

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL

**PROJETO DE GRADUAÇÃO II**

**HIDROLISE ENZIMÁTICA A PARTIR DE FUNGOS DO LODO  
ALGÁCEO PRODUZIDO EM UM FOTOBIORREATOR QUE TRATA  
ESGOTO SANITÁRIO**

BRENDA SOSSAI REGANINI

VITÓRIA  
2017

BRENDA SOSSAI REGANINI

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA A PARTIR DE FUNGOS DO LOGO  
ALGÁCEO PRODUZIDO EM UM FOTOBIORREATOR QUE TRATA  
ESGOTO SANITÁRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso (Projeto de Graduação II) apresentado ao Departamento de Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Professor D. Ing. Ricardo Franci Gonçalves

VITÓRIA  
2017

## RESUMO

Uma nova tecnologia para tratamento de esgoto sanitário, voltada para a produção superavitária de energia, encontra-se em desenvolvimento pelo Núcleo Água da UFES em uma estação de tratamento de esgoto localizada na cidade de Vila Velha-ES. O principal foco é maximizar a produção de biogás no sistema de tratamento ampliando a eficiência energética, através da codigestão anaeróbia da matéria orgânica presente no esgoto e na biomassa do lodo algáceo produzido em um sistema de fotobiorreator. A digestão anaeróbia é fortemente limitada pela hidrólise bacteriana da matéria orgânica complexa, como por exemplo, a biomassa algácea, o que limita sobremaneira o desempenho da etapa anaeróbia do sistema. Por isso, implementar alternativas que aumentem a biodegradabilidade anaeróbia deste tipo de substrato carbonáceo é estratégico. Diversos processos de hidrólise têm sido estudados para promover o aumento da produção de energia e geração de diferentes subprodutos. Este projeto tem por objetivo desenvolver a biodegradação da parede celular e de biodisponibilização de constituintes intracelulares das algas produzidas no fotobiorreator através de hidrólise biológica enzimática à partir de fungos filamentosos. O lodo algáceo mixotrófico coletado através de coagulação – floculação – decantação, e desaguamento apresentou uma concentração média de sólidos totais de 40 g/L e 86% de matéria orgânica, e em seguida foram realizadas análises de solubilização desta matéria orgânica (DQO<sub>filtrada</sub>) e carboidratos (açúcar disponível). Como etapa essencial foram selecionados fungos filamentosos que apresentassem potencial enzimático satisfatório para celulase e protease, esses foram encontrados nos isolados de *Mucor sp.* e *Trichoderma koningii*. A eficiência na redução de sólidos foi maior para fixos e voláteis com uso de 20% de extrato enzimático de ambos fungos, a partir de 24 horas de detenção. Já a solubilização da DQO<sub>f</sub> e carboidratos foi mais eficiente para o *Mucor sp.* em 6 horas com 20% de extrato, e para o *Trichoderma koningii* em 12 horas em com uso de 5% de extrato. A partir dos resultados obtidos, verifica-se a necessidade de um substrato puro de microalgas, contribuindo para resultados mais concretos além de estudos para concentrações menores que 5%.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo <i>Raceway</i> – Estação piloto de tratamento de esgoto integrado ao cultivo de microalgas, Araçás, Vila Velha.....	22
Figura 2: Tipos de fotobiorreatores: A) lagoa aberta (Modelo <i>Raceway</i> ); B) fotobiorreator fechado (tubular); C) fotobiorreator fechado (placas planas). ....	23
Figura 3: Planta piloto para geração de biocombustível de microalgas em um fotobiorreator modelo <i>Raceway</i> – Israel.....	31
Figura 4: Pré-tratamentos de microalgas para digestão anaeróbica melhorada: tratamento térmico, hidrólise térmica, ultra-som e hidrólise enzimática. ....	33
Figura 5: Não tratadas (1);Após hidrólise térmica (2); Após ultra-som (3); Após pré-tratamento enzimático (4). Nomenclaturas: Células de <i>S. obliquus</i> (SO); <i>C. sorokiniana</i> (CS); cw = parede celular; N = núcleo, t = thylakoids. ....	34
Figura 6: Representação do crescimento de fungos filamentosos em substâncias sólidas. ....	37
Figura 7: Ação sinérgica das celulasas. ....	43
Figura 8: Esboço de um sistema de tratamento integrado ao sistema de microalgas em fotobiorreatores. ....	46
Figura 9: Esporos de <i>Curvularia sp.</i> - Câmara de Neubauer.....	51
Figura 10: Shaker SL 222 - Incubadora utilizada para os processos de hidrólise enzimática e fermentação submersa, nas condições de 150rpm a 30°C.....	53
Figura 11: Resultado positivo para atividade da enzima amilase em (a) e (b), ambos F11 - <i>Penicillium sp.</i> Resultado positivo para atividade da enzima celulase em (c) F19 - <i>Trichoderma koningii</i> e (d) F17 - <i>Trichoderma sp.</i> Resultado positivo para atividade da enzima lipase em (e) e (f), ambos F10 - <i>Penicillium sp.</i> Resultado positivo para atividade da enzima protease em (g) e (h), ambos F10 - <i>Penicillium sp.</i> ....	59
Figura 12: Gráfico de %redução de sólidos totais (F18). ....	65
Figura 13: Gráfico de %redução de sólidos fixos (F18).....	65
Figura 14: Gráfico de %redução de sólidos voláteis (F18).....	65

Figura 15: Gráfico de %redução de sólidos totais (F19). .....	68
Figura 16: Gráfico de %redução de sólidos fixos (F19).....	68
Figura 17: Gráfico de %redução de sólidos voláteis (F19).....	68
Figura 18: Amostras filtradas após hidrólise ( <i>Mucor sp.</i> ) com 10% de extrato enzimático. ....	70
Figura 19: Gráfico de %DQO filtrada solubilizada para <i>Mucor sp.</i> .....	72
Figura 20: Gráfico de %DQO filtrada solubilizada para <i>Trichoderma koningii</i> ..	73
Figura 21: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 5% de extrato do <i>Mucor sp.</i> .....	76
Figura 22: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 10% de extrato do <i>Mucor sp.</i> .....	77
Figura 23: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 20% de extrato do <i>Mucor sp.</i> .....	77
Figura 24: Gráfico de disponibilidade de carboidrato, <i>Mucor sp.</i> .....	78
Figura 25: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 5% de extrato do <i>Trichoderma koningii</i> . ....	79
Figura 26: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 10% de extrato do <i>Trichoderma koningii</i> . ....	79
Figura 27: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 20% de extrato do <i>Trichoderma koningii</i> . ....	80
Figura 28: Gráfico de disponibilidade de carboidrato, <i>Trichoderma koningii</i> . ...	80

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1: Vantagens e desvantagens do sistema anaeróbio de tratamento de esgoto. ....	16
Quadro 2: Aplicação econômica das microalgas e vias de produção. ....	26
Quadro 3: Classificação internacional das enzimas. ....	40
Quadro 4: Princípio dos métodos de análises laboratoriais. ....	53
Quadro 5: Elenco de fungos - Laboratório de Saneamento UFES. ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição bruta de espécies de microalgas. ....	28
Tabela 2: Composição química e algumas propriedades típicas do lodo de esgotos.....	29
Tabela 3: Produção de logo biológico anaeróbio em reator tipo UASB.....	30
Tabela 4: Caracterização da biomassa adensada (número de amostras: 5). ..	55
Tabela 5: Resultados de índice enzimático resumido. ....	57
Tabela 6: Resultados do índice enzimático para diferentes tempos de incubação (48h, 96h e 144h).....	60
Tabela 7: Caracterização de sólidos das amostras do lodo bruto utilizado em análises do F18. ....	62
Tabela 8: Caracterização de sólidos das amostras do lodo bruto utilizado em análises do F19. ....	62
Tabela 9: Redução de sólidos com 5% de extrato bruto enzimático (F18). ....	63
Tabela 10: Redução de sólidos com 10% de extrato bruto enzimático (F18). .	63
Tabela 11: Redução de sólidos com 20% de extrato bruto enzimático (F18). .	64
Tabela 12: Percentual de redução de sólidos totais (F18). ....	64
Tabela 13: Percentual de redução de sólidos fixos (F18). ....	64
Tabela 14: Percentual de redução de sólidos voláteis (F18).....	64
Tabela 15: Redução de sólidos totais com 5% de extrato bruto enzimático (F19).....	66
Tabela 16: Redução de sólidos totais com 10% de extrato bruto enzimático (F19).....	66
Tabela 17: Redução de sólidos totais com 20% de extrato bruto enzimático (F19).....	66
Tabela 18: Percentual de redução de sólidos totais (F19). ....	67
Tabela 19: Percentual de redução de sólidos fixos (F19). ....	67

Tabela 20: Percentual de redução de sólidos voláteis (F19).....	67
Tabela 21: Resultados de DQO filtrada (mg/L) após hidrólise (F18).....	71
Tabela 22: Resultados de DQO filtrada (mg/L) após hidrólise (F19).....	72
Tabela 23: Resultados de Carboidrato (mg/L) da amostra filtrada após hidrólise (F18).....	76
Tabela 24: Resultados de Carboidrato (mg/L) da amostra filtrada após hidrólise (F19).....	78



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral .....	12
2.2. Objetivos Específicos .....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
3.1. Sistema De Tratamento De Esgoto.....	13
3.1.1. Tratamento Anaeróbio .....	14
3.1.2. Tratamento integrado ao cultivo de microalgas .....	19
3.1.1. Cultivo de microalgas no sistema de tratamento integrado .....	24
3.2. Biomassa Algácea.....	26
3.2.1. Microalgas .....	26
3.2.1. Características do lodo algáceo.....	29
3.3. Processo Hidrolítico de conversão da Biomassa .....	31
3.3.1. Hidrólise Enzimática .....	32
3.4. Fungos Filamentosos .....	36
3.4.1. Caracterização dos fungos filamentosos .....	36
3.4.2. Enzimas fúngicas.....	39
3.4.3. Potencial enzimático dos fungos filamentosos .....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
4.1. Informações Preliminares.....	46
4.2. Isolamento e detecção de Fungos Filamentosos .....	48
4.3. Avaliação do Potencial Enzimático dos Fungos Filamentos .....	48
4.4. Produção do Extrato Bruto Enzimático.....	50
4.4.1. Fermentação submersa .....	50
4.4.2. Obtenção do inóculo de suspensão de esporos .....	51

4.5. Hidrólise Enzimática.....	52
4.6. Análise de solubilização da Biomassa do Lodo Algáceo.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
5.1. Caracterização da Biomassa do Lodo Algáceo.....	55
5.1.1. Fungos filamentosos isolados .....	55
5.1.2. Seleção de fungos filamentosos .....	57
5.1.3. Discussão .....	61
5.2. Redução da Concentração de Sólidos .....	62
5.2.1. <i>Mucor</i> sp.....	63
5.2.2. <i>Trichoderma koningii</i> .....	66
5.2.3. Discussão .....	69
5.3. Solubilização da Matéria Orgânica (DQO) .....	71
5.3.1. <i>Mucor</i> sp.....	71
5.3.2. <i>Trichoderma koningii</i> .....	72
5.3.3. Discursão .....	73
5.4. Solubilização da Matéria Orgânica (Carboidrato).....	76
5.4.1. <i>Mucor</i> sp.....	76
5.4.2. <i>Trichoderma koningii</i> .....	78
5.4.3. Discussão .....	81
6. CONCLUSÃO E OBSERVAÇÕES .....	83
7. FINANCIAMENTO .....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

A população mundial teve seu crescimento rápido e desordenado, o que resultou em aglomerações sem infraestrutura e serviços públicos de qualidade. Por isso, grande parte das cidades do Brasil ainda lança esgoto sanitário diretamente nos corpos d'água, causando grande impacto ao corpo receptor, e desequilíbrio a ecologia local, colocando em risco também a saúde humana (CHO *et al.*, 2013).

A intensificação dos despejos de efluentes domésticos e industriais nos corpos d'água com elevadas concentrações de nutrientes provoca aceleração da produtividade de microalgas, alterando a ecologia do sistema aquático. A maior presença dessas apresenta grande risco à saúde, pois são organismos produtores de toxinas e podem causar transferência de patógenos (CHO *et al.*, 2013). Visto isso, diversos autores têm estudado meios de reduzir a presença de microalgas em corpos d'água através de diferentes tipos de processos de tratamento de esgoto.

Assim, um grande esforço deve ser empreendido pelo país no sentido de reverter o déficit do sistema de esgotamento sanitário, com a construção de redes coletoras e de estações de tratamento. Não obstante, uma especial atenção deve ser dada às tecnologias de tratamento, tendo em vista que muitas delas exercem elevado consumo de energia e podem comprometer a segurança energética de uma determinada região.

O Núcleo Água do Departamento de Engenharia Ambiental da UFES, nesse sentido, desde 2007 vem desenvolvendo uma nova tecnologia de tratamento de esgoto com o intuito de tornar as estações de tratamento superavitárias em energia. O sistema em desenvolvimento compreende a associação em série de um reator UASB e um fotobiorreator, objetivando aproveitar a biomassa algácea produzida nesse último para produzir mais biogás no UASB.

As espécies de microalgas utilizadas para o tratamento de esgoto podem variar significativamente em seu valor nutricional, dependendo de suas condições de cultivo. Estudos mostram que sistemas abertos de tratamento de esgoto, como

as lagoas de alta taxa, favorecendo o crescimento da biomassa algácea e consequente produção de lipídeos (CHEIRSILP *et al.*, 2012). Já os sistemas de fotobiorreatores fechados são considerados mais complexos quando comparados aos cultivos abertos, porém permitem maior controle das condições de operação, maximizando a taxa de produção de biomassa com tempos de coleta menores, além de reduzir as chances de contaminação durante o cultivo (BAHADAR *et al.*, 2013), e aproveitar de forma integral os subprodutos/coprodutos que podem ser gerados para reaproveitamento.

Na tecnologia de tratamento que está sendo desenvolvida no Núcleo Água, a hidrólise do lodo algáceo coletado a partir do efluente do fotobiorreator é uma etapa importante para assegurar a eficiência da codigestão no UASB, como alternativa para aumentar a biodegradabilidade anaeróbia da biomassa algácea, tendo em vista a complexidade deste substrato carbonáceo.

A via alcalina e a via térmica de hidrólise foram estudadas e produziram resultados satisfatórios, que já indicam a necessidade de utilização de elevadas quantidades de reagentes (NaOH) na hidrólise alcalina e de energia na hidrólise térmica. Por isso, o objetivo deste estudo é analisar a via biológica da hidrólise da biomassa algácea como pre-tratamento, a fim de somar ao projeto energia dos processos biológicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a hidrólise enzimática a partir de fungos da biomassa do lodo algáceo produzida em um fotobiorreator, como etapa essencial para incrementar a produção de biogás em uma estação de tratamento de esgoto composta pela associação em série de um UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) e um processo a base de microalgas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Isolar, caracterizar e identificar fungos filamentosos a partir da biomassa do lodo algáceo e outras fontes;
- Avaliar, visando seleção, o potencial enzimático dos fungos filamentosos isolados;
- Otimizar os parâmetros operacionais e definir condições ambientais ideais na produção de extrato bruto enzimático, à partir dos fungos isolados;
- Definir condições ambientais ideais no processo de hidrólise enzimática na biomassa do lodo algáceo, com o uso de enzimas brutas produzidas.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Sistema De Tratamento De Esgoto**

Em estações de tratamento de esgoto procura-se otimizar processos e minimizar custos, para alcançar a maior eficiência possível. Duas formas possíveis são através do tempo de detenção e aumento da eficiência das reações bioquímicas de maneira que a carga orgânica seja reduzida, em tempo e espaço (CAMPOS, 1999).

Campos (1999) afirma também que no Brasil devem ser implantadas tecnologias adequadas à realidade do país, percebendo as vantagens de adotar soluções funcionalmente simples, com processos “mais naturais” e com alta relação custo/benefício, com reatores menos mecanizados sendo mais fáceis de serem construídos e operados, diante das condições ambientais, sociais e econômicas.

A composição média do esgoto sanitário é de 99,9% de água e apenas 0,1% de sólidos (JORDÃO, 1995; BRAGA, 2005), sendo que cerca de 75% desses sólidos, são constituídos de matéria orgânica (NUVOLARI, 2003). Em sua composição são destacados os sólidos suspensos, compostos orgânicos (proteínas: 40% a 60%; carboidratos: 25 a 50%; óleos e graxas: 10%), nutrientes (nitrogênio e fósforo), metais, sólidos dissolvidos inorgânicos, sólidos inertes, sólidos grosseiros, compostos não biodegradáveis, organismos patogênicos e possivelmente contaminantes tóxicos de atividades industriais ou acidentais (CAMPOS, 1999).

Uma das principais exigências no tratamento de águas residuais é a remoção de nutrientes e metais tóxicos para limites aceitáveis antes de sua descarga em corpos d'água e/ou reutilização. No entanto a maioria das tecnologias convencionais de tratamento de esgotos se baseia em métodos químicos e físicos que não são econômicos para o tratamento de águas residuais agrícolas (CAI, PARK e YEBOLI, 2013), que é um grande responsável por despejos de nutrientes e elementos tóxicos nos corpos d'água em diversas regiões do Brasil.

Para manter uma estação de tratamento é necessário um aporte energético suficiente para seu funcionamento. Os primeiros estudos publicados sobre análise de ciclo de vida, cujo o termo foi definido pela “*World Commission on Environment and Development* (WCED, 1987), em estações de tratamento de esgoto considera-se o uso da eletricidade como maior consumidor de combustíveis fósseis e gerador de gases de efeito estufa, destacando assim a importância de incluir as emissões de CO<sub>2</sub> associadas a produção de energia destes sistemas (COROMINAS *et al.*, 2013; RISCH *et al.*, 2015).

O uso de elevatórias, grades mecanizadas e sistemas de tratamentos aerados nos sistemas convencionais, como o caso de lodos ativados, aumentam a demanda de energia utilizada nas estações, e consequentemente a demanda do uso de água para o funcionamento do sistema como um todo (GONÇALVES, 2009).

Alternativas de aproveitamento energético são ideais na estação. Segundo Von Sperling (2005), o conteúdo orgânico do esgoto doméstico, se digerido em condições anaeróbicas, libera biogás composto de cerca de 70% de metano.

Chernicharo (2007) enfatiza que é possível a avaliação da produção de metano em um reator anaeróbio a partir da determinação de DQO (Demanda Química de Oxigênio) deste reator. Em estudos realizados pelo autor, obteve-se uma produção diária de 120 litros de esgoto por pessoa corresponderia a uma geração de 12 gramas de CH<sub>4</sub>, sendo que a energia liberada na combustão completa do metano é de 889,5 KJ por mol, ou seja, 55,6 kJ.g<sup>-1</sup>.

#### 3.1.1. Tratamento Anaeróbio

A utilização de sistemas anaeróbios de tratamento de esgoto tem sido uma opção tecnológica ao saneamento por serem sistemas capazes de diminuir o potencial poluente de cargas orgânicas, ao mesmo tempo em que produz biogás e gera fonte de reaproveitamento do lodo anaeróbio, como fertilizantes.

Estes possuem vantagens em relação ao tratamento convencional aeróbio, principalmente devido ao menor volume de lodo gerado (1/10 do sistema aeróbico) e maior produção de fonte de energia, como o biogás (CHERNICHARO, 2007).

Dentre os sistemas biológicos de tratamento de esgoto, os Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB) apresentam um grande avanço na aplicação da tecnologia anaeróbia para o tratamento direto de águas residuais (CATUNDA E VAN HAANDEL, 1996; CHERMICHARO, 1997).

No reator UASB, a digestão anaeróbia da biomassa é um processo para estabilização biológica onde microorganismos na ausência de oxigênio promovem a transformação de compostos complexos em compostos mais simples como gás carbônico e metano (CASSINI, 2003). A sua realização é fortemente limitada pela sua etapa inicial, que vem a ser a hidrólise bacteriana da matéria orgânica complexa, o que limita sobremaneira o processo como um todo.

A formação de metano é desejável nos reatores anaeróbios, uma vez que a matéria orgânica é efetivamente removida da fase líquida, pois o metano apresenta baixa solubilidade em água. Assim, a conversão dos compostos orgânicos em metano é eficaz na remoção de material orgânico. Dessa forma, há uma tendência do uso de reator anaeróbio como principal unidade de tratamento biológico de esgoto, devido a capacidade de remoção constatada em torno de 70% do material orgânico, sem perda de energia ou adição de substâncias químicas auxiliares (CAMPOS, 1999).

O efluente do UASB apresenta quantidades consideráveis de nutrientes, nitrogênio e fósforo que podem ser utilizados pelas algas em seus metabolismos (KRUG *et al.*, 2012). O processo de digestão anaeróbia de microalgas é um dos métodos utilizados para produção de energia, com produção de biogás durante sua digestão. Dentre as principais vantagens da digestão anaeróbica para recuperação desta energia algácea se destaca o fato das microalgas coletadas do sistema de cultura poderem ser utilizadas



diretamente como substrato e este método se aplicar a microalgas coletadas de diversos ambientes naturais (CHO *et al.*, 2013). Portanto, nutrientes presentes no efluente UASB são importantes para o desenvolvimento das microalgas, quando se tem o objetivo com fins de aproveitamento energético.

O sistema anaeróbio possui vantagens energéticas por ser uma possível rede produtora de energia, desconsiderando a eletricidade ou combustível mineral para seu funcionamento, bem como gera combustível renovável de alta qualidade em forma de biogás (AIYUK *et al.*, 2006).

As vantagens e desvantagens amplamente reconhecidas dessa concepção de sistemas de tratamento, estão descritas no Quadro 1:

Quadro 1: Vantagens e desvantagens do sistema anaeróbio de tratamento de esgoto.

Vantagens	Desvantagens
a) Baixo consumo de energia.	a) Longo período de partida do sistema se não há possibilidade de inóculo adequado.
b) Menor produção de lodo de excesso e, portanto, economia considerável no manejo e destino final desse tipo de resíduos.	b) Sensibilidade do processo a mudanças das condições ambientais (pH, temperatura, sobrecargas orgânicas e hidráulicas).
c) Possibilidade de recuperação e utilização do gás metano como biocombustível.	c) Possível emissão de odores desagradáveis.
d) Possibilidade de bom funcionamento, mesmo após de longos períodos de interrupção.	

FONTE: Adaptado de CAMPOS, 1999.

Vê-se que o processo anaeróbio, geralmente por meio de reatores UASB, apresenta inúmeras vantagens em relação aos processos aeróbios convencionais, notadamente quando aplicado em locais de clima quente, como é o caso da maioria dos municípios brasileiros.

A fim de auxiliar o processo de digestão anaeróbia, processos de hidrólise alcalina são utilizados a partir de produção de energia através da lise celular

algácea e geração de subprodutos como bio-metano, bio-etanol, bio-hidrogênio, biodiesel, etc. (XUAN *et al.*, 2009).

Os pré-tratamentos térmicos, mecânicos e termoquímicos estão entre os métodos mais estudados para melhorar o desempenho da digestão anaeróbica de microalgas (PASSOSet *al.*, 2014). Esses métodos são usados para perturbar ou enfraquecer a estrutura da parede celular da microalga, melhorando a biodisponibilidade das macromoléculas e a biodegradabilidade no reator.

No entanto, alguns métodos térmicos e mais mecânicos são energeticamente desequilibrados e desvantajosos, quando a energia consumida no passo de pré-tratamento não é compensada pelo ganho de biogás sem desidratação de biomassa (PASSOSet *al.*, 2014). Desta forma, pesquisas sobre produção de biogás a partir de microalgas devem se concentrar em tecnologias com baixa demanda de energia, como opção os pré-tratamentos biológicos.

Métodos biológicos operam em condições suaves, onde a parede celular das microalgas é degradada enzimaticamente ao invés de ser interrompida como em técnicas mecânicas abruptas de ruptura (GÜNERKEN *et al.*, 2015).

Estudos realizados mostram que o uso de reator anaeróbio no tratamento de esgotos sanitários alcança cerca de 25% a 35% da DQO removida foi recuperada como metano no efluente gasoso. Deve-se considerar também que cerca de 70% desse metano produzido provém do acetato e o restante do  $H_2/CO_2$ . Portanto, é vital que o lodo anaeróbio apresente atividade metanogênica acetoclástica (CAMPOS, 1999).

Segundo estudos e documentos da Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR (2010), o biogás produzido em biodigestor é constituído por outros gases, além do metano ( $CH_4$ ), combustível para a produção de energia. Quanto mais purificado o biogás, melhor será sua eficiência de combustão.

Existem importantes fatores que influenciam a atividade anaeróbia e o desempenho do processo em águas residuárias, segundo CAMPOS (1999) são eles:

- **Temperatura**

Fator que causa interferências no processo de diversas maneiras. Os principais efeitos incluem as alterações na velocidade do metabolismo das bactérias, no equilíbrio iônico e na solubilização dos substratos, principalmente de lipídeos. Reatores anaeróbios de alta taxa, apenas serão economicamente viáveis se o aquecimento for dispensável, ou seja, quando o líquido se mantém acima de 20°C. Abaixo dessa temperatura, a solubilização de gorduras, do material particulado e de polímeros orgânicos é lenta. A velocidade de utilização do substrato configura-se em melhor escala para temperaturas em torno de 35°C, entretanto deve-se levar em consideração a concentração de microorganismo ativos no reator, portanto a velocidade de remoção pode ser atingida a diferentes temperaturas, mantendo-se concentrações elevadas de microorganismo.

- **Carga de Nutrientes**

Nitrogênio (N) e Fósforo (P) são essenciais para os processos biológicos e os esgotos sanitários típicos apresentam esses macronutrientes. A quantidade de N e P em relação a matéria orgânica presente, depende da capacidade dos microorganismos de obter energia pela síntese à partir das reações bioquímicas de oxidação do substrato, portanto a baixa velocidade de crescimento de organismos anaeróbios, comparado aos aeróbios, resulta em menor carga de nutrientes. Admite-se que a relação DQO:N:P de 500:5:1 é suficiente para atender às necessidades de macronutrientes dos organismos anaeróbios, segundo Speece (1996). Além do P e N, o enxofre (S) é também considerado um dos nutrientes essenciais para a metanogênese, e sua concentração é da mesma ordem de grandeza ou levemente superior à de P. Em muitos casos, será necessário aplicar um pós-tratamento para reduzir a concentração de macronutrientes.

- **pH e Alcalinidade**

Os microorganismos anaeróbios são considerados sensíveis ao pH, ou seja, o crescimento ótimo ocorre em faixas estreitas de pH (SPEECE, 1996), em

reações com ação de bactérias anaeróbias o reator deve operar entre pH 6,5 e 8,2. Speece (1996) também cita que é possível atingir operações satisfatórias com pH 6,0. A própria atividade microbiana pode alterar as condições de pH do meio, o que torna inviável as tentativas de neutralização. Em reatores anaeróbios de alta taxa dificilmente exigirá cuidados com a manutenção do pH na faixa entre 6,5 e 7,5, porque é obtido um valor estável de pH naturalmente na atividade metanogênica, devido a predominância do sistema carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ;  $\text{HCO}_3^-$ ;  $\text{CO}_3^{2-}$ ) nesses efluentes.

- **Atividade Metanogênica**

A eficiência do processo de digestão anaeróbia depende da atividade metanogênica do lodo, ou seja, a capacidade de transformar acetato e  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  em  $\text{CH}_4$ , havendo relação estequiométrica entre a quantidade de metano e de fração de matéria orgânica removida, expressa em quantitativo de DQO. Admite-se que a concentração de biomassa no reator tem relação com a concentração de sólidos voláteis em suspensão (SSV). A atividade metanogênica do lodo pode ser obtida por meio da relação entre a quantidade de DQO convertida em metano, por unidade de tempo e a concentração de SSV.

### 3.1.2. Tratamento integrado ao cultivo de microalgas

Como alternativa de pós-tratamento para o efluente do UASB, podemos citar as lagoas de estabilização, caracterizada por ser uma tecnologia favorável e de baixo índice de mecanização. Tem como principal objetivo a remoção complementar da carga orgânica, podendo acrescentar, em alguns momentos, a remoção de nutrientes e patógenos (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

Pesquisas indicam que o sistema UASB associado à lagoa de estabilização é uma maneira eficiente para remoção da matéria orgânica, entretanto podem apresentar elevada concentração de sólidos em suspensão (SS), ocasionada pela expressiva presença de microalgas no efluente final.

As microalgas são importantes em lagoas facultativas nas estações de tratamento de esgoto, pois são responsáveis pelo fornecimento de oxigênio para as bactérias decompositoras de matéria orgânica, porém, segundo Cavalcanti *et al.* (2001), este oxigênio, em geral, não é utilizado para oxidação de material celular das algas, mas, sim, para oxidar o material orgânico de natureza fecal presente no esgoto.

A concentração de microalgas em lagoas depende da quantidade de nutrientes, temperatura e luminosidade disponíveis, mas usualmente está quantificada na faixa de 500 a 2000 µg/L de clorofila-a, segundo Mara (1987) citado por Abdel-Raouf *et al.*, (2012). Sabe-se que a variação de concentração/produção de microalgas também é ocasionada pela influência da estação do ano, do clima, da latitude e da qualidade do esgoto injetado na lagoa.

A elevada concentração de nutrientes no efluente sanitário, especialmente nitrogênio e fósforo nos ecossistemas aquáticos, são capazes de aumentar significativamente a produtividade primária do corpo hídrico, ocasionando a eutrofização (TOMAZ, 2006) e a reprodução excessiva de algas. Isto reduz a qualidade das águas disponíveis, provoca sérios problemas no seu uso, principalmente, para o abastecimento público (CHORUS E BARTRAM, 1999), pois podem causar efeitos nocivos para a biota e também para o homem, especialmente quando predominar espécies de algas que produzem toxinas.

O fósforo é o elemento limitante para o crescimento de algas. A intensificação de atividades humanas, como o uso de fertilizantes agrícolas, despejos industriais e os lançamentos de efluentes domésticos têm promovido a eutrofização de corpos d'água (SIRQUEIRA e OLIVEIRA FILHO, 2005; SMITH e SCHINDLER, 2009), devido ao despejo descontrolado de nutrientes, principalmente o fósforo presente nos componentes químicos.

O efluente dos reatores UASB apresenta quantidades consideráveis de nutrientes, nitrogênio e fósforo, que poderão ser utilizados por organismos fotossintetizantes em seus metabolismos (KRUG *et al.*, 2012). Sistemas integrados de tratamento de esgoto sanitário que utilizam reatores UASB

seguidos de processos com microalgas podem contribuir significativamente para economia de energia e ciclagem de nutrientes.

Com a exigência de padrões de qualidade para efluentes cada vez mais restritivos, impõe a necessidade de polimento do efluente nas lagoas de estabilização facultativas, principalmente no que diz respeito à remoção de nutrientes e algas (MIDDLEBROOKS apud OLIVEIRA e GONÇALVES, 1999). Além disso, existe interesse estratégico na recuperação da biomassa algácea produzida na lagoa, tendo como foco a sua valorização energética através da produção de biocombustíveis como o biogás e biodiesel (PARK *et al.*, 2011; SCHENK *et al.*, 2008). Quando o suprimento de nutrientes é realizado por injeção de fontes externas, ocasiona um acréscimo significativo no custo operacional dos sistemas de cultivo algáceo, reduzindo a eficiência do ciclo de vida ambiental no que se refere ao aproveitamento de energia, ao consumo de matéria prima, e à emissão de gases de efeito estufa (LARDON *et al.*, 2009).

Visto isso, é interessante o aproveitamento dos nutrientes presentes na estação de tratamento para aumentar a produção de microalgas, dessa forma, essas também poderão ser melhor aproveitadas energeticamente para produção de biocombustível.

A fim de reduzir a demanda de energia e, conseqüentemente, o custo energético deste sistema integrado, o biogás gerado no reator UASB pode ser queimado e incorporado ao sistema de microalgas como suplementação de CO<sub>2</sub>, aprimorando o processo de fotossíntese (KADAM *et al.*, 1997), além de gerar maior produção de biomassa para produção de bioenergia.

Para sistemas integrados, são utilizadas diferentes estruturas de cultivo de microalgas pelo efluente anaeróbio, destacando-se os fotobiorreatores fechados e os sistemas abertos.

- FOTOBIORREACTORES

O sistema de fotobiorreator fechado é considerado mais complexo em comparação ao cultivo aberto, entretanto permite o maior controle das condições de operação, maximizando a taxa de produção de biomassa com

tempos de coleta menores, além de reduzir as chances de contaminação durante o cultivo, (BAHADAR *et al.*, 2013). Essa é a opção mais viável quando o objetivo é o cultivo de espécies selecionadas e puras, podendo ser instalados ao ar livre para aproveitamento da luz solar e maximização da produção de microalgas.

O cultivo fotoautotrófico de microalgas pode ser realizado em larga escala através de fotobiorreatores abertos (modelo *Raceway*) (Figura 1 e Figura 2A) ou em fotobiorreatores fechados (Figura 2B) (Lam e Lee, 2012; Razzak *et al.*, 2013).

A modelo *Raceway*, tipo mais comum de fotobiorreator aberto, consiste em um canal oval onde o meio de cultivo apresenta fluxo unidirecional, agitado mecanicamente por pás rotativas giratórias (Figura 1).



Figura 1: Modelo *Raceway* – Estação piloto de tratamento de esgoto integrado ao cultivo de microalgas, Araçás, Vila Velha.

Os sistemas fechados apresentam maior eficiência, maior produtividade de biomassa, menores tempos de detenção, alta taxa de superfície/volume e podem ser utilizados para cultivar um maior número de microalgas do que em sistemas abertos (Chisti, 2007), além do cultivo puro e isolado de espécies.

Entretanto nos cultivos em sistemas abertos, os custos são menores que os fotobiorreatores fechados (Harun et al., 2010; Huang, 2010), devido a medidas simples de manutenção mecânica, hidráulica e biológica.

A tecnologia mais difundida no sistema fechado para cultivo são os fotobiorreatores tubulares, que possibilitam maior controle de temperatura, nutrientes e luminosidade dentro do sistema, devido suas dimensões de projeto. Deve ser fornecida uma luminosidade em intensidade, duração e comprimento de onda ideal (GOUVEIA, 2009). A utilização de tubulação transparente para cultivo reduz o efeito de sombreamento interno entre as algas e a penetração de luz se torna mais eficiente, se comparado a sistemas abertos(**Figura 2**) (BOROWITSKA, 1998).

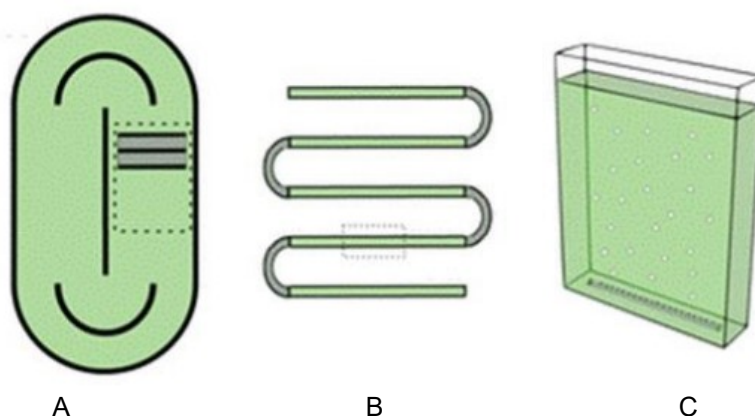


Figura 2: Tipos de fotobiorreatores: A) lagoa aberta (Modelo Raceway); B) fotobiorreator fechado (tubular); C) fotobiorreator fechado (placas planas).

Segundo Yaakob *et al.* (2011), o cultivo de microalgas em lagoas de alta taxa é preferível para o tratamento de efluente secundário, devido à facilidade de manuseio e custo de operação, porém estes sistemas ficam expostos aos fatores ambientais: variação de temperatura, intensidade luminosa e contaminações que prejudicam o crescimento, como a predação e competição entre outras espécies, mesmo localizados em ambientes equatoriais com temperaturas lineares ao longo do ano.



Com o aumento da pressão regulatória para atualizar o tratamento de efluentes a um nível de remoção de nutrientes, as lagoas de alta taxa oferecem a possibilidade de incorporação do P e N na produção de algas (POWELL *et al.*, 2010), produzindo mais biomassa com o intuito de aproveitamento na produção de energias renováveis. Pode também ser destacado o benefício de aproveitamento/consumo do CO<sub>2</sub> pelas algas, ampliando o seu potencial de aplicação em escala real de tratamento para redução de gases efeito estufa.

- SISTEMAS DE LAGOAS

Cultivos em sistemas abertos normalmente se localizam ao ar livre para recebem luz solar direta. Para o tratamento biológico atualmente, utilizam-se sistemas de lagoas de estabilização, são elas: anaeróbia, facultativa, alta taxa e de maturação (CASTILHOS JUNIOR, 2006).

As lagoas de estabilização são bastante indicadas para as condições no Brasil, pela disponibilidade de área, clima favorável (temperatura e insolação elevadas), operação simples e necessidade de pouco ou nenhum equipamento (VON SPERLING, 1996). Segundo Gotardo (2005) os processos bioquímicos e hidrodinâmicos dessas lagoas são influenciados por condições climatológicas como insolação, ventos, temperatura, precipitação e evaporação. A intensidade e duração da radiação solar apresentam-se como fatores primordiais no processo de fotossíntese, parâmetro significativamente favorecido em regiões de clima tropical e subtropical.

### 3.1.1. Cultivo de microalgas no sistema de tratamento integrado

Nos últimos anos diversas pesquisas focaram no cultivo de microalgas em efluentes de tratamento de esgoto, visto que os esgotos sanitários urbanos contêm em média 50 g/m<sup>3</sup> de nitrogênio, sendo que cada m<sup>3</sup> pode contribuir para a formação de 0,5 kg de biomassa para extração de biocombustível (TORRES, 2014).

De acordo com Peccia *et al.* (2013), a quantidade de nitrogênio, tipicamente presente em efluentes de tratamento de esgotos, 15 a 20 mg/L, produziria cerca de 0,2 g/L de microalgas, o que é abaixo do ideal quando cultivado em condições com suplemento de nutrientes, que é em torno de 2 a 10 g/L.

Li *et al.* (2011), em experimentos, cultivaram *Chlorella sp.* em reator circular, em escala de bancada, contendo esgoto filtrado, observando uma produtividade de 0,92 g/L.dia de microalgas. Ainda neste experimento, quando cultivado em batelada, obteve a remoção de 93,9% de amônia, 89,1% de nitrogênio total, 80,1% de fósforo total e 90,8% de DQO. Remoção de nitrogênio e fósforo, pelo tratamento terciário de esgoto, também foi estudado por Martínez *et al.* (2000), utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* resultou na remoção de 100% de amônia e 98% de fósforo.

Segundo Park *et al.* (2011) em lagoas de alta taxa, predadores e contaminantes, como protozoários, rotíferos, insetos, fungos e vírus, podem reduzir a biomassa algácea em até 90%. Abdel-Raouf *et al.* (2012) afirmaram que o cultivo de microalgas em sistemas de tratamento de esgoto inibiu coliformes e removeu metais pesados.

As vantagens do cultivo de microalgas como um recurso de biomassa são, de acordo com Chisti, 2007:

- Microalgas são consideradas como um sistema biológico muito eficiente para transformação de energia luminosa em energia química na forma de compostos orgânicos.
- Apresentam elevada produtividade em mínima área superficial ou volumétrica.
- Muitas espécies de algas podem ser induzidas a produzir concentrações muito elevadas de compostos com valor comercial, como proteínas, carboidratos, lipídios e pigmentos.
- Microalgas apresentam elevadas taxas de crescimento.
- O cultivo de microalgas pode ser realizado a partir de águas salinas, salobras e águas residuárias de esgotos sanitários ou industriais.

- Sistemas de produção de biomassa microalgácea podem ser facilmente adaptados a diferentes níveis de competências operacionais ou tecnológicas.
- Microalgas podem ser cultivadas em diferentes tipos de sistemas.

Entre as diversas aplicações econômicas da biomassa microalgácea, inclui o seu aproveitamento na produção de biocombustíveis seguindo diferentes vias potenciais na Quadro 2:

Quadro 2: Aplicação econômica das microalgas e vias de produção.

Aplicação Econômica da Biomassa de Algas	Via de Produção	Referências
Produção de metano	Fermentação anaeróbia da biomassa	Frigon et al., 2013
Produção de biohidrogênio	Fermentação aeróbia/anaeróbia ou via biológica direta	Chen et al., 2013
Geração de biodiesel	-	Qin, 2005 Kapdan e Kargi, 2006 Chisti, 2007 Yen et al., 2013
Produção de etanol	-	Bahadar e Khan, 2013 Chen et al., 2013
-	Conversão termoquímica da biomassa, pirólise, gaseificação e liquefação termoquímica.	Barreiro et al., 2013 Duan et al., 2013

## 3.2. Biomassa Algácea

### 3.2.1. Microalgas

Microalgas são microrganismos que se desenvolvem em diferentes ambientes (BICUDO, 2005). A maioria das microalgas tem hábito planctônico, embora também haja muitas espécies bentônicas e terrestres (habitando ambientes úmidos). Segundo Lourenço (2006) os termos “fitoplâncton” e “microalgas” são sinônimos.

As cianobactérias comumente estão incluídas no termo “microalgas”, mesmo sendo procariontes, mas por apresentarem características em comum, entre elas, a presença de cloroplastos, portanto possuem atividade fotossintética (LARKUM *et al.*, 2012). Uma mesma espécie de microalgas pode apresentar

perfil de crescimento distinto, de acordo com as condições de cultivo empregadas.

As microalgas apresentam conteúdo lipídico de 1% a 70% podendo alcançar 90%, sobre peso seco em determinadas condições de cultivo (METTING, 1996). Existem fatores que influenciam no acúmulo de lipídios na célula de microalgas como: intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de nitrogênio (YEN *et al.*, 2013). Os carboidratos podem ser encontrados nas microalgas em forma de amido, glicose, açúcares e outros polissacarídeos (SPOLAORE *et al.*, 2006). Bahadar e Khan (2013) afirma que, sob condições normais, as microalgas produzem um valor calórico de 18 a 21 kJ/g.dia.

As características presentes na biomassa de microalgas que influenciam a biodegradabilidade anaeróbica relacionam a sua composição macromolecular, devido a presença de lipídeos, proteínas e carboidratos, assim como a estrutura de sua parede celular (CARRERE *et al.*, 2016).

Segundo Wanget *al.* (1995), a parede celular de microalgas é composta por 25-30% de celulose, 15 - 25% de hemicelulose, 35% de pectina e de 5-10% de glicoproteínas. Gonzalez-Fernandez *et al.* (2015) acrescentam que as características macromoleculares das microalgas também estão relacionadas às condições ambientais, bem como a composição intracelular destas espécies podem ser influenciadas por perturbações ambientais.

Além disso, diversas espécies de microalgas, quando em adequadas condições de cultivo, são capazes de acumular cerca de 50-70% de óleo/lipídeo em seu peso seco (CHISTI, 2007). Estes dois fatores, quando combinados, formam um índice de desempenho para indicar a capacidade de uma microalga no que diz respeito à produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2010). Segue na Tabela 1 algumas características do conteúdo das microalgas:

Tabela 1: Composição bruta de espécies de microalgas.

Espécies	Proteína (%)	Lipídeo (%)	Carboidrato (%)
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Chlamy domonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chorella pyrenoidosa</i>	57	2	26
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Dunaleilla salina</i>	57	6	32
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16
<i>Spirulina plantesis</i>	46-63	4-9	8-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17

FONTE: Adaptado de Becker (2004).

Sabe-se que a maioria das microalgas apresenta parede celular rígida, impedindo uma biodegradabilidade eficiente (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). A ruptura da parede celular é considerada um grande obstáculo para alcançar uma conversão de biogás a partir de microalgas. Portanto, as matérias primas de microalgas necessitam ser pré-tratadas antes da digestão anaeróbica. Neste objetivo, vários estudos mecânicos e termoquímicos foram realizados em estudos específicos na literatura com foco de definirem a maneira mais eficiente de interrupção da parede celular (PASSOS *et al.*, 2013; MENDEZ *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

A parede celular das microalgas é composta por duas partes: uma parte fibrilar (esqueleto) e uma parte amorfa (matriz). O componente fibrilar é formado por celulose, manose e xilenos, o componente amorfo é o local onde a parte fibrilar é submersa (LEE, 2008). Paredes celulares complexas, como as de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, são compostas também por uma camada externa, que pode ser homogênea ou ter uma bainha trilaminar (TLS). A TLS bastante resistente ao processo de degradação anaeróbia, composta por sporopolenina, também chamada de algaenano, um biopolímero tipo lignina, formado a partir de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos (KWIETNIEWSKA e TYS, 2014).

É necessário saber que, é formada uma comunidade mista de microalgas e bactérias, ao lidar com a biomassa de microalgas cultivadas em lagoas abertas para tratamento de águas residuais. Esta biomassa varia em termos de

dinâmica populacional, composição de microalgas e estrutura da parede celular, geralmente rígida, devido às condições variáveis do sistema (PARK *et al.*, 2011; PASSOS *et al.*, 2015a).

A produção de biomassa através da digestão anaeróbica da biomassa de algas está ganhando muito interesse devido ao processamento mínimo requerido neste objetivo de rota produtiva (PRAJAPATI *et al.*, 2013). No entanto, o pré-tratamento de biomassa de algas antes da sua utilização na geração de biocombustíveis (incluindo o biometano) é necessário para uma produção significativa de combustível, com a purificação de espécies presentes.

### 3.2.1. Características do lodo algáceo

Todo sistema de tratamento biológico de água residual gera o lodo na forma de suspensão em flocos. É subdividido de acordo com a natureza e origem dos sólidos em lodo primário – gerado a partir da sedimentação do material particulado do afluente e lodo secundário (ou biológico) – gerado pelo reator biológico (como exemplo o reator anaeróbio) constituindo uma mistura de sólidos não biodegradáveis e massa bacteriana que cresce no reator (Campos, 1999). A Tabela 2 demonstra a composição química e propriedades do lodo de esgotos:

Tabela 2: Composição química e algumas propriedades típicas do lodo de esgotos.

Parâmetro	Lodo Secundário		Lodo Primário digerido	
	Faixa	Típico	Faixa	Típico
Sólidos Totais (%)	2,0-8,0	5,0	6,0-12,0	10,0
Sólidos Voláteis (% de ST)	60-80	65	30-60	40
Nitrogênio (% de ST)	1,5-4,0	2,5	1,6-6,0	3,0
Fósforo (% de ST)	0,8-2,8	1,6	1,5-4,0	2,5
Potássio (% de ST)	0 -1	0,4	0-3,0	1,0
pH	5,0-8,0	6,0	6,5-7,5	7,0
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	500-1500	600	2500-3500	3000

FONTE: Adaptado de Metcalf e Eddy, 1991.

O lodo gerado pelo processo anaeróbio tipo UASB, de acordo com alguns pesquisadores pelos dados experimentais de produção biológica, são apresentados na tabela a seguir mostra resultados de sistemas em escala de demonstração ou real, tratando esgoto municipal bruto:

Tabela 3: Produção de logo biológico anaeróbio em reator tipo UASB.

Referência	AProdução (gSTS/hab.dia)	B – Teor de sólidos (g/L)	C – Teor de água (%)	A/B – Quantidade de lodo (hab.dia) <sup>-1</sup>
Aisse (1993)	15-25	-	-	-
Louwe Kooimans <i>et al.</i>	20	-	-	-
Haskoning	10-20	50-100	90-95	0,2
Vieira e Solza	22	72	93	0,31
Haskoning <i>et al.</i>	15	60-80	93	0,21
Van Haandel e Lettinga	16	50-75	93	0,26

O tratamento do lodo tem por objetivo reduzir o volume e o teor de matéria orgânica (estabilização). As técnicas para processamento do lodo são: armazenamento antes do processamento em decantadores ou em tanques; espessamento antes da digestão e/ou desidratação; condicionamento antes da desidratação via tratamento químico, estabilização por digestão anaeróbia ou aeração; desidratação; centrifugação; leitos de secagem ou lagoas (CAMPOS, 1999).

Pensando nisso e como descrito por Müller (1998), as tecnologias hidrolíticas podem ser aplicadas para minimizar os efeitos da produção de biomassa, com objetivos de aumentar a solubilização dos sólidos presentes no lodo; melhorar a eficiência de um processo subsequente da biodegradação ou para a remoção de nutrientes (fósforo e nitrogênio) e promover a redução de água no lodo.

Cheirsilp *et al.* (2012) estudaram a produção de lipídios e biomassa de algas nos diferentes tipos tróficos de cultivo e comprovaram que que no cultivo mixotrófico, como o de fotobiorreatores abertos, há maior geração tanto de lipídeos como de biomassa algácea. Lee (2001) mostrou que, dentre as espécies de microalgas presentes em sistemas de tratamento de esgoto, a

*Spirulina sp.*, *Chlorella sp.* e *Dunaliella sp.*, são as espécies mais resistentes a condições severas de cultivo em sistemas abertos.

Sobre a comunidade de microlagas no efluente da lagoa de alta taxa, foram identificados por Cruz (2005): 12 táxons de Chlorophyceae; 7 táxons de Cyanophyceae; 2 táxons de Euglenophyceae e 1 táxon de Bacillariophyceae.

### 3.3. Processo Hidrolítico de conversão da Biomassa

Diversos processos físicos, químicos e biológicos de hidrólise têm sido estudados, promovendo aumento da produção de energia pela hidrólise celular algácea e geração de diferentes subprodutos como biometano, bioetanol, biohidrogênio, entre outros. (XUAN *et al.*, 2009).



Figura 3: Planta piloto para geração de biocombustível de microalgas em um fotobiorreator modelo Raceway– Israel.

FONTE: Israel's Seambiotic.

A escolha do processo hidrolítico depende da espécie algácea predominante no meio de cultivo e as características particulares do grupo dominante. A principal diferença entre a hidrólise física e química da biológica é o ataque preferencial de agentes hidrolíticos fortes à biomassa, como temperatura e



alcalinidade, obtendo uma resposta mais rápida quando comparado exclusivamente de uma ação enzimática, ou seja, mais lenta (CASSINI, 2003).

Por outro lado, a hidrólise enzimática é mais específica no que tange o substrato carbonáceo a ser solubilizado, e as enzimas não interferem significativamente nas características principais físico-químicas e biológicas da biomassa algácea sob tratamento, devido suas características de atuação.

### 3.3.1. Hidrólise Enzimática

De fato, o pré-tratamento enzimático consiste na conversão de moléculas da parede celular em substratos mais utilizáveis para microorganismos anaeróbicos. É necessário conhecer a composição da parede celular da microalga para selecionar as enzimas apropriadas que atuarão sobre ela. A maioria das espécies apresenta composição da parede celular de: celulose, hemicelulose, pectina e glicoproteína (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Alguns resultados promissores já foram demonstrados em termos de solubilização de biomassa e aumento da produção de biogás após o pré-tratamento enzimático de culturas de microalgas puras (OMETTO *et al.*, 2014). No entanto, a literatura ainda é fraca no efeito do pré-tratamento enzimático na biomassa microalgácea mista, cultivada em sistemas de tratamento de águas residuais.

A digestão anaeróbica de microalgas é principalmente inibida pela composição química de suas paredes celulares contendo biopolímeros capazes de resistir a degradação bacteriana. Adotando pré-tratamentos, como o tratamento térmico, hidrólise térmica, ultra-som e hidrólise enzimática, apresentaram potencial de remover esses compostos inibitórios e aumentar os rendimentos de biogás, pela degradação da parede celular, liberando a matéria orgânica intracelular (OMETTO *et al.*, 2014).

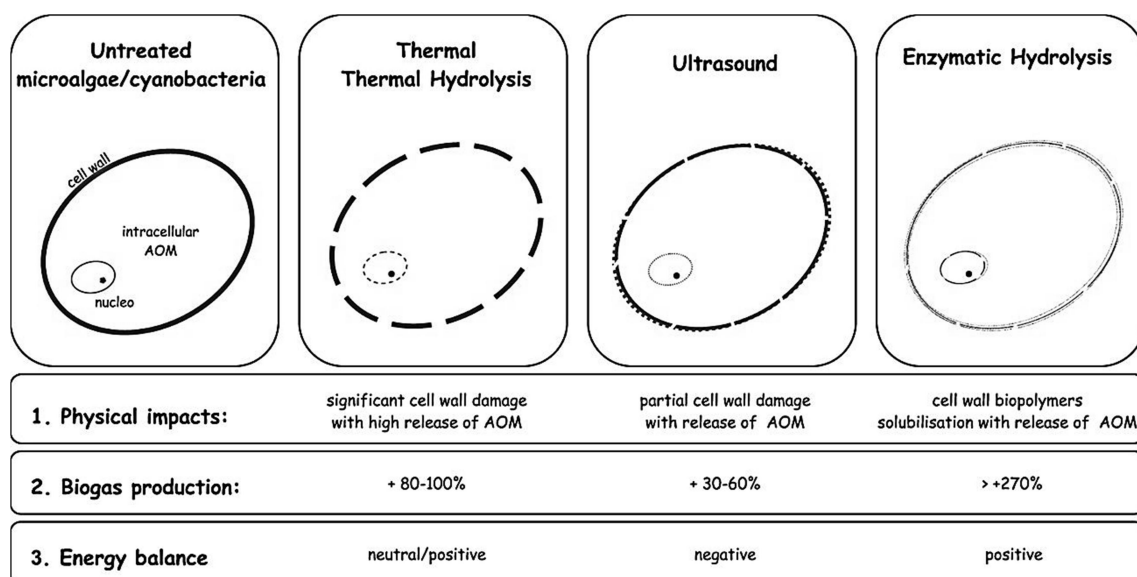


Figura 4: Pré-tratamentos de microalgas para digestão anaeróbica melhorada: tratamento térmico, hidrólise térmica, ultra-som e hidrólise enzimática.  
 FONTE: OMETTO *et al.*, 2014.

Os mesmos autores relataram resultados de sucesso com pré-tratamentos biológicos utilizando enzimas celulasas. De acordo com isso, Yin *et al.* (2010) observaram que a adição de celulasas a *Chlorella sorokiniana* aumentou a degradação da parede celular e produziu a liberação de 25, 6 e 8 vezes mais proteínas, péptidos e açúcares, respectivamente, após 3 horas de incubação a uma temperatura de 50°C. Da mesma forma, a adição de celulase a *Chlorella vulgaris* para otimizar a extração de lipídios produziu 60% e 85% de hidrólise enzimática, após 24h e 72 h de tratamento (CHO *et al.*, 2013b).

Nesse estudo, as enzimas foram escolhidas levando em consideração a composição da parede de algas. A parede celular das microalgas é composta basicamente de açúcares (24-74%), ácido urônico (4-24%), proteínas (2-11%) e glucosamina (0-15%), além de celulose e hemicelulose (BLUMREISINGER *et al.*, 1983).

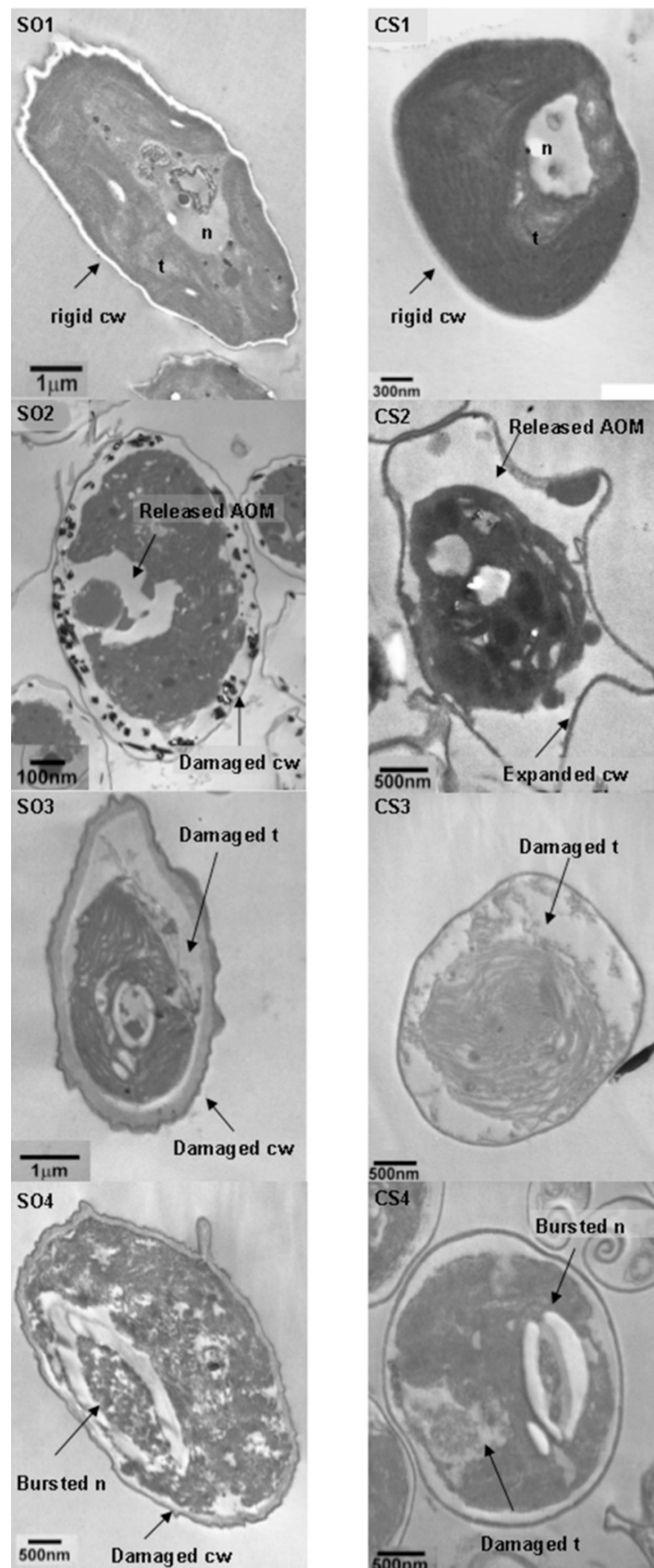


Figura 5: Não tratadas (1); Após hidrólise térmica (2); Após ultra-som (3); Após pré-tratamento enzimático (4). Nomenclaturas: Células de *S. obliquus* (SO); *C. sorokiniana* (CS); cw = parede celular; N = núcleo, t = thylakoids.  
 FONTE: OMETTO *et al.*, 2014.

A **Figura 5** ilustra o efeito dos pré tratamentos citados aplicados às microalgas. De acordo com o estudo abordada para diferentes pré-tratamentos, a hidrólise enzimática permitiu a solubilização dos constituintes da parede celular, gerando uma maior produção de biogás em comparação com pré-tratamentos térmicos e de ultra-som responsáveis pela degradação da parede celular física.

Apesar das vantagens apresentadas pela hidrólise enzimática sua aplicação em grande escala ainda esbarra em dificuldades técnicas e econômicas. Entre as estratégias para a viabilidade desta etapa em larga escala estão o aumento da carga de substrato, diminuição da carga enzimática, redução do tempo de hidrólise e a busca por enzimas mais eficientes (OUYANG *et al.*, 2013).

Houve tentativas de pré-tratamento de biomassa de algas usando enzimas comerciais, incluindo  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase (CHOI *et al.*, 2010) e celulase, xilanase, lipase e protease (EHIMEN *et al.*, 2013). Entretanto, o uso de enzimas comerciais para o pré-tratamento de biomassa de algas para a produção de biocombustíveis é economicamente inviável. Os fungos têm capacidade única para produzir variedades de complexos de enzimas extracelulares, incluindo celulase e xilanase (KAUSHIK *et al.*, 2013), portanto, as enzimas brutas fúngicas poderiam fornecer uma alternativa mais barata para a enzima comercial para o pré-tratamento de biomassa de algas.

As paredes de células de algas são ricas em celulose (BAILEY e OLLIS, 1986) o que pode contribuir até 70% em peso seco (BALDAN *et al.*, 2001). Além disso, a celulose na parede celular de algas frequentemente contém açúcares que não a glicose, como a xilose que forma os polissacarídeos esqueléticos dispostos como microfibrilas de xilanos. Assim, conclui-se que as enzimas brutas fúngicas com boa atividade de celulase e xilanase poderiam ser aplicadas eficientemente para o tratamento de biomassa de algas e a ruptura da parede celular (OMETTO *et al.*, 2014)

Esses estudos demonstraram a eficiência de vários pré-tratamentos para uma maior conversão de metano de diferentes microalgas. No entanto, esses pré-tratamentos resultaram em uma relação de energia líquida negativa (energia retornada em energia investida) (PASSOS *et al.*, 2013; MENDEZ *et al.*, 2013).

Neste contexto, a hidrólise enzimática da parede celular das microalgas pode ser uma alternativa promissora para os pré-tratamentos mecânicos e térmicos que consomem energia e a hidrólise catalítica química. O pré-tratamento enzimático inclui a ausência de subprodutos inibidores. Até agora, muito pouco trabalho foi feito sobre o efeito da hidrólise enzimática de microalgas para fins de produção de metano (CIUDAD*et al.*, 2014; MIAO*et al.*, 2013)

O custo geral do processo da hidrólise enzimática pode ser inferior à hidrólise termoquímica, pois evita a corrosão por contenção e ocorre sob temperaturas suaves. Do mesmo modo, as enzimas podem ser produzidas por uma ampla gama de bactérias e fungos (MIAO*et al.*, 2013; AHAMED*et al.*, 2008).

A biodegradabilidade de um lodo algáceo foi aumentada com sucesso por Ometto *et al.* (2014), mediante o emprego da enzima celulase quando combinada com tratamento térmico. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos é uma das vantagens citadas das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER*et al.*, 1999).

Segundo AJEEJ (2015), o alto conteúdo energético dos lipídios torna os substratos atraentes para a digestão anaeróbica devido à maior produção de gás. No entanto, a hidrólise de lípidos é considerada mais lenta do que a hidrólise de proteínas e carboidratos.

### **3.4. Fungos Filamentosos**

#### **3.4.1. Caracterização dos fungos filamentosos**

O grupo de microrganismos com maior número de espécies são os fungos filamentosos, apresentam imensa variedade quanto à morfologia, fisiológicas e atributos bioquímicos (PURVIS e HECTOR, 2000).

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, geralmente filamentosos, obtêm seu alimento por absorção, podem ser macro ou microscópicos, propagam-se por meio de esporos e armazenam glicogênio

como fonte de reserva. Organismos largamente distribuídos na natureza (no ar, na água, no solo e podem crescer nos mais diversos substratos) (PELCZAR, 1996; PUTZKE e PUTZKE, 1998; TANIWAKI e SILVA, 2001; GUERRERO e SILVEIRA, 2003).

O crescimento dos fungos filamentosos, é uma combinação da extensão apical das hifas associado à geração de novas hifas por ramificação do micélio, permite ao fungo penetrar no substrato sólido e formar uma estrutura sólida, o que confere uma vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Além disso, as enzimas hidrolíticas são excretadas pelas hifas sem grande diluição como ocorre na fermentação submersa, o que faz com que sua ação seja muito mais eficiente, permitindo adentrar no substrato aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas (RAIMBAULT, 1998).

Segundo Menezes (2006), nas fermentações em estado sólido (FES) o crescimento do fungo acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinada pela disponibilidade dos nutrientes e pelas características do substrato (Figura 6).

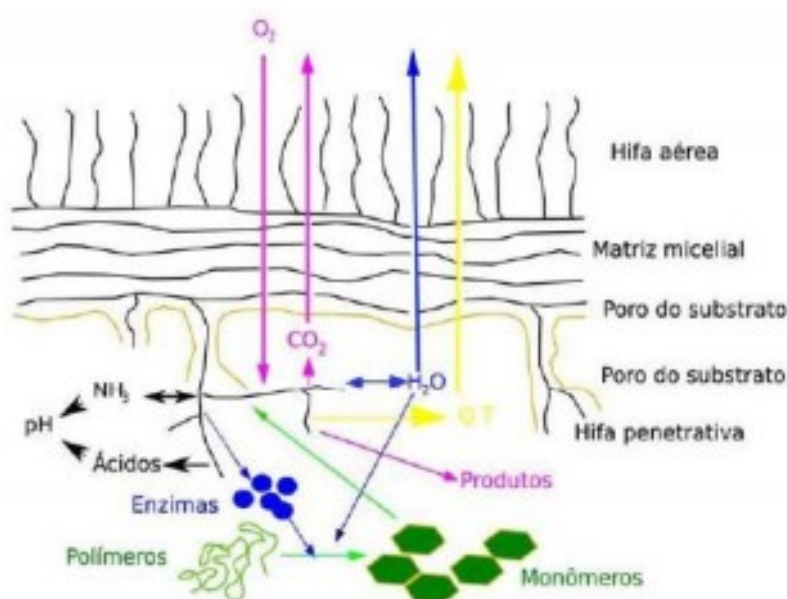


Figura 6: Representação do crescimento de fungos filamentosos em substâncias sólidas.

FONTE: Adaptado Holker e Lenz (2005)

Os fungos filamentosos secretam eficazes enzimas no meio ambiente (BENEETT, 1998), elas auxiliam na degradação de produtos como a celulose e o amido (PELCZAR, 1996), porém praticamente apenas 2% dos microrganismos em todo mundo foram testados como fonte de enzimas (HASANet *at.*, 2006).

O gênero *Aspergillus* é o fungo mais importante para a produção comercial de enzimas e tem sido usado já por muitas décadas, na produção de enzimas extracelulares e ácido cítrico, é considerado um microrganismo GRAS – *Generally Recognized As Safe* (Geralmente Reconhecidos Como Seguros) (SCHUSTER *et al.*, 2002). Algumas espécies desse gênero são fonte rica de enzimas como pectinases, proteases e amiloglicosidase, segundo Frost e Moss (1997).

A atenção que se dá para os fungos é decorrente da produção de enzimas e metabólitos, incluindo antibióticos, ácidos orgânicos, pigmentos e outros aditivos alimentícios (PUNTet *at.*, 2002). Apresentam grande importância na indústria de alimentos, como produção de cerveja, vinho, destilados, na panificação; na agricultura como agente de controle biológico de pragas, dentre muitos outros produtos (MELO eAZEVEDO, 1998).

O uso prático das enzimas vem sendo explorado pelo ser humano há milhares de anos (SHARMAet *al.*, 2001). Pode-se considerar, de forma direta, o emprego de preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal; ou indiretamente, pelo aproveitamento da ação enzimática devido ao crescimento microbiano sobre determinados substratos. Os microrganismos são atualmente a primeira fonte na indústria de enzimas, sendo: 50% de origem de fungos e leveduras, 35% de bactérias, e o restante (15%) de plantas ou de animais de acordo com Boopathy (1994) citado por Rolle (1998).

As propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas dos fungos filamentosos, permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes microrganismos (SOCCOL *et al.*, 1994).

### 3.4.2. Enzimas fúngicas

Enzimas são catalizadoras biológicas, que apresentam em sua maioria aminoácidos ligados por ligações peptídicas covalentes, ou seja, polímeros. Os catalizadores atuam diminuindo a energia necessária para a ativação de uma reação, tornando mais rápida a obtenção do produto. As reações não catalisadas requerem mais energia para serem iniciadas, portanto, sua velocidade é menor que as reações catalisadas (LEHNINGHER *et al.*, 2006).

A produção e uso de enzimas microbianas, de forma controlada, constituíram o maior setor da indústria biotecnológica (NEIDLEMAN, 1991). Enzimas podem ser utilizadas para substituir produtos químicos, como compostos cáusticos, ácidos e solventes tóxicos que agredem o meio ambiente e provocam desgaste nas estruturas e materiais (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGUER, 2000). Diversos fatores são necessários considerar durante a produção enzimática, como a composição do meio de cultivo, substrato para a produção da enzima, temperatura de incubação, pH, aeração, uso de indutores, dentre outros (THIRY e CINGOLANI, 2002).

A classificação das enzimas se dá pelas reações que elas catalisam. Segundo Lehninger (2006), foi adotado um sistema para nomear e classificar, devido a necessidade perante a ambiguidade de nomenclatura e o crescente número de enzimas recém-descobertas. Pode-se verificar a classificação internacional (segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular – IUBMB) das enzimas no Quadro 3:



Quadro 3: Classificação internacional das enzimas.

Classe	Tipo de Reação Catalisada
Oxidoredutorases	Transferência de elétrons (íon hidreto ou átomo H)
Transferases	Reações de transferência de grupos
Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para água)
Liasas	Adição de grupos em ligações duplas ou formação de ligações duplas pela remoção de grupos
Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
Ligases	Formação de ligações C-C e C-N pelo acoplamento da clivagem do ATP com as reações de condensação.

FONTE: LEHNINGER, 2006.

As enzimas extracelulares possuem grandes vantagens quando comparadas a intracelulares, segundo Wiseman (1985); Gacesa e Hubble (1990):

- São secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular que são difíceis de aplicação em larga escala;
- O número de enzimas excretadas é limitado, logo, é relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento;
- As enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares.

As reações enzimáticas são amplamente afetadas por variações na temperatura, pH, tamanho do inóculo, fontes de carbono, presença de indutores ou inibidores, aeração e no tempo de crescimento (MUKHOPADHYAY e MALIK, 1980).

Para que o pH se mantenha num valor ótimo para atividade biológica e produção enzimática, é de extrema importância que exista uma suficiente capacidade tamponamento que permita neutralizar possíveis alterações durante o crescimento (FONSECA e TEIXEIRA, 2007).

A concentração afeta do substrato afeta diretamente a velocidade das reações enzimáticas. A velocidade de reação catalisada por enzimas aumenta

proporcionalmente com o aumento do substrato, até a velocidade máxima (LEHNINGER *et al.*, 2006).

A temperatura é um fator crucial para o desenvolvimento do experimento, segundo FONSECA e TEIXEIRA (2007) a temperatura ótima quando o cultivo é realizado em um meio com uma determinada concentração e valores controlados de pH, resultam na interação promissora dos dois efeitos.

Entre as enzimas de interesse industrial as fitases, amilases, inulinases, celulasas, proteases, galactosidases, lipases e lacases representam importantes insumos intermediários para as indústrias químicas, alimentares, têxteis e outras (SINGHANIA *et al.*, 2007; RAMACHANDRAN *et al.*, 2004; RAMACHANDRAN *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-COUTO *et al.*, 2004).

As enzimas são altamente específicas e as paredes celulares de algas são constituídas por biopolímeros complexos. Portanto, ao invés de uma única enzima, é necessário um mixer de enzimas para hidrolizar as espécies de microalgas alvo de forma eficiente (EHIMEN *et al.*, 2013).

As enzimas que tem como o substrato o amido, amilases, são aquelas produzidas por fungos filamentosos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* (PANDEY *et al.*, 1999).

As proteases de origem microbiana são importantes devido a atuação em diversos substratos específicos, podendo ser utilizadas em diversas áreas da bioquímica e da biotecnologia (BATATA *et al.*, 2002). As proteases são caracterizadas pela especificidade de substrato (KUDRYAVTSEVA *et al.*, 2010).

As lipases têm sido isoladas de uma variedade de tecidos de animais e plantas, e podem ser também produzidas por processos de fermentação usando várias espécies de microrganismos, como fungos e bactérias (SANTOS, 2003).

A celulose é o polímero orgânico mais comumente encontrado e o componente mais importante na parede celular das plantas. Representa  $1,5 \times 10^{12}$  do total anual de produção de biomassa pela fotossíntese, especialmente nos trópicos,

é considerada uma fonte inesgotável de matéria-prima (GUO *et al.*, 2008; KLEMM *et al.*, 2005).

- Enzima CELULASE

As celulasas pertencem à classe de hidrolases e constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadoras muito específicas que atuam para a liberação de açúcares, como a glicose, que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON e HAHNHAGERDAL, 1996; CASTRO e PEREIRA, 2010).

Essas enzimas podem ser produzidas por diversos microrganismos, que incluem bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Ruminococcus*, etc) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Bulgaria*, *Helotium*, *Poria*, *Aspergillus*, etc), plantas (*Fragaria*) e animais (moluscos e insetos) (LYND *et al.*, 2002; PALOMER *et al.*, 2004)

Estudos que utilizam simultaneamente dois fungos filamentosos na produção de enzimas, foram desenvolvidos por Gutierrez-Correa e Tengerdy (1997) e Deshpande e colaboradores (2008), utilizando cultura mista de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* na produção de celulasas por fermentação em estado sólido, apresentaram produções maiores dessas enzimas do que utilizando os fungos filamentosos separadamente.

A classificação das celulasas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos (LYND *et al.*, 2002):

- Endoglucanases (E Gases), que clivam ligações internas da fibra celulósica.
- Exoglucanases (Ex Gases), que atuam na região externa da celulose.
- $\beta$ - glicosidases ( $\beta$  Gases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose.

Quando atuam conjuntamente, essas enzimas apresentam um rendimento melhor do que a soma dos seus efeitos individuais. A Figura 7 ilustra a ação sinérgica entre as enzimas do complexo celulolítico.

Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis (etapa A). E Gases e Ex Gases realizam a etapa de despolimerização, passo limitante para todo o processo de hidrólise da celulose (etapa B e C). A hidrólise secundária degrada a celobiose em glicose pelas  $\beta$ -glicosidases (etapa D) (ZHANG e LYND, 2004).

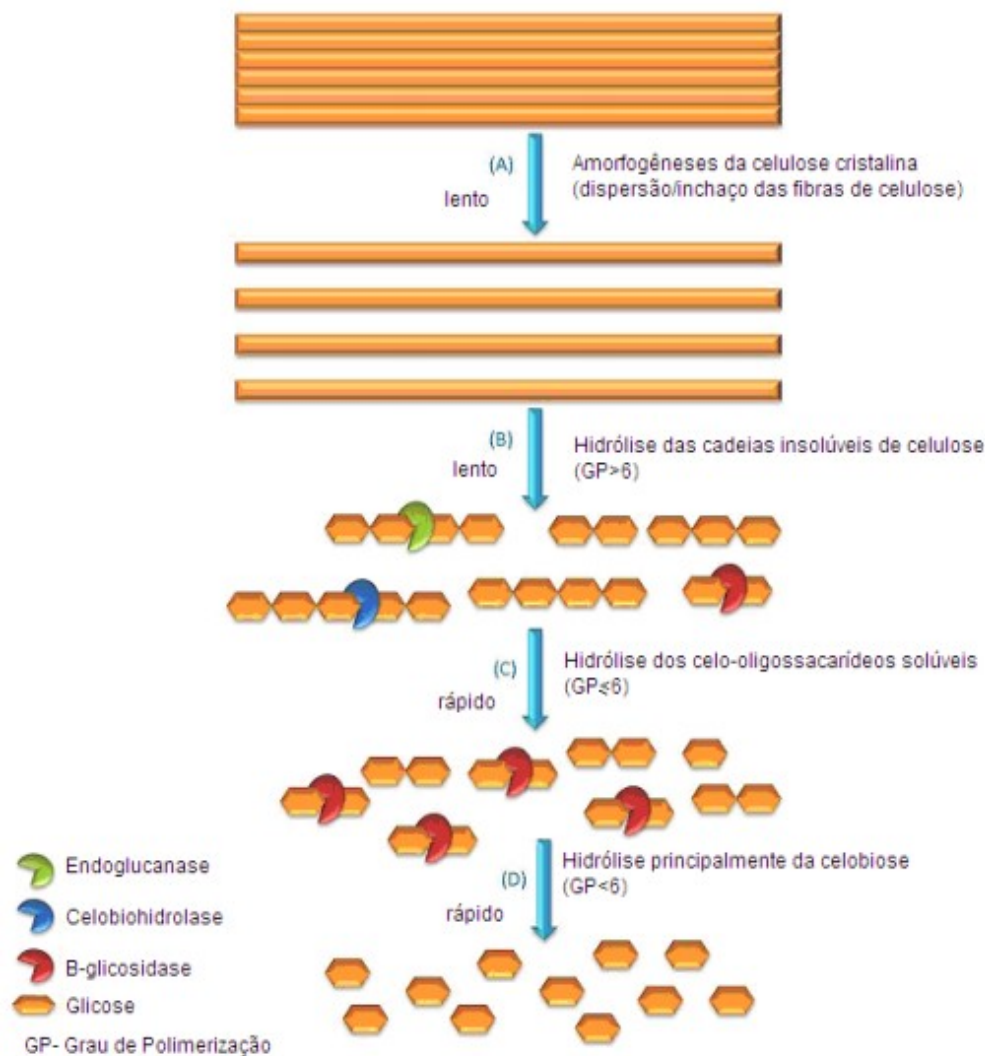


Figura 7: Ação sinérgica das celulases.  
FONTE: Adaptado de Arantes e Sadler (2010).

Diante à heterogeneidade e complexidade da biomassa lignocelulósica, a bioconversão dos constituintes da parede celular requerem múltiplas atividades enzimáticas. Para um sistema de enzimas eficiente e de baixo custo deveria conter atividades balanceadas de celulasas, xilanase, entre outras (BRIJWANI *et al.*, 2010).

Estratégias baseadas no uso de celulasas em biorrefinarias para um processamento econômico incluem: aumento da produtividade volumétrica das enzimas comerciais, produção das enzimas utilizando substrato mais baratos, produção de coquetéis enzimáticos com maior estabilidade para processos específicos, além de produzir celulasas com maior atividade específica sobre substratos sólidos (ZHANG *et al.*, 2006).

Os elevados custos da hidrólise enzimática verificados são devido a fatores como: efeitos de inibição das enzimas e acessibilidade das enzimas ao substrato e a ligação não produtiva, exigindo o uso de altas concentrações de enzimas e tornando a carga (concentração) enzimática uma importante variável do processo (Leu e Zhu, 2012; Mussato *et al.*, 2008).

#### 3.4.3. Potencial enzimático dos fungos filamentosos

O meio de cultura sólido para a detecção de enzimas produzidas por fungos tem sido utilizado há vários anos. Hankin e Anagnostakis (1975) relataram que as enzimas podem ser facilmente detectadas no meio de cultura sólido. As enzimas hidrolíticas como, por exemplo: celulasas, xilanases, pectinases são geralmente produzidas por fungos em meio de cultura, uma vez que essas enzimas são usadas na natureza pelos fungos para o seu próprio crescimento (PANDEY *et al.*, 1999).

O índice de atividade enzimática (IE) é um dos parâmetros semiquantitativos mais utilizados para avaliação da capacidade de produção de enzimas pelos microrganismos em meio de cultura sólidos. A seleção de microrganismos considerados produtores de enzimas inclui a correlação direta entre o diâmetro

do halo de degradação e a habilidade degradativa dos microrganismos no meio específico (CESKA, 1971; LIN *et al.*, 1991).

Para avaliar o potencial enzimático dos fungos, Lealem e Gashe (1994) e Stamford *et al.* (1998) recomendam o índice enzimático (IE)  $\geq 2,00$ . Assim, os isolados que exibiram os maiores IE nos meios de crescimento, são aqueles que possuem maior atividade enzimática extracelular (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Terra (2008) considerou o índice enzimático  $\geq 2,00$ , denominando os microrganismos como um produtor potencial de enzima em meio sólido.

Vários trabalhos foram realizados quanto as seleções de fungos de interesse biotecnológico, como o realizado por Guimarães *et al.* (2006). Esses autores avaliaram 40 isolados fúngicos quanto à produção de enzimas microbianas. As enzimas testadas foram: xilanase, glicose-oxidase, fosfatase alcalina, fitase, pectinase e amilase. Entre 40 isolados fúngicos, 23 desses exibiram potencial enzimático. Níveis significativos de amilase foram produzidos pelas espécies de *Paecilomyces* e *Aspergillus phoenicis*.

Lima-Filho *et al.* (2003) observaram a produção enzimática para as enzimas amilase, celulase, protease, e lipase por isolados de *Coletotrichum spp.* isolados por diferentes substratos de frutas. Todos apresentaram resultados positivos para as enzimas testadas.

As modificações genéticas têm sido usadas na forma de melhorar a capacidade de produção e secreção de enzimas por microrganismos. Até o momento, um número limitado de espécies de fungos foi explorado como células hospedeiras para a produção de enzimas recombinantes. Enzimas naturais ou recombinantes são, principalmente, produzidas por *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Trichoderma reesei* (PUNT *et al.*, 2002).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Informações Preliminares

O projeto consta de um sistema integrado com microalgas a ser desenvolvido em escala piloto em uma base experimental localizada na Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE), da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), no bairro Araçás, em Vila Velha, Espírito Santo. Todos os processos de tratamento de esgoto integrados ao sistema a base de microalgas estão ilustrados:

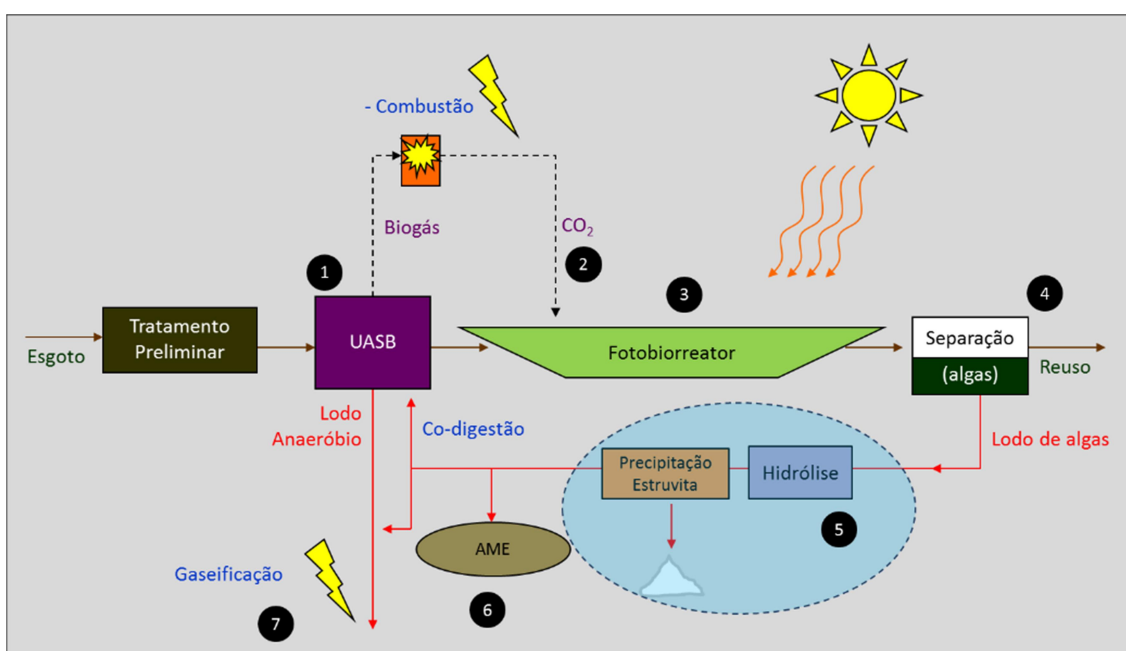


Figura 8: Esboço de um sistema de tratamento integrado ao sistema de microalgas em fotobiorreatores.

FONTE: Gonçalves, 2005.

O esgoto bruto foi captado e submetido a um tratamento preliminar com o objetivo de remover sólidos grosseiros, óleos e graxas e areia, por meio de mecanismos de ordem física. O efluente pré-tratado foi direcionado para o processo de tratamento secundário anaeróbio, constituído por dois reatores anaeróbios do tipo UASB em escala piloto, para tratamento biológico com redução da carga orgânica e nutrientes (1). O pós tratamento do efluente secundário ocorreu em fotobiorreator aberto (modelo *Raceway*) lagoas de alta taxa (3). O  $\text{CO}_2$  resultante da incineração do biogás gerado nos reatores

anaeróbios será injetado no sistema de microalgas a fim de favorecer a fotossíntese, controlar o pH, e com isso aumentar o crescimento da biomassa microalgácea (2).

A fim de aproveitar o lodo algáceo, os efluentes dos fotobiorreatores passam por um processo de separação sólido-líquido (4), em que o efluente filtrado poderá ser direcionado ao reúso e o lodo coletado para ensaios de hidrólise e também em estudos paralelos de precipitação de estruvita, este é o substrato bruto (5), além de ensaios de atividade metanogênica específica (AME) (6) e gaseificação do lodo anaeróbio para produção de energia que serão estudados em pesquisas paralelas posteriores (7).

As amostras foram coletadas a partir da lagoa de alta taxa, do tipo fotobiorreator *raceway*, disposta em ambiente livre aberto. O presente estudo foi realizado ao longo de um ano e, mesmo que o sistema tenha sido projetado para manter as condições ideais durante todo o processo, diversos fatores influentes podem modificar as características de reprodução das microalgas e funcionamento da lagoa de alta taxa nesse tempo.

Alterações locais de fatores ambientais como radiação solar, temperatura, precipitação, sazonalidade temporal e etc., fatores pontuais como contaminação por microorganismo, bem como fatores hidráulicos, hidrodinâmicos e energéticos podem interferir nas condições de projeto do sistema, culminando em alterações nas características previstas para o efluente. Dessa forma, ao longo de todas as análises do lodo bruto verificou-se uma heterogeneidade das amostras, sendo necessária a caracterização a cada amostra coletada, prevendo modificações do sistema.

De acordo com estudos realizados anteriormente, para biodegradação da biomassa do lodo algáceo via hidrólise térmica e alcalina, observou-se a necessidade de concentrações ideais para Sólidos Totais (ST) em 4,0%. Isso porque os processos hidrolíticos não atingiram resultados esperados a concentrações menores, mostrando baixa solubilidade da matéria orgânica (DQOf solubilizada) em relação a biomassa bruta (DQOf) (LAMBERTI, 2017).



#### **4.2. Isolamento e detecção de Fungos Filamentosos**

Como fonte amostral foi utilizada a biomassa do lodo algáceo extraída do separador sólido-líquido citada anteriormente, transferida para placas de Petri em gotas, objetivando o isolamento das principais espécies fúngicas contidas no lodo.

Observado o crescimento das espécies nas placas, garantiu-se o isolamento completo por meio de repicagem em triplicata. A partir do isolamento de uma única espécie visualmente, foi necessário a identificação da mesma, sendo possível por visualização no microscópio óptico e caracterização morfológica, pelo método de microcultura em lâmina observando-se a morfologia do crescimento das hifas e pelo método de fixação em lâmina onde observou-se os esporos característicos, conforme Menezes e Assis (2004) e, Rigo (2009). Dessa forma foi possível o isolamento de fungos do próprio local e substrato de pesquisa.

Além dos fungos isolados para este projeto, também foram utilizados as espécies pertencentes ao banco de fungos do LABSAN (Laboratório de Saneamento da Engenharia Ambiental) e um fungo específico da Fiocruz cedido pelo Campus Ceunes – São Mateus. Os fungos identificados nessa pesquisa foram inseridos ao banco de fungos do LABSAN e preservados, com o objetivo de acrescentar às futuras pesquisas.

#### **4.3. Avaliação do Potencial Enzimático dos Fungos Filamentosos**

Nesse primeiro momento da pesquisa, a seleção dos fungos disponíveis já isolados, foi essencial para identificar àqueles com o melhor potencial enzimático observado. Para isso, segundo componentes constituintes da parede celular e conteúdo intracelular da microlaga, foi indicado quatro tipos de enzimas essenciais para ação específica nos substratos de amido, celulose, lipídio e proteína, sendo suas hidrolases necessárias para biodegradação:

Amilase, Celulase, Lipase e Protease. A seleção foi realizada através da determinação da atividade enzimática, conforme metodologias descritas com modificações por Dingle *et al.* (1935) para amilase, celulase e protease, e Sierra (1957) para lipase.

As espécies puras de cada fungo foram cultivadas em placas de Petri, contendo aproximadamente 20,0mL de meio BDA e incubadas a 28°C por um período de 48h. Após esse tempo, as colônias foram transferidas em formatos de discos com 0,5mm de diâmetro cortados diretamente na placa de cultivo e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo 10,0mL dos meios indutores específicos de cada enzima.

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados para todos os fungos, e cada fungo analisado para os quatro tipos de meios específicos, com cinco repetições por meio, prevendo erros estatísticos e contaminações biológicas durante o manuseio e tempo de incubação, contribuindo para resultados mais confiáveis.

As placas de meios específicos com o fungo inserido pontualmente, foram incubadas a 28°C para análises em períodos de 48h, 96h e 144h. A seguir, está descrito a metodologia para formulação de cada meio de cultivo específico:

- Amilase (500mL tampão citrato fosfato 0,1M pH5; 2% ágar; 1,0% amido). Solução reveladora de iodo (Lugol 1:20mL) para visualização do resultado enzimático positivo identificado pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia formada.
- Celulase (500mL tampão acetado de sódio 0,1M pH5; 2% ágar; 2,5% carboximetilcelulose). Solução reveladora vermelho congo 0,5% para visualização do resultado enzimático positivo identificado por um contraste translúcido ao redor da colônia formada.
- Protease (500mL tampão citrato fosfato 0,1M pH5; 2% ágar; 1,0% gelatina; 1,0% leite desnatado). A reação enzimática positiva é

detectada pela modificação química no meio sólido, a reação positiva foi observada pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia, não sendo necessário solução reveladora.

- Lipase (500ml água destilada; 20g ágar; 5g cloreto de sódio; 0,1g cloreto de cálcio; 10g peptona; 10ml Tween 20). A reação enzimática positiva é detectada pela modificação química no meio sólido pela formação de cristais de sal de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima ou pela formação de zonas claras ao redor da colônia devido a completa degradação do sal do ácido gorduroso (Hankin e Anagnostakis, 1975), não sendo necessário solução reveladora.

O índice enzimático (IE) é obtido pela razão entre o diâmetro do halo reacional e o diâmetro da colônia fúngica seguindo a metodologia de Hankin e Anagnostakis (1975), para todas as atividades enzimáticas testadas em cinco repetições, com tempos de detenção de 48h, 96h e 144h.

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia fúngica}}$$

#### **4.4. Produção do Extrato Bruto Enzimático**

Para cada fungo selecionado pela metodologia anterior, foi gerado um extrato bruto enzimático específico do fungo, obtido através do método de Fermentação Submersa (FS), considerando a presença em maior escala da enzima específica de maior potencial IE. O método de FS foi escolhido devido a maior facilidade de controle e operação do processo para produção de enzimas, devido ao meio reacional líquido.

##### **4.4.1. Fermentação submersa**

Utilizou-se como substratos para a fermentação submersa a biomassa do lodo algáceo, coletada da lagoa de alta taxa de Araçás – Vila Velha/ES, após o

processo de separação com TANFLOC (não prejudicial ao fungo) e o efluente do reator UASB. Os substratos foram autoclavados previamente, eliminando qualquer tipo de interferência biológica.

Em frascos de Erlenmeyers de 250mL, contendo 5,0g de biomassa do lodo algáceo autoclavado, acrescidos de 45,0mL do efluente secundário de reator UASB, também previamente autoclavado, foi inoculado 1,0mL de suspensão de esporos fúngicos na concentração de aproximadamente  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, contado em Câmara de Neubauer (Figura 9). Após 4 dias de incubação sob agitação de 150 rpm a 30°C em Shaker, o conteúdo do frasco é centrifugado e depois filtrado em papel de filtro Whatman. O nomeado extrato enzimático bruto é o conteúdo filtrado.

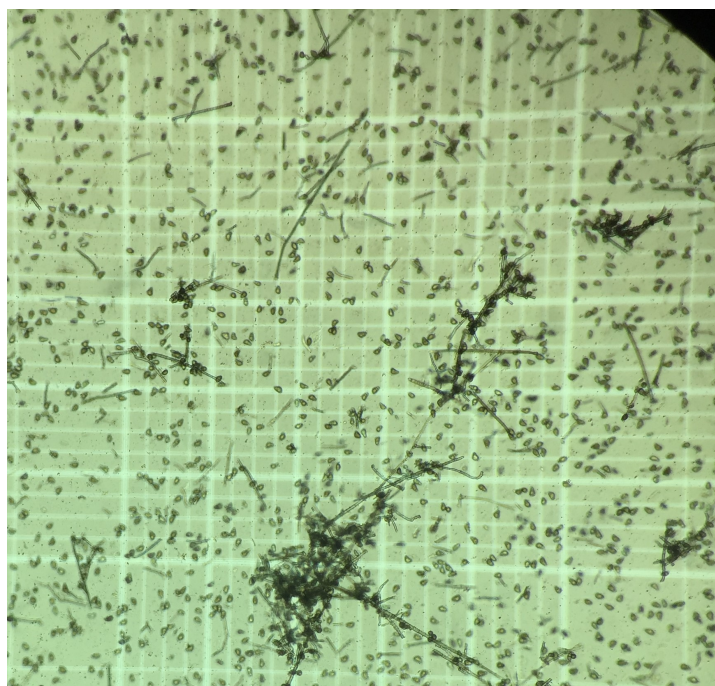


Figura 9: Esporos de *Curvularia sp.* - Câmara de Neubauer.

FONTE: Autoria própria.

#### 4.4.2. Obtenção do inóculo de suspensão de esporos

O inóculo de suspensão de esporos é obtido através da propagação das culturas esporuladas em BDA dos fungos, a 28°C por um período de 5 dias em incubadora. Após a propagação, os esporos são recuperados por raspagem

em solução de água destilada autoclavada, mantendo o isolamento completo em capela de fluxo laminar. O número de esporos em suspensão na alíquota é quantificado em Câmara de Neubauer, conforme o método de Freire (1996), descrito por Amorim (2011), deve ser na ordem de grandeza  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

#### 4.5. Hidrólise Enzimática

Para os processos hidrolíticos da biomassa do lodo algáceo coletada diretamente na etapa de separação sólido-líquido do sistema de tratamento já descrito, visando avaliar sua solubilização, utiliza-se o extrato bruto enzimático obtido na etapa anterior descrita.

Os testes de hidrólise biológica enzimática foram realizados em agitação mecânica no Shaker (Figura 10) em frascos Erlenmeyers de 250mL, em duplicata, com 50mL de biomassa microalgácea por frasco, mantidos sob agitação de 150 rpm. Como parâmetros de projeto para avaliação, foram selecionados diferentes tempos de detenção (6h, 12h, 24h e 48h), três doses dos extratos brutos enzimáticos (5%, 10% e 20% w/w) a uma temperatura constante de 30°C mantida no Shaker, com o propósito de otimização das condições de solubilização do material orgânico.



Figura 10: Shaker SL 222 - Incubadora utilizada para os processos de hidrólise enzimática e fermentação submersa, nas condições de 150rpm a 30°C.  
FONTE: Aatoria própria.

Foram realizados também testes em branco de hidrólise, ou seja, sem a presença de extrato enzimático. Dessa forma sendo possível comparar de forma mais ampla a efetividade das reações hidrolíticas envolvendo enzimas fúngicas sobre a biomassa do lodo algáceo, sabendo-se da presença de outros organismos.

As amostras foram retiradas de acordo com os tempos de detenção estabelecidos, e submetidas imediatamente à temperatura de 70°C por 20 minutos em banho maria, para desativação das enzimas e encerramento do processo enzimático sobre a biomassa de lodo algáceo. Após processo de desativação, as amostras foram armazenadas à temperatura de 4°C até a realização das análises posteriores.

#### 4.6. Análise de solubilização da Biomassa do Lodo Algáceo

O quadro a seguir lista todas as análises realizadas, antes e depois dos processos hidrolíticos, com princípio do método utilizado na análise, e a referência utilizada.

Quadro 4: Princípio dos métodos de análises laboratoriais.

Análise	Princípio do Método	Referência
pH	Força eletromotriz	APHA, 2011
Sólidos Totais (ST)	Gravimetria	APHA, 2011
Sólidos Fixos (SF)	Gravimetria	APHA, 2011
Sólidos Voláteis (SV)	Gravimetria	APHA, 2011
DQO filtrada	Gravimetria + Colorimetria	APHA, 2011
Carboidrato	Gravimetria + Colorimetria	Adaptada

A metodologia de sólidos seguiu os seguintes procedimento:

- Sólidos totais (ST): Resíduo que resta na cápsula após a evaporação em banhomaria de uma porção de amostra e sua posterior secagem em estufa a 103-105°C até peso constante. Também denominado resíduo total.
- Sólidos Voláteis (SV): é a porção dos sólidos (sólidos totais, suspensos ou dissolvidos) que se perde após a ignição ou calcinação da amostra a 550-600°C, durante uma hora para sólidos totais ou dissolvidos voláteis ou 15 minutos para 9 sólidos em suspensão voláteis, em forno mufla. Também denominado resíduo volátil.
- Sólidos Fixos (SF): É a porção dos sólidos (totais, suspensos ou dissolvidos) que resta após a ignição ou calcinação a 550-600°C após uma hora (para sólidos totais ou dissolvidos fixos) ou 15 minutos (para sólidos em suspensão fixos) em fornemufla. Também denominado resíduo fixo.

A solubilização das amostras de lodo algáceo para os diferentes valores de concentração enzimática e temperatura serão avaliadas em função dos parâmetros DQOf (solubilizada), Carboidrato, ST, SV e SF.

Os dados de caracterização da biomassa adensada apresentados, seguiram uma média amostral referente à todas as análises do lodo bruto realizadas no período de novembro de 2016 a outubro de 2017.

A análise de solubilidade indicará maior disponibilidade do material orgânico intracelular para o processo de digestão anaeróbia, e consequente eficiência do processo de hidrólise. Podemos avaliar a biodegradabilidade, de acordo com a porcentagem de DQO biodegradada, calculada pela reação entre DQO filtrada solubilizada final (mg/L) e DQO filtrada inicial (mg/L).

$$\text{Solubilização DQO (\%)} = \frac{DQOf \text{ final} - DQOf \text{ inicial}}{DQOf \text{ inicial}}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização da Biomassa do Lodo Algáceo

Houve a necessidade de realizar o adensamento da biomassa a fim de obter concentração final ideal para que as análises possam apresentar resultados mensuráveis de quantificação possíveis. Obteve-se em média 4,08% de ST na biomassa, ou seja, o teor de sólidos foi de 40,79 g/L.

De acordo com as análises realizadas, a biomassa é composta principalmente de material orgânico, com Sólidos Voláteis (SV) representando cerca 89,67% do conteúdo de sólidos totais da amostra. O substrato utilizado tem por característica ser uma biomassa de lodo mixotrófico, ou seja, apresenta grande presença de algas, fungos, protozoários e rotíferos do material orgânico analisado.

Tabela 4: Caracterização da biomassa adensada (número de amostras: 5).

Parâmetro	Resultado	Desvio Padrão	Coefficiente Variação %
Sólidos Totais bruto ( $\text{gL}^{-1}$ )	40,79	8,97	21,99
Sólidos Fixos bruto ( $\text{gL}^{-1}$ )	4,32	2,15	49,97
Sólidos Voláteis bruto ( $\text{gL}^{-1}$ )	36,47	7,36	20,19
DQO filtrado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	193,74	59,03	30,47
Carboidrato filtrado ( $\text{mg L}^{-1}$ )	170,55	67,55	39,61
pH	4,67	0,01	0,10
Proteínas filtrado (mg/L)	52,09	5,66	10,87

#### 5.1.1. Fungos filamentosos isolados

Os fungos isolados no âmbito da pesquisa foram extraídos da biomassa do lodo algáceo e identificados por meio de microscopia eletrônica. A nível de gênero foram identificados o *Mortierella sp.* e *Trichoderma sp.* Com o objetivo de atingir melhores valores de potenciais enzimáticos da enzima celulase, devido ao seu ataque preferencial aos componentes da parede celular, também foi adquirido do Campus UFES Ceunes – São Mateus, um isolado e catalogado



em espécie pela Fiocruz, *Trichoderma koningii*, cujo seu gênero apresenta características celulolíticas.

Os demais fungos presentes no laboratório, foram também analisados enzimaticamente devido à sua origem que, em sua maioria, são de substratos relacionados ao tratamento de efluentes líquidos.

O Quadro 5 mostra o elenco de fungos montado para esta pesquisa, mantido no Laboratório de Saneamento da Engenharia Ambiental UFES (Labsan).

Quadro 5: Elenco de fungos - Laboratório de Saneamento UFES.

Código	Taxonomia	Local de Origem
F01	<i>Aspergillus sp.</i>	Lodo microalgáceo (ETE UFES Goiabeiras)
F02	<i>Penicillium sp.</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F04	<i>Curvularia sp.</i>	Lodo microalgáceo (ETE UFES Goiabeiras)
F05	<i>Penicillium sp.</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F06	<i>Paecilomyces sp.</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F07	<i>Fusarium sp.</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F08	<i>Aspergillus niger</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F09	<i>Aspergillus niger</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F10	<i>Penicillium sp.</i>	Solo
F11	<i>Penicillium sp.</i>	Solo
F12	<i>Penicillium sp.</i>	Solo
F13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha de mangueira (Mangifera indica)
F14	<i>Aspergillus niger</i>	Solo
F15	<i>Rhizopus sp.</i>	Solo
F16	<i>Mortierella sp.</i>	Lodo microalgáceo (ETE Araçás Vila Velha)
F17	<i>Trichoderma sp.</i>	Lodo microalgáceo (ETE Araçás Vila Velha)
F18	<i>Mucor sp.</i>	Caixa de gordura (RU UFES Goiabeiras)
F19	<i>Trichoderma koningii</i>	Fiocruz/RJ – Ceunes/São Mateus

### 5.1.2. Seleção de fungos filamentosos

A partir da observação desses resultados, foi possível selecionar o melhor índice enzimático de acordo com a enzima específica produzida pelo fungo analisado. Assim, resumidamente, obteve-se os seguintes resultados para índice enzimático geral (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados de índice enzimático resumido.					
Código	Taxonomia	Índice Enzimático (IE)			
		Amilase	Celulase	Lipase	Protease
F01	<i>Aspergillus sp.</i>	1,9	-	-	1,9
F02	<i>Penicillium sp.</i>	3,4	-	-	1,6
F04	<i>Curvularia sp.</i>	5,1	-	-	-
F05	<i>Penicillium sp.</i>	3,6	-	-	2,6
F06	<i>Paecilomyces sp.</i>	-	-	-	-
F07	<i>Fusarium sp.</i>	-	-	-	1,9
F08	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
F09	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
F10	<i>Penicillium sp.</i>	2,6	-	2,2	1,4
F11	<i>Penicillium sp.</i>	2,4	-	3,9	1,2
F12	<i>Penicillium sp.</i>	-	-	-	-
F13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	2,9	1,4	-
F14	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
F15	<i>Rhizopus sp.</i>	-	-	-	-
F16	<i>Mortierella sp.</i>	-	2,2	-	-
F17	<i>Trichoderma sp.</i>	-	2,5	-	-
F18	<i>Mucor sp.</i>	-	2,8	-	-
F19	<i>Trichoderma koningii</i>	-	2,8	-	2,6

Foram realizados 5 repetições de testes para cálculos estatísticos de desvio padrão e coeficiente de variação e, para esse último é aceitável um erro de 20% nas análises biológicas, e todas as análises apresentaram valores aceitáveis.

Dessa forma, foi escolhido o *Curvularia sp.* (F04) como fonte biológica produtora eficiente de amilase e *Penicillium sp.* (F11) para lipase. Como representante produtor de protease, selecionou-se o *Trichoderma koningii*

(F19) relacionando sua taxonomia, de acordo com referências bibliográficas, à bons resultados de degradação da parede celular e para a celulase o *Mucor sp.* (F18).

Os resultados de testes positivos atingidos para cada meio indutor específico estão ilustrados na Figura 11, exemplificando como foram observadas as reações de produção de enzimas a partir da alocação do fungo ao centro da placa de petri.

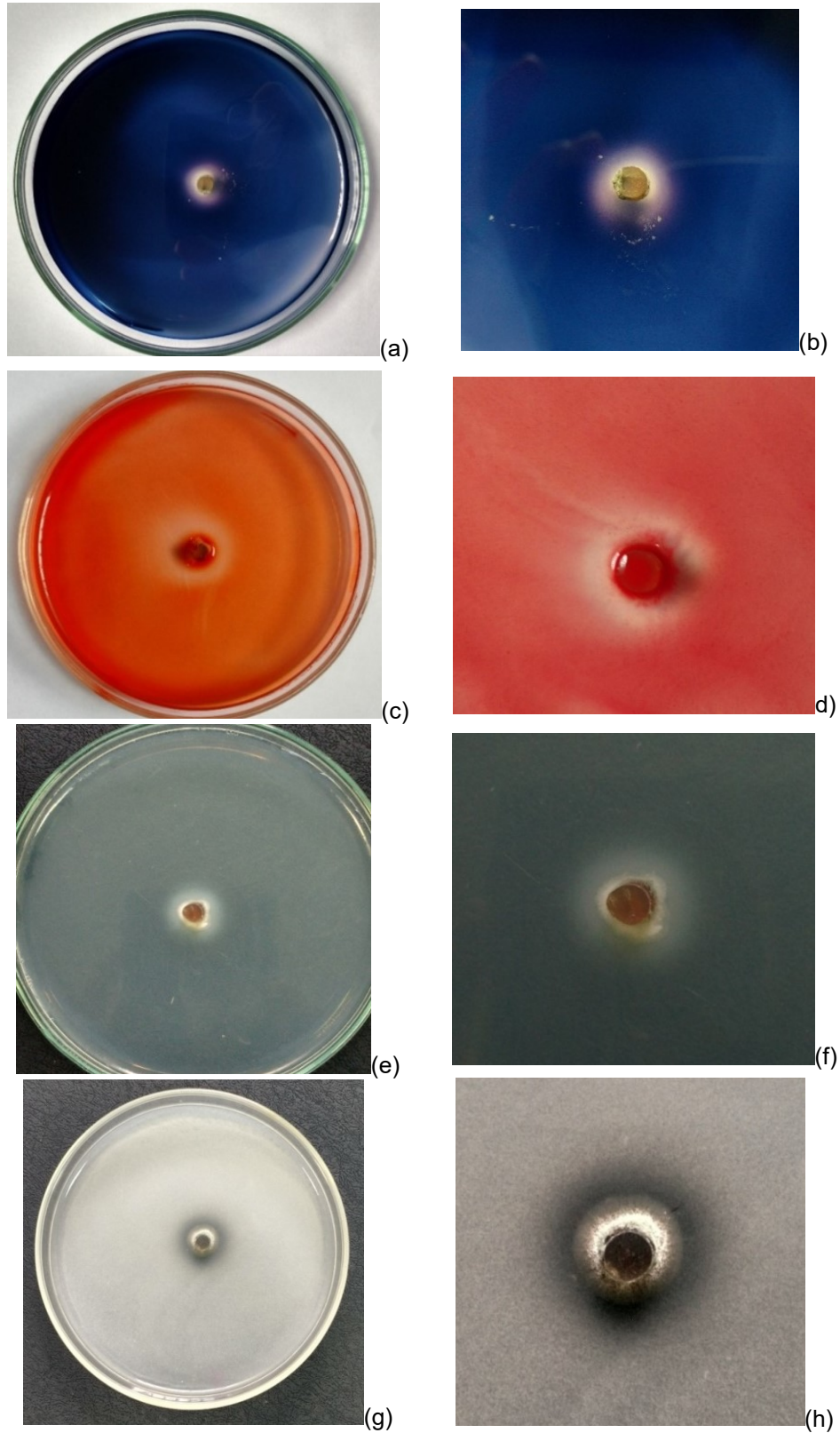


Figura 11: Resultado positivo para atividade da enzima amilase em (a) e (b), ambos F11 - *Penicillium sp.* Resultado positivo para atividade da enzima celulase em (c) F19 - *Trichoderma koningii* e (d) F17 - *Trichoderma sp.* Resultado positivo para atividade da enzima lipase em (e) e (f), ambos F10 - *Penicillium sp.* Resultado positivo para atividade da enzima protease em (g) e (h), ambos F10 - *Penicillium sp.*

Tabela 6: Resultados do índice enzimático para diferentes tempos de incubação (48h, 96h e 144h).

Código	Taxonomia	Celulase			Protease			Lipase			Amilase		
		48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
F01	<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0	1,9
F02	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	1,2	1,7	0	0	0	0	0	0	3,4
F04	<i>Curvularia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,1	0
F05	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0	3,6
F06	<i>Paecilomyces</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F07	<i>Fusarium</i> sp.	0	0	0	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0
F08	<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F09	<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F10	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	1,4	0	0	2	2,3	0	0	0	2,6
F11	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	0	1,2	0	1,9	1,8	0	0	0	2,4
F12	<i>Penicillium</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2,9	1,5	0	0	0	0	1,4	1,3	0	0	0	0
F14	<i>Aspergillus niger</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F15	<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F16	<i>Mortierella</i> sp.	2,2	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F17	<i>Trichoderma</i> sp.	2,2	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F18	<i>Mucor</i> sp.	1,5	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F19	<i>Trichoderma koningii</i>	2,9	2,8	0	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0

### 5.1.3. Discussão

Embora o *Colletotrichum gloeosporioides* (F13) tenha apresentado elevado índice enzimático para produção de celulase, esse não seria interessante do ponto de vista da eficiência, porque apresenta como característica reprodutiva baixa esporulação, acarretando na dificuldade de produção de enzimas. Portanto, buscou-se o fungo de melhor IE, o *Mucor sp.* (F18) que atingiu resultado semelhante ao F13 em 96 horas de observação.

Chandra et al. (2010) afirma que celulasas são utilizadas como enzimas chave na bioconversão de materiais celulósicos. A escolha do *Trichoderma koningii* (F19) como representante produtor de protease teve como acréscimo ser também bom produtor de celulase. Isso se refere à habilidade de várias espécies de *Trichoderma* para formar relações endophyticas mutualistas com várias espécies de plantas, sendo assim produtora de celulasas, segundo Harman et. al. (2004).

Sabe-se que fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* são capazes de degradar componentes mais específicos da parede celular devido a atuação de suas enzimas, portanto esperava-se que as espécies da seguinte taxonomia apresentassem bons resultados na produção da enzima celulase. Como a parede celular também apresenta componentes proteicos em quantidades consideráveis na composição, esperava-se também bons resultados do potencial enzimático para protease. O *Trichoderma koningii* apresentou essas características no tempo de crescimento de 48 horas para celulase e protease. Já o *Trichoderma sp.* (F17) apresentou resultado semelhante ao do *Trichoderma koningii*, para celulase, somente após 96 horas, para protease em 48 horas.

Os resultados de IE dos potenciais de produção para lipase não foram satisfatórios. Apenas o *Penicillium sp.* (F10) e (F11) apresentaram resultados aceitáveis. Portanto a opção mais ideal para análises foi o F11, com IE muito superior ao F10. Para escolha do representante da enzima lipase, foi apenas observado o maior potencial, pois todos apresentaram resultados muito satisfatórios com elevados IE, entretanto, esses resultados foram alcançados

somente após 144 horas de incubação, configurando-se um período muito extenso para produção. Nas primeiras observações (48h e 96h) o IE apresentaram resultados nulos para amilase.

Por essas considerações, a fim de alcançar maior objetividade, optou-se por analisar, no âmbito deste estudo, os resultados obtidos para os fungos *Mucor sp.* (F18) e *Trichoderma koningii* (F19).

## 5.2. Redução da Concentração de Sólidos

A partir da caracterização do lodo em uma média geral de acordo com todas as amostras brutas coletadas, observa-se que o desvio padrão e coeficiente de variação para sólidos foram relativamente elevados, isso porque duas amostras foram muito representativas com altos valores de sólidos totais nas análises com o fungo *Mucor sp.*, no valor de 57,51g/L e 57,39g/L, superestimando a média amostral. Quando esses resultados são anulados dos cálculos, estatisticamente a margem amostral torna-se mais homogênea, contribuindo para menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação.

Como citado anteriormente, para cada análise em laboratório foi utilizado uma biomassa do logo algáceo, portanto seguem resultados médios das amostras utilizadas para cada fungo:

Tabela 7: Caracterização de sólidos das amostras do lodo bruto utilizado em análises do F18.

Parâmetros	Média	DP	CV %	Máximo	Minimo
Sólidos Totais (g/L)	49,214	9,518	19,34%	57,515	40,587
Sólidos Fixos (g/L)	6,476	2,003	30,94%	8,697	4,741
Sólidos Voláteis (g/L)	42,738	7,576	17,73%	49,870	35,845

Tabela 8: Caracterização de sólidos das amostras do lodo bruto utilizado em análises do F19.

Parâmetros	Média	DP	CV %	Máximo	Minimo
Sólidos Totais (g/L)	35,990	3,841	10,67%	40,226	32,057
Sólidos Fixos (g/L)	3,089	8,484	27,46%	5,095	23,834
Sólidos Voláteis (g/L)	32,901	4,842	14,72%	37,760	26,961

Visto a variação das condições das amostras para cada análise e a impossibilidade de análises estatísticas, os resultados de sólidos foram avaliados individualmente pelo percentual de redução de acordo com cada análise realizada.

#### 5.2.1. *Mucor* sp.

Nos processos de hidrólise enzimática utilizando o fungo *Mucor* sp. observou-se a redução de concentração de sólidos totais e sólidos voláteis. Sólidos fixos apresentou os maiores percentuais de redução. A quantidade de matéria orgânica na amostra bruta foi de aproximadamente 87,05%.

Tabela 9: Redução de sólidos com 5% de extrato bruto enzimático (F18).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrolise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
40,9764	4,7810	36,1950	6	35,7273	3,3936	32,3337
40,9764	4,7810	36,1950	12	34,8538	3,4673	31,3865
40,9764	4,7810	36,1950	24	32,8142	3,2153	29,5989
40,9764	4,7810	36,1950	48	31,4437	2,9563	28,4873

Tabela 10: Redução de sólidos com 10% de extrato bruto enzimático (F18).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrolise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
40,9764	4,7810	36,1950	6	33,4945	3,1821	30,3124
40,9764	4,7810	36,1950	12	34,7994	3,2543	31,5450
40,9764	4,7810	36,1950	24	31,3827	3,1707	28,2120
40,9764	4,7810	36,1950	48	33,5575	3,3690	30,1885



Tabela 11: Redução de sólidos com 20% de extrato bruto enzimático (F18).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrólise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
57,4533	8,1708	49,2825	6	47,7580	6,1656	41,5925
57,4533	8,1708	49,2825	12	46,0123	6,0021	40,0102
57,4533	8,1708	49,2825	24	44,9216	6,1175	38,8041
57,4533	8,1708	49,2825	48	45,6075	5,9525	39,6550

No geral, a redução de sólidos foi mais considerável a partir de 24 horas de detenção, com a hidrólise enzimática. Dessa forma, seguem os dados percentuais de redução de sólidos.

Tabela 12: Percentual de redução de sólidos totais (F18).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	12,81%	18,26%	16,88%
12	14,94%	15,07%	19,91%
24	19,92%	23,41%	21,81%
48	23,26%	18,11%	20,62%

Tabela 13: Percentual de redução de sólidos fixos (F18).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	29,02%	33,44%	24,54%
12	27,48%	31,93%	26,54%
24	32,75%	33,68%	25,13%
48	38,17%	29,53%	27,15%

Tabela 14: Percentual de redução de sólidos voláteis (F18).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	10,67%	16,25%	15,60%
12	13,28%	12,85%	18,81%
24	18,22%	22,06%	21,26%
48	21,29%	16,59%	19,54%

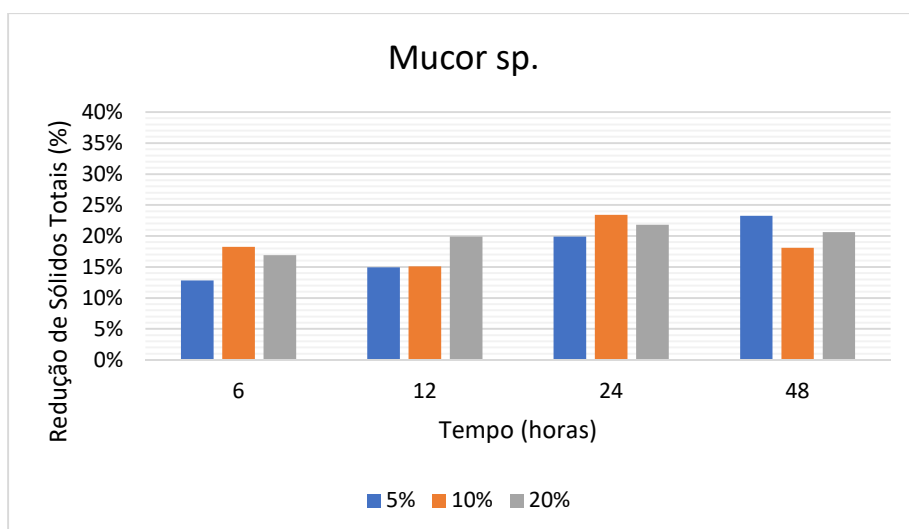


Figura 12: Gráfico de %redução de sólidos totais (F18).

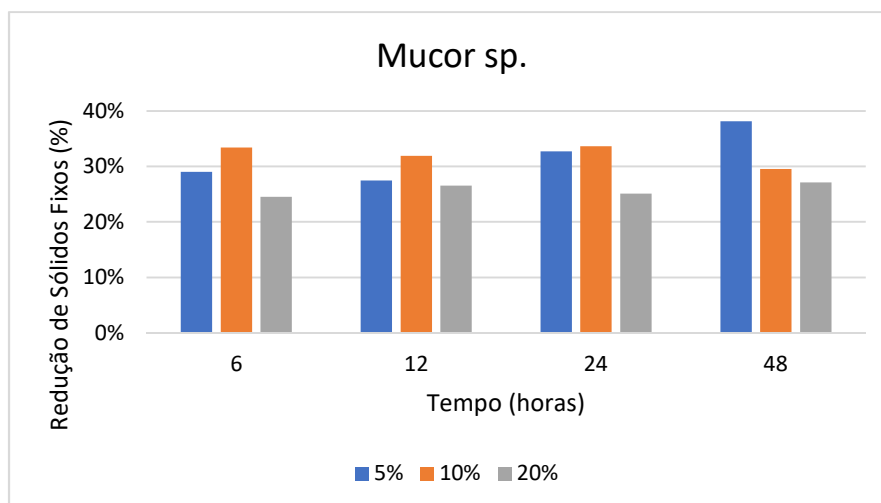


Figura 13: Gráfico de %redução de sólidos fixos (F18).

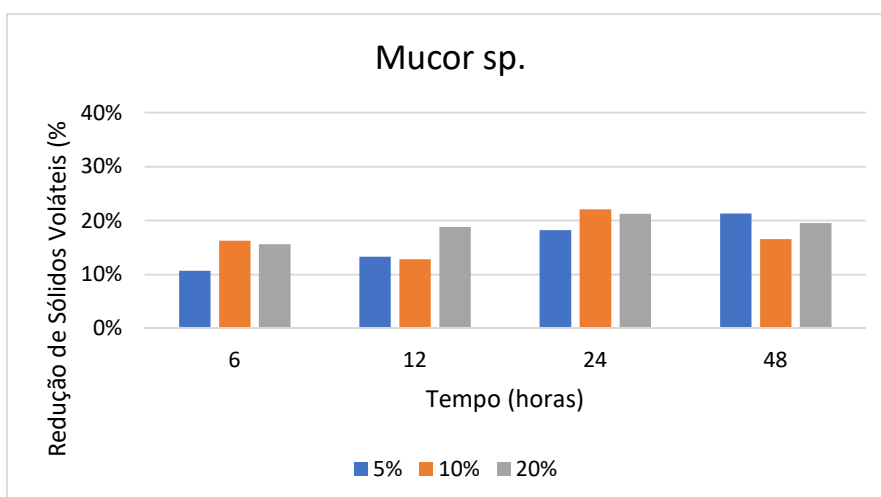


Figura 14: Gráfico de %redução de sólidos voláteis (F18).

### 5.2.2. *Trichoderma koningii*

Utilizando o fungo *Trichoderma koningii*, observou-se a redução de concentração de sólidos totais, fixos e voláteis para a maioria das análises. A redução de sólidos foi mais evidente a partir de 24 horas de detenção da hidrólise enzimática. A quantidade de matéria orgânica na amostra bruta foi de aproximadamente 91,42%.

Tabela 15: Redução de sólidos totais com 5% de extrato bruto enzimático (F19).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrólise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
39,8490	2,5126	37,3364	6	39,3898	2,3085	37,0813
40,2270	2,4664	37,7606	12	43,2522	3,0088	40,2434
39,8490	2,5126	37,3364	24	39,9165	2,1213	37,7952
39,8490	2,5126	37,3364	48	28,6469	1,9408	26,7060

Tabela 16: Redução de sólidos totais com 10% de extrato bruto enzimático (F19).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrólise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
33,8518	2,8027	31,0490	6	40,0650	2,9853	37,0797
40,2270	2,4664	37,7606	12	39,3751	2,6816	36,6935
32,1542	4,2645	27,8896	24	26,3538	2,1153	24,2384
32,1542	4,2645	27,8896	48	9,0310	0,9790	8,0520

Tabela 17: Redução de sólidos totais com 20% de extrato bruto enzimático (F19).

ST bruto (g/L)	SF bruto (g/L)	SV bruto (g/L)	Tempo de detenção hidrólise (horas)	ST hidrolisado (g/L)	SF hidrolisado (g/L)	SV hidrolisado (g/L)
33,8518	2,8027	31,0490	6	29,0314	1,3969	27,6345
40,2270	2,4664	37,7606	12	37,5303	2,7058	34,8245
32,1542	4,2645	27,8896	24	26,6573	2,0791	24,5782
32,1542	4,2645	27,8896	48	15,3742	1,2171	14,1571

No geral, a redução de sólidos foi mais considerável a partir de 24 horas de detenção, com a hidrólise enzimática.

Dessa forma, seguem os dados percentuais de redução de sólidos.

Tabela 18: Percentual de redução de sólidos totais (F19).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de estrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	1,15%	-18,35%	14,24%
12	-7,52%	2,12%	6,70%
24	-0,17%	18,04%	17,10%
48	28,11%	71,91%	52,19%

Tabela 19: Percentual de redução de sólidos fixos (F19).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de estrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	8,12%	-6,52%	50,16%
12	-21,99%	-8,73%	-9,71%
24	15,57%	50,40%	51,25%
48	22,76%	77,04%	71,46%

Tabela 20: Percentual de redução de sólidos voláteis (F19).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de estrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	0,68%	-19,42%	11,00%
12	-6,58%	2,83%	7,78%
24	-1,23%	13,09%	11,87%
48	28,47%	71,13%	49,24%

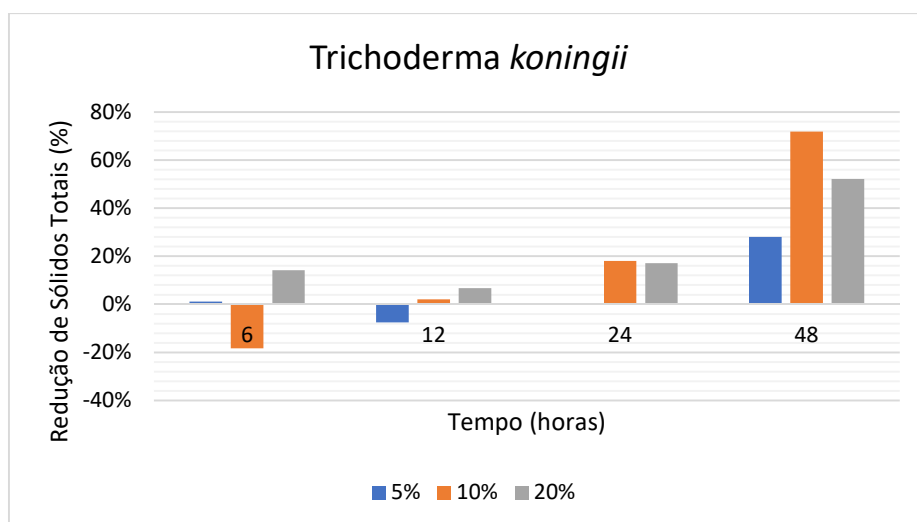


Figura 15: Gráfico de %redução de sólidos totais (F19).

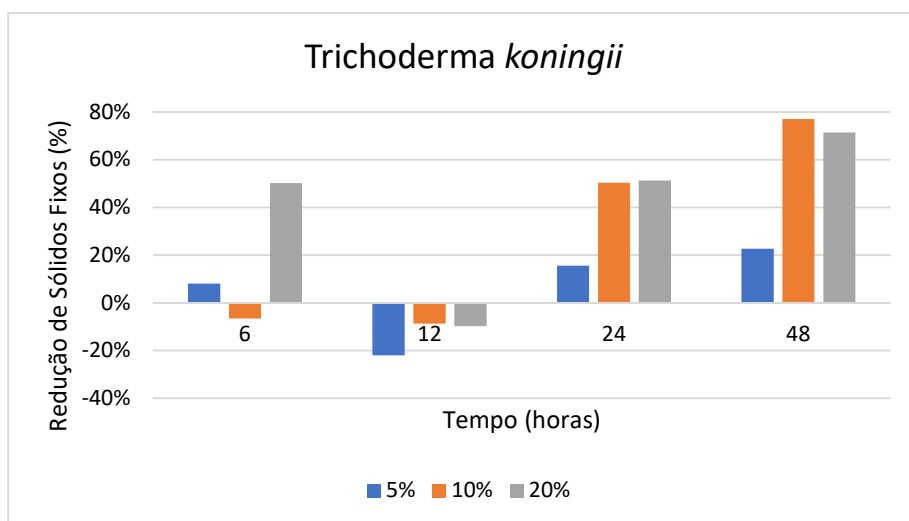


Figura 16: Gráfico de %redução de sólidos fixos (F19).

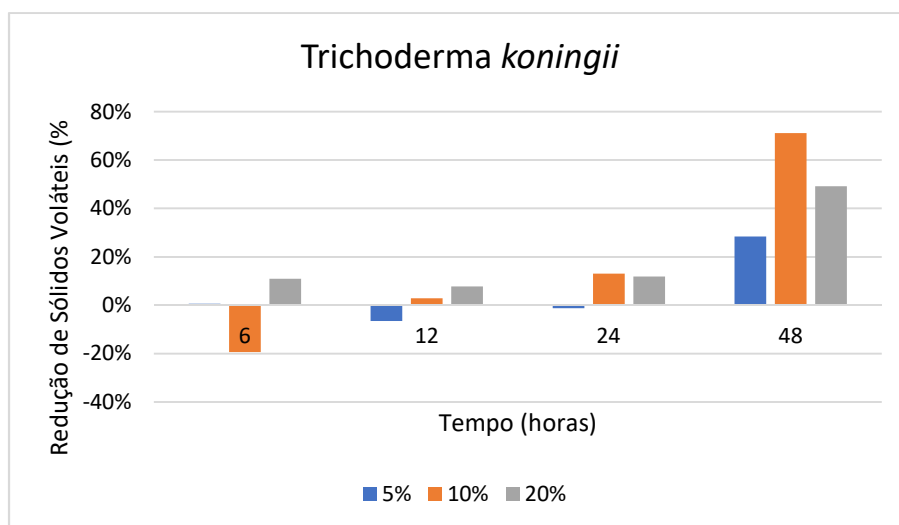


Figura 17: Gráfico de %redução de sólidos voláteis (F19).

### 5.2.3. Discussão

A verificação da redução de sólidos após ensaios de hidrólise enzimática foi contabilizando de acordo com o percentual de redução em função da biomassa utilizada para cada experimento, por isso a necessidade de expor todas as análises individuais de sólidos, anteriormente.

Os tratamentos com o *Mucor sp.* e *Trichoderma koningii* foram mais eficientes na redução de sólidos fixos (SF), ou seja, removendo a parte inorgânica do lodo de biomassa algácea. Para o *Mucor sp.* em torno de 30% e para *Trichoderma koningii* de 50%.

As reduções de sólidos voláteis (SV) são justificados pela volatilização de diferentes compostos orgânicos. Parâmetro importante, porque sua redução significa menor volume final da massa de lodo, facilitando o desague. Os melhores resultados foram após 24 horas de detenção, e em específico para o *Trichoderma koningii*, a redução aumentou substancialmente em 48 horas.

O *Mucor sp.* apresentou resultados satisfatórios para redução de sólidos totais. Sua redução máxima (23,41%) em 24 horas de detenção, com uso de 10% de extrato bruto enzimático. Para os extratos de 5% e 20% os valores máximos foram alcançados em 48 horas e 24 horas, respectivamente. Os resultados alcançados em 6 horas, foram de aproximadamente 18%, sendo possível estabelecer menores tempos de detenção para o *Mucor sp.*

*Trichoderma koningii* obteve seus melhores valores somente após as 48 horas para todas as concentrações de extrato, entretanto, esses foram substancialmente elevados, como por exemplo, com reduções de sólidos totais de 28,11%, 71,91% e 52,19% respectivamente para as concentrações de 5%, 10% e 20% de extrato.

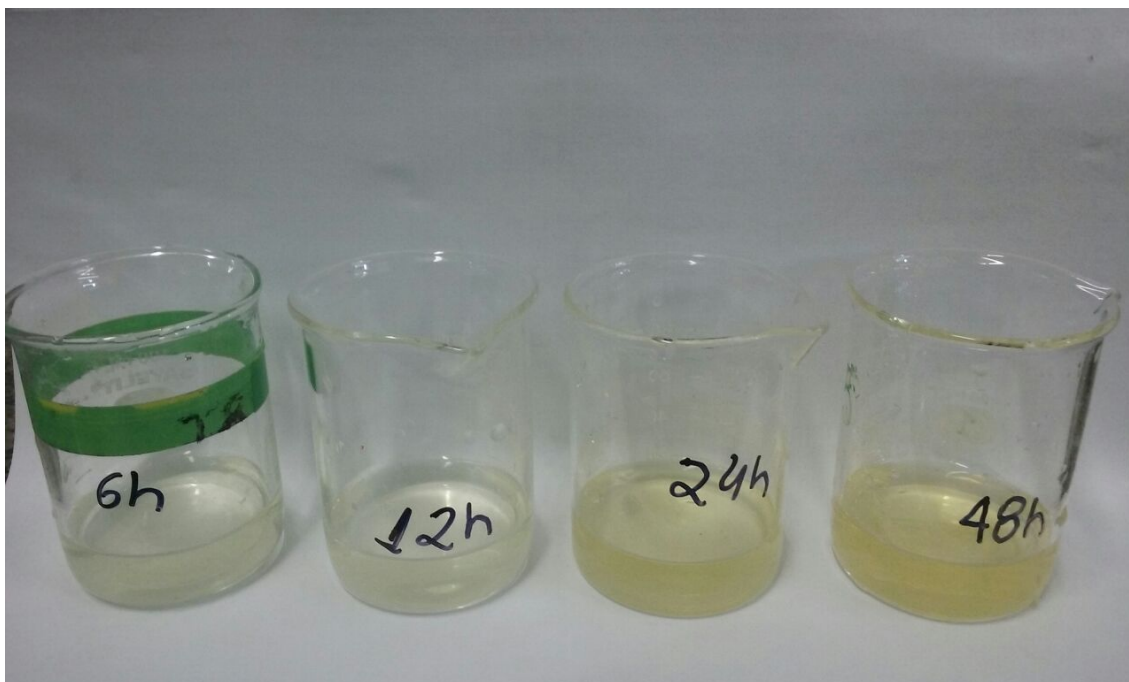


Figura 18: Amostras filtradas após hidrólise (*Mucor sp.*) com 10% de extrato enzimático.  
FONTE: Autoria própria.

Algumas considerações nas medições de sólidos devem ser analisadas. A adição do extrato bruto enzimático de 5% (1,0ml), 10% (2,5ml) e 20% (5ml) foi realizada após a medição da biomassa antes da hidrólise, logo, esses valores podem contribuir para o aumento dos valores de sólidos, o que é visto nos valores de redução negativos.

Além disso, há também crescimento de microorganismos presentes na biomassa bruta (bactérias, fungos, protozoários) que podem somar ao acréscimo do valor de sólidos.

Vale salientar que é pouco provável que a adição das enzimas auxiliasse no crescimento específico do *Mucor sp.* e *Trichoderma koningii* junto aos processos de hidrólise, se os procedimentos para a extração do extrato bruto enzimático foram realizados de maneira ideal.

### 5.3. Solubilização da Matéria Orgânica (DQO)

#### 5.3.1. *Mucor* sp.

Nos ensaios de hidrólise enzimática utilizando o fungo *Mucor* sp., foi observado valores mais altos para a concentração de 20% de extrato bruto enzimático, apresentando DQO filtrada em 1186 mg/L no tempo de detenção máximo adotado, 48 horas. Para as concentrações de 10% e 20% as variações de DQO filtrada no tempo máximo foram de 883 mg/L e 959 mg/L, respectivamente.

Tabela 21: Resultados de DQO filtrada (mg/L) após hidrólise (F18).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	995,65	1133,59	1298,32
12	910,31	1045,27	1173,28
24	896,42	1082,98	1140,54
48	882,53	958,94	1186,18

Observa-se que a DQO filtrada entre as concentrações de extrato definidas apresentaram um limiar regular, onde os valores permaneceram praticamente constantes durante todo o tempo de detenção, a partir de 6 horas. De acordo com os valores obtidos (Tabela 21) as variações apresentadas foram pequenas, em torno de 113 mg/L, 174,65 mg/L e 157,78 mg/L para 5%, 10% e 20% de concentração de extrato bruto enzimático, respectivamente.

Para homogeneizar os resultados dos ensaios de acordo com as diferentes amostras utilizadas em cada análise, o gráfico seguinte foi plotado em termos percentuais de %DQO filtrada para avaliar a biodegradabilidade pela solubilização das amostras específicas. O controle apresentado não contém extrato bruto enzimático, representado apenas pelo lodo de biomassa algácea.



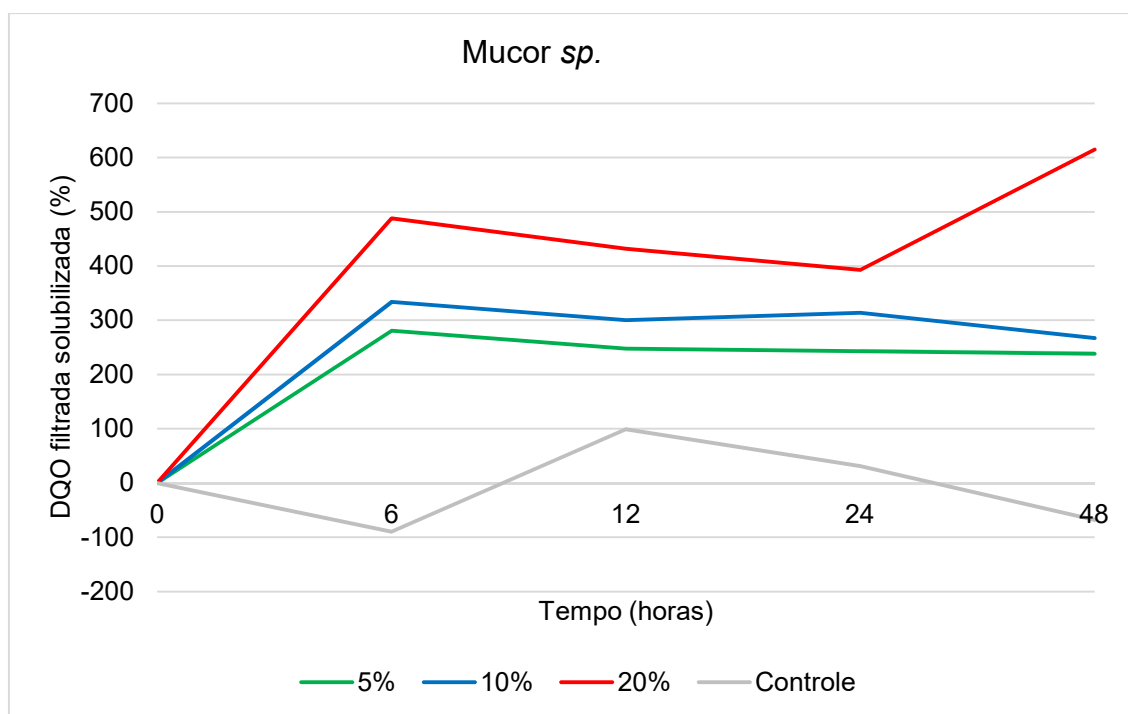


Figura 19: Gráfico de %DQO filtrada solubilizada para Mucor sp.

### 5.3.2. Trichoderma koningii

Nos ensaios de hidrólise enzimática utilizando o fungo *Trichoderma koningii*, foram observados valores variados para as concentrações de extrato bruto enzimático, com DQO filtrada solubilizada no tempo de detenção máximo de 455,53 g/L, 764,81 g/L e 715,22 g/L para concentrações de extrato 5%, 10% e 20% respectivamente. Entretanto, o maior índice de biodegradabilidade foi alcançado pela concentração de 5% em 12 horas de detenção, com 836,25 g/L.

Tabela 22: Resultados de DQO filtrada (mg/L) após hidrólise (F19).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	333,67	296,69	258,20
12	836,25	661,02	663,54
24	370,48	546,30	492,51
48	455,53	764,81	715,22

O comportamento da biodegradabilidade foi semelhante para todas as concentrações de extrato bruto enzimático, com menores valores em 6 horas, alto desempenho em 12 horas, consumo de oxigênio em 24 horas e por fim novamente um aumento da biodegradação em 48 horas.

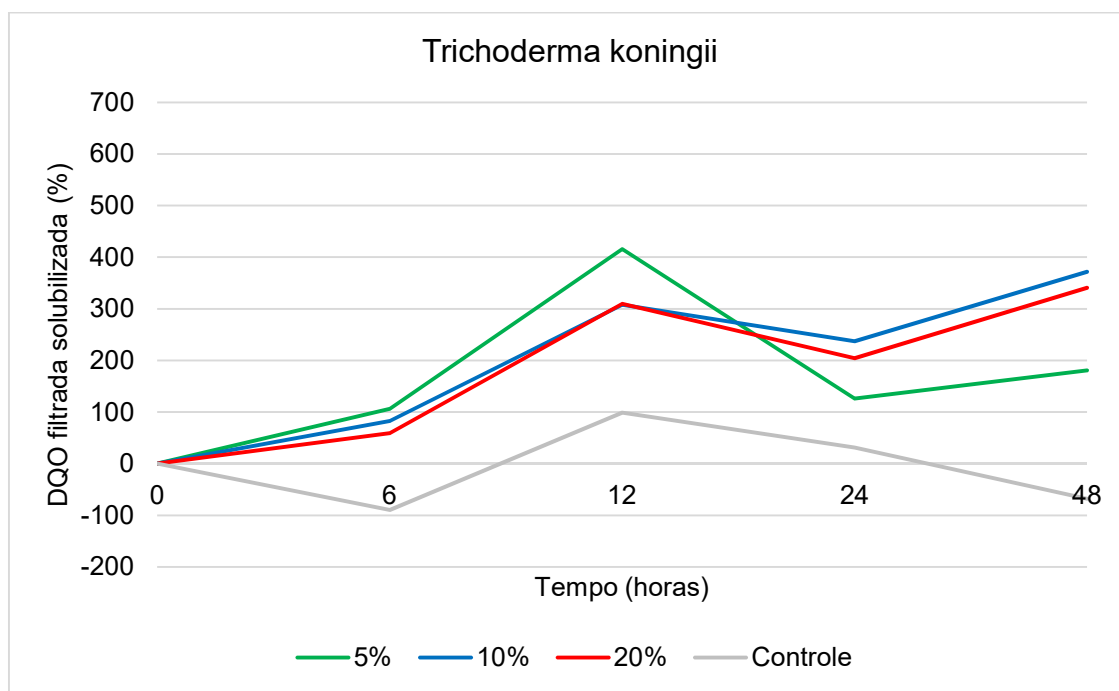


Figura 20: Gráfico de %DQO filtrada solubilizada para *Trichoderma koningii*.

### 5.3.3. Discursão

Durante o processo de hidrólise espera-se um crescente aumento da DQO até sua completa estagnação. Os resultados mostraram essa tendência, entretanto, a biodegradabilidade foi muito variável e as concentrações de DQO filtrada não foram satisfatórias, comparado aos resultados de hidrólise térmica e alcalina em um estudo paralelo a este que apresentou variação de concentração de 3,3 g/L para pré tratamento térmico e 6,5 g/L para alcalino (LAMBERTI, 2017).

A variações de DQO filtrada apresentadas pelo *Mucor sp.* para 5% e 10% de extrato foram suaves. A diferença de concentrações de 5% e 10% não interferiram de forma significativa na solubilização da biomassa, apresentando valores de %DQOf solubilizada homogêneos. Sabendo que as enzimas agem a

uma atividade máxima de acordo com a quantidade de substrato, para 5% e 10% houve processo de saturação das reações, entre consumo e biodegradação em 6 horas. Entretanto, para as análises de concentração de 20% os valores de %DQOf solubilizada foram mais elevados do que 5% e 10% e também mais variáveis, entre 6 horas e 24 horas o oxigênio foi consumido pelas atividades biológicas, a partir disso ocorreu efetivamente a biodegradabilidade da biomassa.

Para as análises com o *Thichoderma koningii*, o limiar constante também não foi alcançado dentro dos testes de detenção em 48 horas, porém apresenta uma tendência. As concentrações de 10% e 20% apresentaram semelhanças de resultados e desenvolvimento mais regular da biodegradabilidade. Entretanto, com 5% foram alcançados extremos valores de biodegradabilidade, alcançando o melhor resultado em 12 horas, porém houve um elevado consumo de oxigênio após a biodegradação.

*Mucor sp.*, como representante apenas da celulase, atingiu maiores valores de solubilização da matéria orgânica com 20% de extrato bruto enzimático, ou seja, a concentração de enzimas desse fungo teve que ser maior para atingir a parede celular das microalgas com melhores valores de %DQOf solubilizada. Os baixos valores testados, 5% e 10%, não foram suficientes no tempo de detenção para valores satisfatórios de biodegradabilidade.

Segundo MAHDY (2014) nos experimentos hidrolíticos para degradação da parede celular, a menor dosagem enzimática diminui a eficiência de hidrólise. Ou seja, quanto menor for a concentração de enzimas, menores serão os resultados de hidrólise enzimática. Verifica-se nos processos hidrolíticos, de acordo com os resultados de DQO filtrada, que a menor concentração enzimática não foi ideal para solubilização da matéria orgânica para a quantidade de substrato utilizada (50,0g)

O *Trichoderma koningii*, de maneira análoga como representante da celulase e protease, não atingiu resultados satisfatórios, esperava-se valores de biodegradabilidade maiores dos apresentados pelo *Mucor sp.*, pois segundo WANG *et al.* (1995), a parede celular de microalgas é composta por 25- 30%

de celulose, 15 - 25% de hemicelulose, 35% de pectina e de 5-10% de glicoproteínas, nesse sentido, *Trichoderma koningii* por apresentar bons índices de protease, produziria maiores valores para %DQOf solubilizada pela degradação das proteínas da parede celular, onde a ação de hidrólise enzimática é eficiente.

Algumas espécies de microalgas podem ser muito resistentes à hidrólise, o que reduz drasticamente a sua biodegradabilidade anaeróbica (TRAVIESO, 1999). Uma espécie de alga presente na biomassa do lodo algáceo é a *Chlorella* sp., assim como o grupo das cianobactérias. Essas são de difícil digestão devido a parede celular composta de polissacarídeos, o que dificulta o processo de hidrólise (OKUDA, 2002; Mussgnug *et al.*, 2010; Bohutskyi *et al.*, 2014).

O substrato utilizado é diversificado e heterogêneo, contendo assim além de microalgas, bactérias, protozoários, vírus e outros fungos. Todos esses organismos também contribuem paralelamente para reações biológicas no processo de hidrólise enzimática. Isso pôde ser verificado a partir das análises realizadas nas mesmas condições mecânicas e temporais do lodo de biomassa algácea, porém sem a presença de extrato enzimático produzido. Dessa forma, vê-se uma semelhança na tendência dos resultados de %DQOf solubilizada de forma mais brandas. Assim, é possível considerar que o uso do extrato bruto enzimático amplificou esses resultados, contribuindo para a solubilização da DQO filtrada.

Entretanto, os resultados obtidos para hidrólise térmica e alcalina, em estudo paralelo, alcançou resultados muito satisfatórios (LAMBERTI, 2017). Deduz-se então que os baixos índices de solubilização da DQO a partir de hidrólise enzimática podem ser potencializados com ajustes de temperatura e pH máximos ótimos suportados pelas enzimas inseridas, para esse lodo de biomassa algácea.

## 5.4. Solubilização da Matéria Orgânica (Carboidrato)

### 5.4.1. *Mucor* sp.

Após ensaios foi possível verificar a crescente solubilização de carboidratos com adição do extrato bruto enzimático do *Mucor* sp. Os resultados dos ensaios, mostraram resultados finais (em 48 horas) de concentração de carboidrato solubilizado de 695,31 mg/L, 1001,42 mg/L e 908,08 mg/L para 5%, 10% e 20%, respectivamente. Entretanto, as máximas atingidas para 5% e 20% foram em 24 horas (756,97 mg/L) e 12 horas (1456,96 mg/L), respectivamente.

Os resultados para 5% e 10% acompanharam o gráfico de DQOf solubilizada, e apresentaram crescimento na disponibilidade. Para as análises de 20%, ocorreu um pico de carboidrato e DQOf solubilizada em 6 horas de detenção, entretanto, após 24 horas houve um decréscimo significativo de carboidrato.

Tabela 23: Resultados de Carboidrato (mg/L) da amostra filtrada após hidrólise (F18).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	497,53	618,64	1430,86
12	488,36	574,47	1456,97
24	756,97	885,86	830,86
48	695,31	1001,42	908,08

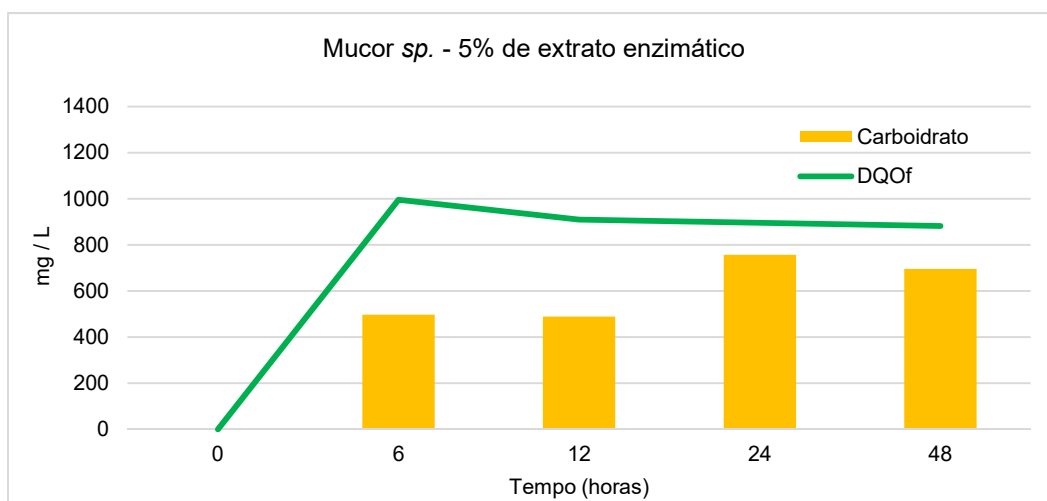


Figura 21: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 5% de extrato do *Mucor* sp.

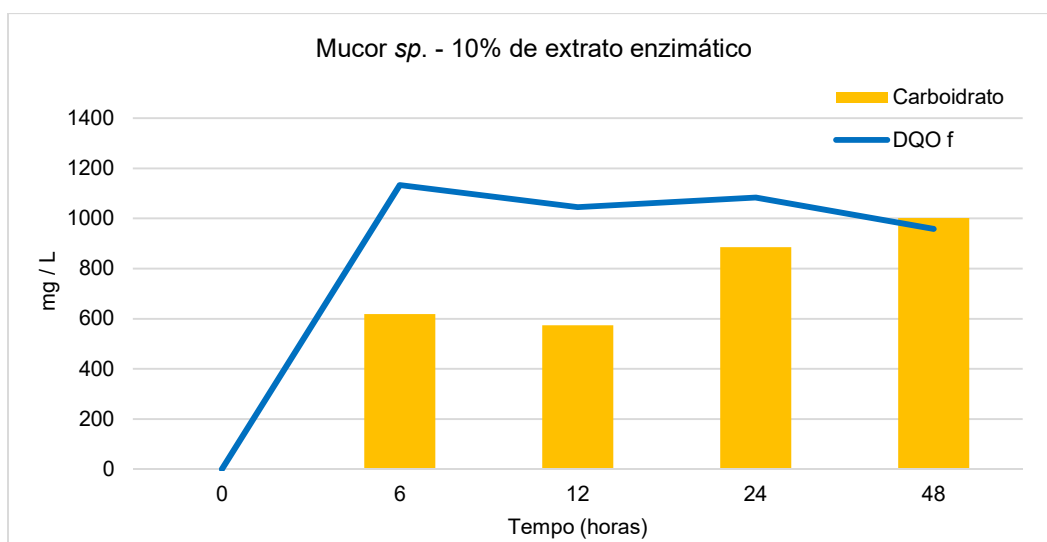


Figura 22: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 10% de extrato do Mucor sp.

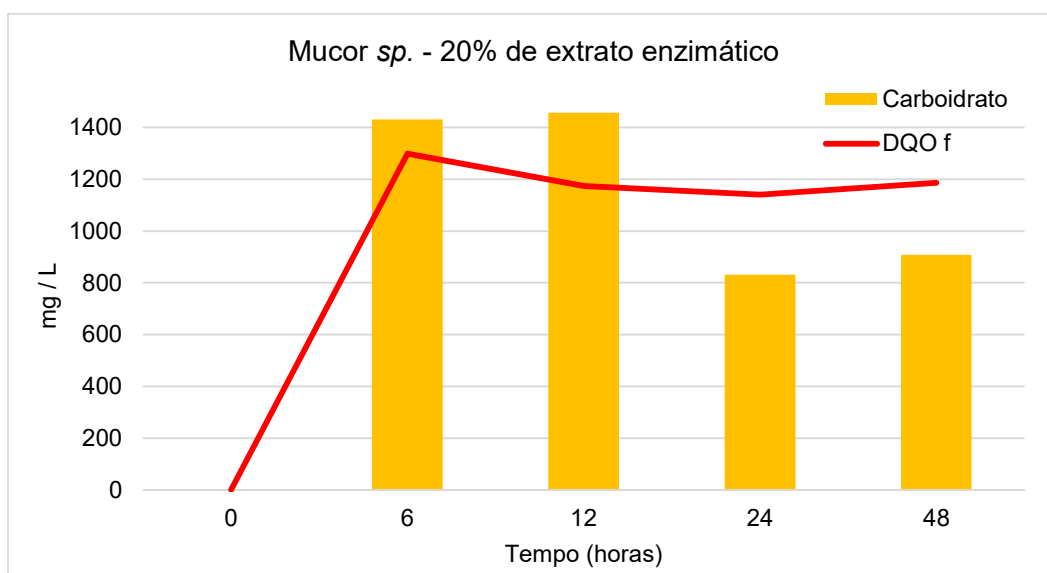


Figura 23: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 20% de extrato do Mucor sp.

Desta forma, segundo a análise de %Carboidrato solubilizado, verificou-se um aumento de 11 vezes para 10% de extrato e 10 vezes para 5% de extrato, no tempo máximo de detenção (48 horas). Com o uso de 20% de extrato bruto enzimático a maior solubilização foi de 15 vezes e ocorreu nas 12 horas iniciais, entretanto esse valor decresceu significativamente em 48 horas.

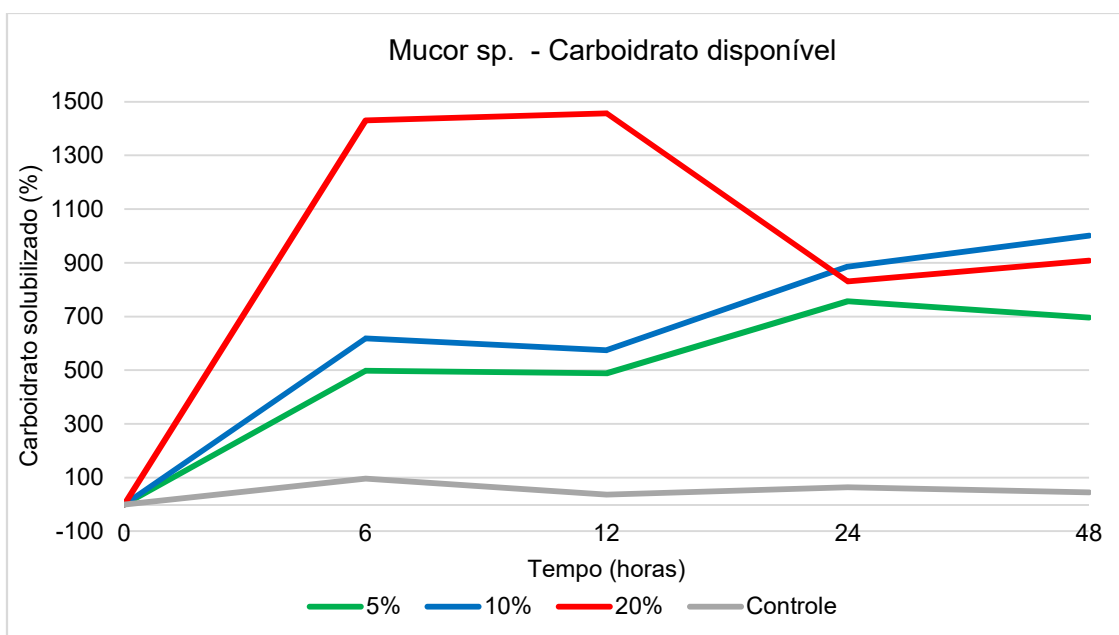


Figura 24: Gráfico de disponibilidade de carboidrato, *Mucor sp.*

#### 5.4.2. *Trichoderma koningii*

Os ensaios com extrato bruto enzimático do *Trichoderma koningii* não foram muito distintos entre si, apresentando um mesmo padrão de resultados, como pode ser observado para o tempo de detenção de 12 horas, onde ocorreram os maiores picos de concentração para 5% (1011,44 mg/L), 10% (833,67 mg/L) e 20% (684,78 mg/L) de extrato bruto enzimático. No tempo máximo de detenção (48 horas) os resultados foram substancialmente baixos de 310,21 mg/L, 378,09 mg/L e 372,30 mg/L, para 5%, 10% e 20% de extrato bruto enzimático, respectivamente. Após 12 horas, as concentrações de DQO filtrada e Carboidrato, reduziram cerca de 50% do valor anterior, e depois houve uma elevação dos valores de DQO filtrada.

Tabela 24: Resultados de Carboidrato (mg/L) da amostra filtrada após hidrólise (F19).

Tempo de detenção (horas)	Concentração de extrato bruto enzimático (w/w)		
	[5%]	[10%]	[20%]
6	432,64	535,52	305,52
12	1011,44	833,67	684,78
24	486,27	464,91	553,55
48	310,21	378,09	372,30

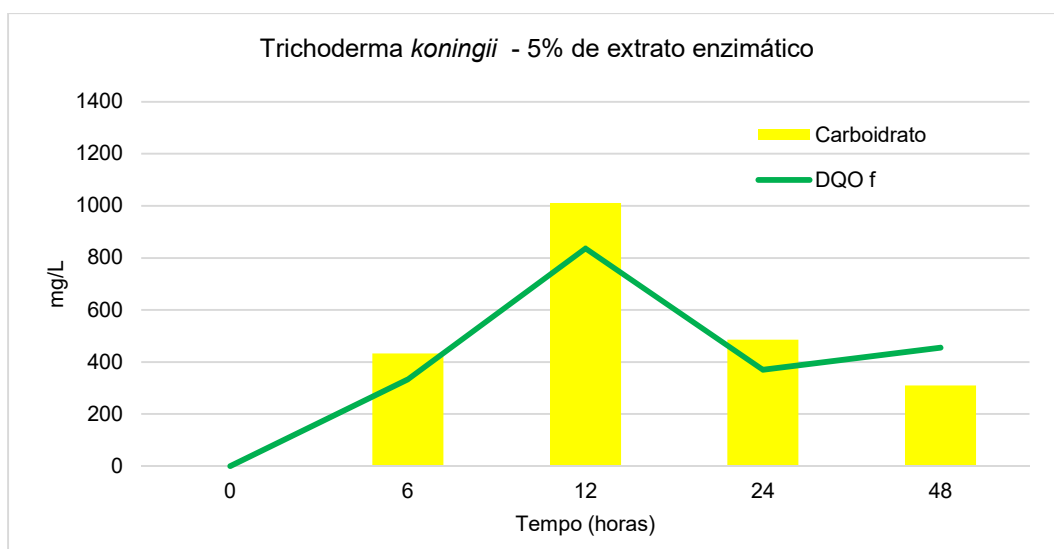


Figura 25: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 5% de extrato do *Trichoderma koningii*.

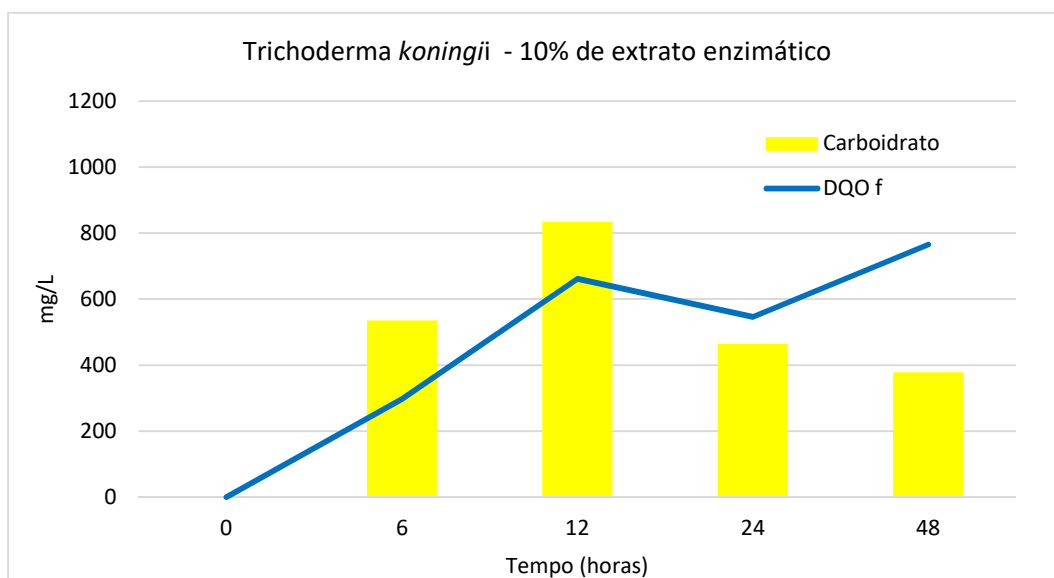


Figura 26: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 10% de extrato do *Trichoderma koningii*.



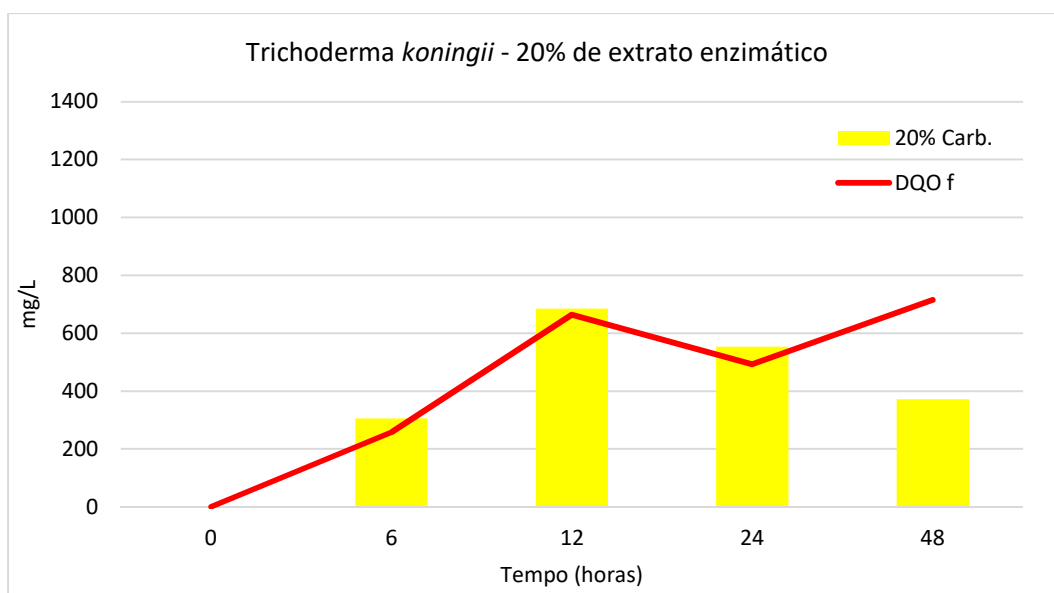


Figura 27: Solubilização de Carboidrato e DQOf com 20% de extrato do *Trichoderma koningii*.

Desta forma, segundo a análise de %Carboidrato solubilizado, verificou-se um aumento de 8 vezes para 5%, 6 vezes para 10% e 9 vezes para 20% de extrato bruto enzimático no tempo de detecção de picos de concentração (12 horas). Após esse período, o decaimento da concentração de carboidrato foi considerável para 5% e 20%, entretanto, a concentração para 10% manteve-se.

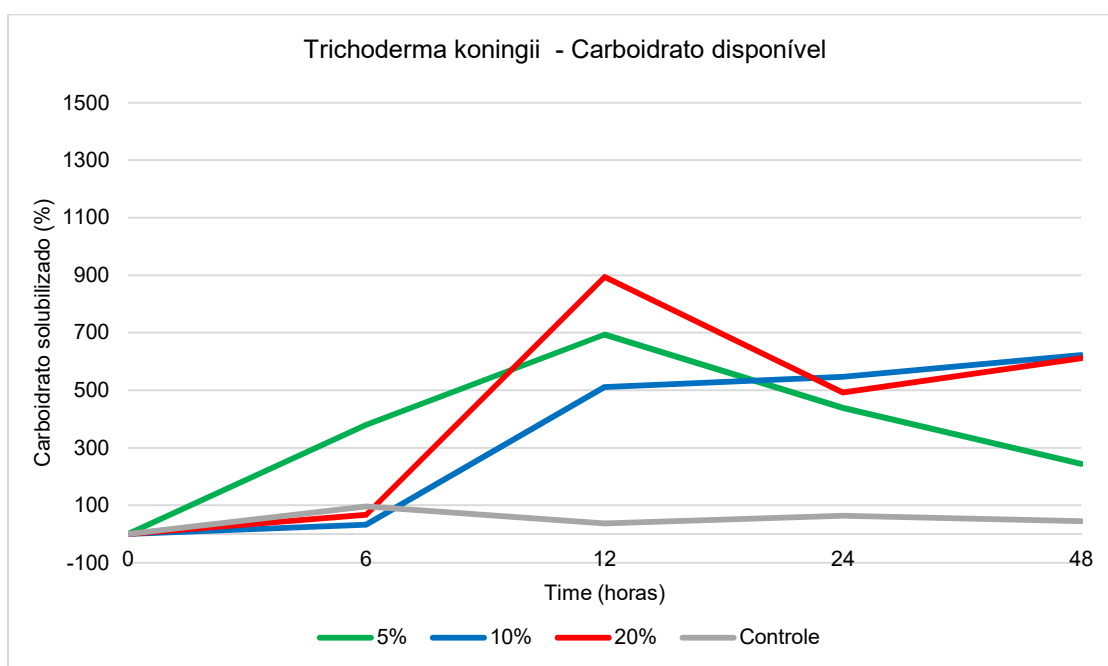


Figura 28: Gráfico de disponibilidade de carboidrato, *Trichoderma koningii*.

#### 5.4.3. Discussão

A partir dos resultados encontrados de solubilização de carboidratos, é possível identificar comportamentos semelhantes de DQOf solúvel e Carboidrato com 5% e 10% de extrato para o *Mucor* sp. nos gráficos comparativos, visto isso também para o *Trichoderma koningii*. A variação de concentração de carboidrato apresentadas pelo *Mucor* sp. para 5% e 10% de extrato foram semelhantes nos tempos de 6 e 12 horas e também 24 e 48 horas.

Para o *Trichoderma koningii*, houve redução significativa nos valores após seu pico máximo de concentração, em 12 horas. A redução de carboidrato foi alta nos momentos finais. Este foi consumido pelos microorganismos visto isso também pela redução da DQOf solubilizada pelo consumo de oxigênio, após 12 horas de detenção. Deduz-se que esse consumo foi possível devido a alta disponibilidade de material de suprimento para os microorganismos presentes na biomassa, possibilitando maior crescimento dessas comunidades.

O consumo de carboidrato disponível também pôde ser observado para as análises de 20% de extrato do *Mucor* sp., onde as concentrações reduziram após 12 horas, entretanto, a DQOf solubilizada apresentou uma regularidade. Assim, a solubilidade do carboidrato foi mais expressiva no tempo de detenção de 12 horas com 20% de extrato bruto enzimático, disponibilizando mais açúcar para o meio de forma mais rápida diante os tempos de detenção pre estabelecidos.

De acordo com resultados obtidos por autores da área em ensaio de hidrólise envolvendo variações térmicas e alcalinas, identifica-se que a solubilização de carboidrato do lodo está estreitamente relacionada às características do lodo e dos componentes intracelulares das microalgas. Portanto, o lodo algáceo misto sob hidrólise expressa menor solubilidade de carboidratos quando comparado ao lodo de cultivo puro de microalgas. Em estudos realizados por PRAJAPATI (2015) contribuíram para afirmar que a hidrólise enzimática é uma ferramenta eficiente de pré-tratamento para melhorar a viabilidade técnica e econômica dos processos de produção de biocombustíveis a partir do cultivo de algas puras. O mesmo autor obteve valores de obtenção de DQO e solubilização de

açúcar da biomassa de algas de 29% e 44%, respectivamente, durante 48 h incubação, a com uso de enzimas do *A. lentulus*, bom produtor de celulase.

A partir dos resultados de solubilização, afere-se que é possível que o pré-tratamento enzimático seja um meio auxiliar de apoio à hidrólise, intensificando o rompimento da parede celular, pois esta técnica é também economicamente viável sendo preparada de forma natural e biológica, não sendo um custo adicional se inserida. Passos (2016) estudou a hidrólise enzimática em cultivos puros de microalgas, e confirmou que o pré tratamento enzimático melhorou a solubilização da biomassa de microalgas e também, em adicional, o rendimento de metado no pré-tratamento.

Com o intuito de evoluir a pesquisa para biodisponibilização do material intracelular do lodo de biomassa algácea e obter valores mais concretos, é necessário acrescentar ensaios com cultivos puros das microalgas mais presentes no substrato, e então entender efetivamente a ação enzimática sobre esses microorganismos e suas características biológicas únicas. Verificar também em percentuais de redução o potencial dessa mesma ação enzimática agindo sobre a biomassa do logo algáceo, não pura.

Concluíse que, os melhores valores atingidos foram:

### *Mucor sp.*

**Sólidos:** 5% de extrato em 48 horas

x

**DQO e Carboidrato:** 20% de extrato em 6 horas

- O uso de 20% de extrato para sólidos não obteve variações significativas durante todo o tempo.

20% de extrato bruto enzimático  
6 horas de detenção

### *Trichoderma koningii*

**Sólidos:** 10% de extrato em 48 horas

x

**DQO e Carboidrato:** 5% de extrato em 12 horas

- O uso de 5% de extrato para sólidos não apresentou redução até 12 horas.

5% de extrato bruto enzimático  
12 horas de detenção

## 6. CONCLUSÃO E OBSERVAÇÕES

A etapa inicial da pesquisa, que envolveu a seleção dos fungos filamentosos pelas características do potencial enzimático, foi de fundamental importância no intuito de definir os organismos que poderiam auxiliar de maneira mais eficiente da degradação da parede celular, primeiramente, com a celulase e protease. Lipase e amilase, foram verificadas a fim de contribuir para futuras pesquisas na biodegradação do material intracelular, após a interferência da parede celular.

Os processos de hidrólise foram mais eficientes na redução de sólidos quando utilizado a concentração de 20% (w/w) para o extrato enzimático bruto para *Mucor sp.* e *Trichoderma koningii*. Os resultados apresentados mostraram que a eficiência de redução de sólidos foi maior para sólidos fixos, mas também considerável para sólidos voláteis. Para todas as concentrações de extrato bruto enzimático, o percentual de redução foi maior a partir de 24 horas de detenção. O aumento da carga de sólidos observado nas análises iniciais (6 horas e 12 horas) dos processos hidrolíticos com o *Trichoderma koningii* pode ter contribuição da carga de extrato bruto enzimático não contabilizado e até mesmo da produção excessiva dos microorganismos no substrato, nessas análises.

Altas concentrações de sólidos levam a uma redução do processo de conversão do substrato, devido a fatores como, dificuldade de homogeneização da mistura, inibição da enzima com o aumento da concentração de glicose liberado, problemas de transferência de massa, diminuição da disponibilidade de água, ligação irreversível da enzima ao substrato incluindo a ligação não produtiva com a lignina e também a desnaturação da enzima (Puri et al., 2013).

Verifica-se a necessidade de análises com menores concentrações de extrato bruto enzimático.

Ambos processos hidrolíticos com os dois fungos utilizados mostraram resultados conflitantes quanto a solubilização de material orgânico, o consumo de DQO e as concentrações de carboidrato, pois, presume-se que ao mesmo

tempo que a biomassa havia sido degradada e o material disponibilizado, esses também eram consumidos pelos microorganismos presentes no substrato. A redução de DQO foi mais eficiente em 6 horas de detenção do *Mucor* sp. e a maior disponibilização de carboidratos foi nesse mesmo tempo com uso de 20% de extrato enzimático. Em 12 horas, com *Trichoderma koningii*, foi possível maior DQO e maior disponibilização de carboidrato, para todas as concentrações de extrato bruto enzimático.

O aumento da carga de substrato é importante a fim de se obter concentrações mais elevadas de açúcares no hidrolisado (Wang et al., 2012; Puri et al., 2013). Sabendo que a enzima age de acordo com a quantidade de substrato, é ideal encontrar a carga máxima de biomassa do lodo algáceo que contribua para maior biodisponibilização dos açúcares (carboidrato).

A partir da comparação do processo hidrolítico de controle sem adição de enzimas, foi constatado que a hidrólise enzimática funciona, de forma branda na temperatura de 30°C e sem controle do pH. Mas é importante verificar a efetividade das atividades das enzimas celulase e protease para os resultados, realizando experimentos com biomassa de microalga pura, desconsiderando assim a ação de qualquer microorganismo no substrato além da microalga, além de controlar melhor as condições de processo.

A partir de estudos literários, as seguintes considerações devem ser intituladas como parâmetros de controle a serem melhorados:

- pH: A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima, chamado pH ótimo da enzima, acima ou abaixo do qual a atividade decresce. Portanto, é fundamental realizar os processos controlando o pH ótimo para a enzima específica utilizada.
- Concentração de substrato: A velocidade de uma reação catalisada por enzimas aumenta conforme a concentração de substrato, até atingir uma velocidade máxima. A obtenção de um platô na velocidade de reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis na enzima (CHAMPE & HARVEY, 1997). Bem como a verificação da efetividade da hidrólise

enzimática no lodo de microalga em comparação a uma biomassa pura de microalga.

- Temperatura: O aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas de enzima e substrato, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo. Uma elevação adicional da temperatura resulta em uma redução na velocidade de reação, como resultado da desnaturação da enzima induzida pela temperatura (CHAMPE & HARVEY, 1997). Portanto, é necessário desenvolver a hidrólise a uma temperatura ótima para a atividade enzimática ocorrer de maneira mais eficiente.

Segundo estudos com hidrólise térmica e química, Wang *et al.*, (2016) afirma que a baixa solubilização obtida em alguns ensaios pode ser justificada pela possível presença de compostos de polissacarídeos de difícil degradação, como celulose e hemicelulose. Sabe-se também que a temperatura requerida para a solubilização desses encontra-se na faixa de 150 a 230°C (Gonzales-Fernandes *et al.*, 2014).

Nesse sentido, a inclusão da hidrólise enzimática com enzimas de fungos que degradam esses materiais com eficiência, como a celulase, poderia auxiliar em índices maiores de solubilidade, encontrando um equilíbrio entre temperatura, pH e concentração enzimática, reduzindo a demanda energética para temperatura.

Além disso, a inclusão de enzimas biológicas produzidas naturalmente não elevaria o custo, consideravelmente, para todo sistema de tratamento.

## **7. FINANCIAMENTO**

O projeto piloto localizado na Estação de Tratamento de Esgotos Sanitários (ETE), da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), no bairro Araçás, em Vila Velha, ES, permaneceu em funcionamento completo.

Os equipamentos essenciais previstos para a realização de todas as etapas foram: autoclave, banho maria, capela fluxo laminar, incubadora, geladeira, shaker, balança analítica, câmara de Neubaur, centrífuga, utensílios, vidrarias e reagentes citados na metodologia.

Foi necessária a utilização do Laboratório de Saneamento do Departamento de Engenharia Ambiental (LABSAN) e seus equipamentos e reagentes, já disponíveis para a pesquisa.

O subprojeto em questão para Construção Sustentável e Saneamento Ambiental contou com apoio financeiro da FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I.B.M.. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2012. v.19, p.257–275.
- AHAMED A, VERMETTE P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochem Eng. J* 40:399–407. 2008.
- AISSE, M.M. *Processos Econômicos de Tratamento de Esgotos Sanitários*. Dissertação. Pontifícia Universidade católica do Paraná. 1993.
- AIYUK S.; FORREZ I, LIEVEN D.; VAN HAANDEL; VERSTRAETE W. Anaerobic and complementary treatment of domestic sewage in regions with hot climates - A review. *Bioresource Technology*, v.97, 2225–2241. 2006.
- AJEEJ, A; THANIKAL, J. V.; NARAYANAN, C. M.; KUMAR, R. E. An overview of bio augmentation of methane by anaerobic co-digestion of municipal sludge along with microalgae and waste paper. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 50. 270-276. 2015.
- AMORIM, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UESB, Itapetinga. 2011.
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC, 2011.
- ARANTES, V.; SADLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010 Article in press. doi:10.1186/1754-6834-3-4.
- B. BALDAN, P. ANDOLFO, L. NAVAIZIO, C. TOLOMIO, P. MARIANI, Cellulose in algal cell wall: an “in situ” localization, *Eur. J. Histochem*. 2001.
- BAHADAR, A.; KHAN, M.B. Progress in energy from microalgae: A review. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v.27, 128–148, 2013.



- BARREIRO, D.L.; PRINS, W.; RONSSE, F.; BRILMAN, W. Hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae for biofuel production: State of the art review and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. 2013. v.53, p.113-127.
- BATATA, R. A. et al. Purification and characterization of na extracelular trypsina-like protease ok *Fussarium oxyporum* var. *lini*. *Journal of Biocience and Bioengineering*, Osaka, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.
- Becker, E. W. (2004). Micro-algas na alimentação humana e animal. *Em: Richmond.A. Livro de mão de Micro Algae Cuture*. Oxford: Blackwell.
- BENEMANN J.R. Opportunities and challenges in algae biofuels production - A Position Paper. by Dr. John R. Benemann in line with Algae World. 2008.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of biotechnology*, Amsterdam, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, Dec. 1998.
- BICUDO, C.E. de M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil – chave para identificação e descrições. São Carlos-SP: Editora RiMa, 2005. 489p.
- BLUMREISINGER, M., MEINDL, D., LOOS, E., 1983. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22 (7), 1603e1604.
- BOOPATHY, R. Enzyme Technology in food health industries. *Indian FoodIndustry*, v. 13, p. 22-31, 1994.
- BRIJWANI, K.; OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*. v, 45, p. 120-128, 2010.
- BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: *Trichoderma and Gliocladium*. Harman GE, Kubicek CP. (Eds). London & Bristol, PA: Taylor & Francis Ltd. Vol. 2, 343-363, 1998.
- CAMPOS, J.R (coord.). Tratamento de Esgotos Sanitários por Processo Anaeróbio e Disposição Controlada no Solo. PROSAB, ABES. 464 p. Rio de Janeiro,1999.

- CARRERE H., ANTONOPOULOU G., AFFES R., PASSOS F., BATTIMELLI A., LYBERATOS G., FERRER I. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. *Bioresource Technology*. v.119, 386 -397, 2016.
- CASSINI, S.T. Digestão de resíduos sólidos orgânicos e aproveitamento do biogas. PROSAB, ABES. 210p. Rio de Janeiro, 2003.
- CASTILHOS JUNIOR, Armando Borges de et al. (Org.). Gerenciamento de resíduos sólidos urbanos com ênfase na proteção de corpos d'água: prevenção, geração e tratamento de lixiviados de aterros sanitários. Programa de Pesquisas em Saneamento Básico - PROSAB - Edital 04. 2006.
- CASTRO, M. A.; PEREIRA Jr. N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, p. 181-188, 2010.
- CAVALCANTI, P.F.F.; HAANDEL, A. van; KATO,M.T.; SPERLING, M. von; LUDUVICE, M.L.; MONTEGGIA, L.O. (2001). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Carlos Augusto Lemos Chernicharo (coord.), Projeto PROSAB, Belo Horizonte [s.n.]. cap. 3, p. 105-170.
- CESKA, M. Enzymatic catalysis of solidified media. *European Journal Biochemistry*, Berlim, v. 22, n. 2, p. 186-192, Mar. 1971.
- CHAMPE, P. C. & HARVEY, R. A. (1997). *Bioquímica ilustrada*, 2ªed. Artes Médicas, Porto Alegre. p. 53-92 e p. 177-192.
- CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P.K.; KUMAR, H.; SANGWAN, R.S.. Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy*. v.34, n.5, p.805-811, 2010.
- CHEIRSILP, B., TORPEE S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*. V.110, 510–516, 2012.

- CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H.W.; HO, S.H.; CHENG, C.L.; LEE, D.J.; BAI, F.W.; CHANG, J.S. Microalgae-based carbohydrates for biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*. 2013. v.78, p.1-10.
- CHERNICHARO, C. A. L. Reatores anaeróbios: Princípios do tratamento biológico de águas residuária. v. 5. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Ambiental-UFMG, 2007.
- CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v.25, 294–306, 2007.
- CHO, S., PARK S., JAECHUL Y., LEE T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresource Technology*, v.143, 330-336, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007. v.25, p.294-306.
- CHO, H.S., OH, Y.K., PARK, S.C., LEE, J.W., PARK, J.Y., Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew. Energ.* 54, 156e160, 2013b.
- CHO, S., PARK S., JAECHUL Y., LEE T. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatments on mixed-microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresource Technology*, v.143, 330-336, 2013.
- CIUDAD G, RUBILAR O, AZÓCAR L, TORO C, CEA M, TORRES A, et al. Performance of an enzymatic extract in *Botryococcus braunii* cell wall disruption. *J Biosci Bioeng*;117(1):75–80, 2014.
- COROMINAS L., J. FOLEY J., GUEST J.S, HOSPIDO A., H.F. LARSEN. MORERA S., SHAW A. Life cycle assessment applied to wastewater treatment: State of the art. *Water Research*. v.47, 5480-5492, 2013.
- CRUZ, L.S. Variação temporal das comunidades fitoplanctônicas em uma lagoa de polimento de efluente de um reator anaeróbio compartimentado tratando esgoto sanitário. 2005. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Univ. Federal do Espírito Santo. 173p.

- DE VRIES, R.P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 65, p. 497-522, 2001.
- DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABART, T.; SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Indian Journal of Chemical Technology*. v. 15, p. 449-456, 2008.
- DINGLE, J.; TEID, W. W.; SOLOMONS, G. L. The enzymic degradation of pectin and other polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 4, n. 8, p. 149-155, Apr. 1953.
- DUAN, P.; BAI, X.; XU, Y.; ZHANG, A.; WANG, F.; ZHANG, L.; MIAO, J. Non-catalytic hydrolysis of microalgae to produce liquid biofuels. *Bioresource Technology*. 2013. v.136, p.626-634.
- E.A. EHIMEN, J.B. HOLM-NIELSEN, M. POULSEN, J.E. BOELSMAND, Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae, *Renew. Energy* 50,476–480, 2013.
- FALLOWFIELD, H. J.; CROMAR, N. J. & EVISON, L. M. (1996). Coliforme die-off rate constants in high rate algal pond and the effect of operational and environmental variables. *Water Science Technology*, v. 34, n 11, p 141-147.
- FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. *Reatores biológicos: fundamentos e aplicações*, Lisboa: Lidel, p. 483, 2007.
- FRIGON, J.C.; MATTEAU-LEBRUN, F.; ABDOU, R.H.; MCGINN, P.J.; O'LEARY, S.J.B.; GUIOT, S.R. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied Energy*. 2013. v.108, p.100-107.
- FROST G. M.; MOSS, D. A. production of enzymes by fermentation. In: REHM H. J.; REED, G. *Biotechnology*. Weinheim: VCH, 1997. p. 65-102.
- GACESA, P.; HUBBLE, J. *Tecnologia de las enzimas*. Zaragoza: Acriba, 206p, 1990.

- GALANTE, Y.M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma enzymes in the textile industry. In: Harman GE, Kubicek CP (eds) Trichoderma and Gliocladium. Taylor and Francis, London, pp 311–326, 1998.
- GODFREY, T.; WEST, S. I. INtroduction to industrial enzymology. In: GODFREY, T. (Ed.). Industrial enzymology. 2 edition. London: Macmillan, P. 120-138, 1996.
- GONÇALVES, R.F. (coord.) Uso racional de água e energia: Conservação de água e energia em sistemas prediais e públicos de abastecimento de água. PROSAB, ABES. 352p. Rio de Janeiro, 2009.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C, SIALVE B, BERNET N, STEYER J-P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of Scenedesmus biomass on methane production. Bioresour Technol; 110:610–6, 2012.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C, SIALVE B, BERNET N, STEYER J-P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: focus on biomethane production. Biofuels Bioprod Bioref, 6:205–18. 2012.
- GONZÁLEZ-FERNANDEZ C. SIALVE B., MOLINUEVO-SALCES B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. Bioresource Technology, v.198, 896–906, 2015.
- GOTARDO, J. T. Perfil Longitudinal de uma lagoa facultativa de tratamento secundário de esgoto doméstico aplicada nas condições ambientais do sul do Brasil. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- GOUVEIA L., OLIVEIRA, A.C. Microalgae as a raw material for biofuels production. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, v.36, 269–274, 2009.
- GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. Glossário ilustrado de fungos: termos conceitos aplicados a micologia. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 124p, 2003.
- GUIMARÃES, L. H. S.; NOGUEIRA-PEIXOTO, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for

- production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 474- 480, out./dez. 2006.
- GÜNERKEN, E., D'HONDT, E., EPPINK, M.H.M., GARCIA-GONZALEZ, L., ELST, K., WIJFFELS, R. Cell disruption for microalgae biorefineries. Biotechnol. Adv. 33, 243–260, 2015.
- GUO, R. et al. Molecular cloning and characterization of two novel cellulase genes from the mollusc *Ampullaria crosseana*. Journal of Comparative Physiology, Berlin, 2008.
- GUTIERREZ-CORREA, M., TENDERDY, R.P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. Biotechnology Letters. v. 19, p. 665-667, 1997.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. Mycologia, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, Nov./Dec. 1975.
- Harman, G. E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. Espécies de *Trichoderma* - simpatizantes de plantas avirulentas oportunistas. Nature Reviews Microbiology: 43-56. doi10.1038 / nrmicro797. 2014.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.M.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010. v.14, p.1037-1047.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 39, n. 2, p. 235-251, Feb. 2006.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology. v, 8, p. 301-306, 2005.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Applied Energy. 2010. v.87, p.38-46.
- J.E. BAILEY, D.F. OLLIS, Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, 1986.

- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalyst: molecular biology, three dimensional structures and biotechnology applications as lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, Amsterdam, v. 53, p. 315-351, Oct. 1999.
- KADAM, K. L. Power plant flue gas as a source of CO<sub>2</sub> for microalgae cultivation: Economic impact of different process options. *Energy Conversion and Management*, v.38, 505-510, 1997.
- KAPDAN, I.K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme Microbial Technology*. 2006. v.38, p.569–582.
- KLEMM, D. et al. Cellulose, chemistry and application. *Angewadte Chemie International Edition*, Weinheim, 2005.
- KRUG, E. M.; HOLLENBERG, J. N.; HILLENBRAND, T.; HIESSL, H. Integration of Microalgae Systems at Municipal Wastewater Treatment Plants: Implications for Energy and Emission Balances. *Environmental Science & Technology*, v.46, 11505–11514, 2012.
- KUDRYAVTSEVA, N. N. et al. The influence of cultural médium composition on the proteolytic enzyme secretion of fungus *Rhizoctonia solani*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Clifton, 2010.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v, 35, p. 377–391, 2008.
- KWIETNIEWSKA, E., TYS, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34, 491–500, 2014.
- LAM, M.K.; LEE, K.T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and way forward. *Biotechnology Advances*. 2012. v.30, p.673-690.
- LAMBERTI, G. G. Solubilização de matéria orgânica de nutrientes do lodo algaço de uma lagoa de estabilização através de processos hidrolíticos alcalino e térmico. Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Engenharia e Desenvolvimento Sustentável. Vitória, p. 125. 2017.

- LARDON, L.; HELIAS, A.; SIALVE, B.; STEYER, J. P.; Bernard, O. Lifecycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ. Sci. Technol.*, v.43, 6475–6481, 2009.
- LARKUM, A. W.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. *Trends Biotechnology*, London, v. 30, n. 4, p. 198-205, 2012.
- LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram- positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 77, n. 3, p. 348-352, Mar. 1994.
- LEE Y.K. Microalgal mass culture system and methods; their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*, v.13, 307-315, 2001.
- LEE, R.E. *Phycology*, fourth ed. Cambridge University Press, 2008.
- LEHNINGER, A. L. NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Bioquímica: princípios de bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p, 2006.
- LEU, S.; ZHU, J. Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: Our recent understanding. *Bioenerg. Res.*, v. 6(2), p. 405-415, 2013.
- LI, Y.; YI-FENG, C.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B. Characterization of microalga *Chlorella* sp. Well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2011. v.102, p.5138-5144.
- LIMA-FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós colheita. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 28, n. 6, p. 620-625, nov./dez, 2003.
- LIN, J. E.; CHANG, D. C. N.; SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decad fungi that can degrade toxic chemical. *Biotechnology Techniques*, Kew, v. 5, n. 4, p. 275- 280, July 1991.



- LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações. São Carlos-SP: Editora RiMa, 2006. 588p.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H van; PRETORIUS, I.S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.
- LYND, L.R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. Biotechnology and Bioengineering. v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.
- MAHDY, A; MENDEZ, L; BLANCO, S; BALLESTEROS, M; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. Bioresource Technology, v 171, 421-427. 2014.
- MARIN, A.R.; -ESPINOSA, L.G.M.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology. 2010. v.101, p.58–64.
- MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J.M.; EL YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. Bioresource Technology. 2000. v.73, p.263-272.
- MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renew. Sust. Energ. Rev., v.14, 217–232, 2010.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 486p, 1998.
- MENDEZ L, MAHDY A, TIMMERS RA, BALLESTEROS M, GONZALEZ-FERNANDEZ C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. Bioresour Technol, 149:136–41, 2013.
- MENEZES, G.D.G. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 por fermentação semi-sólida em biorreatores de coluna. 2006. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências

- em Engenharia Química – Instituto de Tecnologia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
- MENEZES, M.; ASSIS, S.M.P. Guia prático para fungos fitopatogênicos. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2004.
- METCALF; EDDY. Desing of Facilities for the Treatment and Disposal os Sludge. In: *Wastewater Engineering*, New York, McGraw-Hill. P.765-926, 1991.
- METTING, F. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1996. v.17, p.477–489.
- MIAO H, LU M, ZHAO M, HUANG Z, REN H, YAN Q, et al. Enhancement of Taihu blue algae anaerobic digestion efficiency by natural storage. *Bioresour Technol*, 149:359–66, 2013.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state fermentation bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, New York, v.68, n. 16, p. 61-138, 2000.
- MUKHOPADHYAY, S. N.; MALIK, R. K. Increased production of cellulase of *Trichoderma* species by pH cycling and temperatute profiling. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 1980.
- MÜLLER J.; LEHNE G.; SCHWEDES J.; BATTENBERG S.; NÄVEKE R.; KOPP J.; DICHTL N.; SCHEMINSKI A.; KRULL R.; HEMPEL D.C. Disintegration of Sewage Sludges and Influence on anaerobic digestion. *Wat. Sci. Tech*. V. 38, 425-433. 1998.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Cellulose*, v. 15, p. 711-721, 2008.
- NEIDLEMAN, S. L. Enzymes in the food industry: a backward glance. *Food Technology*, Chicago, v.45, n.1, p. 88-91, Jan. 1991.
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JUNIOR, A. F. Hidrolíticas Extracelulares de isolados de Rizóbia nativos da Amazônia

- centra, Amazonas, Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, out./dez, 2006.
- OLIVEIRA, F. F.; GONÇALVES, R. F. Readaptação de ETEs com lagoas de estabilização a rigorosos padrões de qualidade através de biofiltros aerados submersos. ENCARTE TECNICO DA REVISTA BIO ENG. SANIT. E AMB. 1996. v.4, n.3, p.46-52.
- OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 18, p. 312-331, 1996.
- OMETTO, F.; QUIROGA, G.; PSENICKA, P.; WHITTON, R.; JEFFERSON, B.; VILLA, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. ScienceDirect. *Water Research*, v.65, p.350-361, 2014
- OUYANG, J.; BAOTIAN, L.; ZHANG, M.; ZHENG, Z., YU, HENG. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. *Bioresour. Technol.*, v. 146, p. 288-293, 2013.
- P. KAUSHIK, A. MALIK, S. SHARMA, Vermicomposting: an eco-friendly option for fermentation and dye decolourization waste disposal, *Clean-Soil Air Water* 41, 616–621, 2013.
- PALOMER, X.; DOMÍNGUEZ, E.P.; VENDRELL, M.; LLOPI.T.. Study of the strawberry Cel1endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Plant Science*. v. 167, p. 509-518. 2004.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July 1999.
- PARK, J.B.K.; CRAGGS, R.J.; SHILTON, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. 2010. *Bioresource Technology*. 2011. v.105, n.3, p.35-42.

- PASSOS F, GARCÍA J, FERRER I. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresour Technol*, 138:79–86, 2013.
- PASSOS, F., GUTIÉRREZ, R., BROCKMANN, D., STEYER, J.P., GARCÍA, J., FERRER, I., Microalgae production in wastewater treatment systems, anaerobic digestion and modeling using ADM1. *Algal Res.* 10, 55–63, 2015a
- PASSOS, F., UGGETTI, E., CARRÈRE, H., FERRER, I., Pretreatment of microalgae to improve biogas production; a review. *Bioresour. Technol.* 172, 403–412, 2014.
- PASSOS, F.; HOM-DIAZ, A.; BLANQUEZ, P.; VICENT, T.; FERRER, I. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 199, 347-351. 2016.
- PECCIA, J.; HAZNEDAROGLU, B.; GUTIERREZ, J.; ZIMMERMAN, J.B. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. *Trends in Biotechnology*. 2013. v.31, p. 134-138.
- PELCZAR, J. R.; MICHAEL. J. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 524p, 1996.
- POWELL, N., SHILTON, A., PRATT, S., CHISTI, Y.(2010). Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Science and Technology*.
- PRAJAPATI, S. K.; BHATTACHARYA, A; MALIK B, A; VIJAY, V.K. Pretreatment of algal biomass using fungal crude enzymes. *Algal Research*, v. 8. 8-14, 2015.
- PUNT, P. J.; BIEZEN, N. Van.; CONESA, A.; ALBERS, A.; MANGNUS, J.; HONDEL, C. van den. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 200-206, May 2002.
- PURI, J. D.; HEAVEN, S.; BANKS, C. J. Improving the performance of enzyme in hydrolysis of high solid paper pulp derived from MSW. *Biotechnol Biofuels*, 6:107, 2013.

- PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity, *Nature*, London, v. 405, p. 212- 219, May 2000.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, T. L. Os reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, v. 2, 829 p, 1998.
- QIN, J. Bio-hydrocarbons from algae. Rural Industries Reserch and Development Corporation. Australian Government. Fev/2005. n.5/025, 18p.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* [online], 1(3). Retrieved August 28, 2001 from [www.ejbiotechnologyinfo/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF](http://www.ejbiotechnologyinfo/content/vol1/issue3/full/9/9.PDF). ISSN 0717-3458.1998.
- RAMACHANDRAN, S.; PATEL, A.K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; FRANCIS, F.; NAGY, V.; SZAKACS, G.; PANDEY. A. Coconut oil cake - a potential raw material for the production of amylase. *Bioresource Technology*, v. 93, p. 169–174, 2004.
- RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1749–1754, 2005.
- RAZZAK, S.A.; HOSSAIN, M.M.; LUCKY, R.A.; BASSI, A.S.; LASA, H. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013. v.27, p.622-653.
- RIGO, E. Produção e caracterização parcial de lipases com atividade de hidrólise e de síntese por fermentação em estado sólido de farelo de soja. Florianópolis: UFSC (Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos), 2009.
- RODRÍGUEZ COUTO, S.; ROSALES, E.; GUNDÍN, M.; SANROMÁN, M.A. Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* sp. *Journal of Food Engineering*, v. 64, p. 423–428, 2004.

- ROLLE, R. S. Review: enzyme applications for agro - processing in developing countries: an inventory of current and potential applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, n. 5, p. 611-619, Oct. 1998.
- S.K. PRAJAPATI, P. KAUSHIK, A. MALIK, V.K. VIJAY, Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: possibilities and challenges, *Biotechnol. Adv.* 31, 1408–1425, 2013.
- S.P. CHOI, M.T. NGUYEN, S.J. SIM, Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *Bioresour. Technol.* 101, 5330–5336, 2010.
- SANEPAR – CIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ – Paraná, 2010. Disponível em: <http://www.sanepar.com.br/sanepar/agencia>. Acesso em 17 de mar. de 2011.
- SANTOS, R. Imobilização de lipases em gel de Pectina. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Regional de Blumenau, UFSC/FURB, Florianópolis/Blumenau, SC, Brasil, 77p, 2003.
- SCHENK, P.M.; STEPHENS, E.; POSTEN, C. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research*. 2008. v.1, p.20-43.
- SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C. DIJCK, P. W. M. van. On the safety of *Aspergillus Niger*: a review. *Applied Microbiology & Biotechnology*, Berlin, n. 59, n. 4-5, p. 426-435, Dec. 2002.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, New York, v. 19, n. 8, p. 627-662, Dec. 2001.
- SIERRA, S. A. Simple method for detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 23, n. 1, p.15-22, Dec. 1957.
- SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Improved Cellulase Production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF Through Process Optimization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.142, p. 60-70, 2007

- SIRQUEIRA, D.B.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. Cianobactérias de águas doce e saúde pública: uma revisão. *Universitas Ciência da Saúde*. 2005. v.3, n.1, p.109-127.
- SMITH, V.H.; SCHINDLER, D.W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*. 2009. v.24, n.4, p.201-207.
- SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J-M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.41, p.330-336, 1994.
- SPEECE, R. E. (1996) *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*. Nashville, Tennessee, Archae Press.
- SPOLAORE, P.; CASSAN, C.J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial Applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006. v.101, p.87-96.
- STAMFORD, T. L. M. ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L.Urban). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, n. 4, p. 382- 385, out./dez. 1998.
- TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. Fungos em alimentos: ocorrências e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 82 p, 2001.
- TEIXEIRA PINTO, M. A. & ONOYAMA, M. T. (1991). Remoção de matéria orgânica, fósforo e nitrogênio de esgotos domésticos utilizando o processo de lagoas de alta taxa. *Revista DAESABESP*, n. 161, p. 6-13.
- TERRA, M. F. Atividade enzimática de fungos filamentosos isolados de cavernas da caatinga brasileira. 60p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation process. *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 103-105, 2002.
- TOMAZ, CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.) Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.

- London: E & FN Spon. 1999. p.369-405. P. Poluição difusa. São Paulo: Editora Navegar. 2006. 446p.
- TORRES, H. S. J.; CASSINI, S. T. A.; GONÇALVES, R. F.; Isolamento, Sobrevivência e Caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis. *In: Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental*. 9, 2014. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2014.
- ULRICH, P. & CERAMI, A. Protein Glucation Diabetes and Aging. *Recent Progress in hormone research* 2001; 56: 1 – 22.
- VAN HAANDEL, A.C.; LETTINGA, G. Tratamento de Lodo. *In: Tratamento Anaeróbio de Esgotos, um Manual para Regiões de Clima Quente*. Campina Grande, PB. Cap. 6, 1994.
- VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3a edição, Belo Horizonte – MG, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, 452p.
- VON SPERLING, Marcos. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias: Lagoas de Estabilização. 4. ed. Belo Horizonte: Segrac, 1996. 140p.
- WANG J, EVANGELOU V.P. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. *In: Pessarakli M. Handbook of plant and crop physiology*.USA: Marcel Dekker Inc. 695-717, 1995.
- WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, R. J. High-solidsloading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. *Appl Energy*, v. 99, p. 23-31, 2012.
- WCED, 1987. World Commission on Environment and Development, Our Common Future. Oxford University Press, New York.
- WISEMAN, A. Manual de biotecnologia de los enzimas. Zagaroza: Acriba, 445p, 1985.



- XUAN, J. LEUNG M.K.H., LEUNG, D.Y.C. NI, M. A review of biomass- derived fuel processors for fuel cell systems. Renewable and Sustainable Energy Reviews. v.13, 1301 -1313, 2009.
- YAAKOB Z., KAMRUL F., ESHAN A., ABDULLAH R.S., TAKRIF F.M.S. An Overview of Microalgae as a Wastewater Treatment. Jordam International Energy Conference. Malaysia, 2011.
- YEN, H.W.; HU, I.C.; CHEN, C.Y.; HO, S.H.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. Bioresource Technology. 2013. v.135, p.166-174.
- ZHANG Y-H.P; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, v.88, p. 797- 824, 2004
- ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.