicaram que a *Chlorella* ZY-1 teve uma excelente tolerância a altas concentrações de CO₂. Os resultados indicaram a viabilidade do ZY-1 para fixar gases de CO₂ (YUE e CHEN, 2004).

Desde a década de 1980 que se percebem mudanças no clima mundial. A partir de estudos comprovou-se que a ação do homem era responsável por essas mudanças através do aumento da emissão de gases que provocam o efeito estufa. Como conseqüência, a temperatura média do planeta subiu a níveis alarmantes, colocando em risco a vida na Terra. Para Sato *et al.* (2005) a fixação de gás carbônico pelo cultivo de microalgas é um dos métodos mais promissores para a redução dos gases do efeito estufa.

O desafio hoje é se promover medidas que reduzem a emissão dos gases nocivos sem com isso prejudicar a capacidade produtiva mundial, onerando ainda mais o setor produtivo, e ainda conseguir promover o desenvolvimento sustentável.

A industrialização e o crescimento econômico, tidos durante muito tempo como pré-requisitos para uma melhoria na qualidade de vida das pessoas, passaram a ser responsabilizadas pelas agressões ao meio ambiente e pela alteração da concentração de Gases de Efeito Estufa (GEE). Esta alteração poderá provocar um aumento de temperatura média do planeta, com conseqüências desastrosas e que ameaçam a manutenção da vida na Terra. Para tratar do problema, foram criadas conferências para estudar e discutir a questão. Durante a Conferência das Partes realizada em Kyoto - 1997 foi definido um acordo onde se estabeleceram metas de redução de emissão de GEE para os países industrializados e alguns países em transição para a economia de mercado, além da criação de critérios e diretrizes para utilização dos mecanismos de mercado.

Este acordo foi chamado de Protocolo de Kyoto. Através de uma proposta brasileira, o Protocolo estabeleceu o Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), que diz que cada tonelada de CO₂ deixado de ser emitido ou retirado da atmosfera por um país em desenvolvimento, poderá ser negociada no mercado mundial através de Certificados de Emissões Reduzidos (CERs).

Para o Brasil, este mecanismo trará a oportunidade de receber recursos que financiem projetos que promovem o desenvolvimento sustentável, gerando riquezas e melhorias na qualidade de vida, em troca dos CERs que os países industrializados necessitam para cumprir suas metas de redução e/ou remoção de GEE.

As microalgas representam uma das poucas tecnologias para captura e utilização de CO₂. A fixação de CO₂ por microalgas emprega as habilidades fotossintéticas dos organismos, e pode ser um dos mais eficientes processos de remoção de CO₂. Para economia é mais desejável coletar CO₂ de fontes abundantes do que da atmosfera, onde a concentração é da ordem de 0,035% (SAKAI *et al.*, 1995).

2.5 ASPECTOS LEGAIS RESOLUÇÃO CONAMA 357/05

Um dos sérios problemas ambientais da Terra como um todo é a poluição dos recursos de água doce, principalmente se considerados os pequenos cursos,

onde ocorrem os despejos dos resíduos líquidos de indústrias que utilizam raízes de mandioca como matéria-prima (FIORETTO, 1994).

A produção nacional anual de amidos de mandioca elevou-se de 170.000 toneladas em 1.990 para 546.500 toneladas em 2.005 (ABAM, 2007). Considerando-se que uma tonelada de amido produzida gera aproximadamente 6,2 m³ de águas residuárias (CEREDA, 2001), nesse sentido a dimensão da problemática fica ampliada.

Para o enquadramento dos valores obtido para as análises de DBO e DQO, a seguintes normas foram consideradas:

A resolução da CONAMA 357/05, através do Art. 1º, dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. No seu capítulo I, art VII – que se refere à carga poluidora: diz que a quantidade de determinado poluente transportado ou lançado em um corpo de água receptor, expressa em unidade de massa por tempo e o art. VI - aquicultura: o cultivo ou a criação de organismos cujo ciclo de vida, em condições naturais, ocorre total ou parcialmente em meio aquático.

De acordo com o Ministério da Saúde (2001), não existe padrão para DQO. Na prática, as empresas de tratamento de água consideram como valor padrão de DQO o dobro do valor da DBO, que é 10 mg.L⁻¹.

Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, considera-se a manupueira enquadrada na classe 2, que determina como limite máximo de DBO o valor de 5 mg.L⁻¹ (CONAMA, 2005). Este valor poderá ser ultrapassado no caso de efluente de sistemas de tratamento de águas residuárias que reduza a carga poluidora em termos de DBO em 5 dias, o teste deve ser realizado à temperatura de 20°C do despejo em no mínimo 80%. Caso pretenda-se lançar o efluente em corpo receptor, o sistema deve ser planejado de forma que se atenda a Legislação Ambiental, cuja exigência é de que o efluente atinja o padrão de lançamento (DBO de 60 mg.L⁻¹) ou que o sistema tenha eficiência de 85% na remoção de DBO e que o lançamento do efluente tratado não venha a alterar a classe de enquadramento dos cursos d'água.

2.6 CULTURA DA MANDIOCA

2.6.1 Características gerais

A mandioca pertence à família das *Euphorbiaceae* e tem importância econômica para os países tropicais. Segundo Branco e Hess (1975) existem dois grandes grupos de mandioca, o grupo da mandioca doce (aipim ou macaxeira), de uso comum doméstico, e o grupo da mandioca brava que pode conter uma quantidade acima de 1.500 ppm de compostos cianogênicos, preferida para a industrialização em função da resistência a pragas. A manípueira de aspecto “leitoso” tem considerável quantidade de amido, proteínas, glucose, restos de célula e ácidos cianídricos e objeto deste estudo para o cultivo de microalgas. As inovações introduzidas pelas descobertas tecnológicas estão permitindo, a cada dia, a evolução das possibilidades de uso da mandioca, a partir da extração do seu amido, do qual se origina uma série infindável de subprodutos, de aplicações diversas nas indústrias.

De acordo com dados da SEAB/DERAL (Secretaria de Agricultura e do Abastecimento/Departamento de Economia Rural) citados na TABELA 5, o Estado do Paraná ocupou o segundo lugar na produção de raízes no ano de 2007.

TABELA 5 – EVOLUÇÃO DA ÁREA COLHIDA, PRODUÇÃO, RENDIMENTO, PARTICIPAÇÃO E COLOCAÇÃO PARANÁ/BRASIL ENTRE 2000 – 2007 (MANDIOCA).

ANOS	Brasil			Paraná			Comparativo	
	Área (há)	Produção (t)	Rendimento (Kg/ha)	Área (ha)	Produção (t)	Rendimento (kg/ha)	% PR/BR	Colocação PR/BR
2000	1.708.875	23.040.670	13.483	182.850	3.779.827	20.672	16,41	2º
2001	1.667.183	22.577.142	13.542	172.815	3.614.859	20.918	16,01	2º
2002	1.675.274	23.065.577	13.768	142.892	3.463.968	24.242	15,02	2º
2003	1.633.568	21.961.082	13.444	108.097	2.476.346	22.909	11,28	2º
2004	1.754.875	23.926.553	13.634	151.032	2.975.527	19.701	12,44	2º
2005	1.901.535	25.872.015	13.606	166.935	3.347.383	20.052	12,94	3º
2006	1.896.509	26.639.013	14.046	169.705	3.789.166	22.328	14,22	3º
2007	1.894.458	26.451.200	14.010	150.617	3.377.008	22.421	12,72	2º

FONTE: SEAB/DERAL (DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL)

Conforme demonstrado na TABELA 6, a região de Paranavaí é a principal produtora de mandioca do Estado. Os núcleos de: Paranavaí com 734.420 (t); Umuarama, 683.843 (t) e Toledo, 495.025 (t) contribuíram significativamente com a produção de mandioca do Estado do Paraná. A cultura tem grande importância social como geradora de trabalho nas regiões: para cada hectare de mandioca necessita-se de 32 dias de trabalho/homem.

TABELA 6 – ÁREA E PRODUÇÃO DE MANDIOCA POR REGIÃO ADMINISTRATIVA DA SEAB/PR - (SAFRA 2007).

NUCLEOS REGIONAIS	ÁREA (HA)	PRODUÇÃO (T)
Apucarana	226	3.714
Campo Mourão	13.705	277.065
Cascavel	15.765	425.500
Cornélio Procópio	480	10.305
Curitiba	3.983	60.693
Francisco Beltrão	10.860	248.990
Guarapuava	1.630	33.625
Irati	900	16.056
Ivaiporã	2.200	48.510
Jacarezinho	1.430	31.420
Laranjeiras do Sul	870	16.265
Londrina	791	16.054
Maringá	5.824	122.091
Paranaguá	1.225	18.491
Paranavaí	30.915	734.420
Pato Branco	1.764	35.535
Ponta Grossa	928	12.945
Toledo	18.945	495.025
Umuarama	33.152	683.843
União da Vitória	5.024	86.462
Total	150.617	3.377.008

FONTE: SEAB/DERAL (DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL)

Em relação a outras culturas, o cultivo de mandioca apresenta algumas vantagens como: boa rentabilidade, menor risco de perdas por adversidades climáticas e a possibilidade de colheita na época em que o produtor considerar mais conveniente. O potencial de negócios no setor industrial e na produção de raízes apresenta várias possibilidades de agregação de valor aos produtos derivados da mandioca que são utilizados na indústria de carnes, têxtil, papel, química, massas alimentícias, medicamentos, embalagens biodegradáveis etc.

A mandioca contém cerca de 65% de água nas raízes, com aproximadamente 35% de fécula (EFING, 1991). Nas fábricas de farinha de mandioca, a prensagem da massa ralada produz cerca de 300 litros de líquido residual por tonelada de raiz e, nas fecularias, este valor aumenta para 600 litros

de um efluente mais diluído, devido à adição de água durante sua produção. Durante a prensagem das raízes de mandioca ralada gera-se um líquido branco chamado de manipueira

Segundo a ABAM - Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca - a cultura das tuberosas, entre as quais se destaca a mandioca, é feita em nível mundial nos países que se situam entre 30º de latitude Norte e Sul, em relação à linha do equador. Essa faixa engloba boa parte da América Latina, Caribe, África e Ásia. O Brasil tem posição destacada, não só pela expressiva produção agrícola, mas principalmente pela extensa área territorial coberta pelas culturas. Pela ampla área abrangida pelos cultivos, seu uso se desdobra em formas muito diversas de tecnologia, processos e, por conseguinte, de produtos, adaptados à realidade regional e ao consumidor final. A importância das culturas de tuberosas é socialmente inquestionável, mas na área de valorização econômica muitas vezes são marginalizadas, condenadas por suas virtudes de serem rústicas pouco dependentes de insumos e resistentes a fatores climáticos adversos.

Para Cereda (2002) a mandioca é um cultivo que contribui para a subsistência da África, econômica da Tailândia e China, onde pouco é utilizado para alimentação humana, e de valorização cultural no Brasil e alguns países da América do Sul. A mandioca *Manihot esculenta* é conhecida no idioma espanhol como Yuca, no idioma Francês como Manioc e no Inglês como Cassava. Por ser eminentemente calórica e rústica a mandioca é considerado um alimento de subsistência, capaz de proporcionar energia para populações carentes. Apresenta uma composição de valor calórico com 142 Kcal/100g; 33 mg/100g de glicídios; 2 mg/100g de protídios e 0,2 mg/100g de lipídios. Dentre os valores de vitaminas apresenta 2,0 µg/100g de retinol; 300 µg/100g de tiamina; 72 µg/100g de riboflavina; 2,2 mg/100g de niacina e 49 mg/100g de ácido ascórbico. Este mesmo autor cita a composição dos principais minerais encontrados em raízes e tubérculos cultivados no Brasil, sendo que a mandioca apresenta 43 mg/100g de cálcio; 140 mg/100g de fósforo; 0,50 mg/100g de ferro; 40,6 mg/100g de sódio e 343,7 mg/100g de potássio.

Para Cardoso (2003) o cultivo da mandioca no Brasil está associado ao seu descobrimento, pois desde esta época se planta mandioca em todo o território brasileiro. O produto tem grande importância econômica devido ao seu grande aproveitamento industrial e também para a alimentação humana e animal. A

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, através da mandioca e fruticultura tropical esta divulgando a tecnologia que orienta a adição de fécula de mandioca (amido, polvilho ou goma) à farinha de trigo para a fabricação do tradicional pão francês. Este trabalho é resultado da parceria com outros institutos de pesquisa, conduzidos em planta piloto, plantas comerciais e indústrias de panificação, que indicam que a substituição da farinha de trigo por fécula de mandioca, na proporção de 10 a 15%, dependendo da qualidade da farinha de trigo usado, praticamente não afeta as características de cor, sabor e textura da casca e miolo do pão.

Para Cereda (2002) várias opções podem ser encontradas nos mercados das capitais para aumentar o consumo de mandioca: minimamente processadas, congeladas ou refrigeradas, pré-cozidas e congeladas e mais recentemente, “*french fries*” e “*chippys*”.

Segundo Takahashi e Gonçalo (2005) aproximadamente 500 milhões de pessoas no mundo utilizam a mandioca ou derivados dela como alimento, sendo que a mesma serve de matéria-prima para uma série de produtos que podem ser processados ou quimicamente modificados.

Da raiz da mandioca se produz a farinha de mesa e a fécula também conhecida como amido. Após sofrer algumas transformações a fécula pode ser usada na indústria de alimentos, papel, farmacêutica e indústrias químicas.

Efing (1991) relata que o potencial de uma fecularia de médio porte, que processa uma tonelada diária de raízes, equivale a um índice de poluição de 150 a 250 habitantes/dia. Isso em termos de DBO, equivale a 1.500 mg/L para a água proveniente do lavador de raízes e 30.000 mg/L para o líquido resultante da prensagem da massa ralada. Se for comparar com a vinhaça alcoólica, esta gera uma DBO de 15.000 mg/L.

A busca de soluções para a poluição provocada pela manipueira tem sido fonte de diversos estudos. Gravata (1946) sugeriu a aplicação deste resíduo na fertirrigação do cultivo desta cultura.

2.6.2 Produção de amido de mandioca

Dados da ABAM (Associação Brasileira dos Produtos de Amido de Mandioca) para produção de amido entre 1990 e 2008 está representado na FIGURA 7 e a produção Brasileira por Estado referente ao ano 2008 está representado na FIGURA 8 onde podemos observar que o Paraná aparece em 1º lugar em produção de amido.

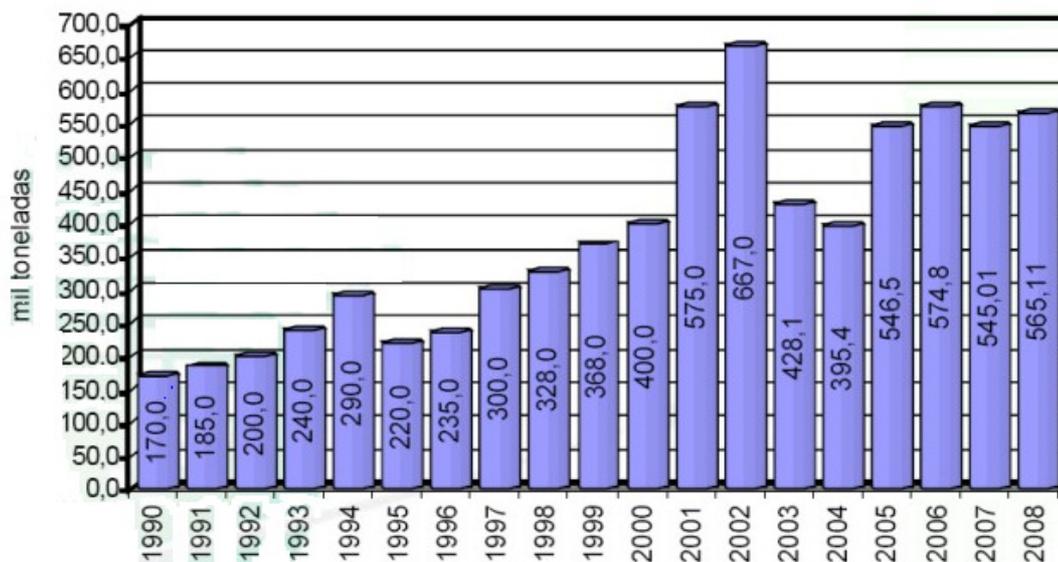


FIGURA 7: EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO DE FÉCULA
FONTE: Cepea/ ABAM

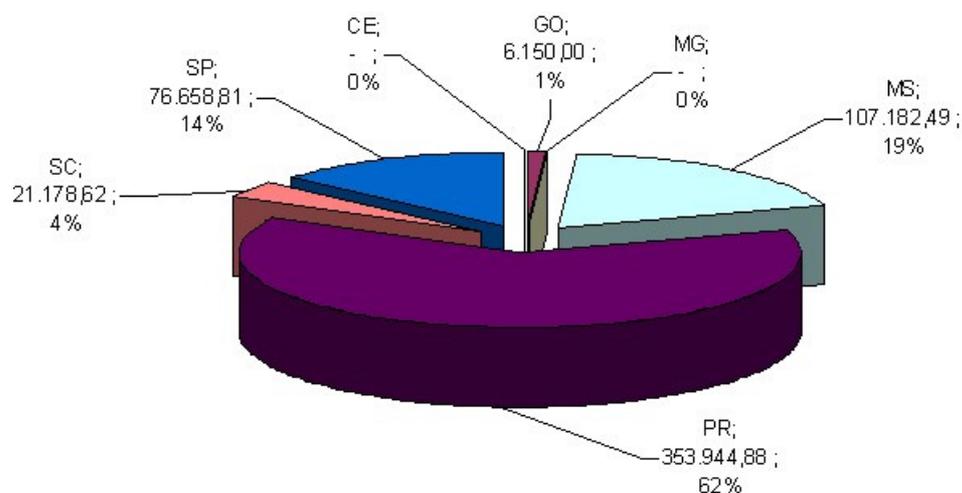


FIGURA 8: PRODUÇÃO BRASILEIRA DE AMIDO POR ESTADO – ANO 2008.
FONTE: Cepea/ ABAM

2.6.2.1 Processo para obtenção do amido de mandioca

A recepção da matéria prima inicia-se na plataforma de descarga, após a recepção e pesagem da mandioca. O próximo passo é a pré limpeza, sendo que equipamentos especializados possibilitam a lavagem e descascamento das raízes simultaneamente.

A trituração é feita por processo de marteladas, as raízes são picadas em pedaços de até 3 cm de diâmetro, permitindo uma alimentação uniforme e desintegração mais eficiente. A mandioca triturada é conduzida por elevador helicoidal à um depósito especial, que possibilita a distribuição na quantidade que for programada para as etapas seguintes ao processamento do fabrico do amido.

A desintegração é feita através do contato entre as raízes trituradas e um cilindro rotativo que funciona em alta velocidade periférica, ralando a mandioca, rompendo as células e permitindo desintegração total e homogeneidade de dimensões, com conseqüente liberação do amido. O material ralado (massa) é bombeado para as peneiras cônicas rotativas, constituindo-se numa mistura mandioca-água.

A extração é efetuada em peneiras cônicas rotativas. Estes extratos são montados em baterias de três ou quatro, com a finalidade de aumentar o rendimento. A água entra em contracorrente (esguichos) para melhor separar o rendimento. O amido líquido, resultante da extração, segue para a etapa seguinte, que é a purificação. A polpa resultante ou massa é canalizada para a rede de tratamento de efluentes da fábrica, ou se optar, poderá seguir processo de secagem para o fabrico de rações.

A peneiração é feita para eliminar a polpa fina, servindo como melhorador na qualidade do produto. Em seguida, a mistura de amido com água, segue para a concentração, em centrifuga de pratos bicos, cuja finalidade é concentrar o amido até 20 a 22 Bé. A água separada do amido é canalizada para a rede de tratamento de efluentes da fábrica. O amido concentrado segue por gravidade e/ou bombeamento a um tanque especial de homogeneização cujo equipamento dispõe de um mecanismo que permite a mistura constante (mexedor) do produto concentrado, para evitar a decantação.

Todos esses passos e os demais são ilustrados conforme a FIGURA 9.

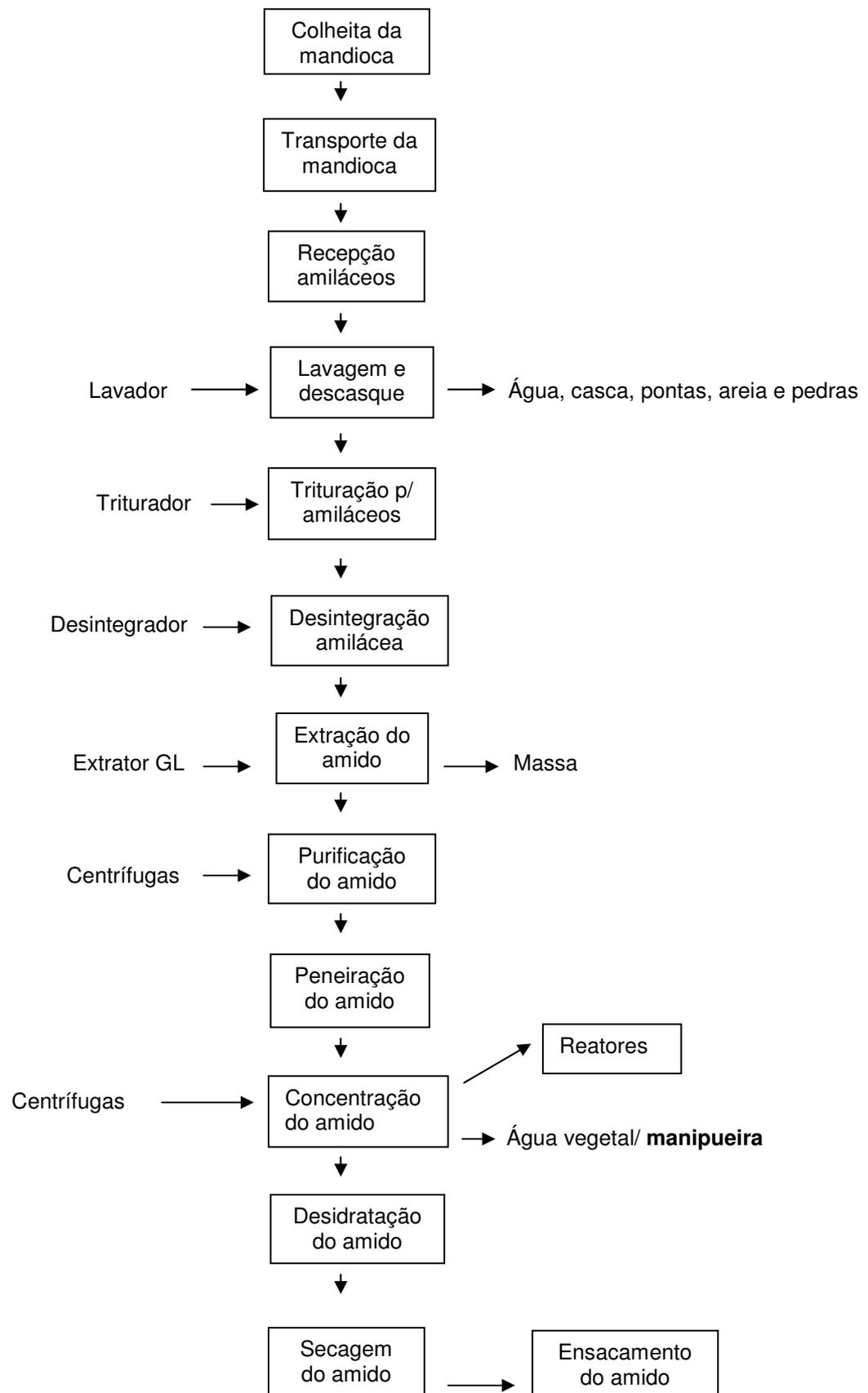


FIGURA 9: Processo para obtenção do amido de mandioca

2.6.3 Usos da manipueira

A manipueira é um resíduo líquido resultante do processamento da mandioca para a fabricação de farinha e fécula, os quais podem atingir vazões da ordem de 500 litros de água residual por tonelada de raiz processada (FIORETTO 2001). Esta água conhecida como manipueira é altamente nociva ao meio ambiente e representa segundo Wosiacki (1995), citado por Fioretto (2001), cerca de 60% do peso da matéria processada.

Para Fioretto (2001) um dos sérios problemas ambientais como um todo é a poluição dos recursos hídricos de água doce, principalmente se considerados os pequenos cursos d' água onde acontecem os despejos dos resíduos de indústrias que utilizam raízes de mandioca como matéria-prima. A utilização da manipueira na fertilidade do solo foi estudada e do ponto de vista agrícola, a manipueira é um resíduo não esgotado e quando aplicado ao solo observa-se um acréscimo nas concentrações de elementos no solo, porém o acompanhamento da aplicação no solo faz-se necessário devido a predominância de íon potássio que implica diretamente no desequilíbrio dos cátions básicos do solo (FIORETTO, 2001).

De acordo com dados do IPARDES de 2004 no Paraná existem 114 estabelecimentos que produzem derivados da mandioca, desses, 43 fabricam féculas, contribuindo com 70% da fécula produzida no Brasil. Mesmo a fécula sendo o alvo comercial da produção o processamento origina subprodutos como a casca e a massa de fecularia que podem ser reutilizados. Os mesmos autores ainda citam que as indústrias produzem cerca de 6.000 litros de água para a lavagem de uma tonelada de raízes para a extração da fécula.

Barros *et al.*, (2008) desenvolveram um processo para aproveitar a água derivada da prensagem de mandioca na produção de biossurfactantes (subproduto metabólico de bactérias, fungos e leveduras, que permitem o refino de petróleo).

Leonel e Cereda (1995) viabilizaram o uso da manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Foi estudado o armazenamento do resíduo a temperatura ambiente por 72 horas, e realizada a caracterização físico-química da manipueira e dos meios elaborados com esse substrato. Verificou-se que a produção de ácido cítrico não diferiu quanto ao meio.

Não foi possível o crescimento do microorganismo em estudo em concentração de cianeto acima de 70 mg/L.

Ponte (1992) utilizou a manipueira como defensivo agrícola testado como nematicida e, posteriormente, como inseticida, revelando extraordinária eficiência e notável economicidade; e sem os riscos de toxidez dos produtos comerciais.

2.6.4 Composição da manipueira

Segundo Fioretto (2001) a composição química da manipueira depende das condições de clima e do solo, sendo que uma tonelada de raízes de mandioca pode conter em média 600 litros de água (60% de umidade) nas suas células. Durante os processos de fabricação de farinha, 20 a 30% dessa água é eliminada, tendo um aspecto leitoso e se não houver a decantação ou uso de tecidos na prensa, podem conter de 5% a 7% de fécula, proteínas, glicose, restos de células, ácido cianídrico, substâncias orgânicas e nutrientes minerais essenciais

A TABELA 7 apresenta a composição química da manipueira de diferentes origens, onde se observa a predominância de fósforo e potássio entre os minerais desse resíduo.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA MANIPUEIRA, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES

ELEMENTO	AUTOR 1	AUTOR 2	AUTOR 3	AUTOR 4	MÉDIA
N (%)	0,15	0,15	0,21	0,09	0,15
P (ppm)	219,00	250,00	354,0	200,20	255,80
K (meq/l)	43,00	56,4	64,48	41,00	51,22
Ca (meq/l)	11,25	13,50	12,00	13,75	12,62
Mg (meq/l)	30,50	45,00	36,00	30,00	35,38
S (ppm)	-	-	210,00	64,00(***)	137,00
Fe (ppm)	22,00	-	-	11,20	16,60
Zn (ppm)	2,40	-	-	5,00	3,70
Mn (ppm)	1,50	-	-	9,80	5,65
Cu (ppm)	1,00	-	-	0,81	0,90
Na (ppm)	-	-	-	14,00	14,00
M. O (Kg/m ³) (**)	-	30,00	33,54	57,90	40,50
ph	3,27(*)	4,20	3,90	4,00	4,03

(*) Acidez titulável (%); (**). Teores expressos no total de resíduo (parte líquida + parte sólida); (***) sulfetos totais; - Sem informações

FONTE: (FIORETTO, 2001)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INÍCIO DOS EXPERIMENTOS

Todo o trabalho experimental ocorreu através de uma parceria UFPR e FURG/RS, sendo que o início dos experimentos ocorreu nas instalações do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG/RS, e o desenvolvimento na divisão de Engenharia de Bioprocessos da UFPR, Laboratório de Engenharia de microlagas (LEM).

3.2 MICROORGANISMOS E MEIO DE CULTIVO

A cepa de *Chlorella minutissima* utilizada neste estudo foi isolada da lagoa de estabilização da estação de tratamento de efluentes industriais da Usina Termelétrica Presidente Médici, em Candiota-RS e foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade de Rio Grande (FURG). O meio de cultura MBM, exceto o substrato orgânico (manipueira), foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121°C.

3.3 PREPARAÇÃO DA VIDRARIA

Todo o material utilizado para o cultivo da *Chlorella minutissima* foi lavado previamente com água e sabão, em seguida enxaguado com água destilada, seco em estufa e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Os frascos utilizados nos cultivos foram vedados com algodão, recobertos com papel para a esterilização e novamente levados à estufa para secagem completa. Foram utilizados ainda mangueiras de silicone, algodão, barbante, elástico de dinheiro, gaze, pipeta, papel alumínio e papel Kraft (FIGURA 10).



FIGURA 10 - PREPARO DE ERLENMEYERS

3.4 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo e manutenção do inóculo, utilizou-se a microalga *Chlorella minutissima* LEB 108 (COSTA *et al.*, 2006) em meio MBM - Meio Bristol's Modificado (WATANABE, 1960) padrão para o cultivo desta *Chlorophyta*.

Após a esterilização dos frascos já preparados iniciou-se o inóculo com a *Chlorella minutissima*. Esta microalga depois de cultivada no meio MBM foi inoculada em diferentes concentrações de manipueira.

Para a manutenção e propagação do inóculo utilizaram-se cultivos em meio MBM na fase exponencial de crescimento, com uma concentração inicial de microalga de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

Após os resultados preliminares com o primeiro experimento, adaptou-se a microalga em um meio contendo 20% deste resíduo durante um cultivo de 15 dias o qual foi utilizado como inóculo para o experimento seguinte. Adotaram-se nos novos experimentos diferentes concentrações de manipueira.

A quantidade do volume de inóculo utilizado para o experimento I foi estabelecida usando-se a seguinte fórmula: $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ e para o cálculo da concentração de biomassa foi utilizada a equação da curva padrão apresentada na FIGURA 14.

A manutenção do inóculo foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, 1 L, 2 L e 6 L sucessivamente e providos de aeração através de bombas de ar,

mantidos em estantes de fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro a uma temperatura de 30°C.

3.5 MANIPUEIRA COMO MEIO DE CULTIVO

A manipueira empregada no presente trabalho foi gentilmente cedida pela empresa Podium Alimentos – Comercial Agrícola Anhumai Ltda de Paranavaí e armazenada em frascos de plástico de 2,5 L, estocados em *freezer* (-10°C), para uma melhor conservação de sua composição química.

A composição físico-química da manipueira é apresentada na TABELA 8, sendo comparada ao meio padrão MBM (WATANABE, 1960). A avaliação química do resíduo foi conduzida em função das análises já realizadas no laboratório da própria empresa e pelo CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos), e segundo características prévias levantadas.

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO DO MEIO MBM E MANIPUEIRA

DESCRIÇÃO	UNIDADE	MBM (média)	MANIPUEIRA
DBO	mg O ₂ /l	nc	2.400
DQO	mg O ₂ /l	nc	6.180
pH		6,5 – 7,0	4,4
Fonte de Carbono	MG/l	nc	Não realizada
Fonte de Nitrogênio	MG/l	0,25	Nitrogênio Total 154,15 Nitrogênio Kjeldahl 143,08 Nitrato 11,07 Nitrito < 0,01
Fonte de Fósforo	MG/l	0,25	19,26
Fonte de Potássio	MG/l	0,25	1.463,39
Fonte de Sulfato	MG/l	0,396	Nc
Fonte de Cálcio	MG/l	0,01	Nc
Fonte de Magnésio	MG/l	0,075	Nc
Fonte de Manganês	MG/l	1,81	Nc
Fonte de Ferro	MG/l	0,02	Nc
Fonte de Sódio	MG/l	0,025	Nc
Fonte de Cloreto	MG/l	1,845	Nc
Matéria Orgânica	MG/l	nc	Nc
Cianeto (quantitativo)	MG/l	nc	61,91
Fonte de Zinco	MG/l	0,222	3,56

FONTE: Valores do meio MBM baseados na tabela apresentada por WATANABE (1960) e análise físico-química da manipueira cedida pela empresa Podium Alimentos – Comercial Agrícola Anhumai Ltda. de Paranavaí e também realizada pela CEPA/UFPR. “nc”- não calculado.

3.5.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL EM MEIO DE CULTIVO A BASE DE MANIPUEIRA

Para os experimentos II e III foram utilizados fotobiorreatores do tipo Erlenmeyer (FBRE) de 2 L (FIGURA 11) com volume útil de 1,5 L e para os experimentos I e IV foram utilizados fotobiorreatores do tipo tubulares (FBRT) de 2 L (FIGURA 12 a - início do cultivo e FIGURA 12 b - final do cultivo) com volume útil de 1,65 L.



FIGURA 11 – FOTO DO CULTIVO ALGAL EM FOTOBIORREATOR ERLENMEYER.



FIGURA 12 A – FOTOBIORREATOR TUBULAR (INÍCIO DO CULTIVO)



FIGURA 12 B – FOTOBIORREATOR TUBULAR (FINAL DO CULTIVO)

3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para manutenção dos inóculos e cultivos foram utilizados os meios MC - Meio para *Chlorella* e MBM (WATANABE, 1960) para *Chlorella minutissima*, sendo que o segundo foi usado nos ensaios posteriores, por ter apresentado melhor desempenho neste estudo.

As amostras foram mantidas a temperatura entre 27°C e 33°C em estufa termostatizada com o auxílio de aquecedor doméstico para os dias mais frios. Os volumes das culturas foram mantidos constantes pela reposição diária da água perdida por evaporação. A evaporação está intimamente ligada à luminosidade e à temperatura ambiente, assim como à umidade relativa do ar e a velocidade de aeração do cultivo. Baixa umidade relativa e alta velocidade de aeração aumentam a evaporação.

3.6.1 Manutenção dos cultivos

Diariamente foram retiradas amostras, a fim de controlar o pH dos meios dos cultivos nos experimentos iniciais. Água esterilizada era repostada aos cultivos de forma a repor a H₂O evaporada.

No dia 16/04/2007 iniciou-se o estudo e também feita a leitura inicial de pH. O pH foi corrigido com NaOH a 10% somente nos experimentos iniciais até a adaptação da microalga em estudo.

Os experimentos foram conduzidos em estantes de fotoperíodo, conforme FIGURA 13 com temperatura variando entre 27°C-33°C, iluminância de aproximadamente 2500 Lux em fotoperíodo de 12 horas claro / 12 horas escuro.

Uma vez que a microalga em estudo foi tirada do seu habitat natural e submetida a uma condição de estresse (cultivo), houve a necessidade de uma aclimação às condições em laboratório.



FIGURA 13 – ESTANTE COM FOTOPERÍODO PARA CULTIVO ALGAL

3.7 ACLIMATAÇÃO PRÉVIA

Antes do início dos experimentos, a partir dos tubos de ensaios de cultivos estoque, foram desenvolvidos cultivos em frasco Erlenmeyer de 500 mL e posteriormente 1 L, 2 L e 6 L. A aclimação foi desenvolvida durante 15 dias, utilizando uma mistura de 20% de manipueira e 80% de meio MBM; permitindo assim que as microalgas estivessem adaptadas quando então foram empregadas como inóculo.

3.8 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Para a avaliação do crescimento celular foi determinada a concentração celular máxima, velocidade específica máxima de crescimento e produtividade máxima (ANEXO - TABELAS 19 - 46). A velocidade específica é definida como a variação da quantidade de células formadas na unidade de tempo em relação à

própria quantidade de células e é representada pela seguinte equação: $\mu_x = (1/X) \cdot \Delta X/\Delta t$.

A produtividade é o quociente da produção pelo tempo, dando idéia de quantidade de biomassa produzida em um intervalo de tempo. A produtividade pode ser determinada pela seguinte equação: $P_x = \Delta X/\Delta t$.

3.8.1 Determinação da concentração celular

Inicialmente diferentes concentrações de manipueira (20%, 40%, 60%, 80% e 100%) foram adotadas objetivando verificar em qual destas o crescimento algal teria melhor resultado como alternativa para um eventual tratamento e destinação deste resíduo e também como fonte de matéria orgânica para o crescimento da *Chlorella*.

Para este estudo as amostras foram medidas em espectrofotômetro, sendo que a emissão de luz foi medida em comprimento de onda $\lambda = 670$ nm, valor este recomendado para ler a cor verde, contra branco constituído pelo meio estéril, sem inóculo.

As leituras dos valores de absorbância foram efetuadas em todas as amostras, sem qualquer preservação, imediatamente após a retirada de uma alíquota de cada amostra e transferência desta para a cubeta do espectrofotômetro. O equipamento foi calibrado com o “branco” representado pelo próprio meio de cultivo, nas diferentes condições propostas para a diluição de manipueira, sem o inóculo algáceo.

A espécie cultivada e sua produtividade, velocidade específica de crescimento e biomassa nas diferentes condições propostas foram determinadas e comparadas

3.8.2 Curva padrão de crescimento para *Chlorella minutíssima*

Para este estudo foram feitas diluições sucessivas de um volume fixo de massa celular da microalga *Chlorella minutissima* LEB 108 (COSTA *et al.*, 2006) em fase exponencial, concomitantemente à leitura em espectrofotômetro a 670 nm (COSTA *et al.*, 2002).

Foi traçada a curva-padrão absorbância x biomassa (g.L^{-1}), (FIGURA 14) através da qual, com posterior regressão linear, obteve-se a seguinte equação: $y = (0,4283x - 0,0181)$ e $R^2 = 0,9459$ para a *Chlorella minutissima* em meio MBM.

Os resultados mostram uma positiva relação linear entre o peso seco e a absorbância, apresentando um coeficiente de correlação (R^2). Sendo assim, esta curva foi utilizada de modo a fornecer inóculo na concentração definida para o início dos experimentos.

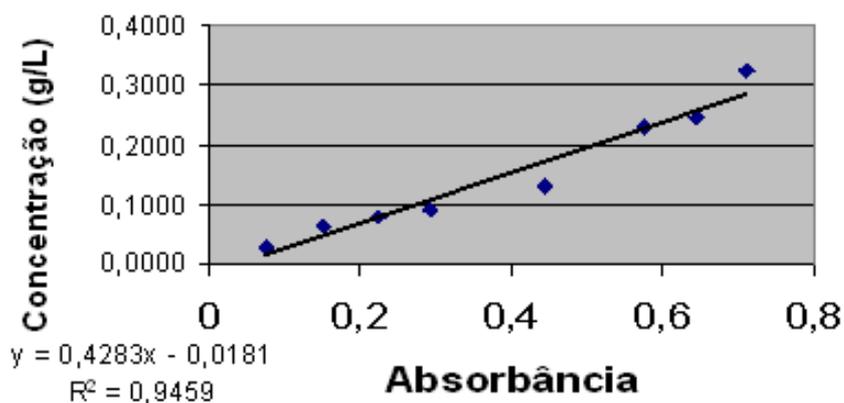


FIGURA 14 – CURVA PADRÃO DETERMINADA PARA *Chlorella minutissima* LEB 108 CULTIVADA EM MEIO MBM (Meio Bristol's Modificado)

3.9 DETERMINAÇÃO DO pH

A determinação do pH das culturas foi realizada através de leitura direta na amostra em pHmetro digital (da marca Hanna, HI9321) e registrada a cada 24 horas. Neste trabalho foi observada a variação do pH como forma de identificação do crescimento e aclimação da microalga aos meio propostos.

3.9.1 CORREÇÃO DO pH

Nos experimentos iniciais (I e II) foram realizadas análises diárias de pH e durante todos os experimentos (I, II, III, IV) a leitura do crescimento algal foi realizado através de espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 670 nm.

O pH da manipueira é de aproximadamente 4,4 dependendo da origem do resíduo. Para este estudo, o pH da manipueira nos experimentos I e II foram corrigidos para 7 com NaOH a 10%, ideal para cultivo de *Chlorella minutissima*

Para os experimentos III e IV, já adaptados em manipueira, não houve a correção de pH a fim de analisar a resistência dessa microalga ao meio utilizado.

3.10 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E ILUMINÂNCIA

Todos os dias foram registrados as temperaturas máximas e mínimas do ar, com um termômetro de mercúrio e a iluminância através de um luxímetro digital (Minipa MLM 101), sendo mantida em 2500 Lux.

3.11 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS TOTAIS

A composição bioquímica está intimamente ligada à qualidade nutritiva das microalgas, sendo os lipídios componentes de fundamental importância (RENAUD *et al.*, 2002). As microalgas são citadas como produtoras de ácidos graxos poliinsaturados em sua fração lipídica, com 1 a 40% de lipídios e em determinadas condições de cultivo, podendo alcançar 85% (COSTA *et al.*, 2006). Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), porém modificada. A FIGURA 15 mostra os lipídios extraídos por este método.

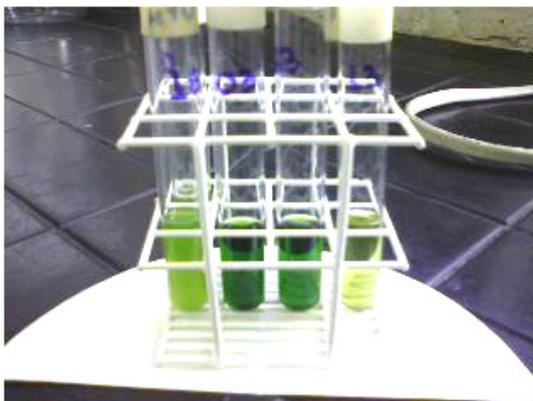


FIGURA 15 – LÍPIDIOS EXTRAÍDOS PELO MÉTODO BLIGH E DYER (1959)

METODOLOGIA DE BLIGH e DYER (1959) - (modificada)

1. Pesar 0,5 g de amostra;
2. Adicionar 2 mL de clorofórmio, 4 mL de metanol e 1,6 mL de sulfato de sódio 1,5%;
3. Agitar em shaker por 30 minutos;
4. Adicionar 2 mL de clorofórmio e 2 mL de sulfato de sódio 1,5%;
5. Agitar em shaker 2 minutos;
6. Separar as camadas por decantação ou centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos;
7. Pipetar a camada superior para um tubo de ensaio;
8. Adicionar 1 mL de sulfato de sódio 1,5%;
9. Filtrar em papel filtro para um tubo de centrífuga previamente tarado;
10. Deixar em estufa a 100°C por 24 horas para evaporar os solventes;
11. Resfriar em dessecador por 15 minutos;
12. Pesar;
13. Determinar a porcentagem de lipídios pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Lipídios} = (m_{\text{final}} / m_{\text{inicial}}) \times 100$$

$$\text{Onde: } m_{\text{final}} = (m_{\text{FinalTubo}} - m_{\text{InicialTubo}})$$

$$m_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ g}$$

3.12 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

A determinação de Proteínas para este estudo foi realizada pelo Método Kjeldahl, descrito no manual do Instituto Adolfo Lutz (1979).

3.13 DETERMINAÇÃO DE DBO E DQO

As análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram feitas por refluxo fechado colorimétrico para DQO e método manométrico para DBO baseados no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2005).

3.14 DETERMINAÇÃO DE CIANETO

A análise inicial de cianeto presente na manipueira e após resíduo tratado foi a de Cianeto Total ou método de destilação – espectrofotometria conforme descrição a seguir (NAGARAJA, *et al.*, 2002).

O Método desdobra-se em duas etapas: a primeira etapa é a extração através da destilação e a segunda etapa é a leitura através da medição espectrofotométrica.

- Destilação:

Um volume ou massa pré-medido de amostra bruta ou diluído foi submetido à destilação em um recipiente que continha inibidor, meio ácido e calor.

Após a remoção de substâncias interferentes, o cianeto é convertido em ácido cianídrico (gás HCN) e expurgado com o ar diretamente para uma solução absorvedora. Auxiliado pelo vácuo formado pela bomba de sucção e água em condensador, o HCN foi então coletado pela passagem diretamente em uma solução absorvedora de hidróxido de sódio 1N, em seguida, transferida para balão volumétrico de 100 ml, 200 ml, 250 ml ou 500 ml e completado o volume, com água destilada.

Do destilado alcalino do balão, foi retirada uma alíquota para análise espectrofotométrica.

- Espectrofotometria:

Um volume pré medido, diluído ou não, do destilado alcalino, do balão volumétrico, foi então submetido à reação colorimétrica, onde o cianeto presente foi convertido a cloreto de cianogênio CNCl pela reação com cloramina T, em $\text{pH} < 8$ sem a hidrólise para CNO^- .

Após a reação e pela adição dos reagentes piridina/ácido barbitúrico, o CNCl forma um complexo de cor vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de cianeto presente na amostra. Esta cor é, então medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 578 nm e em cubeta de 10 mm de caminho ótico.

3.15 RESPIROMETRIA

Foi usado um sistema de sensores para a quantificação de gases O_2 e CO_2 específico para processos fermentativos desenvolvido por (STURM *et al.*, 2008).

3.15.1 Sensores de O_2 e CO_2

No presente estudo foi utilizada instrumentação desenvolvida no laboratório de bioprocessos da UFPR para cultivo da microalga *Chlorella minutissima* em manipueira. A FIGURA 16 mostra uma proveta de 2 L montada com sensores para medição de O_2 , que foi utilizado para quantificar este gás quando submetidos a 20% de manipueira; 70% de água e 10% de inóculo. Esse sistema de sensores para a aquisição de dados foi testado pela primeira vez com microalgas em parceria com seu idealizador Wilerson Sturm em 2008.

Para a fixação dos sensores foram utilizados tubos de PVC de 100 mm de diâmetro, aos quais foram conectados os tubos de entrada e saída provenientes do processo/biorreator. A medição de percentual de gás carbônico foi feita por sensor infravermelho (Vaisala model GMT), e de oxigênio por sensores eletroquímicos (Alphasense modelo O2-A2), um na entrada de ar, funcionando como referência e outro na saída do processo. Para permitir o cálculo de massas de cada um dos

gases produzidos ou consumidos, foi utilizado um sensor de vazão mássico (Aalborg modelo GFM) por dispersão térmica, o qual já vem calibrado para medição de volume independente da pressão empregada na aeração, diminuindo assim os erros. Foi feito um sistema de aquisição de dados através de software supervisorio (Laquis, 2009). Todos os sensores foram conectados a controladores de processo Novus Modelo N1100, através de rede industrial (STURM *et al.*, 2008). Para a gravação dos dados do processo, bem como indicação em tempo real, foi utilizado um computador tipo Notebook, no qual foi instalado o software supervisorio.



FIGURA 16 – INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE PARA O CULTIVO DA *Chlorella minutissima* EM MANIPUEIRA

3.16 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em manipueira foi realizado em estufas com iluminação e fotoperíodo.

Foi elaborado um delineamento experimental sendo que a leitura por espectrofotometria, realizada em triplicata, teve como objetivo avaliar o crescimento algal.

Desta forma, as definições a seguir apresentam a matriz do planejamento experimental e os níveis das variáveis estudadas nos cultivos.

3.16.1 Efeito de diferentes concentrações de manipueira diluída em meio MBM para cultivo da *Chlorella minutissima* usando fotobiorreatores do tipo tubular – Experimento I (FBRT)

Este estudo foi realizado durante 15 dias em fotobiorreatores do tipo tubular (FBRT) de 2 L, com volume útil de 1,5 L. Foram preparadas diferentes diluições de manipueira em meio MBM mais 10% de inoculo, resultando em um volume final de 1,65 L.

Foi avaliado o crescimento microalgal da *Chlorella minutissima* LEB 108 (COSTA *et al.*, 2006) frente às diferentes misturas de manipueira diluída em meio MBM (v/v) nas seguintes proporções: (0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%) de acordo com a TABELA 9.

Os cultivos foram realizados sob condições controladas a 30°C, 2500 Lux, pH 7 e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, sendo que para este experimento inicial aplicou-se um planejamento de 1 fator, com 6 níveis, ou seja, um experimento fatorial 6¹, num total de 6 condições.

TABELA 9 – EXPERIMENTO I: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA DILUÍDA EM MEIO MBM PARA OS ENSAIOS DE ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM FOTOBIORREATOR DO TIPO TUBULAR (FBRT)

condição	% manipueira
1	0
2	20
3	40
4	60
5	80
6	100

3.16.2 Efeito de diferentes concentrações de manipueira diluída em meio MBM para cultivo da *Chlorella minutissima* usando fotobiorreatores do tipo Erlenmeyer – Experimento II (FBRE)

A TABELA 10 apresenta o planejamento experimental usado para avaliar diferentes proporções de inóculo: (5%, 10% e 20%), frente a diferentes concentrações de manipueira diluída em meio MBM para cultivo da *Chlorella minutissima* em fotobiorreatores do tipo Erlenmeyer (FBRE) de 2 L, com volume útil de 1,5 L. Foram mantidas as mesmas condições de controle de temperatura, iluminância, pH e fotoperíodo do tratamento anterior. Aplicou-se para este estudo um planejamento de 2 fatores, cada um com 3 níveis, ou seja, um tratamento fatorial 3^2 , num total de 9 condições.

TABELA 10 – EXPERIMENTO II: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM MEIO MBM PARA OS ENSAIOS DE REFINAMENTO DE ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM FOTOBIORREATOR DO TIPO ERLLENMEYER (FBRE)

condição	% manipueira	% inóculo
1.1	5	5
1.2	5	10
1.3	5	20
2.1	10	5
2.2	10	10
2.3	10	20
3.1	20	5
3.2	20	10
3.3	20	20

3.16.3 Efeito de diferentes concentrações de manipueira diluída em H₂O para cultivo da *Chlorella minutissima* usando fotobiorreatores do tipo Erlenmeyer – Experimento III (FBRE)

A TABELA 11 apresenta planejamento experimental para avaliar diferentes proporções de inóculo: (5%, 10% e 20%), frente a diferentes relações de manipueira diluída em H₂O para cultivo da *Chlorella minutissima* em fotobiorreatores do tipo erlenmeyer (FBRE) de 2 L, com volume útil de 1,5 L . Foram mantidas as mesmas condições de controle de temperatura, iluminância, pH e fotoperíodo dos tratamentos anteriores. Aplicou-se para este estudo um planejamento de 2 fatores, cada um com 3 níveis, ou seja, um tratamento fatorial 3^2 , num total de 9 condições.

TABELA 11 – EXPERIMENTO III: PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM ÁGUA PARA OS ENSAIOS DE REFINAMENTO DE ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM FOTOBIORREATOR DO TIPO ERLLENMEYER (FBRE)

condição	% manipueira	% inóculo
1.1	5	5
1.2	5	10
1.3	5	20
2.1	10	5
2.2	10	10
2.3	10	20
3.1	20	5
3.2	20	10
3.3	20	20

3.16.4 Efeito de diferentes concentrações de manipueira diluída em H₂O para cultivo da *Chlorella minutissima* usando fotobiorreatores do tipo tubular – Experimento IV (FBRT)

A TABELA 12 apresenta planejamento parcialmente otimizado para avaliar diferentes proporções de manipueira (15%, 20%, 25% e 30%) diluída em H₂O e 10% de inóculo para cultivo da *Chlorella minutissima* em fotobiorreatores do tipo tubular (FBRT) de 2 L, totalizando um volume útil de 1,65 L. Foram mantidas as mesmas condições de controle de temperatura, iluminância, pH e fotoperíodo dos tratamentos anteriores. Aplicou-se para este estudo um planejamento de 1 fator, com 4 níveis, ou seja, um tratamento fatorial 4¹, num total de 4 condições.

TABELA 12: EXPERIMENTO IV : PROPORÇÕES DE MANIPUEIRA E INÓCULO DILUÍDA EM ÁGUA PARA OS ENSAIOS OTIMIZADOS DA *Chlorella minutissima* EM FOTOBIORREATOR DO TIPO TUBULAR (FBRT)

condição	% manipueira
1	15
2	20
3	25
4	30

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A geração de resíduos agroindustriais, o impacto sobre o meio ambiente, bem como as possíveis formas de se aproveitar estes resíduos nos motivou a desenvolver um processo para cultivar a microalga *Chlorella minutissima* LEB 108 (COSTA *et al.*, 2006) em manipueira. Várias espécies de *Chlorella* têm sido amplamente exploradas por ser uma fonte potencial de compostos de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica como lipídios, proteínas, pigmentos e polissacarídios, entre outros.

A cepa de *Chlorella minutissima* foi obtida junto à coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande e foi isolada da lagoa de estabilização da estação de tratamento de efluentes industriais da Usina Termelétrica Presidente Médici, em Candiota-RS.

O meio de cultivo utilizado na manutenção dos inóculos e cultivos foi o Meio Bristol Modificado – MBM. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo Erlenmeyer (FBRE) de 2 L com volume útil de 1,5 L e em fotobiorreatores tipo tubular (FBRT) de 2 L com volume útil de 1,65 L com concentração inicial de microalga de 0,2 g.L⁻¹. O aparato experimental foi mantido em estante de fotoperíodo de 12 h claro/escuro sob condições controladas a 30°C, 2500 Lux.

Os experimentos foram divididos em quatro etapas, sendo a primeira avaliação do crescimento da *Chlorella minutissima* realizada em manipueira diluída (0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100%) em meio MBM (v/v) com objetivo de avaliar a adaptação da *Chlorella* no resíduo estudado. No segundo experimento foi proposto um planejamento com nove condições de manipueira diluída em meio MBM objetivando o refinamento de adaptação da microalga em estudo. No terceiro experimento foram propostas as mesmas condições de planejamento do experimento II, porém para o experimento III a manipueira foi diluída em água, eliminando o meio sintético e forçando a adaptação à manipueira. Na quarta e última etapa foram utilizadas concentrações de manipueira diluída a 15%, 20%, 25% e 30 % em água a fim de avaliar o crescimento e o potencial detoxificante de inóculos adaptados.

4.1 ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM MANIPUEIRA E MEIO MBM EXPERIMENTO I

Para o experimento I, foram realizados cultivos em fotobiorreatores do tipo proveta (FBRT) 2 L, com volume útil de 1,65 L, onde avaliou-se a adaptação e variação de crescimento da *Chlorella minutissima*, frente a seis concentrações de manipueira diluída a 0%, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% em meio MBM (v/v).

O volume inicial de inóculo foi de 150 mL (10%), tendo então este primeiro tratamento um total de 1,65 L para cada condição estabelecida.

A TABELA 13 mostra que o maior valor de biomassa foi obtido com MBM puro (0% de manipueira e 100% de MBM), e com a maior diluição (20% de manipueira em MBM). Nesses casos foi atingido uma concentração máxima ($X_{\text{máx}}$) de 1,90 a 1,93 g.L⁻¹. Para concentrações maiores de manipueira, a produção de biomassa foi menor, mas ainda assim atingiu 1,34 g.L⁻¹ para a manipueira pura. Esses resultados indicam que há, possivelmente, algum efeito inibidor da manipueira sobre o crescimento da microalga, mas esse efeito não impede o crescimento.

A produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) atingida nos cultivos foram da ordem de 0,2 g.L⁻¹.dia⁻¹, com valores mais altos (de 0,240 a 0,280 g.L⁻¹.dia⁻¹) para as maiores diluições e valores mais baixos (de 0,150 a 0,220 g.L⁻¹.dia⁻¹) para meios mais concentrados em manipueira. Em todos os casos, as produtividades foram maiores que as atingidas por (RADMANN *et al.*, 2004) quando cultivaram a microalga *Chlorella minutissima* em meio MBM a 35°C, 2500 Lux, NaHCO₃ como fonte de C, 1,0 g.L⁻¹ de NO₃⁻ e conseguiram produtividade máxima de 0,065 g.L⁻¹. dia⁻¹. Este crescimento mais rápido para um mesmo intervalo de tempo, pode ser devido à maior concentração de nutrientes no meio contendo 100% de meio MBM, sem a manipueira.

TABELA 13 – RESULTADO DA $X_{\text{máx}}$; $P_{\text{máx}}$ e $\mu_{\text{máx}}$ DO EXPERIMENTO I

Concentração de manipueira	0%	20%	40%	60%	80%	100%
$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	1,935	1,902	1,512	1,577	1,440	1,340
$P_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	0,252	0,240	0,280	0,220	0,150	0,220
$\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹)	0,251	0,083	0,295	0,128	0,115	0,225

O pH ótimo para o desenvolvimento de *Chlorella* sp. é o pH 7. O pH da água influencia a forma como o CO₂ é encontrado, sendo que esta fonte pode apresentar-se da seguinte forma: H₂CO₃, HCO₃⁻¹ ou CO₃⁻² (RICHMOND, 1990). O pH durante todo o período de cultivo para este experimento variou entre 5,52 na condição 5 (80% de manipueira e 20% de MBM) e 7,98 na condição 1 (0% de manipueira e 100% de MBM), porém ficaram a maior parte do tempo na faixa de 6,5 a 7,5. Tais resultados diários de medida do pH são apresentados nas Tabelas 19 a 46 no anexo. Segundo Sung *et al.*(1999), a *Chlorella* sp. apresenta uma velocidade específica do crescimento quase constante em valores de pH acima de 4,2 e, por esse motivo, ela cresce facilmente. De acordo com Poli *et al.* (2004) e Fox (1996), as microalgas retiram CO₂ do meio em forma de HCO₃⁻¹ e isto eleva o pH, o que explica a necessidade de correção do mesmo.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) para este experimento ocorreu na condição 3 (40% de manipueira e 60% de MBM) que foi de 0,295 dia⁻¹. Nota-se que, de forma semelhante à produtividade máxima, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ são mais variáveis porque a sua determinação depende de determinações pontuais de concentração, mais sujeita a erro experimental que a medição de biomassa final, que é cumulativa.

4.2 REFINAMENTO DE ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM MANIPUEIRA E MEIO MBM - EXPERIMENTO II

Para este experimento, utilizou-se como inóculo a microalga *Chlorella minutissima* já adaptada no experimento I referente à condição 2 (20% manipueira e 80% de MBM), por ter apresentado maior resultado de $X_{\text{máx}} = 1,902 \text{ g.L}^{-1}$ quando diluído em manipueira.

A proporção de inóculo foi pré-definida em 5%, 10% e 20% para as três condições deste experimento, onde se pretendeu observar o efeito da concentração de inóculo no crescimento da microalga. Este experimento teve um volume útil de 1,5 L para cada condição.

O maior valor de concentração celular neste experimento foi obtido com a condição 1.3 (5% de manipueira, 75% MBM e 20% de inóculo) que apresentou uma

$X_{m\acute{a}x}$ de 2,790 g.L⁻¹ (TABELA 14). Considerando que é um valor superior aos resultados obtidos no experimento anterior, verifica-se uma adaptação da *Chlorella* na manipueira diluída em meio MBM.

A produtividade máxima obtida neste experimento ocorreu na condição 2.3 (10% de manipueira; 70% de MBM e 20% de inóculo) que foi de 0,520 g.L⁻¹. dia⁻¹ valor este superior ao obtido por Radmann *et al.* (2004) que foi de 0,065 g.L⁻¹. dia⁻¹ com *Chlorella minutissima*. Fato este que pode ter ocorrido pela quantidade de meio MBM e inóculo presentes nesta condição, bem como fatores como temperatura e iluminação que auxiliam no crescimento mais rápido desta microalga.

TABELA 14 - RESULTADO DA $X_{m\acute{a}x}$; $P_{m\acute{a}x}$ e $\mu_{m\acute{a}x}$ DO EXPERIMENTO II

Condição	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
Manipueira	5%	5%	5%	10%	10%	10%	20%	20%	20%
Inóculo	5%	10%	20%	5%	10%	20%	5%	10%	20%
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	1,950	2,042	2,790	1,845	1,985	1,687	1,796	2,536	2,211
$P_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	0,290	0,330	0,310	0,290	0,510	0,520	0,470	0,500	0,230
$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)	0,144	0,333	0,158	0,172	0,392	0,318	0,108	0,289	0,167

A velocidade específica máxima de crescimento para este experimento ocorreu na condição (10% de manipueira – 80% de MBM – 10% de inóculo) que foi de 0,392 dia⁻¹.

O aspecto mais importante dessa bateria de cultivos é que mesmo as condições de menor crescimento ainda apresentam uma formação de biomassa maior do que as do experimento I. Esse potencial de crescimento em manipueira foi em seguida explorado em cultivos sem adição de nutrientes.

4.3 REFINAMENTO DE ADAPTAÇÃO DA *Chlorella minutissima* EM MANIPUEIRA DILUÍDA EM ÁGUA - EXPERIMENTO III

Para este experimento, utilizou-se como inóculo a microalga *Chlorella minutissima* já adaptada no experimento II referente à condição 1.3 (5% de manipueira, 75% de MBM, 20% de inóculo) a qual atingiu uma $X_{m\acute{a}x}$ de 2,790 g/L.

O maior valor de concentração celular neste experimento foi obtido com a condição 2.3 (10% de manipueira, 70% MBM e 20% de inóculo) que apresentou uma $X_{\text{máx}}$ de 2,538 g.L⁻¹ (TABELA 15).

A proporção de inóculo também foi pré-definida em 5%, 10% e 20% para as três condições estudadas neste experimento, onde se pretendeu observar a variação de crescimento da microalga. Este tratamento teve um volume total de 1,5 L para cada condição.

A produtividade máxima obtida neste experimento ocorreu na condição (20% de manipueira – 60% de água – 20% de inóculo) foi de 0,520 g.L⁻¹. dia⁻¹ (TABELA 15) valor este superior ao obtido por Radmann *et al.* (2004).

TABELA 15 – RESULTADO DA $X_{\text{máx}}$; $P_{\text{máx}}$ E $\mu_{\text{máx}}$ PARA O EXPERIMENTO III

Condição	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3
Manipueira	5%	5%	5%	10%	10%	10%	20%	20%	20%
Inóculo	5%	10%	20%	5%	10%	20%	5%	10%	20%
$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	1,447	2,111	1,802	1,435	2,167	2,538	2,192	1,804	2,302
$P_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	0,210	0,400	0,310	0,230	0,340	0,310	0,430	0,300	0,520
$\mu_{\text{má}}$ (dia ⁻¹)	0,112	0,348	0,231	0,394	0,176	0,145	0,395	0,244	0,397

A velocidade específica máxima de crescimento para este experimento ocorreu na condição 3.3 (20% de manipueira – 60% de água – 20% de inóculo) que foi de 0,397 dia⁻¹.

É de fundamental importância ressaltar que nesta bateria de cultivos foi usada apenas manipueira e água, o que mostra que a microalga *C. minutissima* pode crescer em manipueira. Considerando que esse crescimento deve implicar em redução dos nutrientes (e da carga poluidora) do resíduo, foi feito um novo experimento com concentrações relativamente mais altas de manipueira para avaliar tanto crescimento como detoxificação.

4.4 OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DA *Chlorella minutissima* EM MANIPUEIRA DILUÍDA EM ÁGUA - EXPERIMENTO IV

Para o experimento IV, foram realizados cultivos em fotobiorreatores do tipo proveta (FBRT) de 2 L, com volume útil de 1,65 L, onde avaliou-se a otimização e

variação de crescimento da microalga, frente a quatro concentrações de manipueira (15%, 20%, 25% e 30%) em água. Essa faixa foi escolhida para avaliar o crescimento da microalga em concentrações próximas à que foi verificada como melhor em outros ensaios (20% de manipueira), para validar os resultados anteriores.

Utilizou-se como inóculo 10% da microalga *Chlorella minutissima* já adaptada no experimento III referente à condição 2.3 (10% manipueira, 70% água e 20% inóculo), a qual atingiu uma $X_{m\acute{a}x}$ de 2,538 g.L⁻¹.

Como os experimentos anteriores mostraram uma adaptação da *Chlorella minutissima* e melhor rendimento de biomassa entre 5% e 20% de manipueira foi proposto o experimento IV para otimizar o cultivo e verificar se a microalga em estudo adaptar-se-ia neste resíduo com uma porcentagem acima de 20%. Fato este que veio a provar que os valores de biomassa ficaram próximos em relação aos experimentos anteriores obtendo-se uma $X_{m\acute{a}x}$ de 2,317 g.L⁻¹ na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) para este experimento (TABELA 16).

Para este experimento a produtividade máxima atingida ocorreu na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) com valor de 0,540 g.L⁻¹. dia⁻¹, valor este superior ao obtido por Moraes (2006), que obteve produtividade máxima de 0,087 g.L⁻¹. dia⁻¹ em ensaio com meio MBM contendo 6% de CO₂.

TABELA 16 – RESULTADO DA $X_{m\acute{a}x}$; $P_{m\acute{a}x}$ E $\mu_{m\acute{a}x}$ PARA EXPERIMENTO IV

condição	15%	20%	25%	30%
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹)	1,822	2,317	2,017	1,944
$P_{m\acute{a}x}$ (g.L ⁻¹ . dia ⁻¹)	0,310	0,540	0,230	0,230
$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia ⁻¹)	0,295	0,353	0,251	0,261

A velocidade específica máxima de crescimento para este experimento ocorreu na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) que foi de 0,353 dia⁻¹. Segundo Moraes (2006), a microalga *Chlorella kessleri*, apresentou máximo valor para velocidade específica de crescimento de 0,267 dia⁻¹ em ensaios com 6% e 12% de CO₂. À medida que a velocidade de crescimento celular aumenta, o tempo de geração diminui, viabilizando economicamente o cultivo.

O maior teor de lipídios obtido, 11,08%, ocorreu na condição 1 (15% de manipueira e 85% de água) (TABELA 17), valor acima dos obtidos por Costa *et. al.*, (2006) que conseguiram para as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* um valor de 6,96% e 7,98%, respectivamente, em meio MBM. Segundo Ilmann *et al.*, (2000), a redução da concentração de nitrogênio em cultivos com *Chlorella* aumenta a produção de lipídios, o que pode ter ocorrido neste último experimento, pois o KNO₃ encontrado no meio MBM pode ter sido consumido pela microalga durante os experimentos I e II, fato este que deve ser investigado em estudos futuros.

A maior porcentagem de proteína ocorreu na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) com 55,11% (TABELA 17), sendo que a condição 1 não foi realizada análise por perda de amostra durante o ensaio . A redução de proteínas e lipídios pode ter ocorrido pelo consumo de amido (fonte de carbono) ou pela presença de sólidos suspensos, fato este que deverá ser investigado em trabalhos futuros.

Avaliando a tendência de produção e de produtividade de biomassa, verifica-se que é possível trabalhar com concentrações de manipueira de até 30% - e possivelmente superiores – com produção de biomassa da ordem de 2 g.L⁻¹, embora o valor que se recomenda para estudos posteriores seja de 20% de manipueira devido à maior produtividade em biomassa.

As altas concentrações de proteínas e moderadas concentrações de lipídios indicam que, apesar de certo grau de toxicidade que se esperava para manipueira, não chega a haver limitação de nutrientes como N ou P – se existisse, o teor de proteínas cairia e o de lipídios subiria.

TABELA 17 – TEOR DE LIPÍDIOS, BIOMASSA E PROTEÍNAS PARA O EXPERIMENTO IV

condição	lipídios(%p/p)	X Máx g.L ⁻¹	proteínas
1	11,08	1,822	não realizado
2	8,84	2,317	55,11
3	10,32	2,017	34,54
4	10,20	1,944	41,74

4.5 ANÁLISES DE DBO, DQO E CIANETO

Com relação à manipueira foram investigadas possíveis utilizações da biomassa produzida, os impactos ambientais provocados, a redução de cianeto, a redução de DBO e DQO após cultivos com a *Chlorella minutíssima* (TABELA 18).

A legislação pertinente, os custos envolvidos e considerações sobre viabilidade econômica da utilização desta microalga foram considerados.

As amostras de manipueira enviadas pela empresa Podium de Paranaíba vieram com análises iniciais de DBO a 2.400 mg O₂/L de DQO a 6.180 mg O₂/L; pH de 4,4; sólidos totais de 5.324 mg/L e sólidos suspensos de 2.160 mg/L, sendo que a análise inicial de cianeto foi feita pela CEPPA – Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos da UFPR.

No final do experimento IV foram feitas três análises de DBO, DQO e cianeto.

Na prática, as empresas de tratamento de água consideram como valor padrão de DQO o dobro do valor da DBO, ou seja, 10 mg.L⁻¹. De acordo com Resolução do CONAMA 357/2005, considera-se a manipueira enquadrada na classe 2, que determina como limite máximo de DBO o valor de 5 mg.L⁻¹. Este valor poderá ser ultrapassado no caso de efluente de sistemas de tratamento de águas residuárias que reduza a carga poluidora em termos de DBO 5 dias, 20°C do despejo em no mínimo 80%.

Motta e Cerella (1985) comprovaram a possibilidade de tratar por digestão anaeróbica a manipueira. O processo de digestão anaeróbica envolve uma primeira fase acidogênica e uma segunda, em separado, metanogênica, que em conjunto acarretam uma redução do DQO da ordem de 85% e de cianeto de 95% (CEREDA, 1994). No presente processo, a redução de DQO é menor, mas a de cianeto é superior, havendo geração de biomassa de alto valor nutricional.

A TABELA 18 mostra que levando em conta as diluições propostas neste experimento, houve remoção de 98,9% de cianeto, redução de 62% de DBO e 36% da DQO na condição de 20% de manipueira, a qual apresentou maior produção de biomassa. O fato de ainda haver uma quantidade razoável da DBO e DQO após o tratamento com a *Chlorella minutíssima*, abre espaço para reutilização do resíduo, processo esse não realizado, tendo em vista que a finalidade principal do experimento IV era de validar os resultados dos experimentos anteriores.

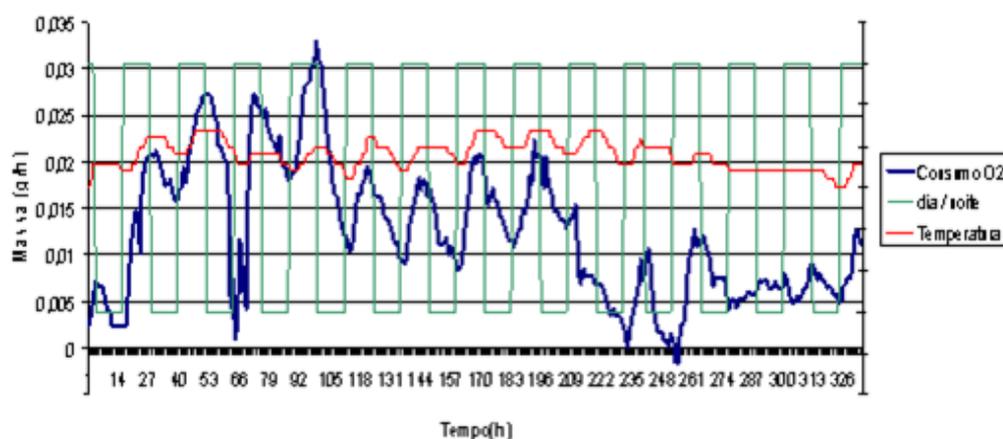
TABELA 18 - ANÁLISE DE DBO, DQO E CIANETO COM INÓCULO PARA O EXPERIMENTO IV

Condições originais – considerando diluição				Efluentes dos cultivos					
Cianeto mg/L	DBO mg O ₂ /L	DQO mg O ₂ /L	% manipueira	Cianeto mg/L	redução (%)	DBO mg O ₂ /L	redução (%)	DQO mg O ₂ /L	redução (%)
4,086	360	927	15	0,07	98,3%	227	36,9%	658	29,0%
5,448	480	1236	20	0,06	98,9%	182	62,1%	790	36,1%
6,810	600	1545	25	0,05	99,3%	182	69,7%	679	56,1%
8,172	720	1854	30	0,05	99,4%	542	24,7%	1571	15,3%

4.6 RESPIROMETRIA

Este estudo foi realizado pela primeira vez com microalgas no laboratório de processos biotecnológicos da UFPR em parceria com o pós-graduando Wilerson Sturm, onde foi avaliado o metabolismo respiratório através da fotossíntese de microalgas.

Neste trabalho foi avaliado o efeito de concentrações de oxigênio no cultivo mixotrófico contendo 20% de manipueira e 80% de água, equivalente a condição 2 do experimento IV, a fim de avaliar a influência do O₂ na obtenção de biomassa (FIGURA 17). Este mesmo gráfico mostra que houve um aumento de O₂ durante o dia e diminuição no período da noite, fato este que pode ser combinado pelo metabolismo e a temperatura do cultivo.

FIGURA 17 – CONSUMO DE O₂

5 CONCLUSÃO

A utilização da manipueira como meio de cultivo para microalgas é, sem dúvida, mais barato e promissor, pois reduz a carga poluidora desse resíduo.

Sua potencial utilização é de grande viabilidade para Brasil, onde as condições de radiação solar, temperatura, estabilidade climática, grande extensão territorial e disponibilidade de água em quase todas as suas regiões, constituem condições fundamentais para o cultivo de microalgas.

A substituição ou complementação do meio de cultivo com um resíduo orgânico pode ser explorada como forma de diminuir os custos de produção aliados à manutenção do meio inorgânico para o crescimento de *Chlorella minutissima*. Os resultados evidenciam o potencial da utilização da manipueira como substrato orgânico no cultivo da microalga *Chlorella minutissima*.

Através de observações e análises foi possível determinar condições que diminuem os custos de produção com relação à fonte de carbono, pois a manipueira é rica em amido, fonte de carbono, que foi diluída no meio de cultura servindo de nutriente para as microalgas. Condições ideais de pH inicial, aeração e adequada forma de agitação favorecem a dissolução do meio proposto.

Os demais fatores estudados podem ser combinados de forma a atingir as melhores taxas de crescimento para a produção de biomassa da microalga estudada.

O efeito dos experimentos propostos por este trabalho, sobre a eficiência do crescimento algal, bem como, a sua capacidade de remoção de agentes poluidores em condições laboratoriais, e o processo de purificação do resíduo utilizado, tendo como base a ação da *Chlorella minutissima* LEB 108 foram avaliados. Em um período de 15 dias a microalga demonstrou ser eficaz na redução de cianeto, DBO e DQO, mostrando a capacidade metabólica da *Chlorella* em converter fontes orgânicas de carbono em biomassa e a viabilidade da utilização desta para produção de metabólitos de interesse comercial.

Após o experimento IV os resultados demonstraram maior redução de cianeto nas condições 25% e 30% de manipueira, cujo valor foi reduzido de 27,24 mg/L (valor inicial) a 0,05 mg/L (valor final).

As análises demonstraram maior redução de DBO encontrada nas condições 20% e 25% de manipueira no experimento IV, com valor reduzido de 2.400 mg O₂/L (valor inicial) a 182 mgO₂/L (valor final). Independente da diluição do resíduo em água o resultado demonstra uma redução significativa da DBO.

A maior redução de DQO foi encontrada na condição 15% de manipueira, com valor reduzido de 6180 mg O₂/L (valor inicial) para 658 mgO₂/L (valor final), valores estes ainda superiores aos estabelecidos pela legislação vigente. O resultado mostra que mesmo diluído em água o resíduo assimilado é tratado pela *Chlorella minutissima*.

A maior produção de biomassa nos quatro experimentos foi obtida quando cultivada em Erlenmeyer, utilizando-se meio MBM no experimento II, condição 1.3 (5% de manipueira, 75% de meio MBM e 20% de inóculo) com uma X_{máx} de 2,790 g.L⁻¹. O resultado alcançado foi superiores aos obtido por Costa *et. al.*, (2006) que conseguiram biomassa de 1,53 g.L⁻¹ em 22 dias de cultivo quando a *Chlorella minutissima* foi cultivada a 35°C, 1250 Lux, 16,8 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e 0,5 g.L⁻¹ de NO₃⁻, porém inferior ao alcançado pelo mesmo autor e colaboradores que conseguiram biomassa de 5,06 g.L⁻¹ para *Chlorella vulgaris* quando cultivada a 35°C, 2500 Lux, 16,8 g.L⁻¹ NaHCO₃ e 1,0 de g.L⁻¹ de NO₃⁻.

A velocidade específica máxima de crescimento nos quatro cultivos foi obtida no experimento III na condição 3.3 (20% de manipueira – 60% de água – 20% de inóculo) que foi de 0,397 dia⁻¹. Morais, 2006 obteve velocidade específica de crescimento de 0,267 dia⁻¹ com *Chlorella kessleri* quando adicionou 6% e 12% de CO₂ ao cultivo em meio MBM, valor este inferior ao obtido neste estudo.

A produtividade máxima atingida ocorreu no experimento IV na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) com valor de 0,540 g.L⁻¹. dia⁻¹, valor superior ao obtido por Morais (2006) quando cultivou *Chlorella kessleri* em meio MBM a 6% de CO₂ que foi de 0,087 g.L⁻¹. dia⁻¹.

O maior teor de lipídio obtido ocorreu no experimento IV na condição 1 (15% de manipueira e 85% de água) 11,08 % valor acima dos encontrados por Costa *et. al.* (2006), para *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* que foram de 6,96% e 7,98% respectivamente, porém novas condições de cultivo para aumentar esses valores devem ser estudadas. Os ácidos graxos que as microalgas produzem podem ser extraídos e convertidos em biodisel (BROWN & ZEILER, 1993). Dentre as vantagens do uso de microalgas para obter ácidos graxos para

produção de biodiesel podemos citar: sua alta produtividade, tolerância a variação das condições ambientais, uso de águas residuárias ou salobras, proporcionar quantidades de nutrientes e a possibilidade de utilizar o restante de biomassa para outros fins (BENEMANN, 1997).

Com relação à maior porcentagem de proteína ocorreu no experimento IV na condição 2 (20% de manipueira e 80% de água) com 55,11%.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar o potencial para produção de biodiesel, hidrogênio, gás metano e etanol utilizando microalgas.

Estudar o cultivo de *Chlorella minutissima* em outros resíduos agroindustriais em condições ambientais não controladas.

Estudar o cultivo de *Chlorella minutissima* em meio complementado com manipueira em condições ambientais não controladas

Testar outros substratos orgânicos para cultivo mixotrófico de *Chlorella minutissima*.

Testar a agitação nos fotobiorreatores em escala piloto, com pás rotativas.

Criar uma metodologia de quantificação de CO₂ consumido, por microalgas, para ser aprovada junto aos órgãos competentes em projetos de MDL (mecanismo de desenvolvimento limpo).

Criar e testar outros modelos de biorreatores.

REFERÊNCIAS

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th end. ed. P. Cunniff. AOAC International, Arlington, Virginia, USA, 1995;

ABAM. **Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca**. Disponível em: <<http://www.abam.com.br/>> Acesso em: 05/05/2007;

ABNT. **Associação Brasileira de Normas Técnicas**. NBR 12614; águas – determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) – (método de incubação 120°C, cinco dias). Rio de Janeiro, 1992. 5p;

ANDRADE, M. R. **Cultivos autotróficos e mixotróficos de *Spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no extremo sul do Brasil**. Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na sub-área de Bioprocessos em alimentos, Rio Grande do Sul, 2005;

ANUPAMA, P.R.; RAVINDRA, P. **Value-added food: single cell protein**. *Biotechnology Advances.*, v.18, n.6, p. 459-479, 2000;

BARROS, F. F. C., QUADROS, C.P., PASTORE, G.M., **Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira**. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 28(4): 979-985, out.-dez. 2008;

BECKER, E. W. **Microalgae for human and animal consumption**. In: BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (Eds) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge. Cambridge University Press, p: 222-255, 1988;

BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. **Production and Utilization of the Blue-green Alga *Spirulina* in India**. *Biomass*. Vol. 4, no.2, pp.105-125, 1984;

BENEMANN, J. R. **CO₂ mitigation with microalgae systems**. *Energy Conversion Management*, 38, p. 475 - 479, 1997;

BENEMANN, J. R.; TILLET, D.M.; WEISSMAN, J.C. **Microalgae biotechnology**. *Trends in Biotechnology* 5(2), p.47-53, 1987;

BICUDO, C. E. M.; MENEZES M. **Gêneros de algas Continentais do Brasil** (chave para identificação e descrição) – Segunda edição. 502p. São Carlos, 2006;

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification**. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917, 1959;

BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (Eds.) **Microalgal Biotechnology**. Cambridge, Cambridge University Press, p: 222 – 255, 1988;

BOROWITZKA, M. A. **Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters**. *Journal of Biotechnology*, 70, 313-321, 1999;

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Biotecnologia Industrial**. Fundamentos, São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. 1ª edição. Vol. I, 2001;

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. 1ª edição. Vol.II, 2001;

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda. 1ª edição. Vol. III, 2001;

BOYD, C. **Walter quality management and aeration in shrimp farming. Fisheries and Allied Aquacultures**. Departmental Series. Auburn University. nº 2, 83 p., 1989;

BOYD, C.; MARTINSON, D. **Evaluation of propeller – aspirator – pump reactors**. Aquaculture, 36, p. 283 – 292, 1984;

BRANCO, S.M.; HESS, M.L. **Tratamento de resíduos**. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. de A. (Coord.). Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial, São Paulo: Ed. Blücher, v.2, cap.3, p.47-76, 1975;

BROWN, M. L. & ZEILER, K. G. **Aquatic biomass and carbon dioxide trapping**. Energ Convers Manage. 34, 1005 – 1013, 1993;

CARDOSO, C. E. L. **Competitividade e inovação tecnológica na cadeia agroindustrial de fécula de mandioca no Brasil**. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Economia Aplicada, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2003;

CARIOCA, J.O.B.; ARORA, H.L. **Biomassa: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. Fortaleza: Edição UFC. 644 pg., 1984;

CARNEIRO, F. P.; PIRES, M. Y. **Aproveitamento das águas residuárias do processamento da mandioca em fertirrigação**. Instituto Euvaldo Lodi. Núcleo Central. Coletânea BITEC 2004-2005/IEL.NC, Brasília: IEL/SEBRAE/CNPq, 355 p., 2006;

CEREDA, M. P. **Importância das Tuberosas Tropicais**. In: Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Volume 2. Fundação Gargill, São Paulo, 2002;

CEREDA, M.P. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**, São Paulo: fundação Cargill, v.4, cap.1, p.31-35. (Séries culturas de tuberosas amiláceas Latino americanas), 2001;

CEREDA, M.P. **Resíduos da industrialização de mandioca no Brasil**. In: Resíduos da Industrialização da mandioca, São Paulo: Editora Paulicéia, p.28-34, 1994;

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Qualidade das águas no Estado de São Paulo**, São Paulo, Águas e Energia Elétrica, n.14, p.11 - 22, 1988;

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. **Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas**, Vetor, 12, p.61 – 78, 2002;

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA N°357 de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providencias**. Publicado no Diário Oficial da União. 18 março de 2005;

COSTA J. A., RADMANN E. M., CERQUEIRA V. S., SANTOS G. C., CALHEIROS M.N. **Perfil de Ácidos Graxos das Microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* Cultivadas em Diferentes Condições**. Alim. Nutr., Araraquara. V.17, n.4, p.429-436, 2006;

COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em Meios Naturais e Sintéticos: Fatores Nutricionais e Custos Experimentais**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 1999;

EFING, L. M. A. **Biomassa de *Trichosporon sp.*. Determinação das Condições de Cultivo, em Meio Químico, de Composição Definida Semelhante à da Manipueira**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná como requisito para obtenção do grau de Mestre, Curitiba, 1991, p.83;

FAINTUCH, B. L. **Análise Comparativa da Produção de Biomassa a Partir de Três Cianobactérias empregando Distintas Fontes Nitrogenadas: Exame de Qualificação Específica de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica**. USP., São Paulo, 1989;

FAST, A.; BOYD, C. **Water circulation, aeration and other management practices**. In: FAST, A.; LESTER, J. (Ed.). *Marine shrimp culture: principles and practices*., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 457 - 495, 1992;

FIORETTO, R. A. **Uso direto da Manipueira em Fertirrigação: Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**, Fundação Cargill. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca, v. 4, 2001;

FIORETTO, R. A. **Uso direto da manipueira em fertirrigação**. In: Resíduo da industrialização de mandioca no Brasil, 1ªed. p.51-80, São Paulo: Editora Paulicéia, 1994;

FOX, R. D. ***Spirulina* production & potencial**. Paris: Edisud, 1996. 232 p.

GRAVATA, A.G. **Aproveitamento industrial da manipueira**. Chácara e Quintais, São Paulo, v. 74, p. 82-84, 1946;

GRIMA, E. M.; FERNADEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. **Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up.** Journal of Biotechnology, 70, p. 231-247, 1999.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina: Superalimento del futuro.** Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994;

HESS, M. L. **Tratamento de despejos de feculíneas de mandioca por oxidação biológica.** Revista DAE, São Paulo, v. 23, n. 4, p.29-35, 1962;

HOLLOWAY, T.; FIORE, M. G. H. **Intercontinental Transport of Air Pollution: Will emerging science lead to a new hemispheric treaty.** 37, p. 4535 - 4542, 2003;

IAL: INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** S. Paulo: O Instituto. 2 ed. V. I, 1979;

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 06/08/2009;

IEL - INSTITUTO EUVALDO LODI. **Núcleo Central. Coletânea BITEC 2004-2005/IEL.NC,** Brasília: IEL/SEBRAE/CNPq., 355 p., 2006;

ILLMANN, A. M., SCRAGG, A. H., SHALES, S. W. **Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium.** Enzyme and Technology, 27, p 631-635, 2000;

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Arranjo produtivo da mandioca da região de Paranavaí -** Loanda no estado do Paraná. Paraná, 95 p., 2004;

IPARDES. Disponível em: atendimento@ipardes.pr.gov.br. Acesso em 03 de Abril de 2007;

KNOERR, C. E. **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de biomassa de microalgas (*Spirulina*) a partir de resíduos agroindustriais.** Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de mestre em processos biotecnológicos, programa de pós-graduação em engenharia de bioprocessos, setor de tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2006;

KOTZABASIS, K., HATZIATHANASIOU A., BENGGOA-RUIGOMEZ M. U., KENTOURI M., DIVANACH P. **Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*:** Role of the concentration and frequency of administration. Journal of Biotechnology 70, 357-362, 1999;

Laquis Software. LCDS- Leão Consultoria e Desenvolvimento de Sistemas Ltda;

LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica: 2ª ed.** São Paulo: Sarvier, ISBN 85 – 7378 – 026 6, 1995.

LEONEL, M.; CEREBÁ, M.P. **Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.** Sci. Agric., Piracicaba, 52(2): 299-304, 1995;

LIMA, M. A.; LIGO, M. A. V.; CABRAL, M. R.; BOEIRA, R. C.; PESSOA, M. C. P. Y.; NEVES, M. C. **Emissão de gases de efeito estufa provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil**: EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, 1999;

MERCHANT, R. E., ANDRE C. A., SICA D. A. **Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension**. Journal of medicinal food, v.5, n 3, p.141-152, 2002;

MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na sub-área de Bioprocessos em Alimentos. Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006;

MOTTA, L. C. & CEREDA, M. P. **Utilização de manipueira da mandioca em digestão anaeróbia**. 119p. Tese (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura,) Faculdade de ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985;

NAGARAJA, P., HEMANTHAK, M. S., YATHIRAJAN, H. S., PRAKASH, J. S. **Novel sensitive spectrophotometric method for the trace determination of cyanide in industrial effluent**. Analytical Sciences. The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. v. 18, p. 1027-1030, 2002;

POLI, C. R., POLI, A. T., ANDRATTA, E., BELTRAME, E. **Aqüicultura Experiências Brasileira**. Florianópolis, SC. Multitarefa Editora Ltda.

PONTE, J. J. **Históricos das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola**. Universidade Federal do Ceará. Fitopatologia, Venez. 5 (1): 2-5, 1992;

RADMANN E., SANTOS, G. C., CALHEIROS M. N., CERQUEIRA U.S. **Produção e extração de ácidos graxos a partir de microalgas**. Projeto apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2004;

RAVEN, P. R.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996;

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

RENAUD, S.; LUONG – VAN, T.; LAMBRINIDIS, P. **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures**. Aquaculture, v. 211: p.195-214, 2002;

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press.

SAKAI, N.; SAKAMOTO, Y.; KISHIMOTO, N.; CHIHARA, M.; KARUBE, I. ***Chlorella* strains from hot spring tolerant to high temperature and high CO₂**. Energ Convers Manage. 16, 693 – 696, 1995;

SATO T., USUI, S., TSUCHIYA, Y., KONDO, Y. **Invention of Outdoor Closed Type Photobioreactor for Microalgae**. Department of Environmental Studies, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8656, Japan, 2005;

SEAB. **Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov.br/>> Acesso em: 13/08/2009;

SMITH, G. M. **Botânica Criptogâmica: Algas e Fungos**, Fundação Calouste Gulbenkian, 4^a ed., v.1, 1955;

SOUTH, G.R.; HITTICK, A. **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific, p. 341, 1987;

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN, E., ISAMBERT, A. **Comercial Applications of Microalgae**. Journal of Bioscience And Bioengineering, p. 87 – 96, 2005;

Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p.5: 15-16 (Method 5220 B);

Standard methods for the examination of water and wastewater. 21th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p.5: 2-7 (Method 5210 B);

STURM, W.; DERGINT, D. E. A.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; MAGALHÃES, D. C. N. V.; SOCCOL, C.R.; Pandey, A. **Informatics in Solid-state Fermentation**. Current Developments in Solid-state Fermentation, New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008;

SUNG, K.D.; LEE, J.S.; PARK, S.C.; CHOI, M.J. **CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics**: Bioresource Technology, p. 269 - 273, 1999;

Supervisório Laquis 3.0. Disponível em: <http://www.lcds.com.br/laquis.asp> 2009;

TAKAHASHI M.; GONÇALO S. **A cultura da mandioca**, Paranavaí: Olímpica, p. 116, II ed., 2005;

TREDICI. M. R. **Mass production of microalgae: photobioreactors**. In: RICHMOND, A. (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p.178 – 214, 2004;

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;

WATANABE, A. **List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo**. J. Gen. Appl. Microbiol. 6, p.1 – 4, 1960;

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. **Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions**: Biochemical Engineering Journal, 6, p. 87 - 102, 2000;

YUE, L.; CHEN W. **Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae**: Energy Convers Manage, p. 1865 – 1876, 2004;

ANEXO

EXPERIMENTO I

TABELA 19 - EXPERIMENTO I - PROVETA 1 - (100% MEIO MBM – 0% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo Dia	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produz	LN X
16/04/2007	17:58	0:00:00	0,0	1	7,48	27	27,2	27,1	0,225	0,06	0,013	-1,4927
17/04/2007	15:57	21:59:00	0,9	1	6,83	25,3	25,2	25,3	0,238	0,06	0,014	-1,4363
18/04/2007	17:58	48:00:00	2,0	1	7,77	23,2	23,2	23,1	0,254	0,48	0,123	-1,3707
19/04/2007	16:05	70:07:00	2,9	2	7,97	26,4	26,5	26,4	0,459	0,13	0,059	-0,7791
20/04/2007	15:28	93:30:00	3,9	2	7,03	22,3	22,1	22,1	0,524	0,35	0,181	-0,6457
21/04/2007	16:19	118:21:00	4,9	3	7,3	21	21	21	0,817	0,11	0,090	-0,2026
22/04/2007	16:08	142:10:00	5,9	4	7,4	26,5	26,4	26,5	0,917	0,25	0,226	-0,0870
23/04/2007	17:20	167:22:00	7,0	5	7,98	24	24	24	1,237	0,20	0,252	0,2125
24/04/2007	15:00	189:02:00	7,9	7	7,94	28,3	28,2	28,5	1,515	0,06	0,087	0,4156
25/04/2007	15:45	213:47:00	8,9	7	7,54	26,4	26,3	26,3	1,611	-0,02	-0,033	0,4766
26/04/2007	15:46	237:48:00	9,9	7	7,34	27	27	27	1,578	0,13	0,213	0,4562
27/04/2007	17:30	263:32:00	11,0	7	7,89	22	22	22	1,845	0,05	0,092	0,6123
28/04/2007	15:50	285:52:00	11,9	7	7,69	20,6	20,5	20,5	1,935	-0,1C	-0,188	0,6599
29/04/2007	15:36	309:38:00	12,9	7	7,51	23,4	23,4	23,4	1,764	0,07	0,117	0,5678
30/04/2007	18:24	336:26:00	14,0	7	7,54	21	21	21	1,905	#####	DIV/0!	0,6446

TABELA 20 - EXPERIMENTO I - PROVETA 2 - (80% MEIO MBM - 20% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produz	LN X
16/04/2007	18:05	0:00:00	0,0	1	6,79	52,3	52,4	52,3	0,102	0,60	0,06	-2,2794
17/04/2007	16:00	21:55:00	0,9	2	7,33	49,8	49	49,8	0,225	0,31	0,07	-1,4910
18/04/2007	18:23	48:18:00	2,0	2	7,25	36,3	36,4	36,4	0,340	0,36	0,12	-1,0785
19/04/2007	18:00	71:55:00	3,0	3	7,54	34,5	36,3	35,3	0,526	0,37	0,19	-0,6430
20/04/2007	14:24	92:19:00	3,8	4	7,25	33,3	33,4	33,3	0,745	0,22	0,17	-0,2944
21/04/2007	14:27	116:22:00	4,8	5	7,29	31,7	31,9	32,1	0,972	0,03	0,03	-0,0283
22/04/2007	16:06	142:01:00	5,9	5	7,24	30,9	30,8	30,8	1,004	0,19	0,19	0,0038
23/04/2007	16:33	166:28:00	6,9	6	7,23	29,8	30	30	1,238	0,12	0,15	0,2132
24/04/2007	15:30	189:25:00	7,9	7	6,89	30,8	31	31	1,401	-0,03	-0,04	0,3372
25/04/2007	17:32	215:27:00	9,0	7	7,03	32,1	31,9	31,6	1,362	0,09	0,12	0,3092
26/04/2007	16:21	238:16:00	9,9	7	7,69	28,4	29,5	29,2	1,484	0,03	0,04	0,3945
27/04/2007	16:10	262:05:00	10,9	7	7,29	28,2	28,2	28,2	1,522	0,16	0,24	0,4197
28/04/2007	15:00	284:55:00	11,9	8	7,84	27,3	27,2	27,4	1,787	0,06	0,10	0,5806
29/04/2007	17:22	311:17:00	13,0	8	7,64	24,5	25,4	25,9	1,902	-0,29	-0,56	0,6431
30/04/2007	15:32	333:27:00	13,9	7	7,54	28,7	28,8	28,8	1,496	#DIV/0!	#DIV/0!	0,4025

TABELA 21 - EXPERIMENTO I PROVETA 3 - (60% MEIO MBM - 40% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/4/2007	18:07	0:00:00	0,0	1	6,59	43	43	43	0,139	0,10	0,01	-1,9741
17/4/2007	16:01	21:54:00	0,9	1	7,21	39,8	39,7	39,7	0,154	0,55	0,08	-1,8735
18/4/2007	18:25	48:18:00	2,0	2	7,03	32	31,9	32	0,388	0,35	0,13	-0,9466
19/4/2007	18:02	71:55:00	3,0	3	6,59	31,9	31,8	31	0,589	0,02	0,01	-0,5291
20/4/2007	16:26	94:19:00	3,9	3	6,68	30,9	31	31	0,600	0,36	0,22	-0,5111
21/4/2007	14:29	116:22:00	4,8	4	7,03	27,1	27,3	27	0,898	0,19	0,17	-0,1074
22/4/2007	16:07	142:00:00	5,9	5	7,52	27	26,9	27	1,128	0,25	0,28	0,12079
23/4/2007	16:35	166:28:00	6,9	7	7,64	28,5	28,5	28,2	1,512	-0,14	-0,21	0,41364
24/4/2007	15:32	189:25:00	7,9	6	7,35	25,8	27,6	28,9	1,335	-0,04	-0,05	0,28887
25/4/2007	17:33	215:26:00	9,0	6	7,2	29,5	30	27	1,279	0,12	0,15	0,24636
26/4/2007	16:23	238:16:00	9,9	7	6,69	30,1	29,9	30	1,441	0,04	0,06	0,3653
27/4/2007	16:12	262:05:00	10,9	7	7,21	28,4	28,9	28,4	1,505	-0,02	-0,04	0,40859
28/4/2007	15:02	284:55:00	11,9	7	7,13	28,5	29,4	30	1,472	0,02	0,03	0,38641
29/4/2007	17:24	311:17:00	13,0	7	7,15	28,2	28,5	29	1,505	-0,09	-0,13	0,40859
30/4/2007	15:34	333:27:00	13,9	7	7,2	31,3	31,2	31,1	1,390	#DIV/0!	#DIV/0!	0,32921

TABELA 22 - EXPERIMENTO I - PROVETA 4 – (40% MEIO MBM - 60% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/04/2007	18:09	0:00:00	0,0	1	7,11	45,5	45,6	45,5	0,128	0,06	0,01	-2,0539
17/04/2007	16:02	21:53:00	0,9	1	7,15	43,9	43,8	43,8	0,135	0,48	0,06	-2,0001
18/04/2007	18:25	48:16:00	2,0	2	7,25	42,2	42,3	42,2	0,284	0,01	0,00	-1,2571
19/04/2007	18:04	71:55:00	3,0	2	7,84	41,8	41,9	41,9	0,288	0,63	0,18	-1,2458
20/04/2007	14:28	92:19:00	3,8	3	7,65	29,9	29,8	30	0,619	0,24	0,15	-0,4790
21/04/2007	15:57	117:48:00	4,9	4	7,15	29,5	29,6	29,4	0,836	0,20	0,17	-0,1792
22/04/2007	16:09	142:00:00	5,9	5	5,89	29,5	29,6	29,4	1,045	0,00	0,00	0,0439
23/04/2007	16:38	166:29:00	6,9	5	6,98	29,4	29,3	29,4	1,049	0,21	0,22	0,0479
24/04/2007	15:34	189:25:00	7,9	6	6,57	28	27,9	28	1,313	0,01	0,01	0,2726
25/04/2007	17:34	215:25:00	9,0	6	7,48	27,7	27,6	27,7	1,325	0,16	0,21	0,2818
26/04/2007	16:25	238:16:00	9,9	7	7,3	27,3	27,5	27,3	1,561	0,01	0,02	0,4450
27/04/2007	16:13	262:04:00	10,9	7	6,2	26,9	27,2	27	1,577	-0,05	-0,08	0,4552
28/04/2007	15:04	284:55:00	11,9	7	6,24	28,6	28,6	28,5	1,505	0,01	0,02	0,4086
29/04/2007	17:26	311:17:00	13,0	7	6,68	28,1	27,9	28,1	1,529	-0,05	-0,07	0,4248
30/04/2007	15:36	333:27:00	13,9	7	6,07	29,3	29,5	29,4	1,467	#DIV/0!	#DIV/0!	0,3834

TABELA 23 - EXPERIMENTO I - PROVETA 5 - (20% MEIO MBM - 80% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/04/2007	18:12	0:00:00	0,0	1	7,08	42,2	42,3	42,3	0,142	0,28	0,04	-1,9513
17/04/2007	16:07	21:55:00	0,9	1	7,41	32,5	32,6	32,5	0,191	0,47	0,09	-1,6567
18/04/2007	18:29	48:17:00	2,0	2	6,79	31,5	31,2	32	0,393	0,07	0,03	-0,9346
19/04/2007	18:05	71:53:00	3,0	2	6,86	29,2	29,1	29,2	0,422	0,02	0,01	-0,8623
20/04/2007	14:30	92:18:00	3,8	2	6,92	29	28,6	28,3	0,429	0,35	0,15	-0,8462
21/04/2007	14:32	116:20:00	4,8	3	7,44	27,5	26,5	28,9	0,663	-0,02	-0,01	-0,4104
22/04/2007	16:10	141:58:00	5,9	3	6,93	28,2	28,4	28,4	0,649	0,04	0,03	-0,4316
23/04/2007	16:40	166:28:00	6,9	3	7,03	26,6	26,9	26,9	0,680	0,24	0,16	-0,3849
24/04/2007	17:36	191:24:00	8,0	4	7,03	26,9	26,8	26,9	0,905	0,09	0,08	-0,0993
25/04/2007	17:36	215:24:00	9,0	5	6,43	31,3	31,2	31,2	0,992	0,13	0,12	-0,0083
26/04/2007	16:26	238:14:00	9,9	5	6,54	27,1	27	27	1,126	0,13	0,14	0,1187
27/04/2007	16:14	262:02:00	10,9	6	5,52	29	28,6	28,3	1,287	-0,06	-0,07	0,2524
28/04/2007	15:06	284:54:00	11,9	6	6,36	30,1	30,8	30,1	1,223	0,14	0,17	0,2011
29/04/2007	17:28	311:16:00	13,0	6	7,55	25	25	24,9	1,440	-0,11	-0,16	0,3647
30/04/2007	15:38	333:26:00	13,9	6	7,16	28	28,2	28,3	1,305	#DIV/0!	#DIV/0!	0,2666

TABELA 24 - EXPERIMENTO I - PROVETA 6 - (0% MEIO MBM - 100% MANIPUEIRA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/04/2007	18:12	0:00:00	0,0	1	7,07	48,3	48,4	48,4	0,117	0,16	0,02	-2,1455
17/04/2007	16:07	21:55:00	0,9	1	6,51	43,7	43,6	43,5	0,136	0,51	0,07	-1,9928
18/04/2007	18:29	48:17:00	2,0	2	6,71	39,3	39,4	39,3	0,311	0,38	0,12	-1,1682
19/04/2007	18:05	71:53:00	3,0	3	6,72	37,2	37,1	37,3	0,498	-0,36	-0,18	-0,6981
20/04/2007	14:30	92:18:00	3,8	2	6,75	32,5	32,6	32,5	0,382	0,62	0,24	-0,9635
21/04/2007	14:32	116:20:00	4,8	5	7,45	31	31	30,9	1,000	-0,18	-0,18	-0,0003
22/04/2007	16:10	141:58:00	5,9	4	7,03	29,5	29,5	29,4	0,837	0,21	0,17	-0,1782
23/04/2007	16:40	166:28:00	6,9	5	7,15	29,1	29,1	28,9	1,060	0,20	0,22	0,0580
24/04/2007	15:36	189:24:00	7,9	6	7,15	27,9	28	27,9	1,315	0,01	0,01	0,2736
25/04/2007	17:36	215:24:00	9,0	6	7,2	27,5	26,5	28,9	1,327	0,01	0,01	0,2828
26/04/2007	16:26	238:14:00	9,9	6	7,5	27,2	27,4	27,3	1,340	-0,19	-0,25	0,2929
27/04/2007	16:14	262:02:00	10,9	5	7,32	26,9	27	27	1,128	-0,92	-1,04	0,1208
28/04/2007	15:06	284:54:00	11,9	3	7,21	28,9	30,1	33,7	0,601	-0,41	-0,25	-0,5091
29/04/2007	17:28	311:16:00	13,0	2	7,21	30	29,8	29,8	0,413	-1,13	-0,47	-0,8834
30/04/2007	15:38	333:26:00	13,9	1	7,15	31	29,9	31	0,202	#####	#DIV/0!	-1,5997

EXPERIMENTO II

TABELA 25 - EXPERIMENTO II - ERL 1.1 (5% MANIPUEIRA – 90% MEIO MBM - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:00	0:00:00	0,0	3	6,5	27	27	27	0,676	0,01	0,00	-0,3911
12/05/2007	17:10	24:10:00	1,0	3	6,4	26,9	26,7	26,7	0,681	0,01	0,01	-0,3839
13/05/2007	17:30	48:30:00	2,0	3	6,5	26,5	26,5	26,5	0,687	0,01	0,00	-0,3758
14/05/2007	17:05	72:05:00	3,0	3	6,6	26,3	26,3	26,3	0,691	0,26	0,18	-0,3696
15/05/2007	17:12	96:12:00	4,0	4	6,2	25,9	25,8	25,9	0,934	0,00	0,00	-0,0686
16/05/2007	17:18	120:18:00	5,0	4	6,2	25,8	25,7	25,8	0,937	0,21	0,20	-0,0655
17/05/2007	17:25	144:25:00	6,0	5	7	25,4	25,3	25,4	1,185	0,01	0,01	0,1700
18/05/2007	17:29	168:29:00	7,0	5	7,1	25,2	25,2	25,2	1,191	0,24	0,29	0,1751
19/05/2007	17:08	192:08:00	8,0	6	7,2	22,3	22,4	22,4	1,563	0,03	0,04	0,4465
20/05/2007	16:55	239:55:00	10,0	6	6,9	20	20,9	20,9	1,655	-0,05	-0,08	0,5036
21/05/2007	16:45	287:45:00	12,0	6	6,5	23,7	23,6	23,6	1,501	0,09	0,13	0,4063
22/05/2007	17:03	336:03:00	14,0	7	6,5	22,1	22,3	22,2	1,833	0,02	0,03	0,6060
23/05/2007	17:02	384:02:00	16,0	7	6,9	21,3	21,2	21,2	1,891	0,02	0,03	0,6371
24/05/2007	17:28	432:28:00	18,0	8	6,8	24,5	24,5	24,4	1,950	-0,08	-0,16	0,6679
25/05/2007	16:58	479:58:00	20,0	8	6,9	29,3	29,4	29,3	1,680	#DIV/0!	#DIV/0!	0,5189

TABELA 26 - EXPERIMENTO II - ERL 1.2 (5% MANIPUEIRA - 85% MEIO MBM - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:05	0:00:00	0,0	1	6,6	39,8	39,8	39,8	0,153	0,53	0,08	-1,8756
12/05/2007	17:14	24:09:00	1,0	2	6,6	37,5	37,5	37,5	0,329	0,50	0,16	-1,1127
13/05/2007	17:34	48:29:00	2,0	3	6,5	27,5	27,5	27,5	0,666	0,08	0,05	-0,4063
14/05/2007	17:09	72:04:00	3,0	3	6,8	25	25	25	0,719	0,46	0,33	-0,3295
15/05/2007	17:20	96:15:00	4,0	6	6,9	27	27	27	1,353	0,19	0,25	0,3021
16/05/2007	17:25	120:20:00	5,0	7	6,5	25,3	25,3	25,4	1,661	0,19	0,31	0,5075
17/05/2007	17:30	144:25:00	6,0	8	6,5	23	23	23	2,042	-0,03	-0,06	0,7140
18/05/2007	17:38	168:33:00	7,0	8	6,9	23,9	23,8	23,9	1,987	-0,22	-0,45	0,6867
19/05/2007	17:15	192:10:00	8,0	7	7,2	26	26	26	1,627	0,00	0,00	0,4869
20/05/2007	17:04	239:59:00	10,0	7	7,1	25,8	25,9	25,8	1,636	-0,05	-0,08	0,4920
21/05/2007	16:55	287:50:00	12,0	6	6,5	23,8	23,8	23,8	1,493	0,01	0,02	0,4011
22/05/2007	17:09	336:04:00	14,0	6	7,1	23	23	23	1,532	-0,10	-0,15	0,4263
23/05/2007	17:10	384:05:00	16,0	5	6,2	22,9	22,9	22,8	1,282	-0,09	-0,11	0,2482
24/05/2007	17:33	432:28:00	18,0	4	7,3	21	21	21	1,089	-0,01	-0,01	0,0851
25/05/2007	17:02	479:57:00	20,0	4	6,9	21,8	21,8	21,8	1,061	#DIV/0!	#DIV/0!	0,0592

TABELA 27 - EXPERIMENTO II - ERL 1.3 (5% MANIPUEIRA - 75% MEIO MBM - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:09	0:00:00	0,0	1	6,5	27,8	27,8	27,8	0,220	0,51	0,11	-1,5141
12/05/2007	17:15	24:06:00	1,0	2	7,4	27	27	27	0,451	0,33	0,15	-0,7965
13/05/2007	17:38	48:29:00	2,0	3	6,8	26,7	26,7	26,7	0,683	0,34	0,23	-0,3819
14/05/2007	17:11	72:02:00	3,0	4	6,7	23	23	23	1,021	0,01	0,01	0,0209
15/05/2007	17:25	96:16:00	4,0	4	6,8	22,7	22,6	22,5	1,034	0,24	0,25	0,0336
16/05/2007	17:32	120:23:00	5,0	5	6,5	21	21	21	1,361	0,23	0,31	0,3082
17/05/2007	17:34	144:25:00	6,0	7	6,6	23,5	23,4	23,6	1,759	0,05	0,08	0,5647
18/05/2007	17:40	168:31:00	7,0	8	6,8	26,2	26,2	26,2	1,848	0,16	0,30	0,6143
19/05/2007	17:20	192:11:00	8,0	10	7,2	27,8	27,9	27,8	2,198	0,11	0,23	0,7875
20/05/2007	17:10	240:01:00	10,0	12	7,3	26	26	26	2,790	-0,09	-0,26	1,0259
21/05/2007	17:04	287:55:00	12,0	10	7,3	25,6	25,6	25,6	2,354	-0,01	-0,03	0,8559
22/05/2007	17:13	336:04:00	14,0	9	7,2	23	23	23	2,297	0,03	0,06	0,8318
23/05/2007	17:14	384:05:00	16,0	9	7,1	21,3	21,2	21,2	2,431	-0,05	-0,13	0,8884
24/05/2007	17:35	432:26:00	18,0	9	7,1	24,5	24,5	24,4	2,194	0,04	0,08	0,7857
25/05/2007	17:08	479:59:00	20,0	9	6,5	22	22	22	2,372	#DIV/0!	#DIV/0!	0,8637

TABELA 28 - EXPERIMENTO II - ERL 2.1 (10% MANIPUEIRA - 85% MEIO MBM - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:10	0:00:00	0,0	1	7,4	27,5	27,7	27,6	0,221	0,51	0,11	-1,5080
12/05/2007	17:16	24:06:00	1,0	2	6,5	27	27	27	0,451	0,36	0,16	-0,7965
13/05/2007	17:39	48:29:00	2,0	3	6,6	25,3	25,3	25,3	0,713	0,06	0,04	-0,3388
14/05/2007	17:12	72:02:00	3,0	3	6,9	23,2	23,1	23,5	0,759	0,09	0,07	-0,2752
15/05/2007	17:26	96:16:00	4,0	3	7,4	20,2	20,2	20,2	0,838	0,09	0,08	-0,1764
16/05/2007	17:33	120:23:00	5,0	4	6,6	26,3	26,3	26,3	0,921	0,32	0,29	-0,0819
17/05/2007	17:35	144:25:00	6,0	5	6,5	21,1	21,2	21,3	1,352	0,16	0,21	0,3017
18/05/2007	17:41	168:31:00	7,0	7	6,6	26,4	26,5	26,5	1,604	0,13	0,21	0,4726
19/05/2007	17:21	192:11:00	8,0	7	6,5	22	22	22	1,845	-0,13	-0,24	0,6124
20/05/2007	17:11	216:01:00	9,0	7	7,1	25,9	25,8	25,8	1,637	0,09	0,15	0,4931
21/05/2007	17:05	239:55:00	10,0	7	7,3	22,8	22,9	22,8	1,796	-0,06	-0,12	0,5858
22/05/2007	17:14	264:04:00	11,0	6	7,3	20	20	20	1,688	-0,52	-0,88	0,5233
23/05/2007	17:15	288:05:00	12,0	5	7,3	27,5	27,6	27,5	1,109	0,05	0,05	0,1035
24/05/2007	17:36	312:26:00	13,0	5	7,3	26	26	26	1,162	0,02	0,02	0,1504
25/05/2007	17:09	335:59:00	14,0	5	7,3	25,4	25,4	25,4	1,184	#DIV/0!	#DIV/0!	0,1689

TABELA 29 - EXPERIMENTO II - ERL 2.2 (10% MANIPUEIRA - 80% MEIO MBM - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:11	0:00:00	0,0	1	6,35	37,8	37,9	37,8	0,163	0,18	0,03	-1,8159
12/05/2007	17:17	24:06:00	1,0	1	6,91	32,3	32,3	32,3	0,192	1,14	0,22	-1,6497
13/05/2007	17:39	48:28:00	2,0	2	6,65	29,8	29,8	29,7	0,415	0,06	0,02	-0,8804
14/05/2007	17:12	72:01:00	3,0	2	6,95	28	28	28	0,437	0,57	0,25	-0,8270
15/05/2007	17:26	96:15:00	4,0	3	6,44	26,4	26,5	26,5	0,687	0,73	0,50	-0,3747
16/05/2007	17:34	120:23:00	5,0	5	6,62	25,2	25,2	25,2	1,191	0,43	0,51	0,1751
17/05/2007	17:36	144:25:00	6,0	7	6,61	24,6	24,6	24,6	1,699	0,16	0,28	0,5302
18/05/2007	17:42	168:31:00	7,0	8	6,45	24	24	24	1,979	0,00	0,01	0,6825
19/05/2007	17:22	192:11:00	8,0	8	6,54	23,9	23,9	23,9	1,985	-0,11	-0,21	0,6856
20/05/2007	17:12	216:01:00	9,0	7	6,66	23,2	23,2	23,2	1,776	0,00	0,01	0,5742
21/05/2007	17:07	239:56:00	10,0	7	6,96	23,1	23,1	23,1	1,781	-0,14	-0,25	0,5773
22/05/2007	17:15	264:04:00	11,0	6	6,98	23	23	23	1,532	-0,15	-0,23	0,4263
23/05/2007	17:16	288:05:00	12,0	5	6,65	22,5	22,5	22,5	1,297	0,02	0,02	0,2599
24/05/2007	17:37	312:26:00	13,0	5	6,5	22	22	22	1,318	0,01	0,02	0,2759
25/05/2007	17:10	335:59:00	14,0	5	6,5	21,7	21,6	21,6	1,333	0,07	0,10	0,2877

TABELA - 30: EXPERIMENTO II - ERL 2.3 (10% MANIPUEIRA - 70% MEIO MBM - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:12	0:00:00	0,0	1	6,31	38,2	38,1	38,3	0,161	1,01	0,16	-1,8270
12/05/2007	17:19	24:07:00	1,0	2	6,5	38	38	38	0,324	0,01	0,00	-1,1278
13/05/2007	17:41	48:29:00	2,0	2	6,59	37,6	37,6	37,6	0,328	0,77	0,25	-1,1157
14/05/2007	17:14	72:02:00	3,0	3	6,92	32,3	32,3	32,3	0,576	0,10	0,06	-0,5511
15/05/2007	17:26	96:14:00	4,0	3	6,42	29,1	29,1	29,1	0,635	0,41	0,26	-0,4548
16/05/2007	17:36	120:24:00	5,0	4	6,35	27,3	27,1	27,3	0,895	0,58	0,52	-0,1105
17/05/2007	17:38	144:26:00	6,0	6	6,41	25,6	25,4	25,6	1,415	0,17	0,25	0,3471
18/05/2007	17:44	168:32:00	7,0	7	9	25,3	25,3	25,3	1,663	0,01	0,02	0,5085
19/05/2007	17:24	192:12:00	8,0	7	6,37	24,9	24,8	24,8	1,687	-0,06	-0,10	0,5230
20/05/2007	17:14	240:02:00	10,0	6	6,5	24	24	24	1,484	-0,08	-0,12	0,3948
21/05/2007	17:09	287:57:00	12,0	5	6,2	23,8	23,8	23,7	1,246	-0,08	-0,11	0,2198
22/05/2007	17:17	336:05:00	14,0	4	6,3	22,6	22,5	22,6	1,035	-0,11	-0,11	0,0346
23/05/2007	17:18	384:06:00	16,0	3	6,1	21,5	21,4	21,4	0,805	0,01	0,01	-0,2167
24/05/2007	17:39	432:27:00	18,0	3	6	21	21	21	0,817	-0,16	-0,13	-0,2026
25/05/2007	17:13	480:01:00	20,0	2	6,5	20,2	20,2	20,3	0,558	0,05	0,03	-0,5830

TABELA 31 - EXPERIMENTO II - ERL 3.1 (20% MANIPUEIRA - 75% MEIO MBM - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:14	0:00:00	0,0	2	6,31	27,9	27,5	28	0,440	0,00	0,00	-0,8209
12/05/2007	17:21	24:07:00	1,0	2	6,5	27	27	27	0,451	0,46	0,21	-0,7965
13/05/2007	17:43	48:29:00	2,0	4	6,59	25,4	25,4	25,4	0,947	0,07	0,07	-0,0542
14/05/2007	17:16	72:02:00	3,0	4	6,92	23,2	23,2	23,2	1,015	0,47	0,47	0,0145
15/05/2007	17:28	96:14:00	4,0	5	6,42	21	21	21	1,361	0,10	0,13	0,3082
16/05/2007	17:39	120:25:00	5,0	6	6,35	25,1	25,2	25,3	1,430	0,30	0,43	0,3575
17/05/2007	17:41	144:27:00	6,0	6	6,41	21,3	21,3	21,3	1,617	0,00	0,00	0,4808
18/05/2007	17:46	168:32:00	7,0	7	6,39	26,2	26,2	26,2	1,617	0,33	0,53	0,4808
19/05/2007	17:26	192:12:00	8,0	7	6,37	22,9	22,8	22,8	1,796	-0,11	-0,20	0,5858
20/05/2007	17:17	240:03:00	10,0	6	6,5	20,5	20,4	20,3	1,666	-0,22	-0,37	0,5101
21/05/2007	17:12	287:58:00	12,0	6	6,2	27,6	27,6	27,5	1,330	-0,11	-0,14	0,2848
22/05/2007	17:20	336:06:00	14,0	5	6,3	26,8	26,5	26,4	1,142	-0,09	-0,11	0,1330
23/05/2007	17:21	384:07:00	16,0	4	6,1	25,6	25,6	25,6	0,941	-0,08	-0,07	-0,0604
24/05/2007	17:42	432:28:00	18,0	3	6	24,6	24,5	24,5	0,730	0,01	0,01	-0,3150
25/05/2007	17:16	480:02:00	20,0	3	6,5	23	23	23	0,766	0,00	0,00	-0,2668

TABELA 32 : EXPERIMENTO II - ERL 3.2 (20% MANIPUEIRA - 70% MEIO MBM - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:16	0:00:00	0,0	1	6,31	24,2	24,4	24,3	0,245	0,67	0,16	-1,4063
12/05/2007	17:23	24:07:00	1,0	3	6,5	23,5	23,5	23,4	0,755	0,03	0,02	-0,2816
13/05/2007	17:47	48:31:00	2,0	3	6,59	22,3	22,4	22,5	0,781	0,29	0,22	-0,2477
14/05/2007	17:19	72:03:00	3,0	4	6,92	21,1	21,1	21,1	1,085	0,17	0,19	0,0818
15/05/2007	17:31	96:15:00	4,0	5	6,42	22	22	22	1,318	0,29	0,38	0,2759
16/05/2007	17:42	120:26:00	5,0	7	6,35	21,8	21,8	21,7	1,859	0,27	0,50	0,6199
17/05/2007	17:43	144:27:00	6,0	8	6,41	23,5	23,6	2,4	2,536	-0,30	-0,75	0,9308
18/05/2007	17:49	168:33:00	7,0	8	6,39	24,4	24,5	24,3	1,954	-0,16	-0,31	0,6700
19/05/2007	17:29	192:13:00	8,0	8	6,37	29,2	29,2	29,2	1,687	-0,52	-0,88	0,5230
20/05/2007	17:20	216:04:00	9,0	5	6,5	27,5	27,5	27,5	1,110	-0,03	-0,03	0,1045
21/05/2007	17:15	239:59:00	10,0	5	6,2	28,4	28,4	28,4	1,080	-0,20	-0,21	0,0772
22/05/2007	17:23	264:07:00	11,0	4	6,3	27	27	27	0,902	0,02	0,01	-0,1034
23/05/2007	17:23	288:07:00	12,0	4	6,1	26,5	26,5	26,5	0,916	-0,29	-0,26	-0,0881
24/05/2007	17:25	312:09:00	13,0	3	6	25,4	25,4	25,4	0,710	0,07	0,05	-0,3419
25/05/2007	17:19	336:03:00	14,0	3	0,5	23	23	23	0,766	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,2668

TABELA 33 - EXPERIMENTO II - ERL 3.3 (20% MANIPUEIRA - 60% MEIO MBM - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
11/05/2007	17:19	0:00:00	0,0	1	6,31	38,5	38,4	38,5	0,160	0,62	0,10	-1,8350
12/05/2007	17:26	24:07:00	1,0	2	6,5	29,2	29,2	29,2	0,422	0,42	0,18	-0,8633
13/05/2007	17:50	48:31:00	2,0	3	6,59	24,4	24,5	24,3	0,733	0,28	0,20	-0,3108
14/05/2007	17:22	72:03:00	3,0	4	6,92	23,5	23,4	23,4	1,007	0,04	0,04	0,0072
15/05/2007	17:33	96:14:00	4,0	4	6,42	22	22	22,1	1,053	0,22	0,23	0,0517
16/05/2007	17:46	120:27:00	5,0	5	6,35	21,1	21,1	21,2	1,355	0,00	0,01	0,3039
17/05/2007	17:48	144:29:00	6,0	5	6,41	21	21	21	1,361	0,17	0,23	0,3082
18/05/2007	17:52	168:33:00	7,0	6	6,39	20,9	20,9	20,8	1,640	0,26	0,43	0,4949
19/05/2007	17:32	192:13:00	8,0	8	6,37	20,5	20,5	20,6	2,211	-0,06	-0,13	0,7934
20/05/2007	17:25	216:06:00	9,0	8	6,5	22,3	22,3	22,3	2,088	-0,21	-0,43	0,7363
21/05/2007	17:19	240:00:00	10,0	7	6,2	24	24	24	1,731	-0,03	-0,06	0,5490
22/05/2007	17:27	264:08:00	11,0	7	6,3	25,1	25,1	25,1	1,673	-0,22	-0,36	0,5147
23/05/2007	17:28	288:09:00	12,0	6	6,1	26,5	26,5	26,5	1,374	-0,09	-0,12	0,3174
24/05/2007	17:29	312:10:00	13,0	5	6	23,4	23,4	23,4	1,260	0,04	0,05	0,2314
25/05/2007	17:26	336:07:00	14,0	5	6,5	22	22	22	1,318	#DIV/0!	#DIV/0!	0,2759

EXPERIMENTO III

TABELA 34 - EXPERIMENTO III - ERL 1.1 (5% MANIPUEIRA - 90% H2O - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:20	0:00:00	0,0	1	6,47	46,6	46,6	46,5	0,124	0,10	0,01	-2,0870
17/07/2007	16:41	24:21:00	1,0	1	6,1	43,1	43,1	43,2	0,138	0,67	0,09	-1,9783
18/07/2007	16:57	48:37:00	2,0	3	7,69	41,8	42	42,2	0,430	0,50	0,21	-0,8445
19/07/2007	15:46	71:26:00	3,0	4	7,78	30,3	30,2	30,4	0,816	0,16	0,13	-0,2034
20/07/2007	16:15	95:55:00	4,0	5	8,5	32,1	32	31,4	0,974	0,10	0,10	-0,0263
21/07/2007	16:50	120:30:00	5,0	5	8,75	28,2	28,4	28	1,087	0,10	0,11	0,0832
22/07/2007	15:42	143:22:00	6,0	6	8,51	30,5	31,3	31,3	1,197	0,11	0,13	0,1801
23/07/2007	15:08	166:48:00	7,0	7	8,36	32,7	32,4	32	1,342	0,07	0,09	0,2942
24/07/2007	17:13	192:53:00	8,0	7	8,7	29,8	30,2	29,6	1,447	-0,01	-0,01	0,3693
25/07/2007	16:47	240:27:00	10,0	7	8,85	30,4	30	30,2	1,432	-0,08	-0,11	0,3593
26/07/2007	15:59	287:39:00	12,0	6	8,97	31,3	28,7	29,3	1,244	-0,09	-0,12	0,2182
27/07/2007	15:25	335:05:00	14,0	5	8,79	29	29,6	29,6	1,048	-0,01	-0,01	0,0469
28/07/2007	17:00	384:40:00	16,0	5	8,88	30,1	29,8	30,7	1,023	-0,13	-0,13	0,0228
29/07/2007	14:40	430:20:00	17,9	4	8,74	30,4	30,1	30,1	0,818	-0,18	-0,14	-0,2003
30/07/2007	09:38	473:18:00	19,7	3	8,66	30,1	29,7	29,5	0,622	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,4750

TABELA 35 - EXPERIMENTO III - ERL 1.2 (5% MANIPUEIRA- 85% H2O - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:26	0:00:00	0,0	1	5,13	42,3	42,6	42,7	0,141	0,00	0,00	-1,9596
17/07/2007	16:43	24:17:00	1,0	1	5,97	42,6	42,7	42,7	0,140	0,66	0,09	-1,9637
18/07/2007	16:59	48:33:00	2,0	3	7,64	42,3	42,1	42,1	0,428	0,32	0,13	-0,8496
19/07/2007	15:52	71:26:00	3,0	3	7,92	29,5	30,6	30,9	0,611	0,22	0,13	-0,4920
20/07/2007	16:20	95:54:00	4,0	4	8,4	32,2	30,3	31,8	0,789	0,50	0,40	-0,2374
21/07/2007	15:55	119:29:00	5,0	7	8,74	27,6	27,6	27	1,559	0,16	0,25	0,4440
22/07/2007	16:00	143:34:00	6,0	8	8,64	26,6	25,6	25,7	1,862	0,12	0,23	0,6215
23/07/2007	15:11	166:45:00	6,9	10	8,52	29	29,2	29,3	2,111	-0,61	-1,29	0,7471
24/07/2007	17:15	192:49:00	8,0	6	8,96	29,4	29,2	28,6	1,270	0,05	0,06	0,2393
25/07/2007	16:49	240:23:00	10,0	6	9,49	26,2	26	25,8	1,395	-0,18	-0,25	0,3328
26/07/2007	16:01	287:35:00	12,0	5	9,14	29,9	29,8	29,7	1,035	-0,10	-0,11	0,0349
27/07/2007	15:27	335:01:00	14,0	4	9,15	28,5	28,6	28,7	0,859	0,00	0,00	-0,1520
28/07/2007	17:03	384:37:00	16,0	4	9	28,9	29,1	28,4	0,854	-0,02	-0,02	-0,1581
29/07/2007	14:43	430:17:00	17,9	4	8,72	30,3	30,2	30,4	0,816	0,00	0,00	-0,2034
30/07/2007	09:40	473:14:00	19,7	4	8,75	29,4	30,6	30,9	0,816	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,2034

TABELA 36 - EXPERIMENTO III - ERL 1.3 (5% MANIPUEIRA - 75% H2O - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt	LN X
16/07/2007	16:30	0:00:00	0,0	2	5,4	39,1	39,2	39,2	0,313	0,34	0,11	-1,1631
17/07/2007	16:44	24:14:00	1,0	3	6	38,7	38,7	38,7	0,475	0,31	0,15	-0,7435
18/07/2007	16:51	48:21:00	2,0	4	7,6	36	36	36	0,688	0,08	0,06	-0,3743
19/07/2007	15:57	71:27:00	3,0	4	8	33,2	33,3	33,3	0,746	0,29	0,22	-0,2924
20/07/2007	16:21	95:51:00	4,0	5	8,3	29	29	29	1,061	0,30	0,31	0,0590
21/07/2007	16:56	120:26:00	5,0	7	8,7	28,4	28,2	28	1,522	0,16	0,25	0,4197
22/07/2007	16:00	143:30:00	6,0	8	8,7	26,8	27,2	27,1	1,802	-0,02	-0,04	0,5888
23/07/2007	15:14	166:44:00	6,9	9	8,6	31,9	31,1	31,7	1,767	-0,19	-0,33	0,5695
24/07/2007	17:17	192:47:00	8,0	7	9,1	29,2	29,4	29,4	1,470	-0,05	-0,07	0,3854
25/07/2007	16:52	240:22:00	10,0	6	9,4	27,5	27,4	27,1	1,339	-0,06	-0,08	0,2919
26/07/2007	16:04	287:34:00	12,0	6	9,1	31,2	30,4	30,8	1,206	-0,06	-0,07	0,1871
27/07/2007	15:29	334:59:00	14,0	5	9,8	28,4	28	28,2	1,087	-0,14	-0,15	0,0832
28/07/2007	17:06	384:36:00	16,0	4	9,1	28,8	29	29,2	0,849	-0,03	-0,02	-0,1641
29/07/2007	14:44	430:14:00	17,9	4	8,7	30,3	31,2	30,8	0,805	-0,15	-0,12	-0,2174
30/07/2007	09:43	473:13:00	19,7	3	8,7	29,6	29,1	28,9	0,633	#####	#DIV/0!	-0,4579

TABELA 37 - EXPERIMENTO III - ERL 2.1 (10% MANIPUEIRA - 85% H2O - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:32	0:00:00	0,0	1	5,23	43	43,6	43,7	0,137	0,51	0,07	-1,9876
17/07/2007	16:46	24:14:00	1,0	2	4,74	42,6	42,7	42,7	0,281	-0,03	-0,01	-1,2706
18/07/2007	16:59	48:27:00	2,0	2	4,85	43,5	43,5	43,6	0,273	0,53	0,14	-1,2976
19/07/2007	16:36	72:04:00	3,0	3	5,13	32,5	32,8	32,9	0,569	0,30	0,17	-0,5641
20/07/2007	16:24	95:52:00	4,0	4	5,32	30,1	30,8	30,4	0,813	0,27	0,22	-0,2074
21/07/2007	16:59	120:27:00	5,0	5	6,7	26,4	27,2	27,6	1,125	0,20	0,23	0,1177
22/07/2007	16:05	143:33:00	6,0	6	8,01	25,8	25,9	26	1,399	0,00	0,00	0,3358
23/07/2007	15:16	166:44:00	6,9	7	8,01	31	31	31,1	1,397	0,02	0,03	0,3342
24/07/2007	17:19	192:47:00	8,0	7	8,04	29,6	29,6	31,2	1,435	-0,05	-0,07	0,3613
25/07/2007	16:55	240:23:00	10,0	6	8,74	28,3	28,1	28	1,307	-0,11	-0,14	0,2676
26/07/2007	16:06	287:34:00	12,0	6	8,71	34,1	34,6	34,5	1,082	-0,09	-0,09	0,0791
27/07/2007	15:32	335:00:00	14,0	5	9,35	33,4	33,8	33,6	0,924	-0,14	-0,13	-0,0792
28/07/2007	17:07	384:35:00	16,0	4	9,3	34,7	34,7	35	0,713	0,02	0,01	-0,3383
29/07/2007	14:46	430:14:00	17,9	4	8,64	34	33,6	33,7	0,735	-0,22	-0,16	-0,3073
30/07/2007	09:45	473:13:00	19,7	3	8,75	35,6	35,2	34,6	0,529	####	#DIV/0!	-0,6360

TABELA 38 - EXPERIMENTO III - ERL 2.2 (10% MANIPUEIRA - 80% H2O - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:38	0:00:00	0,0	1	5,28	41,9	42,3	42,7	0,142	0,49	0,07	-1,9524
17/07/2007	16:48	24:10:00	1,0	2	5,18	42,3	42,6	42,5	0,282	0,33	0,09	-1,2644
18/07/2007	17:06	48:28:00	2,0	3	5,9	42,2	42,3	42,3	0,426	0,57	0,24	-0,8527
19/07/2007	16:37	71:59:00	3,0	5	6,6	31,8	31,2	32,6	0,973	0,06	0,06	-0,0273
20/07/2007	16:26	95:48:00	4,0	5	7,9	29	30,2	30,2	1,035	0,32	0,34	0,0349
21/07/2007	17:01	120:23:00	5,0	7	8,14	28	27,4	27,4	1,550	0,14	0,21	0,4379
22/07/2007	16:06	143:28:00	6,0	8	8,73	27,4	27,5	27,2	1,784	0,12	0,21	0,5786
23/07/2007	15:21	166:43:00	6,9	10	8,36	31	30,5	30,6	2,016	0,06	0,13	0,7009
24/07/2007	17:20	192:42:00	8,0	11	9,16	31,4	31,6	31,4	2,167	-0,01	-0,03	0,7732
25/07/2007	16:56	240:18:00	10,0	10	8,96	29,3	29	28,9	2,117	-0,13	-0,27	0,7501
26/07/2007	16:08	287:30:00	12,0	9	8,86	33	32,7	33,2	1,695	0,00	0,00	0,5276
27/07/2007	15:36	334:58:00	14,0	8	9,35	29	28,7	29,3	1,697	-0,04	-0,06	0,5290
28/07/2007	17:10	384:32:00	16,0	8	8,94	31,4	31,2	31,6	1,579	-0,05	-0,09	0,4567
29/07/2007	14:49	430:11:00	17,9	7	8,71	29,5	30,5	30,8	1,429	-0,04	-0,06	0,3573
30/07/2007	09:48	473:10:00	19,7	7	8,8	32,6	32,9	32,1	1,335	#DIV/0!	#DIV/0!	0,2892

TABELA 39 - EXPERIMENTO III - ERL 2.3 (10% MANIPUEIRA- 70% H2O - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:41	0:00:00	0,0	1	5,37	44,8	44	45,1	0,132	0,76	0,10	-2,0253
17/07/2007	16:50	24:09:00	1,0	4	5,53	42,2	42,4	42,7	0,565	0,43	0,24	-0,5702
18/07/2007	17:08	48:27:00	2,0	7	5,9	41,8	42	42	1,005	0,27	0,27	0,0049
19/07/2007	16:40	71:59:00	3,0	7	6,61	31,2	32,2	32	1,365	0,05	0,07	0,3112
20/07/2007	16:27	95:46:00	4,0	7	7,95	30,4	29,8	30	1,438	0,18	0,26	0,3633
21/07/2007	17:02	120:21:00	5,0	8	8,2	27,6	27,5	28,2	1,762	0,15	0,26	0,5664
22/07/2007	16:07	143:26:00	6,0	9	8,63	26,9	27	25,7	2,058	0,04	0,08	0,7218
23/07/2007	15:24	166:43:00	6,9	10	8,42	28,5	28,8	28,7	2,143	0,14	0,31	0,7622
24/07/2007	17:22	192:41:00	8,0	12	9,2	29,3	28,8	29,2	2,538	-0,15	-0,38	0,9314
25/07/2007	16:58	240:17:00	10,0	9	9,07	28,4	28	28,2	1,956	-0,03	-0,05	0,6710
26/07/2007	16:11	287:30:00	12,0	9	8,88	29,8	29,9	29,9	1,860	-0,07	-0,13	0,6206
27/07/2007	15:38	334:57:00	14,0	8	9,73	29,9	31,1	30	1,630	-0,08	-0,13	0,4888
28/07/2007	17:13	384:32:00	16,0	7	8,85	30,7	31,1	31,2	1,398	0,01	0,02	0,3352
29/07/2007	14:51	430:10:00	17,9	7	8,68	30,3	29,9	30,3	1,434	-0,02	-0,02	0,3603
30/07/2007	09:50	473:09:00	19,7	7	8,71	31,6	30,9	30,8	1,394	####	#####	0,3322

TABELA 40 - EXPERIMENTO III - ERL 3.1 (20% MANIPUEIRA - 75% H2O - 5% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:44	0:00:00	0,0	2	5,35	47,1	47,2	47,5	0,243	0,14	0,03	-1,4164
17/07/2007	16:51	24:07:00	1,0	2	4,85	42,5	42,6	42,7	0,281	0,50	0,14	-1,2685
18/07/2007	17:09	48:25:00	2,0	4	4,61	41,9	42,4	42,4	0,569	0,42	0,24	-0,5640
19/07/2007	16:43	71:59:00	3,0	5	4,89	31,7	32,2	31,8	0,972	0,33	0,32	-0,0283
20/07/2007	16:29	95:45:00	4,0	7	5,5	30	29,5	30,4	1,442	0,12	0,17	0,3663
21/07/2007	17:04	120:20:00	5,0	7	6,25	25,8	26,2	25,4	1,637	0,26	0,43	0,4931
22/07/2007	16:09	143:25:00	6,0	9	6,5	24,7	24,9	23,9	2,192	-0,08	-0,18	0,7847
23/07/2007	15:27	166:43:00	6,9	9	6,07	27	27,2	26,8	2,029	-0,14	-0,29	0,7076
24/07/2007	17:24	192:40:00	8,0	8	7,85	27,4	27,8	28,2	1,760	-0,07	-0,12	0,5654
25/07/2007	17:00	240:16:00	10,0	7	8,24	27,6	27,5	27,3	1,556	-0,01	-0,02	0,4420
26/07/2007	16:13	287:29:00	12,0	7	8,48	27,4	27,9	29,9	1,512	-0,08	-0,12	0,4136
27/07/2007	15:39	334:55:00	14,0	6	8,53	28,1	28,4	28,1	1,304	-0,24	-0,32	0,2656
28/07/2007	17:15	384:31:00	16,0	4	8,85	28	28,5	28,1	0,869	-0,03	-0,03	-0,1399
29/07/2007	14:53	430:09:00	17,9	4	8,49	30,6	30,2	30,1	0,816	-0,15	-0,12	-0,2034
30/07/2007	09:54	473:10:00	19,7	3	8,78	28,5	28,6	28,9	0,643	#DIV/0!	#DIV/0!	-0,4417

TABELA 41 - EXPERIMENTO III - ERL 3.2 (20% MANIPUEIRA - 70% H2O - 10% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:48	0:00:00	0,0	1	5,51	46,7	46,9	46,9	0,123	0,56	0,07	-2,0956
17/07/2007	16:53	24:05:00	1,0	2	4,8	42,7	42,8	43	0,279	0,50	0,14	-1,2758
18/07/2007	17:11	48:23:00	2,0	4	4,58	42,2	42,4	42,4	0,567	0,27	0,15	-0,5671
19/07/2007	16:45	71:57:00	3,0	4	4,53	32,8	31,8	31,8	0,772	0,38	0,30	-0,2584
20/07/2007	16:31	95:43:00	4,0	6	4,94	29,6	29,6	30	1,245	0,23	0,29	0,2192
21/07/2007	17:06	120:18:00	5,0	7	4,9	25,6	26,2	26,2	1,627	0,04	0,06	0,4869
22/07/2007	16:11	143:23:00	6,0	7	5,21	24,7	24,9	24,8	1,689	0,07	0,11	0,5240
23/07/2007	15:30	166:42:00	6,9	8	4,86	26,9	26,9	27,2	1,804	-0,35	-0,63	0,5898
24/07/2007	17:25	192:37:00	8,0	6	5,96	27,8	28,2	28,4	1,307	0,02	0,03	0,2676
25/07/2007	17:03	240:15:00	10,0	6	6,42	26,8	26,4	26,7	1,368	-0,12	-0,17	0,3133
26/07/2007	16:15	287:27:00	12,0	5	6,52	27,1	27,7	28,6	1,100	-0,12	-0,13	0,0954
27/07/2007	15:41	334:53:00	14,0	4	7,95	27,5	27,9	27,4	0,885	-0,22	-0,19	-0,1217
28/07/2007	17:19	384:31:00	16,0	3	8,72	30	31	30,2	0,610	-0,21	-0,13	-0,4940
29/07/2007	14:54	430:06:00	17,9	2	8,31	28,2	28,2	28,1	0,435	-0,04	-0,02	-0,8320
30/07/2007	09:56	473:08:00	19,7	2	8,88	30,1	31	31,1	0,403	#####	#DIV/0!	-0,9095

TABELA 42 - EXPERIMENTO III - ERL 3.3 (20% MANIPUEIRA - 60% H2O - 20% INÓCULO)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produt.	LN X
16/07/2007	16:50	0:00:00	0,0	2	5,63	46,2	46,8	47	0,247	0,13	0,03	-1,3970
17/07/2007	17:00	24:10:00	1,0	2	5,18	42	42,2	42,2	0,285	0,47	0,13	-1,2541
18/07/2007	17:13	48:23:00	2,0	3	4,54	34,7	34	34,1	0,543	0,30	0,16	-0,6100
19/07/2007	16:48	71:58:00	3,0	4	4,55	32,4	31,8	32	0,774	0,26	0,20	-0,2564
20/07/2007	16:33	95:43:00	4,0	5	5,02	29,6	29,2	29,4	1,048	0,32	0,34	0,0469
21/07/2007	17:08	120:18:00	5,0	7	5,3	27,8	26,6	27,8	1,559	0,34	0,52	0,4440
22/07/2007	16:14	143:24:00	6,0	9	6,21	22,8	23	23	2,302	-0,14	-0,32	0,8339
23/07/2007	15:33	166:43:00	6,9	9	6,36	27,6	26,8	26,8	2,025	-0,12	-0,24	0,7055
24/07/2007	17:27	192:37:00	8,0	8	7,25	27,2	27	27,1	1,798	-0,06	-0,11	0,5867
25/07/2007	17:05	240:15:00	10,0	7	8,14	26,6	26,1	26,3	1,611	-0,11	-0,18	0,4767
26/07/2007	16:17	287:27:00	12,0	6	8,33	27,7	29	27	1,316	-0,14	-0,18	0,2747
27/07/2007	15:43	334:53:00	14,0	5	8,43	29,6	29,5	30,3	1,035	-0,09	-0,09	0,0349
28/07/2007	17:21	384:31:00	16,0	4	8,65	27,9	28,1	28	0,875	-0,21	-0,18	-0,1338
29/07/2007	14:56	430:06:00	17,9	3	8,6	28,8	30,2	29,8	0,625	0,02	0,01	-0,4699
30/07/2007	09:57	473:07:00	19,7	3	8,78	28,3	28,9	28,5	0,645	#####	#DIV/0!	-0,4387

EXPERIMENTO IV

TABELA 43 – EXPERIMENTO IV - PROVETA 1 - (15% MANIPUEIRA - 85% ÁGUA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc (g/L)	μ	Produç	LN X
16/08/2007	15:45	0:00:00	0,0	1	7,69	54,5	54,5	54,1	0,095	0,52	0,05	-2,3511
17/08/2007	15:30	23:45:00	1,0	2	7,3	53,8	53,7	53,8	0,195	0,06	0,01	-1,6365
18/08/2007	16:04	48:19:00	2,0	2	7,4	51,6	52	52	0,208	0,49	0,10	-1,5700
19/08/2007	18:15	74:30:00	3,1	4	7,21	49,9	49,9	50	0,444	0,14	0,06	-0,8112
20/08/2007	17:15	97:30:00	4,1	4	7,77	45,5	45,4	45,5	0,514	0,42	0,22	-0,6654
21/08/2007	15:03	119:18:00	5,0	6	7,46	43,2	43,1	43,2	0,829	0,28	0,23	-0,1875
22/08/2007	16:46	145:01:00	6,0	7	7,5	36,5	36,4	36,5	1,187	0,06	0,07	0,1712
23/08/2007	16:20	168:35:00	7,0	7	8,2	34,6	34,5	34,3	1,260	0,25	0,31	0,2312
24/08/2007	15:30	191:45:00	8,0	8	7,59	29,9	29,8	29,9	1,653	0,09	0,14	0,5028
25/08/2007	17:20	217:35:00	9,1	8	7,48	26,7	26,5	26,8	1,822	-0,07	-0,14	0,5999
26/08/2007	15:50	240:05:00	10,0	7	7,69	24,5	24,6	24,5	1,703	-0,10	-0,16	0,5323
27/08/2007	16:10	264:25:00	11,0	6	7,3	22,5	22,6	22,6	1,553	-0,50	-0,77	0,4400
28/08/2007	15:38	287:53:00	12,0	5	8,2	29,5	29,5	29,4	1,046	-0,08	-0,08	0,0449
29/08/2007	16:40	312:55:00	13,0	5	8,32	31,8	32	32,2	0,969	-0,01	-0,01	-0,0312
30/08/2007	17:00	337:15:00	14,1	5	7,9	32,3	32,3	32,3	0,961	0,26	0,25	-0,0402

TABELA 44 – EXPERIMENTO IV - PROVETA 2 - (20% MANIPUEIRA - 80% ÁGUA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/08/2007	15:47	0:00:00	0,0	1	7,1	35,8	35,6	35,7	0,173	0,52	0,09	-1,7516
17/08/2007	15:32	23:45:00	1,0	2	7	34,7	34,5	34,6	0,359	0,03	0,01	-1,0255
18/08/2007	16:06	48:19:00	2,0	2	7,8	33,9	33,5	33,8	0,368	0,36	0,13	-0,9995
19/08/2007	18:17	74:30:00	3,1	3	7,5	30,9	30,8	30,9	0,602	0,07	0,04	-0,5081
20/08/2007	17:17	97:30:00	4,1	3	8	28,7	28,9	28,5	0,642	0,33	0,21	-0,4428
21/08/2007	15:05	119:18:00	5,0	4	8,1	26,5	26,5	26,5	0,916	0,36	0,33	-0,0881
22/08/2007	16:48	145:01:00	6,0	6	8	23,9	23,8	23,9	1,490	0,36	0,54	0,3990
23/08/2007	16:22	168:35:00	7,0	9	7,3	23	22,9	22,8	2,305	0,01	0,01	0,8350
24/08/2007	15:33	191:46:00	8,0	9	7,4	22,8	22,7	22,7	2,317	-0,11	-0,25	0,8403
25/08/2007	17:22	217:35:00	9,1	8	7,3	22,5	22,4	22,4	2,079	-0,32	-0,66	0,7320
26/08/2007	15:53	240:06:00	10,0	6	7,5	21,9	21,5	21,5	1,600	-0,17	-0,27	0,4700
27/08/2007	16:12	264:25:00	11,0	5	8,1	20,9	20,8	20,8	1,368	-0,01	-0,02	0,3136
28/08/2007	15:39	287:52:00	12,0	5	7,5	21,2	21,3	21,1	1,352	-0,30	-0,40	0,3017
29/08/2007	16:42	312:55:00	13,0	4	7,7	22,5	22,8	22,6	1,033	-0,03	-0,03	0,0325
30/08/2007	17:02	337:15:00	14,1	4	7,9	23,5	23,5	23,6	1,004	-0,60	-0,60	0,0040

TABELA 45 - EXPERIMENTO IV - PROVETA 3 - (25% MANIPUEIRA - 75% ÁGUA)

Data	Hora	Tempo	Tempo (dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/08/2007	15:49	0:00:00	0,0	2	7,11	33,9	33,7	34	0,367	0,03	0,01	-1,0015
17/08/2007	15:34	23:45:00	1,0	2	7,21	32,9	33	33	0,377	0,34	0,13	-0,9755
18/08/2007	16:08	48:19:00	2,0	3	7,52	31,8	32,3	32	0,582	0,06	0,03	-0,5411
19/08/2007	18:19	74:30:00	3,1	3	7,15	29,9	29,8	30	0,620	0,28	0,18	-0,4780
20/08/2007	17:20	97:31:00	4,1	4	7,89	28,8	28,9	29	0,852	0,24	0,21	-0,1601
21/08/2007	15:07	119:18:00	5,0	5	7,65	27,9	28	28	1,092	0,19	0,21	0,0883
22/08/2007	16:50	145:01:00	6,0	6	7,26	26,9	26,5	26	1,379	0,17	0,23	0,3215
23/08/2007	16:23	168:34:00	7,0	7	7,24	25,5	25,4	26	1,653	0,03	0,05	0,5023
24/08/2007	15:34	191:45:00	8,0	7	7,98	24,6	24,5	25	1,699	0,15	0,25	0,5302
25/08/2007	17:23	217:34:00	9,1	8	7,34	23,5	23,4	23	2,017	-0,13	-0,27	0,7014
26/08/2007	15:55	240:06:00	10,0	7	7,28	22,9	22,9	23	1,794	0,07	0,12	0,5847
27/08/2007	16:14	264:25:00	11,0	7	8,1	20,8	20,5	21	1,926	-0,17	-0,32	0,6555
28/08/2007	15:41	287:52:00	12,0	6	8,21	20,5	20,6	21	1,658	-0,06	-0,10	0,5058
29/08/2007	16:44	312:55:00	13,0	6	7,59	22,5	22,4	23	1,558	-0,07	-0,11	0,4433
30/08/2007	17:05	337:16:00	14,1	6	7,54	24,5	24,8	25	1,452	-2,72	-3,96	0,3730

TABELA 46 - EXPERIMENTO IV – PROVETA 4 - (30% MANIPUEIRA - 70% ÁGUA)

Data	Hora	Tempo	Tempo(dia)	Dil	pH	T1(%)	T2(%)	T3(%)	Conc(g/L)	μ	Produç	LN X
16/08/2007	15:50	0:00:00	0,0	2	7,35	30,8	32	31,7	0,394	0,11	0,04	-0,9326
17/08/2007	15:36	23:46:00	1,0	2	7,21	27,4	27,2	28,1	0,443	0,19	0,08	-0,8138
18/08/2007	16:10	48:20:00	2,0	3	7,25	33,9	34	33,9	0,549	0,36	0,20	-0,6000
19/08/2007	18:21	74:31:00	3,1	4	7,51	26,9	27	26,9	0,904	0,25	0,22	-0,1013
20/08/2007	17:22	97:32:00	4,1	5	7,98	25,4	25,6	25,4	1,182	0,20	0,23	0,1669
21/08/2007	15:09	119:19:00	5,0	7	7,56	29,7	29,9	30,6	1,438	0,08	0,11	0,3633
22/08/2007	16:52	145:02:00	6,0	7	7,62	27,2	27,1	27,2	1,570	0,06	0,10	0,4511
23/08/2007	16:25	168:35:00	7,0	8	7,42	29,5	29,3	29,4	1,677	0,02	0,03	0,5169
24/08/2007	15:36	191:46:00	8,0	11	7,89	39,6	38,9	39,8	1,705	0,11	0,20	0,5335
25/08/2007	17:25	217:35:00	9,1	9	7,43	28,5	28,4	28,3	1,944	-0,07	-0,13	0,6650
26/08/2007	15:57	240:07:00	10,0	8	7,82	26,5	26,7	26,4	1,830	-0,07	-0,12	0,6041
27/08/2007	16:16	264:26:00	11,0	7	7,98	24,3	24,5	24,1	1,715	-0,04	-0,06	0,5396
28/08/2007	15:43	287:53:00	12,0	6	8,54	20,5	20,6	20,5	1,658	-0,27	-0,44	0,5058
29/08/2007	16:46	312:56:00	13,0	5	7,59	22,5	22,4	22,5	1,298	-0,07	-0,09	0,2610
30/08/2007	17:08	337:18:00	14,1	5	7,24	24,5	24,8	24,8	1,210	#DIV/0!	#DIV/0!	0,1907