



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS DE ALGINATO E PECTINA
PARA O CULTIVO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Desmodesmus*
subspicatus EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

GEISE CRISTINA DE JESUS

Araras
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS DE ALGINATO E PECTINA
PARA O CULTIVO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Desmodemus*
subspicatus EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

GEISE CRISTINA DE JESUS

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras
2018

DE JESUS, GEISE CRISTINA

DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS DE
ALGINATO E PECTINA PARA O CULTIVO DE CÉLULAS
IMOBILIZADAS DE *Desmodesmus subspicatus* EM VINHAÇA DE
CANA-DE-AÇÚCAR / GEISE CRISTINA DE JESUS. -- 2018.

81 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: Mariana Altenhofen da Silva

Banca examinadora: Mariana Altenhofen da Silva, Sandra Regina Ceccato
Antonini, Ricardo Luvizotto Santos

Bibliografia

1. Imobilização celular. 2. Biopolímero. 3. Microalgas. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Geise Cristina de Jesus, realizada em 28/02/2018:

Mariana A. do Silva

Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva
UFSCar

Sandra Regina Ceccato Antonini

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

Ricardo Luvizotto Santos

Prof. Dr. Ricardo Luvizotto Santos
UFMA

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre me guiando, e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer.

Aos meus pais, Maria e Vital, por todo seu amor, incentivo e apoio nesses anos de caminhada, além da companhia nas idas noturnas ao laboratório.

Aos meus irmãos, Gisele e Fábio (*in memoriam*), pelo amor sincero e amizade eterna.

Aos meus sobrinhos, por me reavivarem com suas alegrias e fazendo com que eu deseje ser exemplo de dedicação.

Ao meu noivo Silas, por ser tão companheiro, compreensivo e amoroso.

À Prof.^a Dr.^a Mariana Altenhofen da Silva e ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos pela orientação, ensinamentos e confiança neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) pela convivência diária e por todo aprendizado que proporcionaram.

Aos amigos de caminhada: Beatriz, Carol, Dayane e Felipe, pelo convívio harmonioso e pela torcida a cada passo dado.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia e Química Ambiental (LEQA) e ao Laboratório de Fertilidade do Solo por ceder o espaço todas as vezes que precisei, e especialmente à Sílvia, por compartilhar seu tempo e conhecimento.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados (PPGPVBA) pela oportunidade oferecida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro durante a pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
3.1. Vinhaça.....	5
3.2. Microalgas.....	7
3.3. Células imobilizadas	9
3.4. Uso de microalgas imobilizadas para tratamento de efluentes.....	10
3.5. Biopolímeros.....	12
3.5.1. Alginato.....	12
3.5.2. Pectina	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Polímeros e reagentes.....	19
4.2. Obtenção e caracterização da vinhaça.....	19
4.3. Processo de obtenção das esferas de alginato e de pectina	20
4.3.1. Esferas controle (sem microalgas).....	20
4.3.2. Imobilização da microalga <i>D. subspicatus</i> em esferas biopoliméricas.....	21
4.3.2.1. Inóculo	21
4.3.2.2. Imobilização das microalgas	22
4.4. Caracterização das esferas de alginato e de pectina com e sem células imobilizadas	23
4.4.1. Aspecto visual.....	23
4.4.2. Diâmetro médio das esferas.....	23
4.4.3. Estabilidade química.....	23
4.4.4. Propriedades mecânicas	23
4.5. Avaliação da eficiência de imobilização das microalgas nas esferas de alginato e de pectina	24

4.6. Cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> na forma livre e imobilizada em vinhaça	24
4.7. Análises estatísticas.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Caracterização da vinhaça.....	27
5.2. Produção e caracterização das esferas de alginato e de pectina com e sem microalga imobilizada.....	28
5.3. Eficiência da imobilização celular nas esferas de alginato e de pectina	39
5.4. Ensaio de cultivo da microalga imobilizada em vinhaça	41
5.4.1. Efeito da centrifugação da vinhaça	41
5.4.2. Efeito da concentração de solução reticulante para esferas de alginato	46
5.4.3. Efeito da concentração de solução reticulante para esferas de pectina.....	52
5.5. Avaliação do perfil de redução de potássio utilizando esferas controle	57
5.6. Ensaio de cultivo com as microalgas livres.....	62
6. CONCLUSÕES.....	67
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	69
8. LITERATURA CITADA.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química de vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da fermentação-destilação de diferentes mostos	6
Tabela 2. Composição do meio BG11	21
Tabela 3. Caracterização da vinhaça bruta	28
Tabela 4. Diâmetro médio das esferas de alginato e pectina com e sem microalga imobilizada, variando-se a concentração do biopolímeros e a concentração da solução reticulante.....	37
Tabela 5. Eficiência de imobilização celular das microalgas imobilizadas nas esferas de alginato e de pectina	40
Tabela 6. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça bruta e centrifugada por <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂).....	46
Tabela 7. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça centrifugada por <i>D. subspicatus</i> imobilizadas em esferas de alginato 2% reticuladas com cloreto de cálcio 2, 5 e 10%.....	51
Tabela 8. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça centrifugada por <i>D. subspicatus</i> imobilizadas em esferas de pectina 7% reticuladas com cloreto de cálcio 2, 5 e 10%.....	57
Tabela 9. Remoção máxima de potássio em vinhaça com esferas de alginato 2% com e sem microalga	60
Tabela 10. Remoção máxima de potássio em vinhaça com esferas de pectina 7% com e sem microalga	62
Tabela 11. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça do cultivo de microalgas livres.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Micrografia da microalga <i>D. subspicatus</i> (aumento de 400x).....	8
Figura 2. Estrutura química do alginato.....	12
Figura 3. Representação esquemática do modelo “caixa de ovos”.....	13
Figura 4. Diagrama de gelificação externa (A) e gelificação interna (B).....	14
Figura 5. Estrutura química da cadeia da pectina.....	17
Figura 6. Gotejamento do polímero em solução reticulante para imobilização das microalgas.....	22
Figura 7. Fotografia das esferas produzidas com diferentes concentrações de alginato: 1% (A, B e C), 2% (D, E e F) e 3% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl ₂ na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).	30
Figura 8. Fotografia das microalgas imobilizadas com diferentes concentrações de alginato: 1% (A, B e C), 2% (D, E e F) e 3% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl ₂ na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).	31
Figura 9. Solução de pectina após esterilização em autoclave.....	32
Figura 10. (A) Partículas resultantes do gotejamento de pectina autoclavada (B) Comparativo de tonalidade das soluções de pectina.....	32
Figura 11. Fotografia das partículas produzidas com pectina: 1% (esquerda) e 3% (direita).....	33
Figura 12. Fotografia das esferas produzidas com diferentes concentrações de pectina: 5% (A, B e C), 7% (D, E e F) e 10% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl ₂ na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).	35
Figura 13. Fotografia das microalgas imobilizadas com diferentes concentrações de pectina: 5% (A, B e C), 7% (D, E e F) e 10% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl ₂ na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).	36
Figura 14. Resistência mecânica das esferas de alginato sem e com microalga produzidas com diferentes concentrações de alginato (1%, 2% e 3% m/v) e de CaCl ₂ (2%, 5% e 10% m/v), n=10, letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias (p < 0,05) pelo teste de Tukey.....	38
Figura 15. Resistência mecânica das esferas de pectina sem e com microalga produzidas com diferentes concentrações de pectina (5%, 7% e 10% m/v) e de CaCl ₂ (2%, 5% e 10% m/v), (n=10, letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias (p < 0,05) pelo teste de Tukey.	39
Figura 16. Aspecto visual das esferas de alginato contendo microalgas <i>D. subspicatus</i>	40
Figura 17. Diâmetro normalizado das esferas durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●).....	42
Figura 18. Concentração celular durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●).....	43

Figura 19. Perfis de carbono orgânico total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●)	44
Figura 20. Nitrogênio total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●).....	45
Figura 21. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl ₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●).....	45
Figura 22. Diâmetro normalizado das esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em vinhaça centrifugada.....	47
Figura 23. Concentração celular durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.....	48
Figura 24. Perfis de carbono orgânico total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.	49
Figura 25. Perfis de nitrogênio total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.....	49
Figura 26. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.	51
Figura 27. Diâmetro normalizado das esferas de pectina 7% reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em vinhaça centrifugada.....	53
Figura 28. Concentração celular durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.....	54
Figura 29. Carbono orgânico total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.....	55
Figura 30. Nitrogênio total durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada	55
Figura 31. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga <i>D. subspicatus</i> imobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl ₂ (■), 5% de CaCl ₂ (●) e 10% de CaCl ₂ (▲) em vinhaça centrifugada.	56
Figura 32. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl ₂ 2%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.	58
Figura 33. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl ₂ 5%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.....	59

Figura 34. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl ₂ 10%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.....	59
Figura 35. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl ₂ 2%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.....	60
Figura 36. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl ₂ 5%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.....	61
Figura 37. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl ₂ 10%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.....	61
Figura 38. Curva de crescimento semi-logarítmica para cultivo de células livres de <i>D. subspicatus</i> livre em vinhaça centrifugada.....	63
Figura 39. Carbono orgânico total na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de <i>D. subspicatus</i>	64
Figura 40. Nitrogênio total na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de <i>D. subspicatus</i>	64
Figura 41. Potássio na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de <i>D. subspicatus</i>	65

**DESENVOLVIMENTO DE MATRIZES POLIMÉRICAS DE ALGINATO E PECTINA
PARA O CULTIVO DE CÉLULAS IMOBILIZADAS DE *Desmodesmus*
subspicatus EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Autor: GEISE CRISTINA DE JESUS

Orientador: Prof.^a Dr.^a MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Co-orientador: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

RESUMO

A vinhaça é considerada a principal água residuária do setor sucroalcooleiro, sendo obtida pela destilação alcoólica do vinho para a obtenção do etanol. Considerando as alternativas para sua disposição, a fertirrigação na cultura da cana-de-açúcar é a mais utilizada. No entanto, o seu uso deve ser cauteloso, uma vez que em excesso pode culminar na contaminação dos lençóis freáticos, acarretando problemas ambientais. A aplicação de microalgas imobilizadas no tratamento de águas residuárias com ênfase principalmente na remoção de nutrientes tem aumentado nos últimos anos. Quanto aos métodos de imobilização celular, o sistema de encapsulamento em matrizes de macromoléculas como alginato e pectina vem despertando interesse devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi o desenvolvimento de esferas de alginato e de pectina para a imobilização da microalga *Desmodesmus subspicatus*, assim como a avaliação do seu crescimento e habilidade na remoção de carbono, nitrogênio e potássio da vinhaça. Os parâmetros do processo de produção das esferas, tais como tipo e concentração de biopolímero (alginato 1, 2, e 3% m/v e pectina 5, 7 e 10% m/v) e concentração de reticulante (cloreto de cálcio 2, 5 e 10% m/v) foram estudados quanto a sua influência nas características das esferas. Os resultados indicaram a obtenção de esferas estáveis de alginato e de pectina e, de acordo com os testes, optou-se por utilizar alginato 2% e pectina 7% para imobilização da *D. subspicatus* e seu cultivo na vinhaça. A microalga *D. subspicatus* imobilizada apresentou crescimento celular em vinhaça, com velocidades específicas máximas de 0,009 h⁻¹, e 0,002 h⁻¹ em esferas de alginato e de pectina, respectivamente. Nos ensaios realizados com alginato 2%, a microalga imobilizada atingiu remoções de 42, 49 e 48% de carbono; 34, 35 e 34% de nitrogênio e 22, 23,2 e 31,6% de potássio; e para a pectina 7%, as remoções foram de 32, 39 e 41% para carbono; 11, 24 e 34% para nitrogênio e 39,2, 35,8 e 35,2% para potássio para 2, 5 e 10% de cloreto de cálcio, respectivamente. Os resultados demonstraram a viabilidade do cultivo desta microalga, assim como a capacidade de remoção de compostos da vinhaça.

Palavras-chave: Imobilização, alginato, pectina, microalgas.

DEVELOPMENT OF POLYMERIC ALGINATE AND PECTIN MATRICES FOR THE CULTIVATION OF IMMOBILIZED CELLS OF *Desmodesmus subspicatus* IN SUGARCANE VINASSE

Author: GEISE CRISTINA DE JESUS

Advisor: Prof.^a Dr.^a MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Co-advisor: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

ABSTRACT

Among the main industrial wastewaters, sugarcane vinasse figures as an actual environmental concern, due to its polluting potential and large volumes available, about 10 liters per liter of ethanol. Considering the alternatives to vinasse disposal, fertirrigation is the most commonly used. However, it is currently being questioned due to its effects on the soil and on groundwaters, caused by nutrient lixiviation such as potassium. The application of immobilized microalgae for wastewater treatment with emphasis on the removal of nutrients has increased over the last years. The aim of this study was to develop uniform alginate and pectin beads for immobilization of *Desmodesmus subspicatus* and evaluate its growth and ability to carbon, nitrogen and potassium removal in vinasse. The process parameters of bead production, type and concentration of biopolymer (alginate 1, 2, and 3% w/v and pectin 5, 7 and 10% w/v) and crosslinking agent concentration (calcium chloride 2, 5 and 10% w/v), were varied in order to evaluate their influence on bead characteristics. Results indicated that stable alginate and pectin beads were produced and according to the preliminary particle characterization, concentrations of 2% alginate and 7% pectin were chosen for immobilization of *D. subspicatus* and growth in vinasse. Immobilized *D. subspicatus* showed cellular growth in vinasse, with maximum specific rates of 0.009 h⁻¹ and 0.002 h⁻¹ in alginate and pectin beads, respectively. In the tests performed with 2% alginate, the immobilized microalgae reached 42, 49 and 48% carbon; 34, 35 and 34% nitrogen and 22, 23 and 32% potassium removal; and for pectin 7%, the removals were 32, 39 and 41% for carbon; 11, 24 and 34% for nitrogen and 39, 36 and 35% for potassium, for 2, 5 and 10% of calcium chloride, respectively. The microalgae were able to grow and remove appreciable amounts of nutrients from the vinasse. Compared with the free microalgae cultivation, immobilized microalgae indicate good prospects for the use of nutrient removal from vinasse.

Keywords: Immobilization, alginate, pectin, microalgae.

1. INTRODUÇÃO

Na última década houve um grande incentivo à produção de etanol, essencialmente pelo surgimento dos veículos bicompostíveis, com a tecnologia Flex em 2003, capazes de utilizar qualquer combinação de gasolina e etanol, o que aumentou, consideravelmente, a demanda interna por etanol hidratado. Consoante a isso, a perspectiva almejada era que o Brasil atendesse grande parte da demanda mundial por etanol, dada uma expectativa de criação de um mercado global, com o comprometimento de vários países com adição de etanol à gasolina em função da necessidade de contenção da emissão de gases do efeito estufa e o desenvolvimento de uma nova matriz energética renovável (GILIO; CASTRO, 2016).

A produção total brasileira de etanol no país consolidou-se em 27,8 bilhões de litros na safra 2016/17, sendo estimada em 27,1 bilhões de litros para safra 2017/18, um decréscimo discreto de 2,6% devido principalmente a maior produção de açúcar (CONAB, 2017).

A vinhaça é a principal água residuária da produção de etanol, caracterizada pelo seu odor forte, coloração marrom-escuro, baixo pH, alto teor de potássio e potencial poluente devido à alta carga de matéria orgânica. No Brasil, as tecnologias aplicadas no setor sucroenergético geram aproximadamente 10 litros de vinhaça por

litro de etanol produzido (SALOMON, 2007). Assim, considerando a estimativa para a safra de 2017/18, o volume de vinhaça seria em torno de 271 bilhões de litros.

Atualmente, o principal destino da vinhaça é na fertirrigação da cultura de cana-de-açúcar com substituição de parte da adubação química. No entanto, quando aplicada em altas doses, pode acarretar em salinização do solo e poluição de lençóis freáticos (SILVA et al., 2007; DA SILVA et al., 2014).

Diversas pesquisas têm se concentrado em alternativas para o uso e para o tratamento da vinhaça, como o reuso de vinhaça em fermentação, a fertirrigação, a concentração por evaporação, a produção de leveduras (*single cell protein*), a geração de energia e a produção de biogás (GRANATO, 2003; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Outras possibilidades para um aproveitamento racional desta água residuária seriam tratamentos físico-químicos, extração de componentes, secagem e utilização como suplemento de rações, além do aproveitamento dos seus nutrientes para cultivos microbianos. O tratamento biológico da vinhaça é uma alternativa interessante, uma vez que o tratamento físico-químico pode ser muito dispendioso, pelo fato da elevada quantidade de água presente (DE MATTOS, 2014).

“Microalga” é um termo genérico, sem efeito taxonômico, que engloba micro-organismos algais com clorofila “a” e outros pigmentos, podendo ser tanto organismos eucarióticos, como as algas microscópicas, quanto procarióticos, como as cianobactérias (HOEK et al., 1995; DERNER et al., 2006; BONINI, 2012). Estes micro-organismos têm sido tradicionalmente classificados quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004).

O emprego de microalgas em tratamento de efluentes industriais para remoção de matéria orgânica e nutrientes inorgânicos é sugerido devido à alta eficiência e destino correto dos resíduos, com utilização da biomassa gerada para fertilização dos solos, como ração animal, dentre outros fins dependendo do seu teor em proteínas e lipídios (TAM; WONG, 1996; VASCONCELOS; PEREIRA, 2001).

A imobilização celular consiste em um processo pelo qual micro-organismos e/ou enzimas são confinados através de interações físicas ou químicas em uma matriz ou fixados na superfície do agente imobilizador (GIESE, 2015). O confinamento físico das células em uma região definida do biorreator, assegura elevada concentração celular com atividade catalítica, de forma a aumentar a produtividade e eficiência dos processos (FREEMAN; LILLY, 1998). Desta forma, a imobilização de microalgas em

matrizes poliméricas pode ser útil para determinados processos biotecnológicos, seja na produção de um metabólito específico, seja na remoção de poluentes de águas residuárias (DE-BASHAN; BASHAN, 2010).

O sistema de encapsulamento de células em matrizes de macromoléculas, tais como alginato e pectina, vem despertando interesse devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade. Além destas características, um suporte para imobilização de enzimas e células deve incluir alta capacidade de retenção celular, resistência mecânica ao ataque químico e microbiano e alta difusividade de substratos e produtos (ZHOU et al., 2010; YU et al., 2011).

Outro ponto a ser considerado é que um sistema com microalgas imobilizadas viabilizaria o cultivo contínuo destes micro-organismos, com resultante remoção de parte da matéria orgânica solúvel e dos nutrientes da vinhaça, apresentando como principal vantagem a facilidade na remoção da biomassa que estaria imobilizada nas matrizes poliméricas. Deste modo, o uso da vinhaça como meio de cultivo para clorofíceas imobilizadas em suportes poliméricos seria uma alternativa para reduzir os problemas ambientais, tendo em vista o volume expressivo desta água residuária resultante do setor sucroenergético no Brasil. Cabe ressaltar que o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos está localizado na cidade de Araras - SP, região produtora de cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral da pesquisa foi avaliar o efeito dos parâmetros do processo de obtenção de esferas de alginato e pectina nas propriedades físico-químicas das matrizes poliméricas e na eficiência de imobilização da microalga *D. subspicatus* visando a sua utilização na remoção de matéria orgânica e nutrientes da vinhaça.

Para organizar o desenvolvimento do trabalho foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliação do efeito das variáveis: tipo e concentração de biopolímero e concentração de agente reticulante;
- Avaliação da eficiência de imobilização da microalga nas esferas de alginato e de pectina;
- Seleção de formulações ótimas das esferas de alginato e pectina com a microalga imobilizada para os ensaios em vinhaça;
- Avaliação do cultivo das microalgas nas formas livre e imobilizada em vinhaça bruta e centrifugada em termos de remoção de carbono, nitrogênio e potássio.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Vinhaça

A vinhaça é a principal água residuária do setor sucroenergético, sendo obtida como resíduo da destilação alcoólica do mosto fermentado (vinho). Atualmente no Brasil, os novos equipamentos utilizados em usinas para produção de etanol geram aproximadamente 10 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido. Porém, em usinas mais antigas, a geração pode chegar a 15 litros de vinhaça por litro de etanol. Esta quantidade produzida normalmente retorna para o campo pelo processo de fertirrigação (SALOMON, 2007).

A utilização da vinhaça diretamente no solo pode culminar na contaminação dos lençóis freáticos mais superficiais, o que é grave em determinadas áreas de expansão da cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Por isso, o emprego da vinhaça como fertilizante, tradicional na cultura de cana-de-açúcar, deve ser cauteloso, considerando os riscos ambientais oriundos da lixiviação de íons em função do excesso de potássio (ROSSETTO; SANTIAGO, 2016).

Para evitar problemas ambientais, a CETESB adotou em 2005 a Norma Técnica P4.231, dispondo critérios e procedimentos para armazenamento, transporte e plano de aplicação da vinhaça em solos agrícolas do estado de São Paulo (CETESB,

2015). Portanto, o depósito da vinhaça no solo deve ser ponderado, visto que é proibido o lançamento desta água residuária nos cursos d'água.

A composição química da vinhaça varia de acordo com o material de origem (mosto) conforme mostrado na Tabela 1 (PRADA et al., 1998). A vinhaça proveniente da fermentação do melaço (resíduo da fabricação do açúcar) apresenta maior concentração de potássio em relação à vinhaça gerada na fermentação do caldo de cana. Em razão dos altos teores de matéria orgânica, pH baixo, elevados índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO), além da alta temperatura na saída do destilador, a vinhaça é considerada um efluente com alto poder poluente (FREIRE; CORTEZ, 2000; SILVA et al., 2007).

Tabela 1. Composição química de vinhaça de cana-de-açúcar proveniente da fermentação-destilação de diferentes mostos

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2- 5,0	3,7 - 4,6	4,4 - 4,6
Temperatura (°C)	80 - 100	80 - 100	80 - 100
DBO (mg L ⁻¹ O ₂) ⁽¹⁾	25000	6000 - 16500	19800
DQO (mg L ⁻¹ O ₂) ⁽²⁾	65000	15000 - 33000	45000
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	81500	23700	52700
Sólidos voláteis (mg L ⁻¹)	60000	20000	40000
Sólidos fixos (mg L ⁻¹)	21500	3700	12700
Nitrogênio (mg L ⁻¹)	450 - 1610	150 - 700	480 - 710
Fósforo (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	100 - 290	10 - 210	9 - 200
Potássio (mg L ⁻¹ K ₂ O)	3740 - 7380	1200 - 2100	3340 - 4600
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	450 - 5180	130 - 1540	1330 - 4570
Magnésio (mg L ⁻¹ MgO)	420 - 1520	200 - 490	580 - 700
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄)	6400	600 - 760	3700 - 3730
Carbono (mg L ⁻¹)	11200 - 22900	5700 - 13400	8700 - 12100

(1) DBO: Demanda bioquímica de oxigênio; (2) DQO: Demanda química de oxigênio.

Fonte: Adaptado de PRADA et al. (1998)

Considerada como um caldo nutriente, a vinhaça pode ser aproveitada como fertilizante, na extração de componentes, secagem e também como suplemento em

rações e cultivos aeróbios e anaeróbios. Em pesquisa de crescimento de leveduras e bactérias fixadoras de nitrogênio em vinhaça, foi constatado o crescimento da levedura *Candida utilis* em cultura mista com bactérias fixadoras de nitrogênio, resultando na redução da DBO da vinhaça (MACEDO, 1991). Resultados promissores foram obtidos com a substituição de água por vinhaça, no preparo do meio de cultivo para fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* CMI237 (NAVARRO et al., 2000). Oliveira (1988) usou vinhaça diluída para cultivo de *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b, e verificou um crescimento mixotrófico equivalente ao cultivo fotossintético, além do acúmulo de carboidrato pelas células em condições heterotróficas.

Assim, acredita-se que o uso de microalgas imobilizadas em esferas de alginato e de pectina pode representar uma alternativa interessante para a remoção de nutrientes desta importante água residuária.

3.2. Microalgas

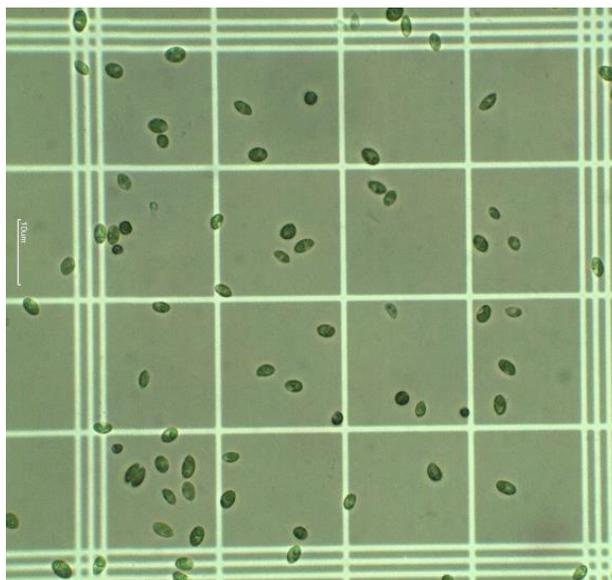
As microalgas abrangem um grupo de micro-organismos de naturezas diferentes, incluindo tanto organismos fotossintetizantes eucarióticos como algas clorofíceas (Chlorophyta), quanto organismos procariotos, como cianobactérias (Cyanophyceae) (MATA et al., 2010; BONINI, 2012). Tradicionalmente, a classificação das microalgas tem sido realizada quanto ao tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva, constituição da parede celular, além de critérios da citologia e morfologia (TOMASELLI, 2004).

O gênero *Desmodesmus* foi criado recentemente a partir de *Scenedesmus*. É frequentemente citado em estudos sobre remoção de nutrientes de águas residuárias e caracteriza-se por formações espinhosas e diferenças genotípicas (AN et al., 1999).

Do ponto de vista taxonômico, a microalga *Desmodesmus subspicatus* é uma espécie de Chlorophyceae com formato característico de esferas para elipses, com cadeias regulares de quatro a oito células. Naturalmente são encontradas em águas continentais, especialmente em ambientes ricos em nutrientes. Esta espécie tem sido cultivada tanto livres como imobilizada para tratamento de efluentes industriais e domésticos, evidenciando sua viabilidade celular elevada, tolerância a variações de pH e temperatura, além de taxas específicas de crescimento semelhantes em ambas condições. Do ponto de vista de escalonamento dos processos, a temperatura parece

ser o parâmetro mais sensível e que regula a atividade metabólica e o crescimento de microalgas (DA SILVA et al., 2017). Na Figura 1 é apresentada uma micrografia da microalga *D. subspicatus* obtida em microscópio ótico MOTIC BA 210TL em Câmara de Neubauer e aumento de 400 vezes.

Figura 1. Micrografia da microalga *D. subspicatus* (aumento de 400x)



Fonte: a autora

As microalgas têm capacidade de assimilar moléculas orgânicas e nutrientes inorgânicos presentes em efluentes, incorporando-os à biomassa, e assim, possibilitando a despoluição de águas residuárias agroindustriais e obtenção de uma biomassa passível de ser utilizada na fertilização dos solos (BASTOS et al., 2015). Porém, esta aplicação possui limitações devido ao alto custo e operação dos sistemas autotróficos, além das características de águas residuárias, que geralmente apresentam elevada turbidez, fato que dificulta a passagem da luz solar (BONINI, 2012). O modelo metabólico prioritário destes micro-organismos é a fotossíntese, entretanto diversas linhagens usufruem do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis (DE MATTOS, 2014).

Em um experimento com *Scenedesmus obliquus*, obteve-se 99% de remoção de fósforo e nitrogênio, após 96 h de cultivo em efluente terciário, e foi relatada uma velocidade de crescimento específico da ordem de $0,05 \text{ h}^{-1}$ (JI et al., 2013). Comportamento semelhante foi observado por Samorì et al. (2013) utilizando a clorócea *D. communis* e por Martínez et al. (2000) usando *S. obliquus*. De Mattos e

Bastos (2015) cultivaram a clorofícea *Desmodesmus sp.* em vinhaça e verificaram consumo de 52,1% do nitrogênio e redução de 36,2% da DQO da vinhaça após 30 horas de cultivo heterotrófico, com produtividade de biomassa superior a $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, evidenciando a aplicação da microalga para a redução de nutrientes desta água residuária.

3.3. Células imobilizadas

Os sistemas com células imobilizadas têm como característica principal o confinamento pelo emprego de uma estrutura física, obrigando a permanência das células em uma região particular do biorreator, resultando em uma maior facilidade de separação posterior. Deve se diferenciar os dois tipos de processos fermentativos realizados com o sistema de células imobilizadas. Um tipo é aquele que se beneficia com o uso do sistema enzimático das células envolvidas na conversão bioquímica desejada, sem necessitar de coenzimas, ou seja, as células não precisam estar vivas quando imobilizadas. O outro modelo é aquele que apresenta necessidade de manutenção da viabilidade celular, pois os produtos a serem formados ou degradados, exigem diversas etapas de transformações, presença da cadeia respiratória, vias metabólicas geradoras de compostos intermediários e também outros mecanismos específicos de células vivas (PRADELLA, 2001).

Estes sistemas de células imobilizadas apresentam vantagens que consistem na possibilidade de uso de elevadas concentrações celulares no volume reacional, operação de sistemas contínuos, exclusão da etapa de reciclo externo de células e possibilidade de alta taxa de conversão de substrato em produtos. Dos métodos de imobilização, o emprego de partículas de alginato de sódio está entre as mais citadas para imobilização de microalgas (MORENO-GARRIDO, 2008). É de grande relevância a natureza do suporte para a eficiência da imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). Uma das grandes vantagens da imobilização celular é a reutilização das partículas, especialmente quando os suportes escolhidos possuem caráter inerte e apresentam alta resistência mecânica (COUTO et al., 2000). O efeito da abrasão e fadiga nas partículas do biocatalisador dependem muito das propriedades mecânicas da matriz polimérica, tais como tamanho, forma, densidade, rugosidade, dureza, elasticidade e grau de homogeneidade (DOS SANTOS et al., 1997).

Existem principalmente três métodos de imobilização de células em suportes: adsorção, ligação covalente e envolvimento. Também conhecido como método de aprisionamento ou oclusão, a técnica de envolvimento é a mais utilizada para imobilização de células devido a sua facilidade, baixa toxicidade e elevada capacidade de retenção celular. Esta técnica consiste no confinamento físico de uma população celular em uma matriz polimérica formada de um gel hidrofílico com poros menores que o tamanho das células, impedindo a sua liberação para o meio e permitindo apenas difusão do substrato e produtos. Na produção das partículas podem ser utilizados polímeros naturais como ágar, carragena, alginato e pectina. A gelificação do ágar ocorre somente pelo abaixamento do pH, enquanto para os outros polímeros citados se dá através de reticulação iônica com cátions mono ou polivalentes, como potássio (K^+) para a carragena, e cálcio (Ca^{+2}) para o alginato e a pectina (SANTOS, 2003).

As vantagens oferecidas pelas técnicas de imobilização e os motivos para a escolha de uma célula ou enzima imobilizada variam de acordo com a aplicação, englobando: duração da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de operação de processo contínuo, com maior facilidade de controle e facilidade na etapa de separação do produto final (HASAN et al., 2006).

As aplicações mais comuns de algas imobilizadas em matrizes poliméricas são a produção de metabólitos, manutenção de culturas, obtenção de energia pela produção de hidrogênio e remoção de nutrientes, metais e poluentes orgânicos (MATOS; BASTOS, 2011).

3.4. Uso de microalgas imobilizadas para tratamento de efluentes

O uso de microalgas tem sido proposto como um tratamento biológico alternativo para remoção de nutrientes (MALLICK, 2002). Todavia, uma das limitações para o desenvolvimento de sistemas de tratamento de águas residuárias baseadas em microalgas é a recuperação da biomassa no final do processo de tratamento. No entanto, a imobilização de células pode representar uma solução alternativa, bem como proporcionar vantagens, tais como o aumento do tempo de retenção celular nos biorreatores e maior atividade metabólica (TAM et al., 1994).

Chevalier e de La Noüe (1985), aparentemente, foram os pioneiros a imobilizar microalgas *S. obliquus* em esferas de carragena para o tratamento de águas residuárias, e este tipo de imobilização de aprisionamento de microalgas foi usado em estudos experimentais para remover nitrogênio e fósforo do efluente secundário da estação de tratamento de águas residuárias da base militar de Valcartier, no Canadá.

Pesquisas sobre a remoção de nutrientes de águas residuárias urbanas por microalgas imobilizadas são limitadas e incluem estudos sobre *Chlorella* imobilizada em alginato (LAU et al., 1997); *S. obliquus* imobilizada em k-carragena (CHEVALIER; DE LA NOÛE, 1985) e *S. intermedius* imobilizada em alginato de cálcio (JIMENEZ-PEREZ et al., 2004).

Recentemente, buscando melhorar a remoção de poluentes e recuperação de biomassa, o uso de co-imobilização de microalgas e bactérias tem aumentado (HERNANDEZ et al., 2006). A utilização de microalgas imobilizadas em esferas de alginato aumenta a eficiência de remoção de metais pesados e de alguns poluentes orgânicos (DE-BASHAN; BASHAN, 2010).

O alginato de cálcio é a matriz polimérica mais comumente usada para imobilizar microalgas e mantém a alta viabilidade das células por longos períodos de tempo. Entretanto, a matriz é frágil na presença de agentes quelantes normalmente presentes nas águas residuárias, como fosfato e citrato, que afetam a estabilidade da matriz podendo levar a desestruturação e dissolução (JIMENEZ-PEREZ et al., 2004).

A deterioração das esferas de alginato devido a diversos fatores tais como o pH e a composição da água residuária, ainda é uma questão preocupante (DRAGET et al., 2002). Entretanto, hipoteticamente, a degradação das esferas de biopolímeros imersas durante um tempo prolongado em águas residuárias, tal como a vinhaça, é resultado principalmente da atividade biológica de bactérias heterotróficas que possuem a capacidade de degradar o alginato e não os nutrientes presentes nas águas residuárias, após o tratamento secundário de efluentes. Como a degradação das esferas é relativamente lenta, o tempo de cultivo é suficiente para eliminar eficientemente nutrientes por micro-organismos imobilizados no interior das partículas (CRUZ et al., 2013).

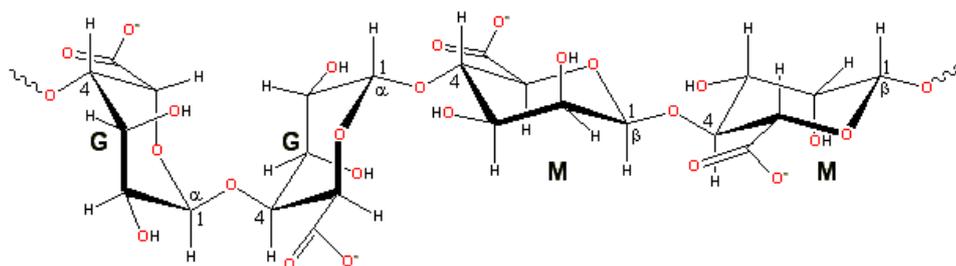
3.5. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros obtidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, tais como: milho, cana-de-açúcar, celulose, quitina, algas, micro-organismos, dentre outras. São abundantes, de baixo custo, e os produtos resultantes da degradação são biocompatíveis e não-tóxicos. Devido às suas propriedades coloidais, tais como espessamento, estabilização, suspensão, formação de gel e emulsificação, são amplamente utilizados em diversas áreas como a farmacêutica, alimentícia, biotecnológica, têxtil e papelreira. Dentre os mais utilizados destacam-se os polissacarídeos, como a celulose, o amido (e seus derivados), a quitosana, os extratos de algas (alginatos e carragenas), o exudado de plantas (goma arábica, sementes (goma guar e goma locuste)) e as proteínas tanto de origem vegetal (glúten) quanto de origem animal (gelatina, albumina, colágeno, soro de leite e proteínas miofibrilares) (BRITO, et al., 2011; PIRES et al., 2015)

3.5.1. Alginato

O alginato de sódio é um polissacarídeo coloidal hidrofílico extraído de diversas espécies de algas pardas (Phaeophyceae) com soluções diluídas de álcalis. A estrutura do ácido algínico consiste de cadeias lineares de resíduos dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), ligados covalentemente com ligações tipo (1 \rightarrow 4) (LIAKOS et al., 2013). Estes resíduos estão arrançados na forma de blocos MM ou GG, ou ligados de forma alternada (blocos MG), apresentando composição e sequência amplamente variáveis, dependendo da fonte do alginato (Figura 2) (GARCIA-CRUZ et al., 2008).

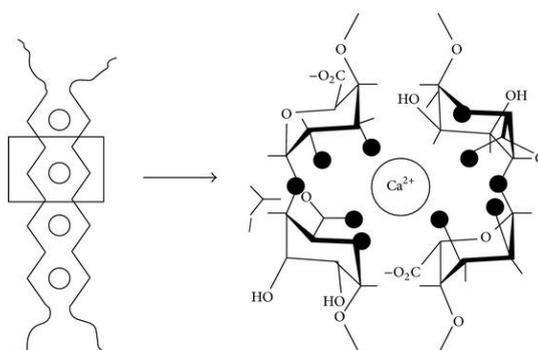
Figura 2. Estrutura química do alginato



(GARCIA-CRUZ et al., 2008)

A imobilização em alginato ocorre através da reticulação dos grupos carboxílicos presentes na cadeia do alginato com cátions polivalentes, sendo o cloreto de cálcio o agente reticulante mais utilizado. Cátions monovalentes e íons Mg^{+2} não resultam na formação de gel. Os grupos carboxílicos de cadeias adjacentes de alginato reagem com os íons cálcio para formar uma rede tridimensional do polímero (DRAGET et al., 1997). O mecanismo que melhor descreve a formação de géis de alginato na presença de íons cálcio é chamado modelo “caixa de ovos” (Figura 3) sendo que a ligação iônica mais seletiva está estritamente ligada ao conteúdo de resíduos do ácido gulurônico (G), ou mais precisamente, à extensão dos blocos GG nas cadeias. As regiões de resíduos G alinhadas lado a lado, resultam na formação de uma cavidade onde os íons cálcio fazem uma junção entre elas. A rede resultante é função da frequência e do tamanho dos blocos GG, bem como da concentração e do tipo de cátion utilizado. Mudanças na concentração do cátion podem alterar o número de zonas de junção de cadeias de alginato, alterando assim a força do gel (SANTOS et al., 2015).

Figura 3. Representação esquemática do modelo “caixa de ovos”



(SOSNIK, 2014)

Pesquisas atuais têm proposto um aprimoramento da teoria “caixa de ovos” assumindo que ligações do tipo GG/MG e MG/MG participam do processo de reticulação, e assim sendo, não devem ser desprezadas, pois também originam cavidades capazes de acomodar os íons cálcio, intervindo macroscopicamente no comportamento mecânico dos géis formados (DONATI et al., 2005).

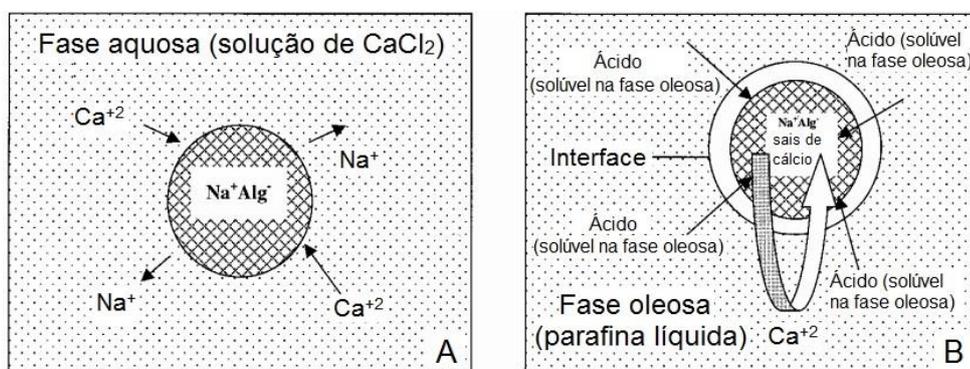
As propriedades do gel de alginato são dependentes das características do polímero (massa molar e composição) e do método de preparação. Matrizes de alginato para imobilização de células ou liberação controlada de princípios ativos

podem ser formadas pelos métodos de gelificação externa ou interna com cátions polivalentes, como o Ca^{2+} (LIU et al., 2002).

Na produção de esferas por gelificação externa, também conhecido como “método de gotejamento” ou “método de difusão”, apresentado na Figura 4 A, a solução de alginato contendo as células ou princípios ativos é gotejada em uma solução de íons Ca^{2+} . Estes se difundem através das gotas promovendo a reticulação instantânea da superfície, aproximando as cadeias do polímero e formando uma superfície menos permeável à difusão dos íons Ca^{2+} . Assim, a concentração do reticulante deve ser ajustada de forma a produzir matrizes com as características desejadas e o aumento da concentração empregada não necessariamente exercerá mudanças significativas nas propriedades da matriz formada. O uso de alginato de alta massa molar e a presença de íons não reticulantes tendem a formar géis mais homogêneos (PAQUES et al., 2014).

No método de gelificação interna, um sal insolúvel de cálcio, geralmente CaCO_3 , é adicionado à solução de alginato (contendo as células ou princípios ativos) e a mistura é emulsificada em uma fase oleosa, conforme apresentado na Figura 4 B (CHAN et al., 2006). Esta solução é então acidificada para a liberação dos íons Ca^{2+} , promovendo a reticulação do alginato. Estudos relatam que as matrizes produzidas por este método tendem a ser mais homogêneas, porém menos densas e mais porosas, resultando em menores eficiências de imobilização e maiores taxas de liberação (QUONG; NEUFELD, 1998; CHOI et al., 2002; LIU et al., 2002)

Figura 4. Diagrama de gelificação externa (A) e gelificação interna (B).



Fonte: Adaptado de LIU et al. (2002)

Chan et al. (2006) produziram esferas de alginato pelos dois métodos citados acima e observaram que esferas produzidas por gelificação externa eram esféricas

enquanto as produzidas por gelificação interna apresentaram formatos irregulares. A rápida reticulação pelos íons Ca^{+2} foi crucial para a formação de partículas esféricas. Os autores concluíram que a estrutura do gel e suas propriedades são governadas pela cinética de formação e pela concentração do reticulante que, por sua vez, afetam a eficiência de encapsulação/imobilização. No mecanismo de gelificação externa, a difusão dos íons Ca^{2+} através das gotas de alginato e a autodifusão das moléculas de alginato em direção a uma zona de gelificação induzida pelo cálcio, resultaram em uma camada densa com alta concentração de alginato na interface alginato- Ca^{+2} . Assim, sugerem que partículas formadas pelo mecanismo de gelificação externa tornam-se mais apropriadas para imobilização de células devido a maior eficiência de imobilização.

O uso de alginato para a imobilização celular apresenta como vantagem o fato das células não sofrerem alterações devido a variações extremas de condições físico-químicas, boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simplicidade de preparação (LU et al., 2005; ZHOU et al., 2010). No entanto, na presença de alguns componentes como íons fosfato e citrato, e cátions monovalentes e Mg^{+2} , os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis, o que pode levar à ruptura da esfera ou até mesmo à dissolução do suporte de imobilização no meio (COVIZZI et al., 2007).

Estudos realizados com células livres de *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 e imobilizadas em diferentes suportes, dentre eles alginato e pectina cítrica, revelou que diferentes concentrações de alginato não afetam a viabilidade celular; porém o período de incubação, em solução reticulante de cloreto de bário, reduziu o número de células vivas. Este fato pode ter ocorrido pela presença do bário inibindo a ação das enzimas nitrilases. Sabe-se que a natureza do gel e a estrutura da matriz do suporte têm fundamental importância para a atividade catalisadora e seu desempenho; afetando assim, os padrões de crescimento microbiano e a de atividade enzimática (DIAS et al., 2000).

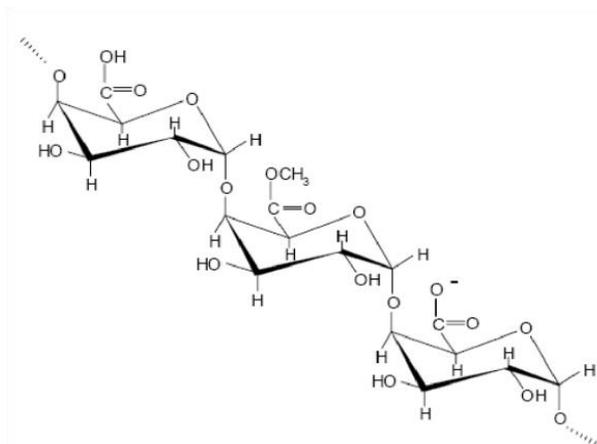
3.5.2. Pectina

Difundidas na natureza, as substâncias pécticas fazem parte dos tecidos das plantas, junto com outras moléculas como o amido, a celulose e a lignina (SANTOS, 2003). Estas substâncias são classificadas em protopectinas, ácidos pectínicos ou

pectina e ácidos pécticos. Insolúveis em água, as protopectinas sofrem hidrólise, resultando na pectina (CLARK, ROSS-MURPHY, 1987). As principais fontes comerciais são o bagaço de frutas cítricas (25% da matéria seca) e bagaço seco de maçã (15-18% da matéria seca) nos quais a extração é conduzida sob condições ácidas ou básicas, com posterior deslignificação pelo tratamento com cloreto de sódio (MARUDOVA et al., 2004). O processamento de resíduos de suco de laranja para a produção de pectina tem um rendimento em torno de 16% em base seca. Em uma geração de 8000 toneladas de resíduos diários, submetidos à secagem até 10% de umidade com rendimento de extração de pectina em torno de 30%, resultam em, aproximadamente, 107 toneladas de pectina (REZZADORI; BENEDETTI, 2009). A produção industrial brasileira teve início no ano de 1954, na cidade de Limeira-SP, uma das maiores produtoras de pectina cítrica do mundo (CP KELCO, 2017).

Quimicamente, a pectina é um polissacarídeo complexo composto de resíduos do ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo α -(1,4) (Figura 5), cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente esterificados por metoxilas. Os açúcares neutros, principalmente a D-galactose, a L-arabinose e a L-ramnose e em menor quantidade a D-xilose, também podem estar ligados à cadeia da pectina (CARDOSO et al., 2003; WALKENSTRÖM et al., 2003; WILLATS et al., 2006).

O teor de metoxilação (TM) é utilizado como critério para a classificação comercial das pectinas e corresponde à proporção dos grupos de ácido galacturônico metilados presentes na molécula de pectina. O teor de metoxilação varia com a idade e a localização dentro do tecido da planta, método de extração, conteúdo de açúcares neutros e possui importante influência sobre as propriedades da pectina, especialmente a solubilidade e as características gelificantes e formadoras de filme (LIU et al., 2007).

Figura 5. Estrutura química da cadeia da pectina

(HOURDET; MULLER, 1991)

As pectinas são classificadas como de alto teor de metoxilação (ATM), quando possuem acima de 50% de seus grupos carboxílicos esterificados, e como de baixo teor de metoxilação (BTM), quando 50% ou menos de seus grupos estão esterificados. A distribuição de cargas ao longo das cadeias de pectinas pode ser modificada utilizando métodos químicos e enzimáticos de desesterificação (HIORTH et al., 2003; MARUDOVA et al., 2004). Quando o processo de desesterificação é realizado com amônia, alguns grupos metil éster são substituídos por grupos amidas, resultando em pectinas BTM com grau de amidação (MAY, 1997).

A pectina é solúvel em água e possui capacidade de espessar, estabilizar e gelificar soluções. A formação de gel é a propriedade principal da pectina, e dependente das características do meio, tais como pH, teor de sólidos solúveis, presença de cálcio, e também do tipo de pectina usada (SANTOS, 2003).

Os mecanismos de associação e gelificação são diferentes para os dois tipos de pectinas. As pectinas ATM, apresentam predominantemente interações intermoleculares por pontes de hidrogênio e forças hidrofóbicas. A gelificação dessas pectinas são normalmente observadas em pH ácido (< 3,5) e na presença de altas concentrações de açúcares. O pH ácido provoca a protonação dos grupos carboxílicos, diminui a repulsão eletrostática entre as cadeias e aumenta a formação de pontes de hidrogênio (WALKENSTRÖM et al., 2003). Nas pectinas BTM, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas são predominantes nas associações intermoleculares. Pectinas BTM gelificam na presença de cátions divalentes, principalmente cálcio, em uma ampla faixa de pH (2,6-8,0) e de conteúdo de sólidos

solúveis (10 a 70%). Neste caso, o modelo “caixa de ovos” descrito inicialmente para o alginato (Figura 2) tem sido amplamente aceito para géis de pectina.

O gel de pectina também tem sido usado na técnica de imobilização de micro-organismos. Na década de 90, muitos pesquisadores ressaltam em seus trabalhos a utilização da pectina como suporte de alguns micro-organismos (RICHTER et al., 1991; BEGIN et al., 1992; van FEETEN et al., 1993; TOMASKA, 1995; GONÇALVES et al., 1996). Filho et al. (2012) utilizaram a pectina extraída de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) como suporte para a imobilização de enzima.

Santos (2003) usou o gel de pectina como suporte para imobilização de lipases com aplicação na síntese de ésteres alquílicos, verificando sua estabilidade em diversos solventes orgânicos, ácidos e álcoois de baixa polaridade. Foram testadas diferentes concentrações do agente reticulante (cloreto de cálcio), e o gel mais rígido foi formado com a solução de 0,3M de CaCl_2 , sendo que as concentrações de íons cálcio utilizadas foram de 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8 e 1M. O gel de pectina foi usado por 5 vezes em reações de esterificação do ácido láurico com pentanol-1 utilizando a lipase de *Candida rugosa*, com o intuito de verificar a eficiência e estabilidade da enzima imobilizada neste gel, após sucessivas reutilizações.

Em um estudo comparativo, Voo et al. (2011), avaliaram a estabilidade e o potencial de crescimento de probióticos em esferas de alginato e pectina, e concluíram que as esferas de pectina foram mais estáveis e apresentaram menor perda de células para o meio líquido, comparadas às de alginato. Estes autores destacam o potencial da pectina como matriz de suporte para a produção de células probióticas considerando sua estabilidade e microambiente favorável para o crescimento celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Polímeros e reagentes

Para a confecção das esferas foram utilizados alginato de sódio de média viscosidade (Sigma Aldrich[®], EUA) proveniente de algas *Macrocystis pyriferae*, com uma proporção de blocos M:G de aproximadamente 58:42 (MARTISEN et al., 1991) e pectina cítrica de baixo teor de metoxilação GENU[®] 8002 (CPKelco, Brasil). Cloreto de cálcio dihidratado (Synth[®], Brasil) foi utilizado como agente reticulante. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Obtenção e caracterização da vinhaça

A vinhaça foi coletada diretamente da saída de colunas de destilação de indústria sucroalcooleira da região de Araras - SP, a aproximadamente 95°C. No laboratório, após o resfriamento, fez-se a homogeneização e o acondicionamento da vinhaça em frascos de 2L os quais foram congelados a -20°C para uso durante os experimentos.

A caracterização físico-química da vinhaça foi realizada conforme a norma P4.231 (CETESB, 2015) com os seguintes parâmetros: pH, carbono e nitrogênio total

(mg L⁻¹), sódio (mg L⁻¹), cálcio (mg L⁻¹), potássio (mg L⁻¹), magnésio (mg L⁻¹), sulfato (mg L⁻¹), fosfato (mg L⁻¹), e teor de óxido de potássio (K₂O, em mg L⁻¹), além de microelementos, como ferro (mg L⁻¹), cobre (mg L⁻¹), zinco (mg L⁻¹) e manganês (mg L⁻¹).

Os teores de carbono e nitrogênio total foram analisados em TOC-LCPN SHIMADZU®, e de potássio, em fotômetro de chama DM-62 Digimed.

4.3. Processo de obtenção das esferas de alginato e de pectina

4.3.1. Esferas controle (sem microalgas)

As soluções dos biopolímeros foram preparadas através da adição da quantidade adequada de alginato (1, 2 e 3% m/v) e pectina (5, 7 e 10% m/v) em água destilada a temperatura ambiente, mantendo-se o sistema sob agitação mecânica constante (1000 rpm), até completa dissolução e homogeneização do material (aproximadamente 1 hora). Para os ensaios, as soluções poliméricas e os demais reagentes foram previamente autoclavados (121°C por 20 min), em autoclave Phoenix Lufanco, modelo AV 150 Plus.

As esferas foram obtidas pela técnica de gotejamento da solução do biopolímero em solução reticulante. Para o sistema de gotejamento, uma agulha (BD PrecisionGlide™, diâmetro: 1,20 x 40 mm) foi acoplada em uma mangueira de silicone (Masterflex®, diâmetro 0,3 mm). Essa mangueira foi ligada a uma bomba peristáltica para controle da vazão de gotejamento da solução. A vazão foi ajustada em 10 mL min⁻¹ (com água destilada) e a distância da agulha até a solução reticulante foi fixada em 10 cm (parâmetros definidos em testes preliminares). Alíquotas de 12,5 mL da solução polimérica foram gotejadas em 50 mL de solução de CaCl₂ (2, 5 e 10% m/v) sob agitação lenta. As esferas foram mantidas na solução reticulante por 3h a 4°C e então recolhidas com peneira e lavadas com água destilada antes dos ensaios de caracterização.

4.3.2. Imobilização da microalga *D. subspicatus* em esferas biopoliméricas

4.3.2.1. Inóculo

As cepas de *D. subspicatus* foram propagadas em meio BG11- Braun-Grunow Medium (RIPKA et al., 1979), em estufa de foto-período Tecnal® TE- 402, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) e fluxo luminoso de aproximadamente 45 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Microdestilaria (LABMAC) do Centro de Ciências Agrárias/UFSCar, Araras – SP. O meio BG11 foi preparado a partir da solução-mãe de seus macronutrientes e de uma solução-mãe contendo seus micronutrientes, cujas concentrações são apresentadas na Tabela 2. A concentração celular foi obtida por contagem direta em microscópio com auxílio de Câmara de Neubauer e confirmada por determinação de massa celular seca.

Tabela 2. Composição do meio BG11

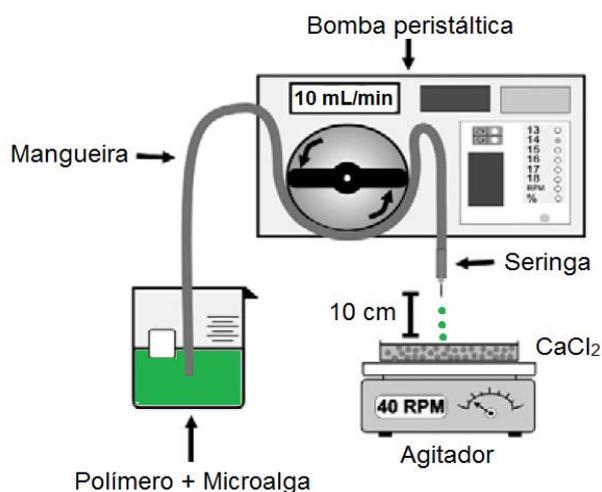
Componente	Solução estoque	Quantidade para 1
K_2HPO_4	3 g 100mL ⁻¹	1 mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,5 g 100mL ⁻¹	1 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Citrato de amônio férrico	0,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Na_2EDTA	0,1 g 100mL ⁻¹	1 mL
Ácido cítrico	0,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Na_2CO_3	2,0 g 100mL ⁻¹	1 mL
NaNO_3	15 g 100mL ⁻¹	10 mL
NaCl	7,2 g 100mL ⁻¹	1 mL
<u>Metais traço</u>		1 mL
H_3BO_3	286 mg 100mL ⁻¹	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	181 mg 100mL ⁻¹	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22 mg 100mL ⁻¹	
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	39 mg 100mL ⁻¹	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	7,9 mg 100mL ⁻¹	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	4,0 mg 100mL ⁻¹	

Fonte: (RIPKA et al., 1979)

4.3.2.2. Imobilização das microalgas

A proporção de cerca de 200 mg de biomassa microalgal para 100 mL de solução polimérica final foi mantida para imobilização celular. A suspensão contendo o inóculo, com concentração celular de aproximadamente 500 mg L⁻¹, foi concentrada em centrífuga refrigerada (SOLAB SL 701) a 1844 g por 20 minutos e a biomassa resuspendida em 50 mL de água destilada. Esta suspensão foi adicionada à solução de alginato ou pectina, de forma a manter a concentração final do biopolímero conforme a formulação desejada. A solução polimérica e os demais reagentes foram previamente autoclavados (121°C por 20 min), em autoclave Phoenix Lufenco, modelo AV 150 Plus. Após o preparo da solução polimérica, o processo de formação das esferas com a microalga imobilizada seguiu o mesmo procedimento do item 4.3.1, como apresentado na Figura 6. O tempo de reticulação foi fixado em 3 horas a 4°C, para minimizar o efeito sobre a atividade microalgal.

Figura 6. Gotejamento do polímero em solução reticulante para imobilização das microalgas



(Adaptado de DE-BASHAN; BASHAN, 2010)

4.4. Caracterização das esferas de alginato e de pectina com e sem células imobilizadas

Inicialmente foram avaliadas as esferas de alginato e pectina sem e com microalga imobilizada variando-se as concentrações de biopolímero e reticulante com o intuito de estabelecer o protocolo de produção das esferas e selecionar formulações adequadas para os testes de cultivo da microalga imobilizada em vinhaça. As esferas de alginato e pectina foram caracterizadas segundo os métodos descritos a seguir nos itens 4.4.1 a 4.4.5.

4.4.1. Aspecto visual: Foram realizadas avaliações subjetivas, considerando os aspectos visuais como homogeneidade (ausência de bolhas de ar), textura, formato e cor.

4.4.2. Diâmetro médio das esferas: Foi avaliado com auxílio de software IMAGE J[®]. As medidas foram realizadas em 10 esferas de cada condição estudada, obtido o diâmetro médio e normalizado.

4.4.3. Estabilidade química: Foi determinada através da exposição das esferas ao meio sintético BG11, água destilada e vinhaça. Trinta esferas de cada formulação foram incubadas com 10 mL de cada meio líquido (em triplicata) e o número de esferas intactas foi inspecionado visualmente e registrado diariamente no intervalo de uma semana (VOO et al., 2011). Os frascos foram mantidos em incubadora Marconi[®] do tipo BOD, modelo MA402, a 25°C, no escuro.

4.4.4. Propriedades mecânicas: Foram avaliadas pelo teste de compressão com o texturômetro TA.XT2 (Stable Micro System SMD, Inglaterra) utilizando-se uma célula de carga de 50 kg e cilindro de compressão de 200 mm de diâmetro (probe). A compressão foi realizada em temperatura ambiente até 70% de deformação da amostra a uma velocidade de pré-teste e teste de 1 mm min⁻¹. A distância entre o probe e a placa plana foi ajustada em 10 mm. Foram avaliadas 10 esferas de cada formulação e a força máxima média foi determinada.

4.5. Avaliação da eficiência de imobilização das microalgas nas esferas de alginato e de pectina

A eficiência de imobilização (Equação 1) das microalgas nas esferas de alginato e pectina foi avaliada através da contagem celular em microscópio ótico MOTIC BA 210TL com auxílio de Câmara de Neubauer na suspensão polimérica original (antes da imobilização) e no meio líquido de reticulação onde as esferas formadas encontravam-se submersas.

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = [(N_o - N_r) / N_o] * 100 \quad (1)$$

onde:

N_o é a concentração celular na solução de biopolímero (células mL⁻¹)

N_r é a concentração celular no reticulante (células mL⁻¹).

Para a contagem celular em Câmara de Neubauer, foi adicionada uma gota da amostra previamente homogeneizada sobre a superfície quadriculada e cobriu-se com uma lamínula. Com auxílio de um microscópio no aumento de 400x realizou-se a contagem de células, sendo a contagem celular por mL calculada a partir da média dos valores obtidos em cinco quadrantes multiplicado por 25×10^4 .

4.6. Cultivo da microalga *D. subspicatus* na forma livre e imobilizada em vinhaça

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de caracterização descritos no Item 4.4, foram selecionadas formulações adequadas de esferas de alginato e de pectina para o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em vinhaça. O cultivo da microalga na forma livre também foi avaliado para fins de comparação.

Nas condições selecionadas de produção de partículas de alginato (alginato 2%, reticuladas com solução de CaCl₂ 2, 5 e 10%) e pectina (pectina 7%, reticuladas com solução de CaCl₂ 2, 5 e 10%), foram conduzidos ensaios com a microalga *D. subspicatus* imobilizada, em vinhaça com pH ajustado com hidróxido de sódio para 7,6 como meio de cultivo. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de vinhaça em agitador orbital TECNAL® TE-420 com 100 rpm e 25°C, no escuro, com monitoramento de 72 horas, sendo que as amostras (frascos

sacrifício em triplicata) foram tiradas em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Em cada frasco, foram adicionados a quantidade de esferas obtidas pelo gotejamento de 12,5 mL de solução polimérica. Durante os ensaios, o diâmetro médio das esferas foi acompanhado (conforme descrito no Item 4.4.2) e os teores de carbono e nitrogênio total do meio líquido foram analisados conforme descrito no Item 4.2. A avaliação do crescimento foi realizada através da contagem celular nas esferas em cada intervalo de tempo. Para isso, foram adicionados em um tubo de ensaio 5 mL de solução de citrato de sódio 3% (m/v) e 5 esferas de microalga imobilizada. Após agitação e completa dissolução das partículas realizou-se a contagem em Câmara de Neubauer (conforme descrito no Item 4.5). A velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi estimada pela inclinação da região linear na curva de crescimento semi-logarítmica. A contagem celular na vinhaça foi realizada para verificar se houve escape de células para o meio líquido (fase *bulk*).

Concomitantemente aos ensaios de cultivo com as microalgas imobilizadas, frascos contendo vinhaça e esferas controle (sem microalgas), em triplicata, foram mantidos nas mesmas condições do cultivo a fim de se avaliar a remoção do potássio pelo próprio biopolímero. Nos intervalos de coleta de amostra do experimento, as esferas controle eram retiradas da vinhaça e o teor de potássio quantificado no meio líquido.

Para o cultivo da microalga *D. subspicatus* na forma livre, 450 mL de vinhaça com pH 7,6 foram autoclavados. A suspensão de microalgas foi concentrada conforme descrito no Item 4.3.2.2.

Para o tempo zero, alíquotas (25 mL) da vinhaça autoclavada foram transferidas, em câmara de fluxo laminar, para frascos Erlenmeyers de 125 mL esterilizados (em triplicata). O concentrado microalgal foi então ressuspendido no volume restante de vinhaça e alíquotas (25 mL) da suspensão foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL previamente esterilizados. Os frascos foram mantidos em agitador orbital TECNAL® TE-420 a 100 rpm e 25°C, no escuro, com monitoramento de 72 horas, sendo que as amostras (frascos sacrifício em triplicata) foram tiradas em 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Durante o ensaio, o crescimento celular foi avaliado por contagem em Câmara de Neubauer (Item 4.5). Para determinação dos teores de carbono e nitrogênio total, e potássio, as amostras foram centrifugadas à 20°C por 20 minutos a 1844 g, logo após serem retiradas do agitador orbital e armazenadas congeladas.

Ressalta-se que, após os primeiros ensaios de cultivo com esferas de alginato, em que foi utilizada a vinhaça bruta como meio de cultivo, constatou-se a necessidade de submeter a vinhaça a centrifugação à 20°C por 20 minutos a 1844 g em centrífuga refrigerada Solab® SL-701.

4.7. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, a fim de determinar diferenças significativas entre as médias, a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O software Statistica V1.1.5 foi utilizado para esses cálculos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da vinhaça

Os parâmetros físico-químicos de caracterização da vinhaça bruta estão apresentados na Tabela 3. A composição química da vinhaça é variável e depende de fatores como a composição e natureza da matéria prima, método de fermentação utilizado, sistema utilizado na preparação do mosto, tipo de levedura utilizada, destilador e do tipo de flegma separado (HELBEL; ANDRADE, 2009). Os valores observados para a vinhaça integral estão de acordo com os encontrados na literatura para vinhaça de diferentes mostos (FREIRE; CORTEZ, 2000, SOARES et al., 2014).

Tabela 3. Caracterização da vinhaça bruta

Parâmetro	Valor
pH	4,5
Temperatura °C	95
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	26800
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	543,3
Carbono orgânico (mg L ⁻¹)	7900
Fósforo (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	85
Potássio (mg L ⁻¹ K ₂ O)	3923,3
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	680
Magnésio (mg L ⁻¹ MgO)	270
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄)	380
Matéria orgânica (mg L ⁻¹)	13619,6
Fe (mg L ⁻¹)	18,3
Cu (mg L ⁻¹)	0,32
Zn (mg L ⁻¹)	0,47
Mn (mg L ⁻¹)	3,64

5.2. Produção e caracterização das esferas de alginato e de pectina com e sem microalga imobilizada

Os testes para produção e caracterização das esferas de alginato e pectina foram conduzidos variando-se as concentrações dos biopolímeros, ou seja, 1, 2 e 3% (m/v) de alginato e 5, 7 e 10% (m/v) de pectina, e de reticulante cloreto de cálcio 2, 5 e 10% (m/v).

Os resultados dos testes de estabilidade indicaram que em todas as condições testadas não houve dissolução das partículas, ou seja, a recuperação foi de 100% em todos os casos (sem e com microalgas). No entanto, é importante ressaltar, que ao final de sete dias as estruturas pareciam visualmente fragilizadas quando comparadas ao início do teste. A presença de sais, sobretudo no caso dos ensaios em vinhaça e meio BG11, pode interferir na estrutura da matriz polimérica, desestabilizando as ligações com o cálcio e aumentando a mobilidade das cadeias (COVIZZI et al., 2007).

Em termos de geometria, as partículas esféricas consistem na forma mais comum para aplicação para imobilização de células e enzimas, minimizando as

limitações difusionais (DE-BASHAN; BASHAN, 2010). De acordo com Luong (1985), há uma limitação de transferência de massa uma vez que o gel introduz uma resistência adicional, alterando o coeficiente de difusão, ou seja, o fluxo do líquido que se move em direção à rede tridimensional polimérica (MONTEIRO et al., 2015).

As esferas produzidas com alginato 2% apresentaram homogeneidade visual, formato esférico regular e textura adequada. Na concentração de alginato 1%, as partículas apresentavam leves pontas, com aspecto de gota e com menor diâmetro, comparado as demais concentrações testadas, conforme demonstrado na Figura 7. Já as esferas de alginato 3% apresentaram-se achatadas, sobretudo quando reticuladas com CaCl_2 10%. Além disso, devido à sua viscosidade elevada, a solução de alginato 3% apresentava gotejamento lento (cerca de 12 h para transferir 50 mL), inviabilizando o processo de produção e utilização das esferas nos cultivos microalgais.

Na imobilização celular para obtenção de bioprodutos ou remoção de poluentes, o tamanho da partícula esférica é fundamental na difusividade de substratos e produtos. Em geral, partículas menores levam à maior rendimento e produtividade do processo devido à menor limitação difusional, disponibilizando quantidades de substratos adequadas, e, portanto, menor interferência no metabolismo celular. A esfericidade das partículas de alginato tem um efeito notável sobre a sua estabilidade mecânica e química. Lee et al. (2013) relataram que uma forma não esférica das partículas reduziu a força do gel em comparação com partículas esféricas. Bugarski et al. (1994) afirmaram que a redução na concentração de alginato de 1,5 para 0,8% resultou na em partículas com formato longo e fino, ou seja, um filamento que liga a nova gota à ponta da agulha, resultando em partículas com formato de gota. Al-Hajry et al. (1999) obtiveram partículas de alginato 1% deformadas, comparadas com maiores concentrações de polímero, sugerindo que para 1% de alginato, a tensão superficial não é forte o suficiente para que a gota de alginato se forme em uma esfera perfeita antes de atingir a superfície da solução de cloreto de cálcio. Além disso, estes autores ressaltaram a formação de estrias nesta menor concentração de alginato, o mesmo observado no presente estudo para as esferas de alginato 1%.

A presença da microalga não alterou as características visuais de formato das esferas, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 7. Fotografia das esferas produzidas com diferentes concentrações de alginato: 1% (A, B e C), 2% (D, E e F) e 3% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl_2 na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).

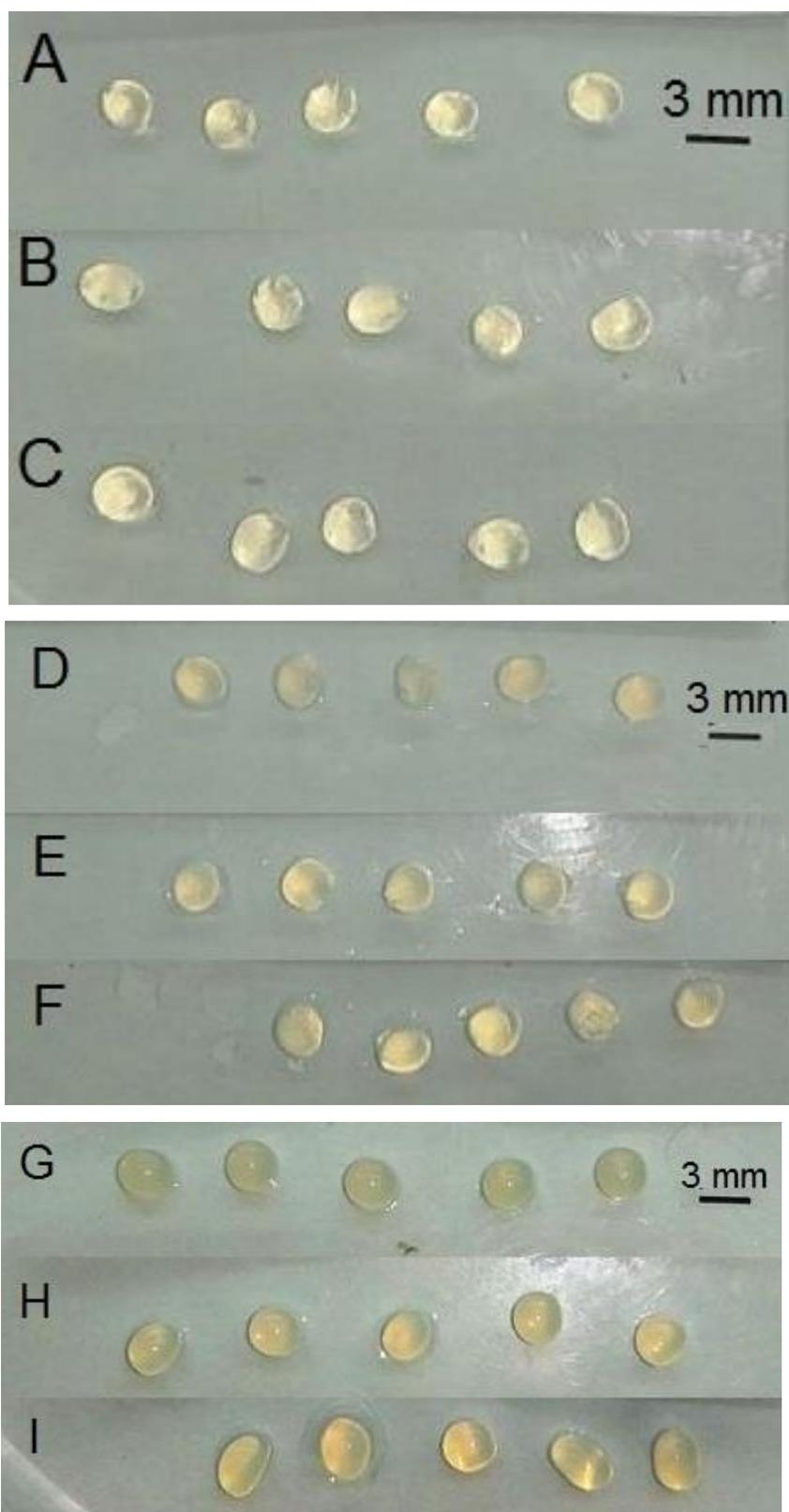
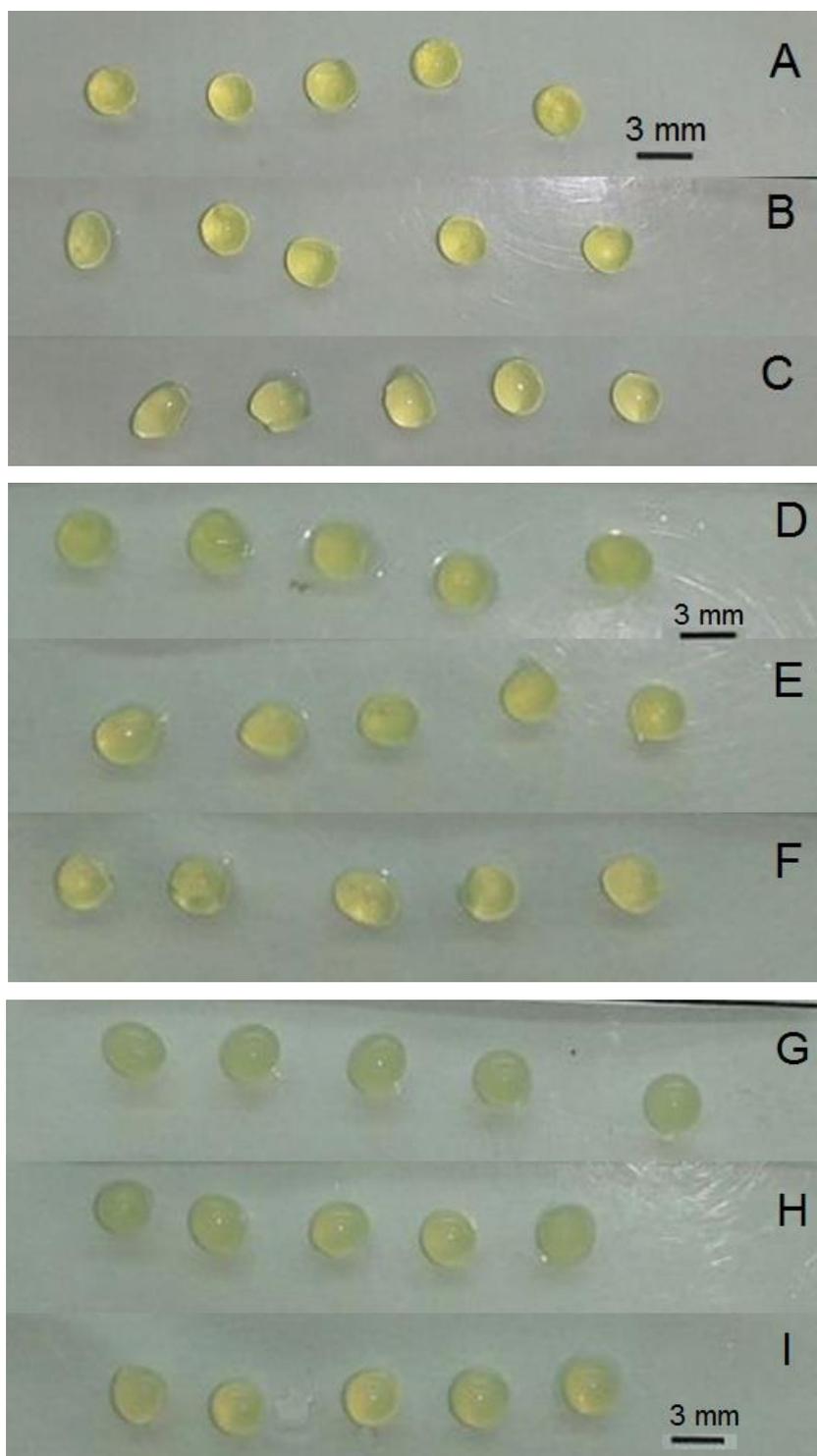


Figura 8. Fotografia das microalgas imobilizadas com diferentes concentrações de alginato: 1% (A, B e C), 2% (D, E e F) e 3% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl_2 na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).



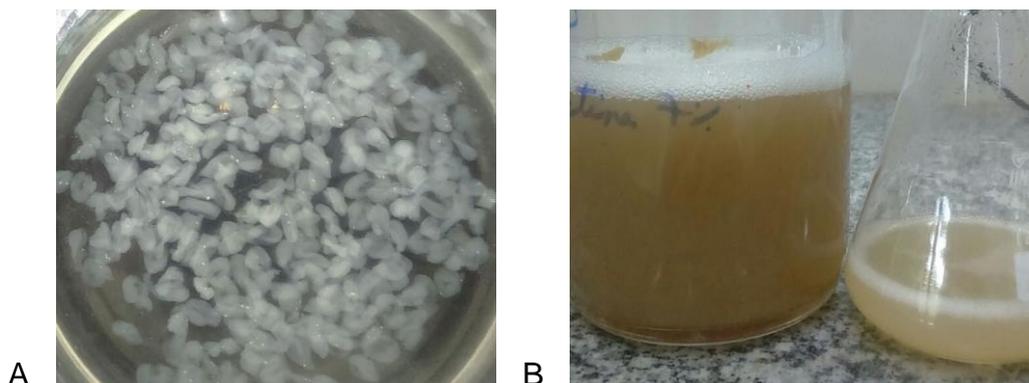
Assim como para alginato, o preparo das esferas de pectina envolveu a esterilização em autoclave das soluções poliméricas e reagentes utilizados. No entanto, após o tratamento térmico da pectina, notou-se que a solução apresentava visualmente uma coloração alterada, viscosidade reduzida e com a presença de um precipitado (Figura 9).

Figura 9. Solução de pectina após esterilização em autoclave



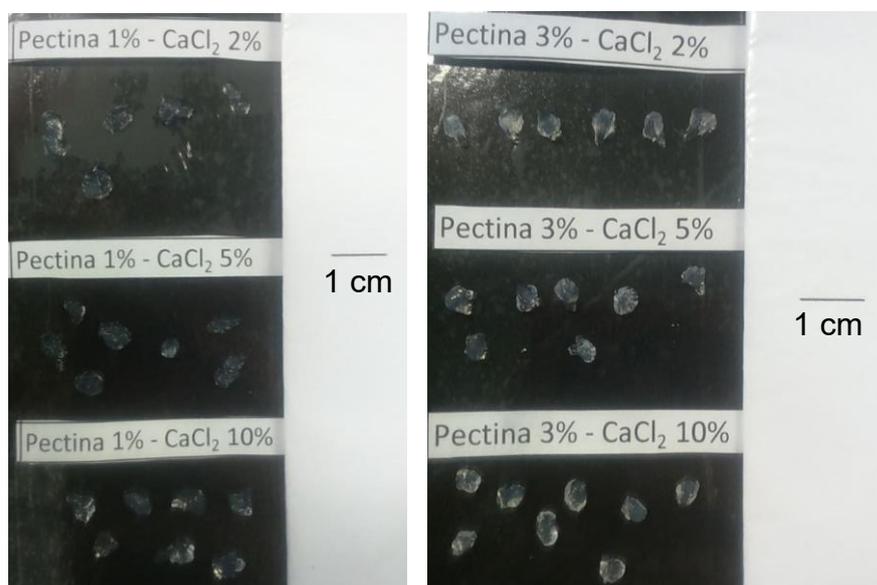
Mesmo com estas alterações, foi realizado o gotejamento da solução polimérica autoclavada em agente reticulante e verificou-se que não houve a formação de esferas, nas concentrações de cloreto de cálcio 2, 5 e 10% m/v, conforme apresentado na Figura 10 A. Assim sendo, foi necessário substituir a esterilização da solução de pectina em autoclave por banho-maria, com temperatura aproximada de 100°C por 20 minutos, deixada esfriar a temperatura ambiente (25°C) (SANTOS, 2003). Pode-se perceber a diferença na tonalidade das soluções poliméricas na Figura 10 B, sendo a solução autoclavada à esquerda, e a solução aquecida em banho-maria à direita.

Figura 10. (A) Partículas resultantes do gotejamento de pectina autoclavada
(B) Comparativo de tonalidade das soluções de pectina



É importante ressaltar que neste trabalho foram realizados testes preliminares com pectina 1 e 3%, porém não foi possível obter partículas esféricas, conforme apresentado na Figura 11. Estas concentrações de pectina foram testadas com o intuito de moderar o uso do biopolímero na imobilização celular, no entanto, foi inviável para a formação de esferas.

Figura 11. Fotografia das partículas produzidas com pectina: 1% (esquerda) e 3% (direita)



A pectina na concentração de 5% formou esferas irregulares, com formato não esférico, em todas as concentrações de cloreto de cálcio testadas, como apresentado na Figura 12 A, B e C. Lee et al. (2014), em um estudo com partículas de pectina, observaram que partículas formadas a partir de soluções de biopolímero com concentração inferior a 7% m/v não eram uniformemente esféricas.

Observa-se que as partículas produzidas a partir da solução de pectina 7% eram esféricas, regulares e homogêneas (Figura 12 D, E e F). Na concentração de 10% de pectina, as esferas ficaram com pequenas ranhuras na superfície da partícula, o que foi proporcional à concentração de reticulante (Figura 12 G, H e I). As soluções de pectina eram menos viscosas, quando comparadas ao alginato, porém na concentração de 10%, o tempo de gotejamento também foi elevado.

Segundo Lee et al. (2014), à medida que a concentração de pectina aumenta, a densidade das soluções de pectina eleva-se ligeiramente, enquanto que a

viscosidade aparente das soluções aumenta exponencialmente. Este estudo também revelou que as soluções de pectina com concentração elevadas (7 e 8% m/v), que são mais viscosas, formam partículas mais esféricas que as soluções de menor concentração (5 e 6% m/v). A viscosidade da solução polimérica pode determinar a resistência à mudança de forma na gota durante a queda, bem como ao entrar em contato com o banho de gelificação.

Na Figura 13, observam-se as esferas de pectina produzidas com microalga, notando-se a coloração esverdeada característica sem alteração das características de formato.

Figura 12. Fotografia das esferas produzidas com diferentes concentrações de pectina: 5% (A, B e C), 7% (D, E e F) e 10% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl_2 na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).

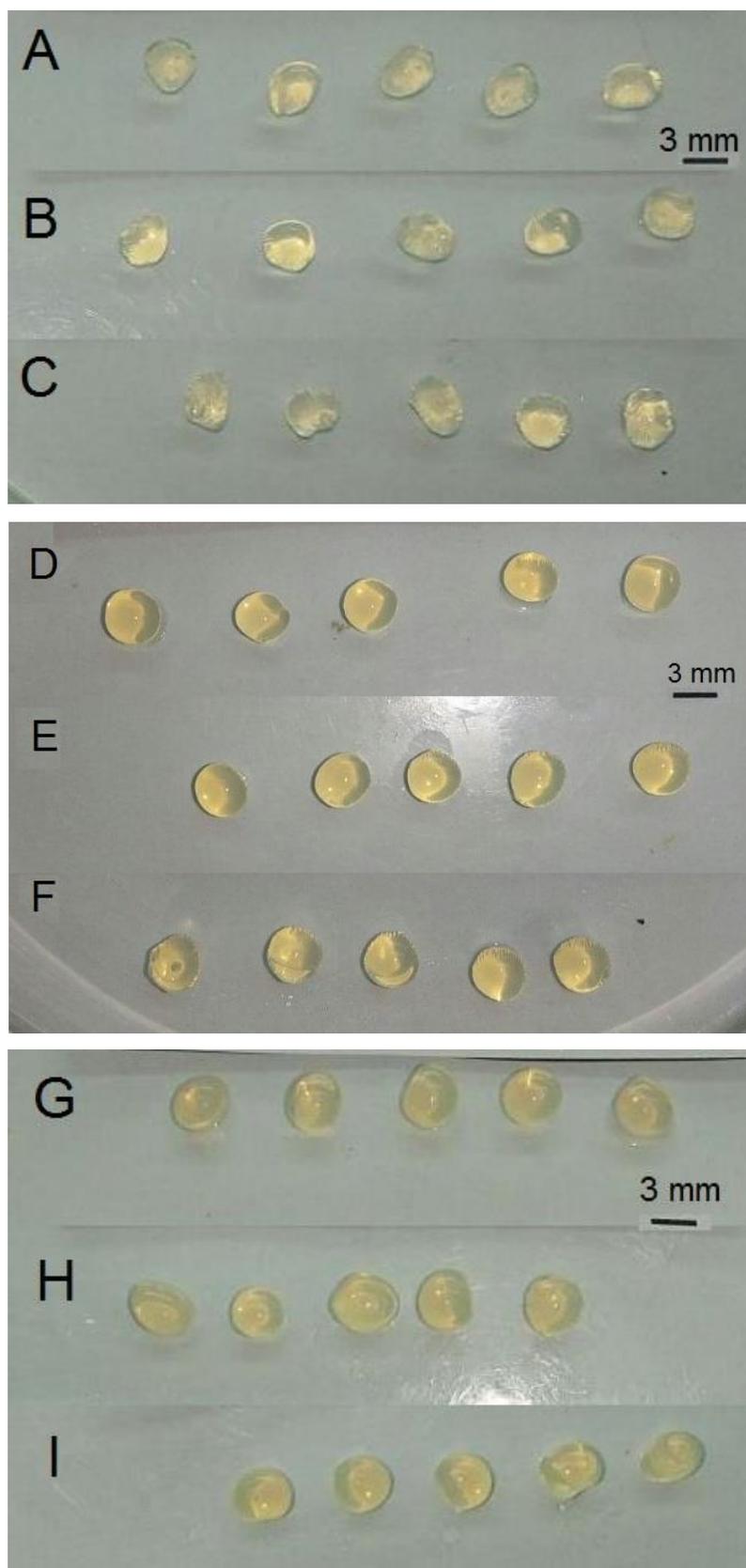
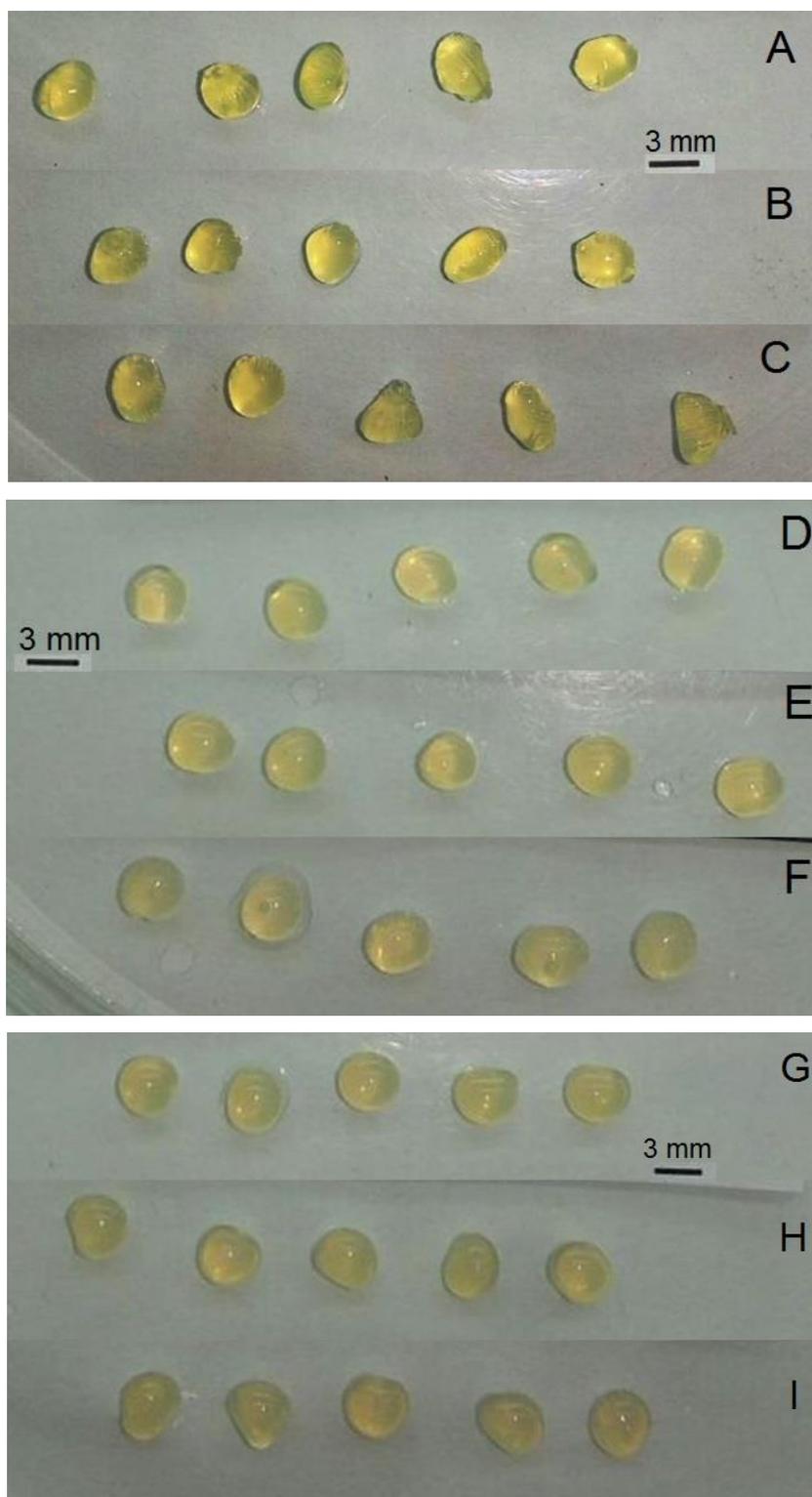


Figura 13. Fotografia das microalgas imobilizadas com diferentes concentrações de pectina: 5% (A, B e C), 7% (D, E e F) e 10% (G, H e I) e diferentes concentrações de CaCl_2 na solução reticulante: 2% (A, D e G), 5% (B, E e H) e 10% (C, F e I).



Além da importância com relação aos aspectos difusionais dos substratos e produtos, o tamanho das esferas pode ser um fator limitante de crescimento populacional para as microalgas (FORERO-CUJIÑO et al., 2016). Devido a isso, ressalta-se a relevância do acompanhamento do diâmetro das esferas biopoliméricas, apresentado na Tabela 4.

Ao analisar o tamanho das partículas de pectina, Lee et al. (2014) afirmam que o raio das gotículas da solução de pectina e das esferas aumentam de acordo com o aumento do diâmetro da agulha de gotejamento, ou seja, estes não eram dependentes da concentração da solução de pectina. Entretanto, para o alginato verifica-se, neste trabalho, uma tendência de aumento do diâmetro quando a concentração do polímero aumentou de 1 para 2%. Em relação aos dois biopolímeros, observa-se que a pectina produziu esferas maiores que o alginato. Além disso, ressalta-se que a presença da microalga não alterou significativamente o diâmetro das esferas.

Tabela 4. Diâmetro médio das esferas de alginato e pectina com e sem microalga imobilizada, variando-se a concentração do biopolímeros e a concentração da solução reticulante.

Biopolímero (m/v)	CaCl ₂ (m/v)	Diâmetro médio (cm)			
		Esferas controle	CV (%)	Esferas com microalga	CV (%)
Alginato 1%	2%	0,231 ± 0,004 ^a	1,73	0,256 ± 0,011 ^a	4,29
	5%	0,240 ± 0,012 ^{a,b}	5,00	0,258 ± 0,022 ^a	8,52
	10%	0,261 ± 0,008 ^b	3,06	0,278 ± 0,033 ^{a,b}	11,87
Alginato 2%	2%	0,304 ± 0,013 ^c	4,27	0,306 ± 0,019 ^{b,c}	6,21
	5%	0,301 ± 0,007 ^c	2,32	0,308 ± 0,020 ^c	6,49
	10%	0,302 ± 0,019 ^c	6,29	0,308 ± 0,018 ^c	5,84
Alginato 3%	2%	0,320 ± 0,010 ^{c,d}	3,12	0,328 ± 0,019 ^{c,d}	5,79
	5%	0,319 ± 0,004 ^{c,d}	1,25	0,324 ± 0,014 ^{c,d}	4,32
	10%	0,342 ± 0,018 ^{c,d}	5,26	0,313 ± 0,022 ^{c,d}	7,02
Pectina 5%	2%	0,363 ± 0,023 ^{e,f,g}	6,33	0,338 ± 0,042 ^{d,e}	12,42
	5%	0,352 ± 0,027 ^{e,f}	7,67	0,357 ± 0,048 ^{c,d,e}	13,44
	10%	0,373 ± 0,027 ^{f,g}	1,00	0,360 ± 0,014 ^{e,f}	3,88
Pectina 7%	2%	0,367 ± 0,007 ^{e,f,g}	1,90	0,374 ± 0,015 ^{e,f}	4,01
	5%	0,371 ± 0,005 ^{f,g}	1,34	0,377 ± 0,014 ^{f,g}	3,71
	10%	0,379 ± 0,012 ^{f,g}	3,16	0,382 ± 0,030 ^{f,g}	7,85
Pectina 10%	2%	0,385 ± 0,016 ^g	4,15	0,382 ± 0,030 ^{f,g}	7,85
	5%	0,370 ± 0,028 ^{f,g}	7,56	0,386 ± 0,025 ^{f,g}	6,47
	10%	0,364 ± 0,031 ^{e,f,g}	8,51	0,399 ± 0,027 ^g	6,76

Média ± desvio padrão de 5 determinações experimentais. Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Tukey. CV é o coeficiente de variação

De-Bashan e Bashan (2010) afirmaram que a resistência à compressão das esferas tende a aumentar com o aumento da concentração do biopolímero e do agente reticulante utilizados para a produção das esferas. De acordo com os resultados obtidos para a resistência mecânica das esferas de alginato e pectina, apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente, observa-se que o aumento na concentração dos biopolímeros aumenta significativamente a força de compressão. No entanto, o aumento na concentração do CaCl_2 , no geral, não afetou a resistência das esferas formadas. Exceto para as esferas controle de alginato 3% quando a concentração de CaCl_2 aumentou de 2 para 10%. A presença da microalga nas esferas também não afetou significativamente a resistência mecânica da matriz. Comparando-se os biopolímeros, constata-se que as esferas de pectina apresentaram forças de compressão superiores que as de alginato.

Figura 14. Resistência mecânica das esferas de alginato sem e com microalga produzidas com diferentes concentrações de alginato (1%, 2% e 3% m/v) e de CaCl_2 (2%, 5% e 10% m/v), n=10, letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

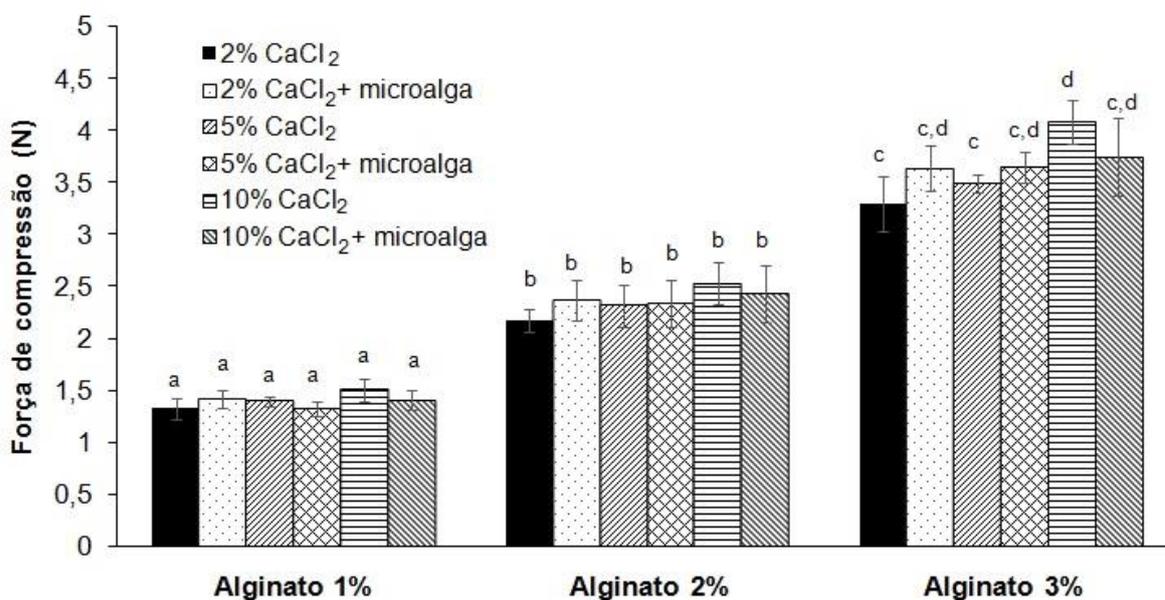
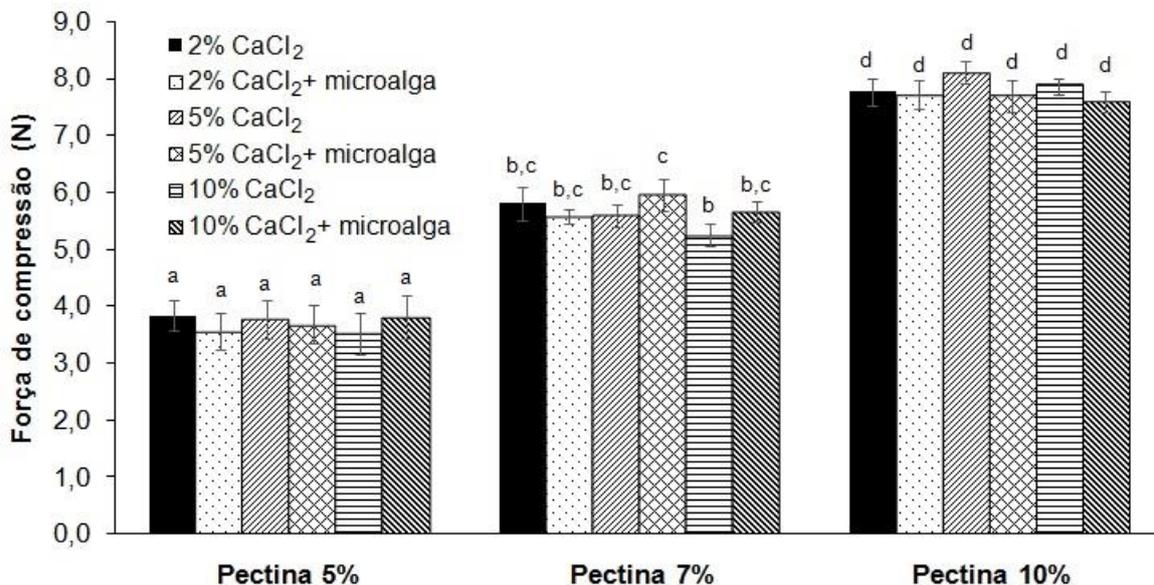


Figura 15. Resistência mecânica das esferas de pectina sem e com microalga produzidas com diferentes concentrações de pectina (5%, 7% e 10% m/v) e de CaCl_2 (2%, 5% e 10% m/v), ($n=10$, letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey).



Assim, considerando os resultados apresentados, as concentrações de alginato e de pectina selecionadas para os ensaios de cultivo da microalga imobilizada em vinhaça foram de 2% e 7%, respectivamente. Estas concentrações produziram esferas resistentes e esféricas, com economia de polímero.

5.3. Eficiência da imobilização celular nas esferas de alginato e de pectina

Ensaio de cultivo em vinhaça centrifugada com a microalga imobilizada foram conduzidos em esferas de alginato 2% m/v e de pectina 7% m/v em diferentes concentrações de reticulante 2, 5 e 10% m/v.

A Tabela 5 apresenta os resultados de eficiência de imobilização da microalga nas esferas. As formulações apresentaram eficiências superiores a 90%, comprovando a adequação física das matrizes na retenção das células de *D. subspicatus*. Estes resultados se confirmam visualmente pela cor da solução reticulante, a qual permaneceu inalterada após o período de 3 horas de reticulação das esferas, e pela cor esverdeada das esferas com microalga (Figura 16).

Figura 16. Aspecto visual das esferas de alginato contendo microalgas *D. subspicatus*



Knezevic et al. (2002) constataram eficiências de 98,2, 99, 98,7, 99 e 99,2% de imobilização de lipases de *Candida rugosa* em alginato, testadas nas concentrações 2, 4, 6, 8 e 10% m/v, respectivamente, ou seja, valores similares aos alcançados no presente estudo. Riaz et al. (2009) obtiveram máxima eficiência de imobilização de α -amilase de *Bacillus subtilis* com o uso da solução de alginato 4% (m/v), que foi aproximadamente 70%, e nas concentrações de alginato de 5 e 6 % m/v, as eficiências de imobilização reduziram para 67 e 64%, respectivamente.

Cabe ressaltar que são raros os trabalhos na literatura que apresentam os rendimentos de imobilização de microalgas, porém, o sucesso do encapsulamento das células se deu pelo preparo adequado das matrizes, principalmente no que diz respeito ao controle de vazão da solução gotejada no reticulante e tamanho das partículas.

Tabela 5. Eficiência de imobilização celular das microalgas imobilizadas nas esferas de alginato e de pectina

[Biopolímero]	[CaCl ₂]	Eficiência de imobilização (%)
Alginato 2%	2%	97,78
	5%	100
	10%	99,23
Pectina 7%	2%	100
	5%	100
	10%	100

5.4. Ensaios de cultivo da microalga imobilizada em vinhaça

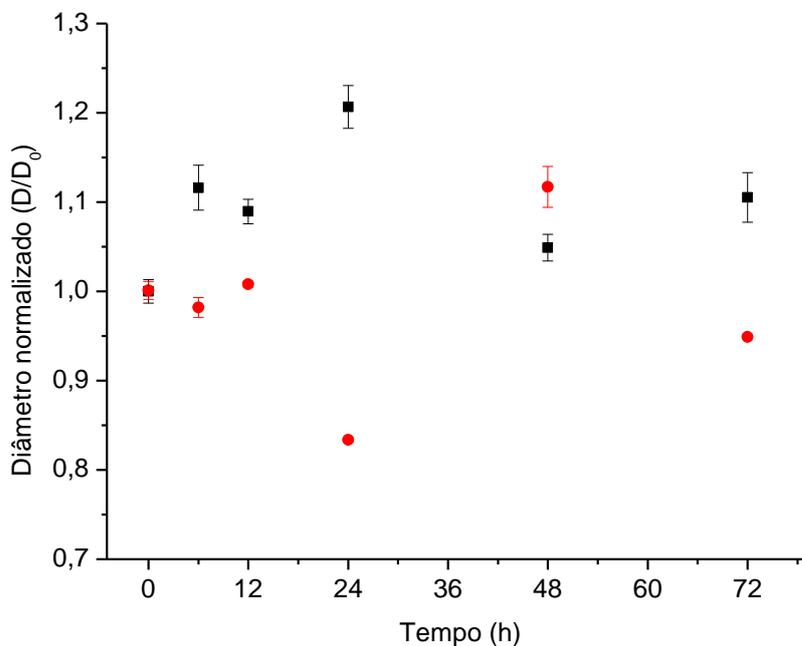
5.4.1. Efeito da centrifugação da vinhaça

O efeito de centrifugação da vinhaça foi avaliado comparando-se os resultados de dois experimentos que utilizaram a microalga imobilizada em esferas de alginato produzidas com solução de alginato 2% gotejadas em solução reticulante de cloreto de cálcio 5%. Os experimentos foram conduzidos utilizando vinhaça bruta como meio de cultivo e vinhaça após o processo de centrifugação, sendo retirados contaminantes e sólidos suspensos de difícil biodegradação.

Apesar da variabilidade na composição química da vinhaça, o que não permite uma padronização das suas características, pode-se observar que o nutriente mineral encontrado em maior proporção é o potássio, e o elemento que apresenta maior percentual na composição química é o carbono (FRANCISCO, 2008). Dada a importância deste nutriente no cultivo de microalgas, a vinhaça torna-se uma alternativa potencial como meio de cultivo para esses micro-organismos (FONTE, 2016).

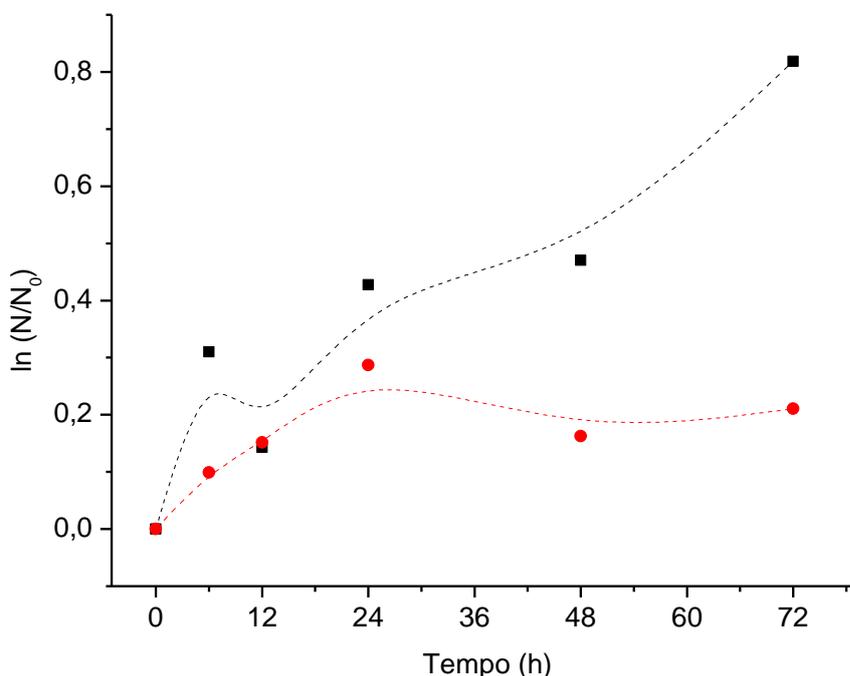
O resultado de diâmetros normalizado (razão entre o diâmetro no tempo t e o diâmetro inicial) das esferas ao longo do cultivo das microalgas imobilizadas em vinhaça bruta e centrifugada está apresentado na Figura 17. Observa-se que na vinhaça centrifugada esferas apresentaram um ligeiro aumento no diâmetro após 24 horas de cultivo (aproximadamente 20% do tamanho original) e uma tendência de diminuição do diâmetro após 48 horas. No ensaio com vinhaça bruta é possível notar um ligeiro intumescimento da esfera em 48 horas e em 72 horas o diâmetro é reduzido. A variação do diâmetro das esferas pode ser relacionada ao grau de intumescimento da matriz. Esta propriedade é importante, pois as modificações na matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade dos nutrientes através das esferas. É interessante ressaltar que apesar dessa variação no diâmetro, as esferas se mantiveram estáveis em relação ao formato e número de esferas ao longo dos experimentos.

Figura 17. Diâmetro normalizado das esferas durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●)



A Figura 18 apresenta as curvas de crescimento semi-logarítmica ($\ln N/N_0$ versus tempo) obtidas durante 72 h de cultivo. O ensaio com vinhaça bruta foi realizado com o objetivo de manter o processo mais próximo das condições industriais, sem adicionar etapas e custos ao processo. No entanto, observou-se a presença de leveduras em microscópio, confirmada através do uso de corante azul de metileno para as contagens. A quantidade de leveduras na vinhaça bruta tende a ser elevada, por volta de 3×10^5 células por mL, apesar da temperatura de saída da água residuária, indicando sua resistência ao processo de destilação do vinho. Assim, de forma a minimizar o efeito das leveduras ainda ativas, optou-se por centrifugar a vinhaça para os próximos experimentos. De fato, trabalhos anteriores confirmam que a vinhaça contém uma microbiota natural, sendo majoritariamente composta por bactérias e leveduras residuais do mosto fermentado. Assim, devido a problemas de contaminação, a viabilidade da produção de microalgas em vinhaça é muito dependente do tempo de cultivo, sendo indicado o emprego de bateladas de poucas horas (DE MATTOS; BASTOS, 2015).

Figura 18. Concentração celular durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl₂) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●)



A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) na vinhaça bruta foi da ordem de $0,002\text{h}^{-1}$, com tempo de geração (t_g) de 346 horas, enquanto que para a vinhaça centrifugada foi $0,009\text{ h}^{-1}$ (tempo de geração de 77 horas). A menor velocidade de crescimento das microalgas obtida no experimento com vinhaça bruta pode ser atribuída à contaminação por leveduras, as quais consomem em metabolismo heterotrófico parte da matéria orgânica do meio. Sendo assim, a centrifugação da vinhaça é benéfica para um processo utilizando microalgas, mesmo que parte dos sólidos suspensos seja removida, porção esta de difícil consumo microbiano. Da Silva et al. (2017) observaram um $\mu_{\text{máx}}$ aproximadamente 2 vezes maior que o observado para a vinhaça centrifugada no cultivo de células livres de *D. subspicatus* em vinhaça a 25°C em um reator em batelada e em condições otimizadas de aeração e mistura. Velocidades específicas de crescimento inferiores para células imobilizadas são esperadas como resposta a limitação difusional de substrato e oxigênio através da matriz de imobilização (DE-BASHAN; BASHAN, 2010). Apesar da baixa demanda de oxigênio nos cultivos heterotróficos de microalgas a partir de matéria orgânica, é fundamental manter o ambiente aeróbio, o que é dificultado pela imobilização.

Nas Figuras 19, 20 e 21 estão apresentados, respectivamente, os perfis de carbono (TOC), nitrogênio (TN) e potássio, obtidos para os experimentos com vinhaça

bruta e centrifugada. As concentrações de TOC e TN para a vinhaça centrifugada apresentaram perfis característicos com tendência de redução destes componentes em relação ao tempo de cultivo, indicando o consumo destes substratos pela microalga. O potássio apresentou uma queda de 27% após 6 horas, permanecendo praticamente constante após este tempo. Para a vinhaça bruta, fica evidente que as concentrações determinadas para estes componentes na vinhaça bruta apresentaram um desvio padrão elevado que pode ser atribuída a heterogeneidade deste meio de cultivo. Neste caso, o TN decresceu em 24 horas e após este tempo aumentou. Com relação ao TOC, observa-se um aumento após 24 horas de experimento. Estes aumentos nas concentrações de TOC e NT podem ser atribuídos à contaminação pelas leveduras da vinhaça. Assim, confirma-se a importância da centrifugação da vinhaça para os experimentos. Já no caso do potássio, percebe-se um decréscimo deste nutriente, sugerindo o consumo pela microalga ou, ainda, que este cátion esteja interagindo com as cargas negativas do alginato por interação eletrostática. Nota-se uma redução de 35% do potássio nas primeiras 6 horas de cultivo, permanecendo praticamente constante após este período.

Figura 19. Perfis de carbono orgânico total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl_2) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●)

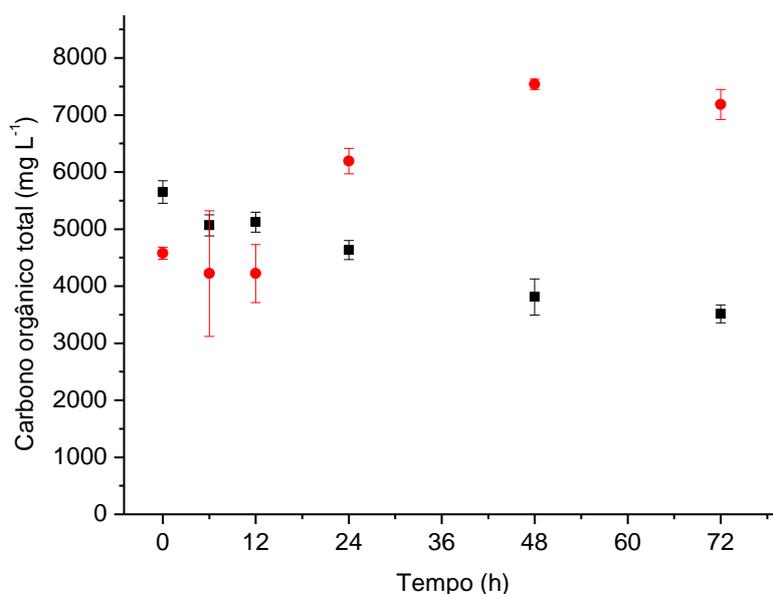


Figura 20. Nitrogênio total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl_2) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●)

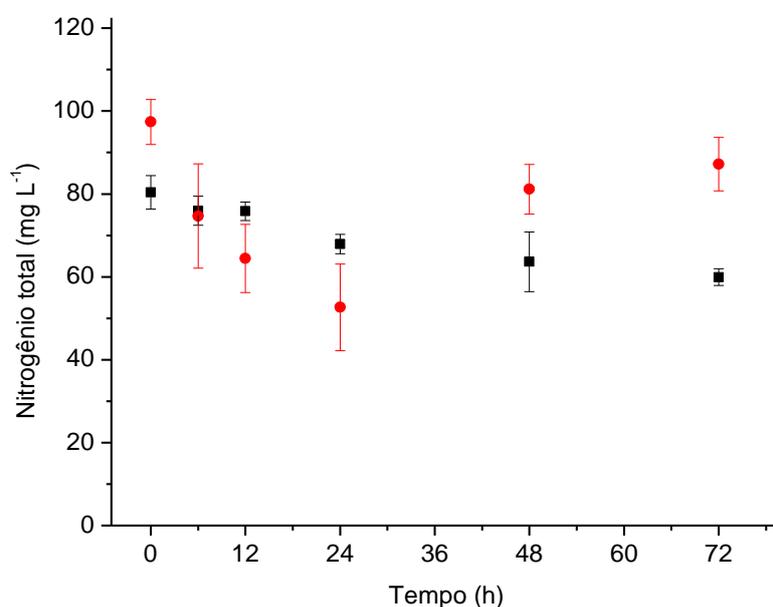
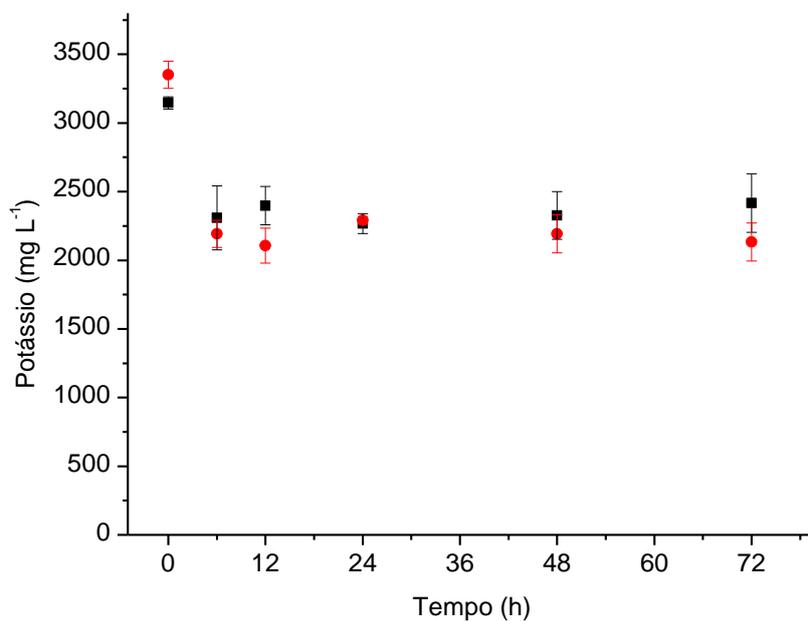


Figura 21. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl_2) em vinhaça centrifugada (■) e vinhaça bruta (●).



Nesse contexto, a Tabela 6 resume os resultados de remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio para as condições experimentais nos seus respectivos tempos de ocorrência.

Tabela 6. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça bruta e centrifugada por *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato (2% com 5% CaCl₂)

Parâmetro	Remoção máxima (%)	Tempo (horas)	Vinhaça
Carbono orgânico total	37,8	72	Centrifugada
Nitrogênio total	45,9	24	Bruta
Potássio	37,1	12	Bruta

A partir destes ensaios, a vinhaça foi centrifugada com o intuito de padronizar a amostra e minimizar o impacto dos contaminantes microbianos originais da água residuária.

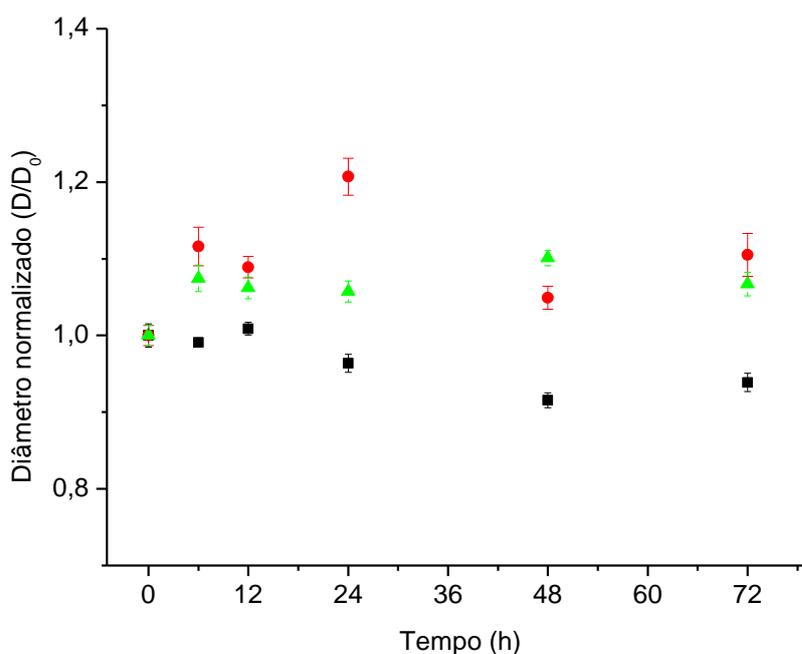
5.4.2. Efeito da concentração de solução reticulante para esferas de alginato

Para avaliar o efeito da concentração da solução reticulante nos perfis de diâmetro normalizado das esferas, crescimento celular da microalga, concentrações de TOC, TN e potássio na vinhaça, experimentos de cultivo da microalga imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com diferentes concentrações de cloreto de cálcio 2%, 5% e 10% foram realizados utilizando vinhaça centrifugada.

Os resultados de diâmetro normalizado das esferas (reticuladas com 2, 5 e 10% de CaCl₂) ao longo do cultivo estão apresentados na Figura 22. Nota-se que os diâmetros das esferas reticuladas com 2% de CaCl₂ apresentaram perfil decrescente, indicando um possível desgaste das esferas após 24 h de cultivo. Por outro lado, as esferas reticuladas com 5% de CaCl₂ apresentaram intumescimento após 24 h de cultivo e uma tendência de diminuição do diâmetro após 48 h. O diâmetro das esferas reticuladas com 10% de CaCl₂ apresentou um perfil crescente, obtendo um diâmetro máximo em 48 horas com posterior decréscimo leve. É importante ressaltar que o intumescimento das esferas reticuladas com 10% de CaCl₂ foi mais leve do que das esferas reticuladas com 5% de CaCl₂ das esferas, fato que pode ser explicado pelo efeito difusivo na esfera. A difusividade na partícula pode ser afetada pela estrutura do polímero tais como tamanho dos poros, flexibilidade da cadeia polimérica e densidade, e estes fatores são dependentes da concentração do polímero e do agente reticulante. O aumento da concentração de Ca⁺² na solução reticuladora tende a

diminuir o grau de intumescimento da matriz polimérica, refletindo no menor aumento de volume (TURBIANI et al., 2011).

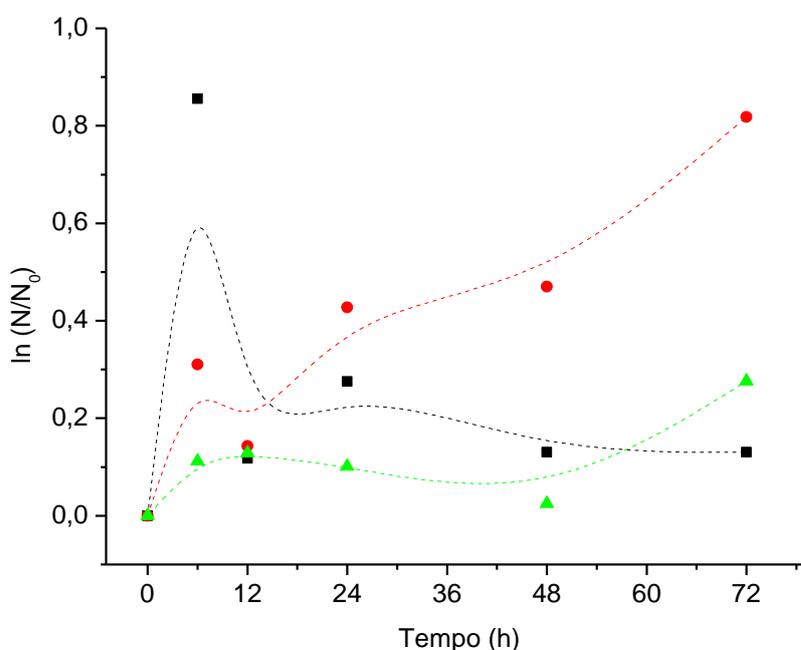
Figura 22. Diâmetro normalizado das esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em vinhaça centrifugada



O crescimento celular interno às esferas biopoliméricas apresentou um acréscimo, sendo que para esferas reticuladas com 5% de CaCl_2 ocorre uma queda em 12 horas com posterior crescimento (Figura 23). Para o ensaio realizado com esferas reticuladas com 2% de CaCl_2 apresenta-se um máximo de crescimento em 6 horas com subsequente decréscimo e se mantém praticamente constante. Isso pode ser relacionado ao menor diâmetro da esfera e possível desgaste. No ensaio feito com esferas reticuladas com 10% de CaCl_2 é observado que houve um crescimento em 12 horas e posterior morte celular, provavelmente ocasionado por uma limitação na difusão de nutrientes na esfera. No entanto, em 72 horas observa-se o ponto máximo deste perfil, porém esta curva apresenta-se com menor concentração celular quando comparado aos outros tratamentos. A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) na vinhaça centrifugada para as esferas de alginato 2% foi da ordem de $0,001 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 693$ horas), $0,009 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 77$ horas) e $0,002 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 346$ horas), para 2, 5 e 10% de cloreto de cálcio, respectivamente. Porém, se considerarmos os primeiros instantes, ocorre um elevado crescimento nas partículas de alginato (2%) de quase 0,9 ciclo-log,

concomitante ao período de maior consumo de carbono e nitrogênio (Figuras 24 e 25). De acordo com a Figura 22, percebe-se que os diâmetros das esferas reticuladas com 2% de CaCl_2 apresentaram perfil decrescente, com uma possível desestruturação física, que pode levar a esta variação do crescimento após as primeiras horas. De qualquer forma, os valores são inferiores aos obtidos por Perez-Garcia et al. (2010) com *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato. Porém, cabe ressaltar que estes autores realizaram os cultivos com águas residuárias sintéticas, ajustando as concentrações de nitrogênio e fósforo a valores recorrentes em efluentes municipais.

Figura 23. Concentração celular durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada



Em relação aos perfis de carbono e nitrogênio na vinhaça ao longo do cultivo pode-se verificar que estes foram semelhantes para os experimentos com as diferentes concentrações de reticulante usadas para a produção das matrizes de alginato. Conforme o esperado, as concentrações foram reduzidas (em torno de 42, 49 e 48% de carbono e 34, 35 e 34% de nitrogênio, para 2, 5 e 10% de cloreto de cálcio, respectivamente) ao longo dos cultivos, ou seja, houve consumo destes compostos pela microalga, evidenciado pela similaridade das curvas. Apesar do crescimento microbiano ter sido superior no experimento com as esferas reticuladas com 5% de cálcio, esta similaridade dos perfis de carbono e nitrogênio podem indicar

que também houve incorporação destes compostos nas matrizes poliméricas, não havendo necessariamente o consumo e consequente geração de biomassa. Esta seria uma situação favorável em termos de tratamento biológico de águas residuárias, ou seja, remoção de carbono e nitrogênio sem geração considerável de biomassa.

Figura 24. Perfis de carbono orgânico total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada.

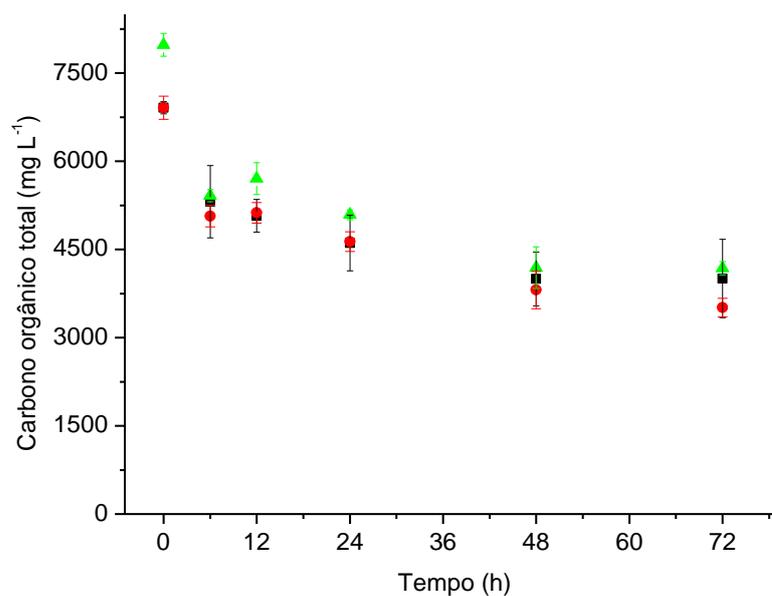
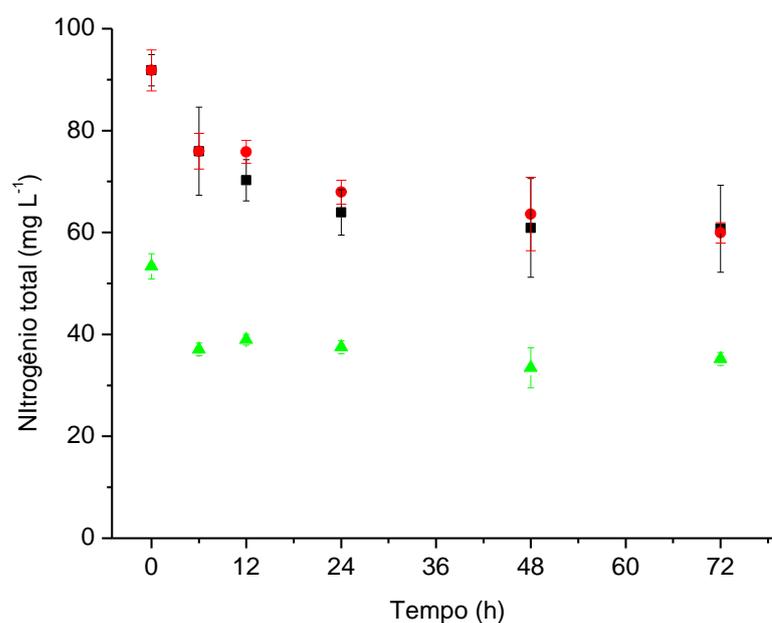


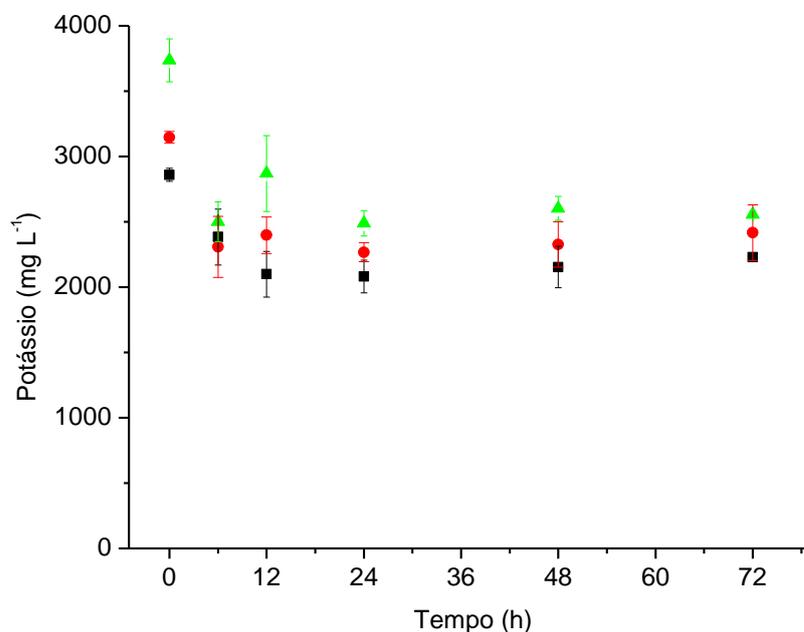
Figura 25. Perfis de nitrogênio total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada



A concentração de potássio (Figura 26) apresentou uma redução de aproximadamente 22%, quando o cultivo foi realizado com esferas reticuladas com cloreto de cálcio 2%, 23,2% com 5% do agente reticulante e 31,6% com 10% de cloreto de cálcio. A literatura relata que alguns biopolímeros são capazes de absorver nutrientes podendo assim aumentar a eficiência de células imobilizadas usadas no tratamento de efluentes (MALICK, RAY, 1994). A estrutura do gel de alginato é governada pela cinética de formação do gel que por sua vez afeta a difusão de solutos nas esferas. Durante a formação das esferas, a difusão dos íons Ca^{+2} dentro da gota e a auto-difusão das moléculas de alginato em direção a uma zona de gelificação induzida pelo cálcio pode acarretar em uma alta concentração de alginato na interface Ca-alginato (SKJÅK-BRÆK et al., 1989; CHAN et al., 2006; PAQUES et al., 2014). Assim, no banho de reticulação com maior concentração de cálcio (10%), uma interface com maior concentração de alginato pode ter sido formada, aumentando a interação da partícula com o potássio.

Um ligeiro aumento na concentração de potássio é observado após 24 h de cultivo, podendo indicar que após este período a estrutura polimérica apresente desestabilização, que pode ser confirmada pela redução do diâmetro das esferas a partir deste tempo, sobretudo para as esferas reticuladas com 2% de CaCl_2 . A literatura não apresenta discussões a respeito do efeito tecnológico da reticulação na difusão de substratos para partículas com células imobilizadas, com consequente influência na remoção de poluentes a partir de águas residuárias .

Figura 26. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl₂ (■), 5% de CaCl₂ (●) e 10% de CaCl₂ (▲) em vinhaça centrifugada.



A Tabela 7 resume os resultados de remoções máximas de carbono, nitrogênio e potássio nos seus respectivos tempos de ocorrência.

Tabela 7. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça centrifugada por *D. subspicatus* immobilizadas em esferas de alginato 2% reticuladas com cloreto de cálcio 2, 5 e 10%

Tratamento	Parâmetro	Remoção máxima (%)	Tempo (horas)
2% CaCl ₂	TOC	42,0	48
	TN	33,8	72
	Potássio	27,2	24
5% CaCl ₂	TOC	49,0	72
	TN	34,7	72
	Potássio	27,9	24
10% CaCl ₂	TOC	47,0	72
	TN	37,3	48
	Potássio	33,4	24

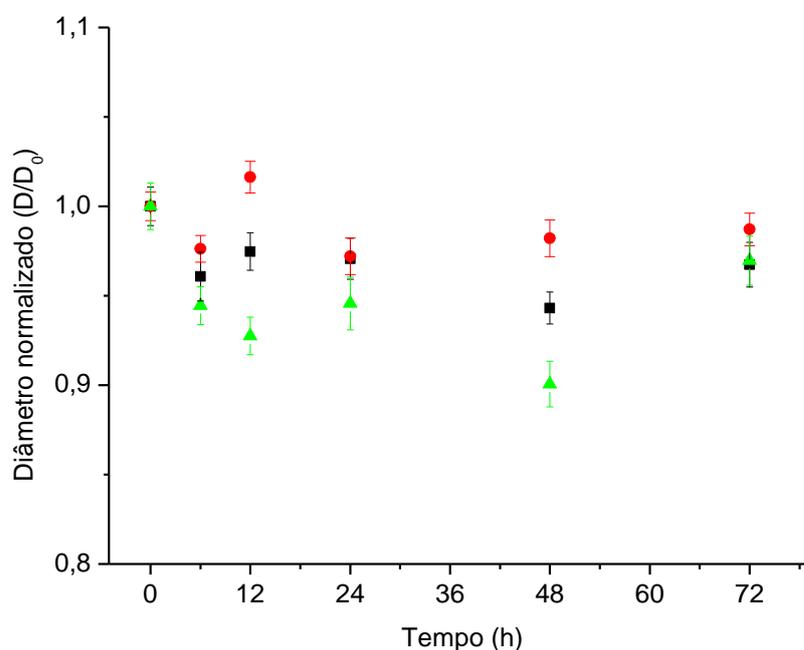
TOC = Carbono orgânico total, TN = Nitrogênio total

5.4.3. Efeito da concentração de solução reticulante para esferas de pectina

Foram realizados experimentos de cultivo da microalga imobilizada em esferas de pectina 7% reticuladas com diferentes concentrações de CaCl_2 (2, 5 e 10%), em vinhaça centrifugada, avaliando-se os perfis de diâmetro normalizado das esferas, crescimento celular da microalga imobilizada e concentrações de TOC, TN e potássio na vinhaça.

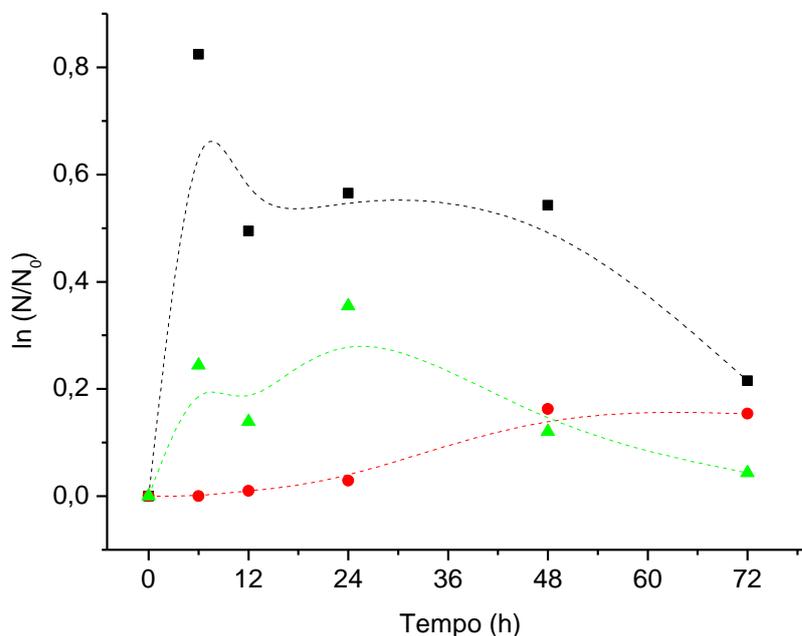
Os resultados de diâmetro normalizado das esferas ao longo do cultivo estão apresentados na Figura 27. Nota-se que os diâmetros das esferas reticuladas com 2% de CaCl_2 apresentaram linearidade durante o ensaio, apresentando pouca variação. Por outro lado, as esferas reticuladas com 5% de CaCl_2 apresentaram intumescimento em 12 h de cultivo, com diâmetro máximo evidenciado, e uma tendência de diminuição do diâmetro após 24 h. O diâmetro das esferas reticuladas com 10% de CaCl_2 apresentou um perfil levemente decrescente, obtendo um mínimo diâmetro em 48 h de cultivo e posterior acréscimo. Para a pectina obteve-se similaridade entre os perfis de diâmetro, o que pode ser explicado pela maior concentração de pectina quando comparada com os perfis de alginato. Sabe-se que a concentração polimérica está diretamente relacionada com a rigidez do gel. Além disso, o aumento da concentração de agente reticulante resulta em géis que apresentam um grau de expansão e uma variação de volume reduzidos, devido principalmente a um aumento da rigidez do gel, tornando-o menos suscetível a grandes variações (BISPO; OLIVEIRA, 2009).

Figura 27. Diâmetro normalizado das esferas de pectina 7% reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em vinhaça centrifugada.



O crescimento celular dentro das esferas de microalgas imobilizadas com pectina 7% (Figura 28) apresentou um acréscimo, sendo que para esferas reticuladas com 2% de CaCl_2 evidencia-se um ponto máximo em 6 horas com posterior decréscimo, indicando morte celular. Este ponto máximo pode ser explicado pela maior porosidade da matriz, levando a uma maior difusão de nutrientes pela esfera biopolimérica (FORERO-CUJIÑO, 2016). O ensaio realizado com esferas reticuladas com 5% de CaCl_2 apresenta um perfil discreto de crescimento, com concentração celular máxima em 48 horas com subsequente leve queda. No ensaio feito com esferas reticuladas com 10% de CaCl_2 é observado, excluindo-se as 12 horas, uma curva de crescimento típico, com adaptação, seguida de crescimento e posterior morte celular. Verifica-se que a concentração celular máxima se dá em 24 horas. A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) na vinhaça centrifugada para as esferas de pectina 7% foi da ordem de $0,001 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 693$ horas) para 2 e 10% de cloreto de cálcio, e $0,002 \text{ h}^{-1}$ ($t_g = 346$ horas) para 5% de cloreto de cálcio. Observa-se neste caso principalmente uma manutenção de uma fase de crescimento mais contínua para as partículas com 5% de CaCl_2 , as quais permaneceram com o tamanho menos inalterado, indicando uma estabilidade maior (Figura 27).

Figura 28. Concentração celular durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada



Em relação aos perfis de carbono e nitrogênio (Figura 29 e 30) na vinhaça ao longo do cultivo pode-se verificar que estes foram similares para os experimentos com as diferentes concentrações de reticulante usadas para a produção das matrizes de alginato. Conforme previsto, as concentrações foram reduzidas (em torno de 32, 39 e 41% de carbono e 11, 24 e 34% de nitrogênio, para 2, 5 e 10% de cloreto de cálcio, respectivamente) ao longo dos cultivos, ou seja, houve consumo destes compostos pela microalga, evidenciado pela semelhança das curvas. Vale ressaltar que o ensaio realizado com esferas reticuladas com cloreto de cálcio 2%, apresentou uma redução máxima de nitrogênio, aproximadamente 21%, em 12 horas de cultivo.

Figura 29. Carbono orgânico total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada

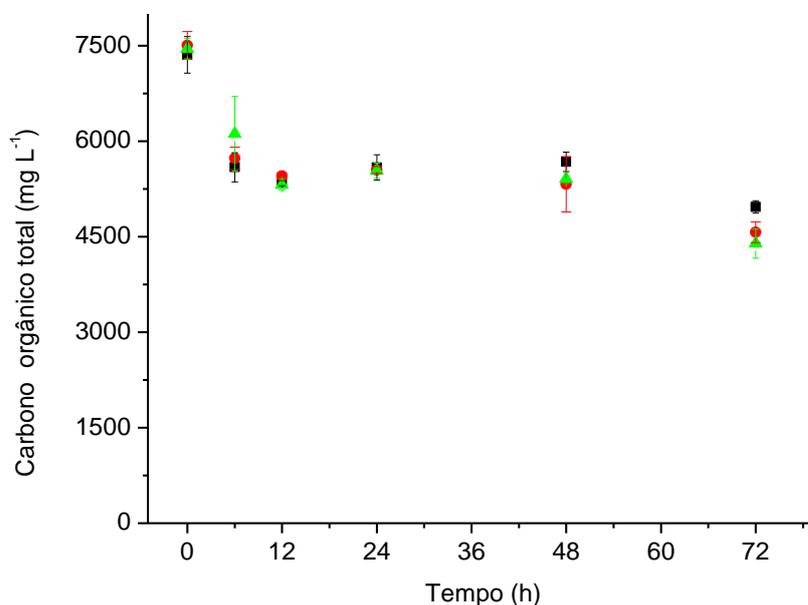
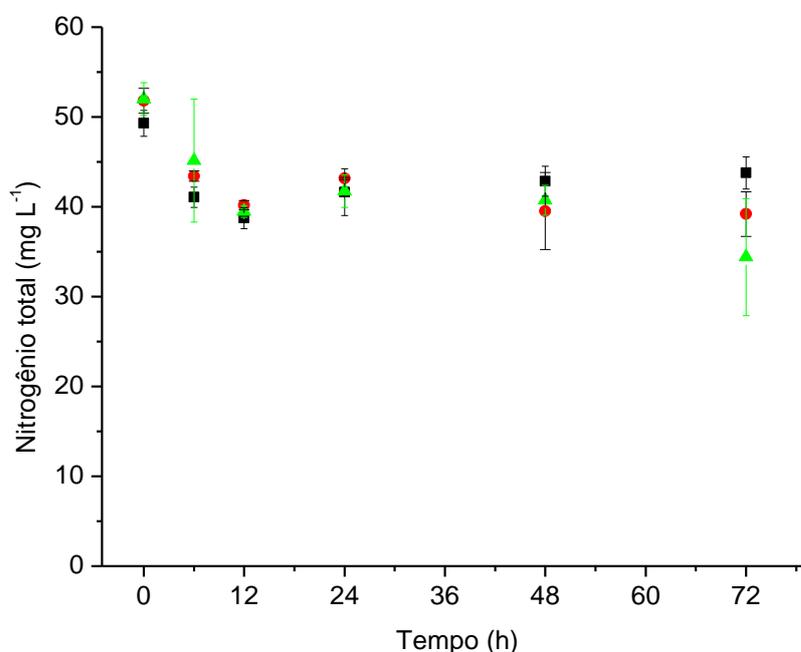


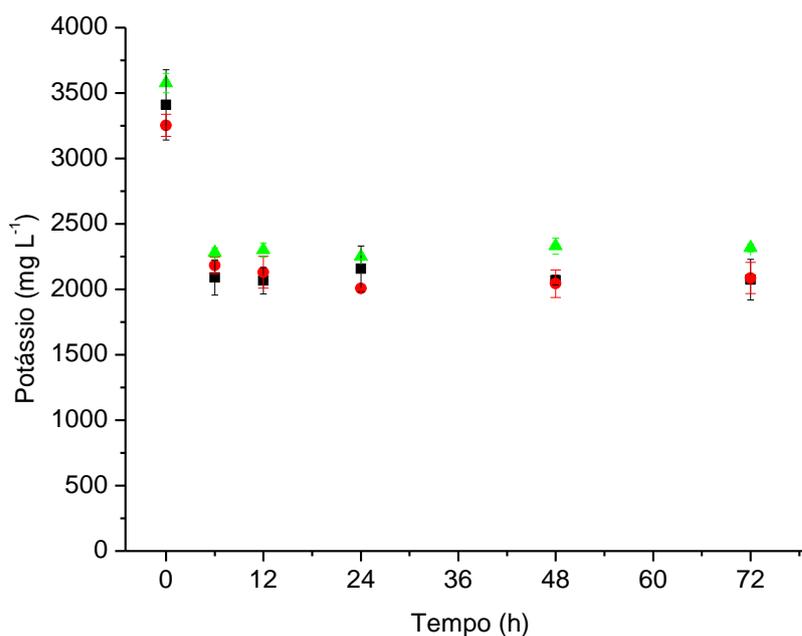
Figura 30. Nitrogênio total durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* immobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada



A concentração de potássio (Figura 31) apresentou uma redução de aproximadamente 39,2%, quando o cultivo foi realizado com esferas reticuladas com cloreto de cálcio 2%, 35,8% quando o agente reticulante foi de 5% e 35,2% quando o

cloreto de cálcio foi de 10%. A maior concentração de biopolímero nas esferas de pectina, em relação às esferas de alginato, pode explicar os maiores percentuais de remoção de potássio da vinhaça, pois neste caso, há um maior número de sítios de ligação disponíveis para interação com o potássio. Nota-se também que, para a pectina, a concentração de reticulante utilizada no processo de formação das esferas teve menor influência nos teores de potássio, em comparação com o alginato. O perfil de potássio apresenta uma remoção de mais de 30% nas primeiras 6 horas, permanecendo praticamente constante após este período. Isto sugere que há um equilíbrio entre o potássio interno e externo às partículas e mesmo tempos de bateladas superiores podem não levar a remoções maiores, além do risco de contaminação bacteriana.

Figura 31. Perfis de potássio durante o cultivo da microalga *D. subspicatus* imobilizada em esferas de pectina (7%) reticuladas com 2% de CaCl_2 (■), 5% de CaCl_2 (●) e 10% de CaCl_2 (▲) em vinhaça centrifugada.



Quando se compara todos os ensaios realizados, visando a maior remoção de nutrientes e matéria orgânica da vinhaça, observa-se que as esferas de pectinas reticuladas com cloreto de cálcio 5 e 10%, obtiveram remoções superiores.

A Tabela 8 resume os resultados de remoções máximas de carbono, nitrogênio e potássio nos seus respectivos tempos de ocorrência.

Tabela 8. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça centrifugada por *D. subspicatus* imobilizadas em esferas de pectina 7% reticuladas com cloreto de cálcio 2, 5 e 10%

Tratamento	Parâmetro	Remoção máxima (%)	Tempo (horas)
2% CaCl ₂	TOC	32,4	72
	TN	21,4	12
	Potássio	39,4	12
5% CaCl ₂	TOC	39,1	72
	TN	24,0	72
	Potássio	38,3	24
10% CaCl ₂	TOC	41,0	72
	TN	34,0	72
	Potássio	37,0	24

TOC = Carbono orgânico total, TN = Nitrogênio total

Para fins de aplicação, recomenda-se o uso do agente reticulante com a concentração de 5%, devido à economia de reagentes e assim, redução dos custos. Além do mais, a pectina possui melhor custo-benefício comparado ao alginato, e assim, favorece o seu uso em aplicações industriais. Vale ressaltar que uma das maiores produtoras de pectina cítrica do mundo está situada próximo ao CCA/UFSCar, na cidade de Limeira/SP. Este biopolímero é produzido a partir de subprodutos da indústria cítrica, tornando a pectina ainda mais acessível.

Nota-se que o ensaio realizado com microalga imobilizada em pectina 7% reticulada com CaCl₂ 2%, alcançou uma remoção de potássio de 39,2% em 72 horas, sendo o melhor tratamento para a remoção deste nutriente inorgânico, que quando acumulado no solo, pode acarretar lixiviação (BEBÉ et al., 2009).

5.5. Avaliação do perfil de redução de potássio utilizando esferas controle

Considerando que o potássio é um dos elementos mais importantes na constituição da vinhaça, sendo de difícil remoção biológica, foram conduzidos ensaios com o intuito de verificar o potencial de incorporação deste nas matrizes poliméricas sem microalga. Sendo assim, realizou-se um experimento simulando as condições de cultivo da microalga utilizando-se apenas as esferas de alginato 2% e de pectina 7%, reticuladas com CaCl₂ 2, 5 e 10%.

Os resultados obtidos para a concentração de potássio na vinhaça do ensaio em alginato estão apresentados abaixo, onde são apresentados também os dados de concentração de potássio durante os cultivos com a microalga, para fins de comparação. Os perfis de remoção de potássio de alginato 2% reticuladas com 2% de CaCl_2 são similares (Figura 32). Observa-se que, em sua maioria, a taxa de remoção de potássio foi superior quando a microalga estava presente, exceto para 72 h da curva das esferas de alginato com 5% de CaCl_2 (Figura 33) e para o tempo de 12 horas na curva com 10% de CaCl_2 (Figura 34). Para o tratamento com as esferas de alginato sem microalga, notou-se que fora as exceções, não houve diferença significativa na taxa de remoção do potássio comparando-se os diferentes níveis de reticulação (2, 5 e 10%). É importante ressaltar que na Figura 34 possa ter havido uma restrição na difusão de nutrientes nas esferas reticuladas com 10% de CaCl_2 , e isso tenha feito com que a remoção com e sem a microalga fosse similar.

Figura 32. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl_2 2%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada.

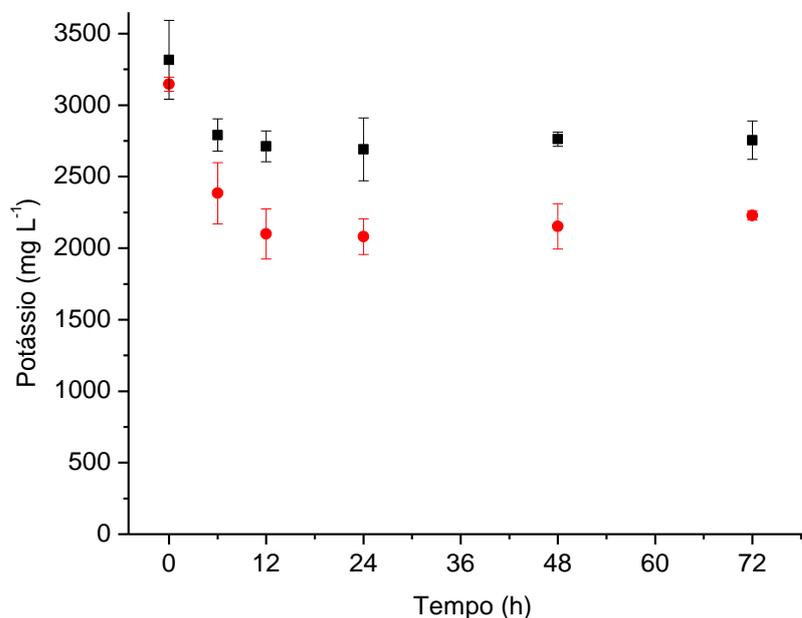


Figura 33. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl_2 5%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada

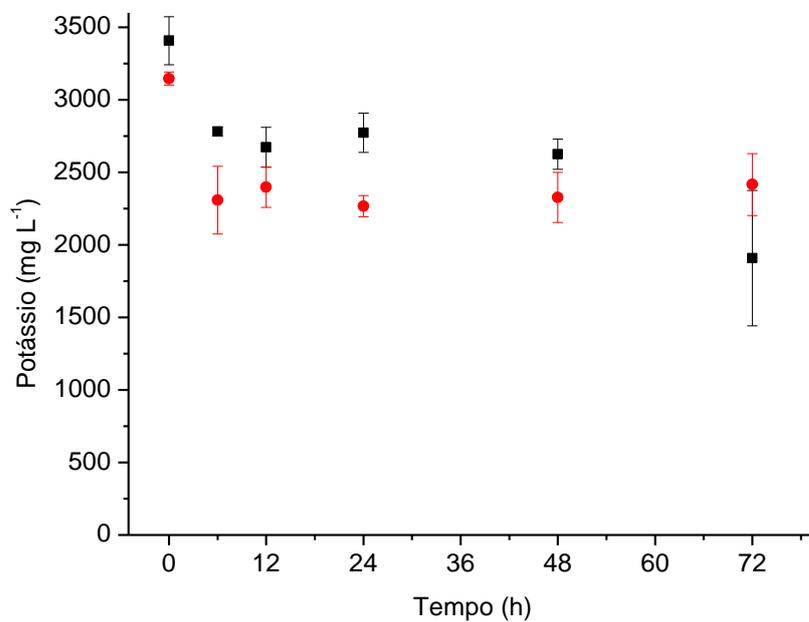
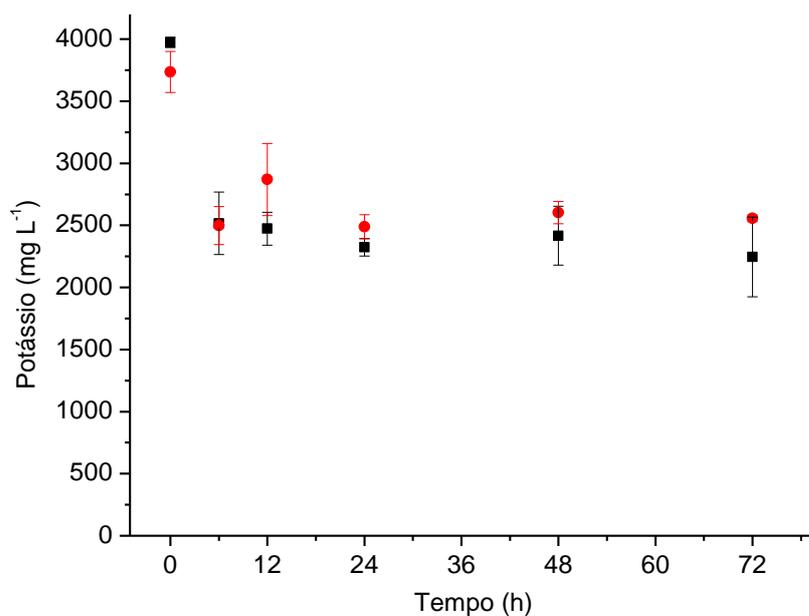


Figura 34. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de alginato 2% reticuladas com CaCl_2 10%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada



A Tabela 9 resume os resultados de remoções máximas de potássio nos seus respectivos tempos de ocorrência, para esferas de alginato.

Tabela 9. Remoção máxima de potássio em vinhaça com esferas de alginato 2% com e sem microalga

Esferas	CaCl ₂	Remoção máxima de potássio (%)	Tempo (horas)
Sem microalga	2%	18,9	24
	5%	44,0	72
	10%	43,4	72
Com microalga	2%	33,8	24
	5%	27,9	24
	10%	33,4	24

Com relação aos perfis de potássio para as partículas de pectina, nota-se a similaridade nos perfis, onde se observa que a curva dos ensaios sem microalgas encontra-se discretamente abaixo devido a menor concentração inicial de potássio nos cultivos com microalgas imobilizadas. É relevante citar que provavelmente a incorporação de potássio pode ter ocorrido somente pela pectina, como se pode observar nas Figuras 35 a 37. Na Figura 36, observam-se remoções máximas maiores do que nas outras concentrações de agente reticulante.

Figura 35. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl₂ 2%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada

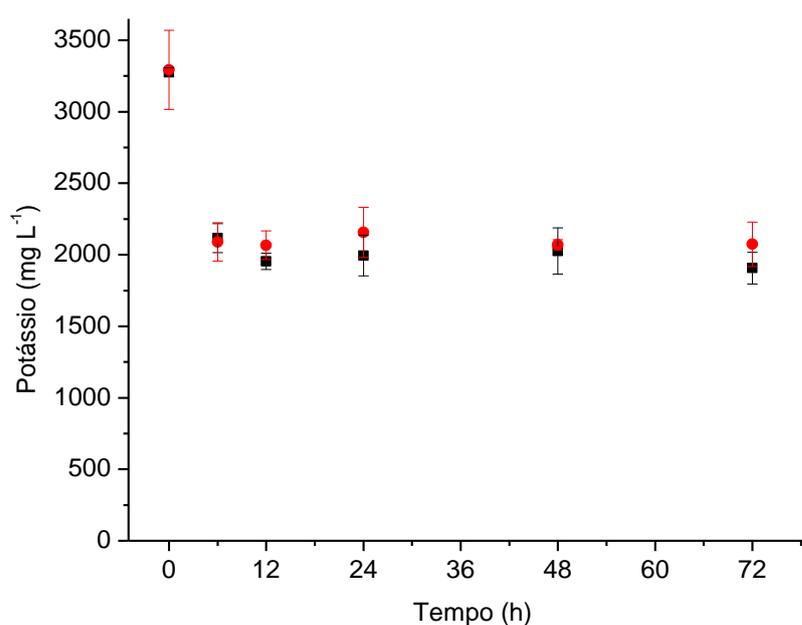


Figura 36. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl_2 5%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada

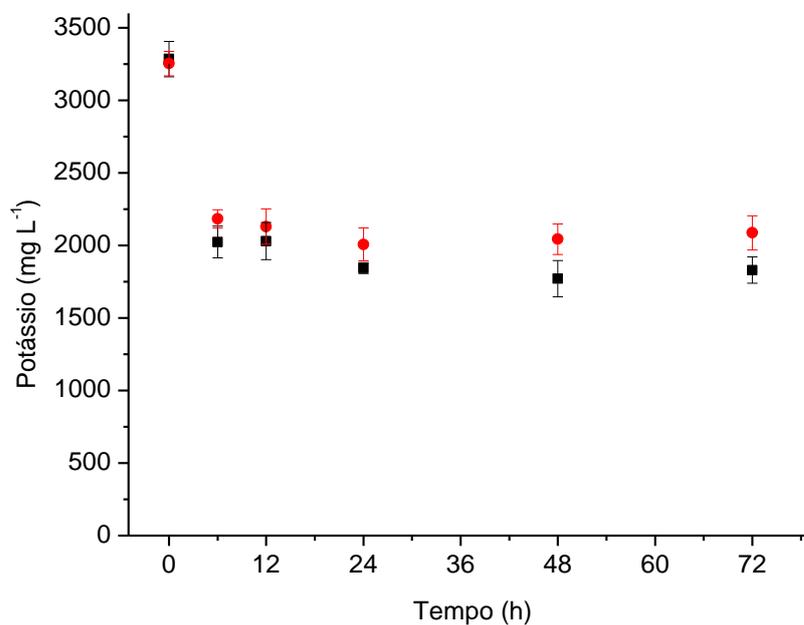
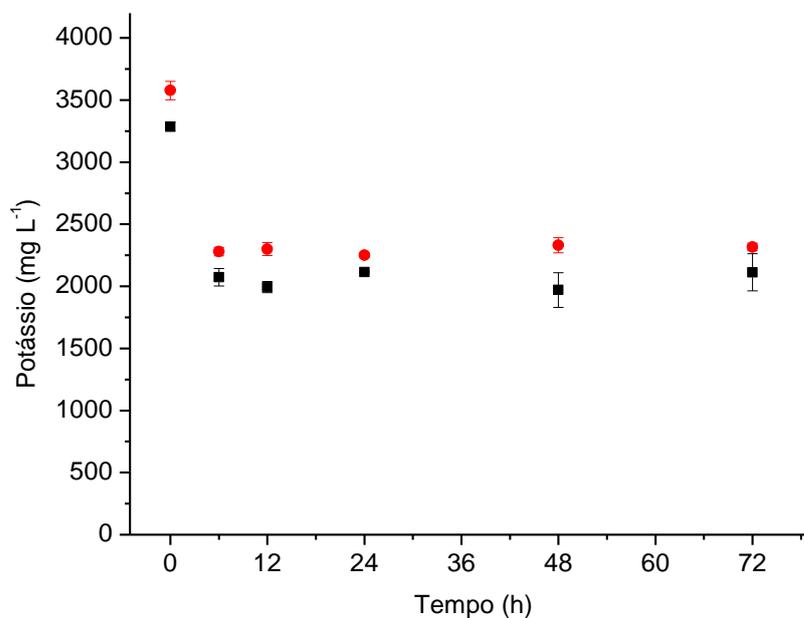


Figura 37. Perfis de concentração de potássio na vinhaça com esferas de pectina 7% reticuladas com CaCl_2 10%, sem (■) e com (●) microalga imobilizada



A Tabela 10 resume os resultados de remoções máximas de potássio nos seus respectivos tempos de ocorrência, para esferas de pectina.

Tabela 10. Remoção máxima de potássio em vinhaça com esferas de pectina 7% com e sem microalga

Esferas	CaCl ₂	Remoção máxima de potássio (%)	Tempo (horas)
Sem microalga	2%	41,8	72
	5%	46,1	48
	10%	40,0	48
Com microalga	2%	37,2	12
	5%	38,3	24
	10%	37,1	24

Estudos mostraram que as esferas produzidas com pectina são menos sensíveis aos íons que desestabilizam as esferas de alginato (STRAND et al., 2000; VOO et al., 2011). Assim, a pectina possui uma vantagem interessante com relação ao alginato, para a utilização em imobilização celular. Com o intuito de favorecer a estabilidade das esferas biopoliméricas, a resistência mecânica deve ser melhorada, que por sua vez é influenciada pelo tamanho e forma da partícula (WONG et al., 2011).

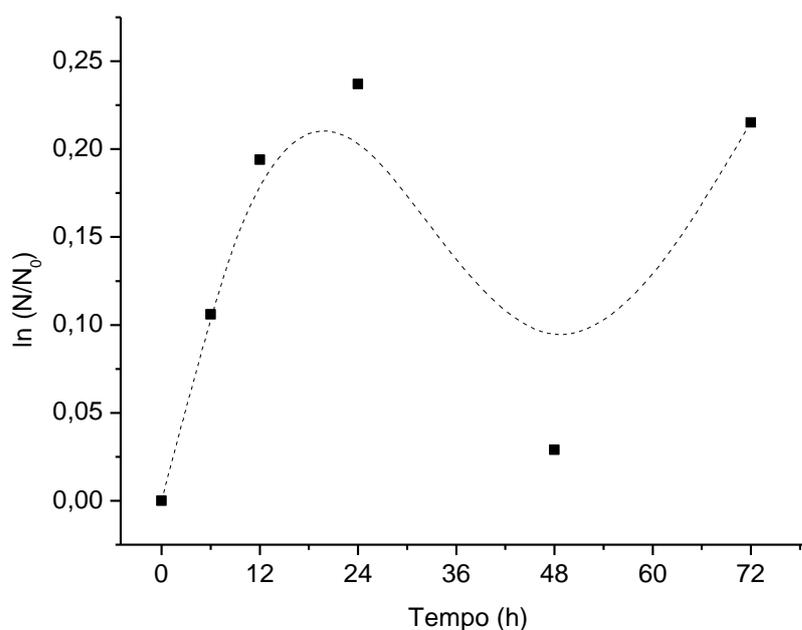
5.6. Ensaio de cultivo com as microalgas livres

O cultivo heterotrófico de *D. subspicatus* na forma livre em vinhaça centrifugada foi realizado durante 72 horas, em condições similares aos cultivos com as células imobilizadas de forma a comparar os dois modelos de crescimento.

Conforme a curva semi-logarítmica (Figura 38), nota-se que a concentração celular é crescente, porém após 48 horas de cultivo, ocorre uma leve queda, indicando possíveis contaminações e/ou competição com outros micro-organismos. Apesar de o fator contaminação ser revelado como uma das grandes desvantagens do cultivo heterotrófico de microalgas, geralmente o seu efeito no cultivo não é quantificado em termos de cinética de crescimento (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Em 72 horas, pode-se observar a recuperação de crescimento da microalga, e deve-se considerar que a vinhaça apresenta mais do que uma fonte de carbono assimilável pelas microalgas heterotróficas, como a glicose e o glicerol, sendo assim, é possível que tenha ocorrido o fenômeno diauxia, onde o micro-organismo tem preferência por um substrato,

ocorrendo seu consumo prioritário, antes de iniciar o consumo de outro substrato presente no meio, cuja afinidade com o micro-organismo é menor (FONTE, 2016).

Figura 38. Curva de crescimento semi-logarítmica para cultivo de células livres de *D. subspicatus* livre em vinhaça centrifugada



Deste modo, a partir de duas fases de crescimento estimam-se duas velocidades específicas de crescimento máximas em torno de $0,01 \text{ h}^{-1}$, entre 0 – 24 horas e 48 – 72 horas, com tempo de geração por volta de 66 horas. Este efeito de mais de uma fonte de carbono foi melhor percebido no ensaio com células livres, uma vez que a interação dos substratos com os micro-organismos se dá de forma direta, sem maiores resistências à transferência de massa. Os resultados indicam melhor crescimento das células de *D. subspicatus* livres em vinhaça do que imobilizadas, o que é esperado devido às questões de limitação difusional já apontadas no trabalho.

Como consequência do crescimento, os perfis de carbono (Figura 39) e nitrogênio (Figura 40) apresentaram-se decrescentes, com remoções de 45% e 49%, respectivamente, em 72 horas. Quanto ao nitrogênio total, verificou-se que a maior remoção foi de 49,2% em 72 horas, com perfil de concentração decrescente ao longo do cultivo.

Figura 39. Carbono orgânico total na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de *D. subspicatus*

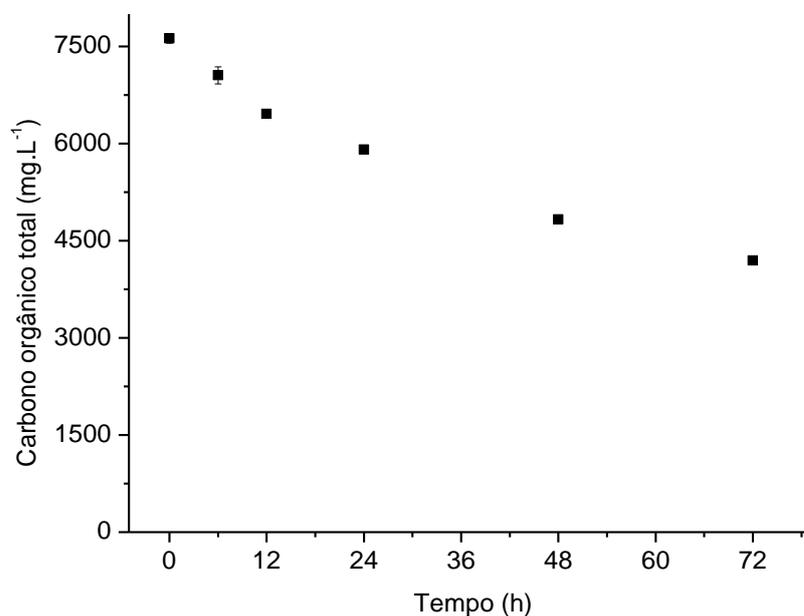
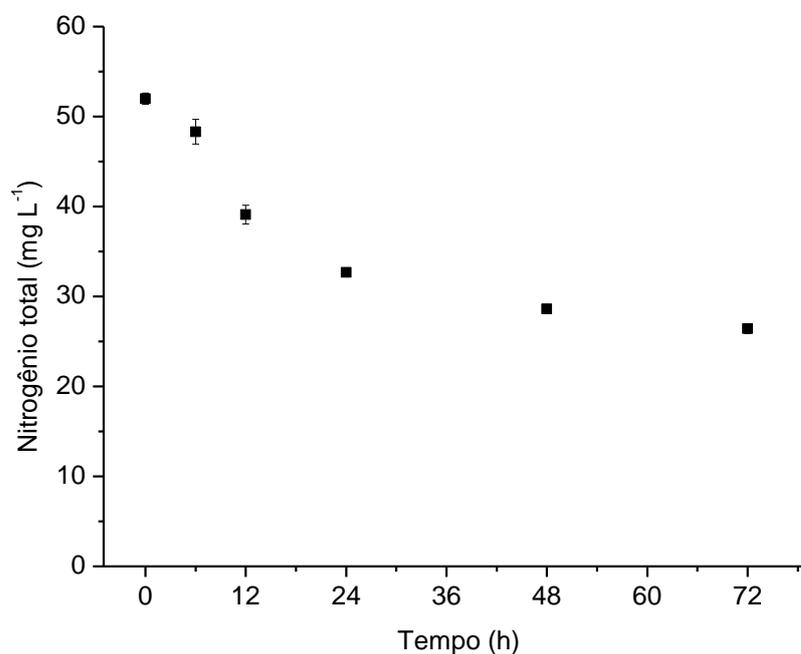


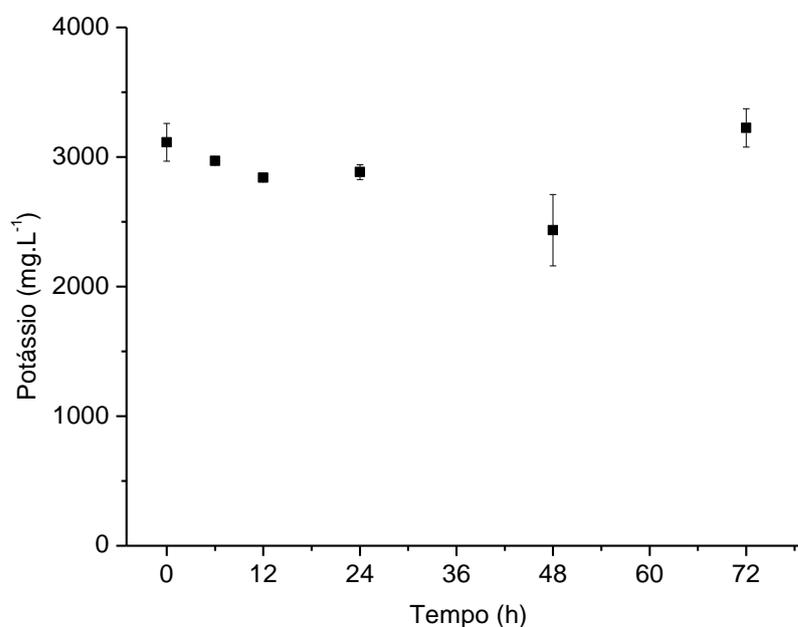
Figura 40. Nitrogênio total na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de *D. subspicatus*



A remoção de potássio máxima foi de 21,8% em 48 horas, sendo que posteriormente evidenciou-se um aumento na concentração de potássio e maior concentração celular, representado na Figura 41. Esse resultado é relevante e indica que o polímero realmente contribui com a remoção de potássio da vinhaça, visto que nos ensaios com a microalga imobilizada, as remoções foram na faixa dos 30%,

atingindo a máxima de 39,4%, no ensaio de pectina 7% e cloreto de cálcio 2%. Sendo assim, os resultados sugerem que ocorre principalmente uma incorporação do potássio em função do equilíbrio químico do que o próprio consumo metabólico deste nutriente pelas células. De acordo com Berry et al. (2003), foi verificado um acúmulo de potássio pelas cianobactérias *Anabaena* e *Anacystis*, em cultivos fotoautotróficos a 25°C com luminosidades de até 15 nmol/m².s. Segundo esses autores, os mecanismos de transporte de potássio ocorrem de forma diferente em cianobactérias mais tolerantes a sais (halofílicas) em ambientes onde a disponibilidade de potássio é menor, sendo exigido o transporte ativo. Considerando a quantidade de potássio presente na vinhaça, possivelmente ocorre um transporte passivo deste nutriente, via gradiente de concentração. Apesar do transporte e acúmulo de íons apresentarem uma importância fundamental no cultivo de cianobactérias e microalgas, inclusive com potenciais aplicações na área de tratamento de efluentes, são raros os estudos que evidenciam estes aspectos (REED et al., 1981; ALAHARI et al., 2001; BERRY et al., 2003).

Figura 41. Potássio na vinhaça centrifugada durante o cultivo das células livres de *D. subspicatus*



Sabe-se que a absorção é o principal mecanismo de remoção de nutrientes pelas microalgas, existindo uma relação direta entre a velocidade específica de

crescimento dos micro-organismos e a remoção de nutrientes, como no caso do potássio (XIN et al., 2010). Outros nutrientes como nitrogênio e fósforo podem ser utilizados para o crescimento celular e removidos de forma eficiente se as águas residuárias apresentarem uma relação N/P apropriada.

Nesse sentido, com relação ao consumo de carbono e nitrogênio, as microalgas livres apresentam maior consumo quando comparada com a imobilizada, possivelmente devido ao maior crescimento e menor restrição difusional do que nas partículas biopoliméricas.

A Tabela 11 resume os resultados de remoções máximas de carbono, nitrogênio e potássio nos seus respectivos tempos de ocorrência, para as microalgas livres.

Tabela 11. Remoção máxima de carbono, nitrogênio e potássio em vinhaça do cultivo de microalgas livres

Parâmetro	Remoção máxima (%)	Tempo (horas)
Carbono orgânico total	45,0	72
Nitrogênio total	49,2	72
Potássio	21,8	48

6. CONCLUSÕES

Nas diferentes condições experimentais, foi possível concluir que:

- Com relação à solução polimérica de alginato, a concentração de 2% (m/v) mostrou-se mais adequada para a produção das esferas, obtendo-se elevada eficiência de imobilização da microalga. Maiores concentrações de alginato, devido à elevada viscosidade, inviabilizam o processo de gotejamento da solução no reticulante para formação das esferas;
- Com relação à solução polimérica de pectina, a concentração de 7% (m/v) mostrou-se mais adequada para a produção das esferas, com alta eficiência de imobilização da microalga. Concentrações de pectina menores do que 5% não formaram partículas esféricas e estáveis;
- Comparando-se as esferas de alginato e pectina nas concentrações de biopolímeros selecionadas para os ensaios de cultivo da microalga imobilizada em vinhaça, observou-se que a pectina (7%) produziu esferas com maior diâmetro e maior resistência mecânica que as de alginato (2%);
- A incorporação da microalga *D. subspicatus* não alterou significativamente as características das esferas, em relação às esferas controle (sem microalga);
- A microalga *D. subspicatus* imobilizada apresentou crescimento celular em vinhaça, com tempos de geração de 77 horas e 346 horas, em esferas de alginato e pectina, respectivamente;

- As microalgas imobilizadas apresentaram capacidade de assimilação de componentes disponíveis na vinhaça, tais como carbono, nitrogênio e potássio;
- A maior remoção de carbono orgânico total da vinhaça ocorreu no cultivo de microalgas imobilizadas em alginato 2% reticuladas com cloreto de cálcio 5%, em vinhaça centrifugada;
- A maior remoção de nitrogênio total da vinhaça ocorreu no cultivo de microalgas livres em vinhaça centrifugada;
- A maior remoção de potássio da vinhaça ocorreu no cultivo de microalgas imobilizadas em pectina 7% reticuladas com cloreto de cálcio 5%, em vinhaça centrifugada;
- Pode-se afirmar que é viável o cultivo heterotrófico de *D. subspicatus* na forma livre e imobilizada, sendo tecnologicamente mais interessante que a vinhaça seja previamente centrifugada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da redução do diâmetro da agulha utilizada no gotejamento nas características das esferas;
- Estudo do recobrimento das esferas de alginato e pectina com um biopolímero catiônico, ex. quitosana;
- Avaliação da remoção de fósforo da vinhaça por *Desmodesmus subspicatus* imobilizada nas condições experimentais selecionadas;
- Avaliação do potencial de utilização das microalgas imobilizadas após o cultivo em vinhaça como fertilizante.

8. LITERATURA CITADA

- ALAHARI, A.; BALLAL, A.; APTE, S.K. Regulation of potassium-dependent Kdp-ATPase expression in the nitrogen-fixing cyanobacteria *Anabaena torulosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5778 – 5781, 2001.
- AL-HAJRY, H. A. et al. Electrostatic encapsulation and growth of plant cell cultures in alginate. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 4, 768-774, 1999.
- AN, S.S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons, **Plant Biology**, n. 1, p. 418-428, 1999.
- BASTOS, R. G. et al. **Efeito da razão carbono-nitrogênio no cultivo de *Desmodemus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar**. In: XX Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 2015, Fortaleza.
- BEBÉ, F. V. et al. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 6, p.781–787, 2009.

- BEGIN, A.; BEAULIEU, G. J.; CASTAIGNE, F. Whey fermentation by *Propionibacterium shermani* immobilized in different gels. **Michwissenschaff**, v. 47, p.411- 415, 1992.
- BERRY, S. et al. Potassium uptake in the cellular cyanobacteria *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 mainly depends on a ktr-like system encoded by *slr1509 (ntpJ)*. **FEBS Letters**, v. 548, p. 53-58, 2003.
- BISPO, V. M.; OLIVEIRA, E. D. **Comportamento de expansão de géis derivados de éteres celulose**. In: X Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009, Foz do Iguaçu.
- BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica Nägeli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.
- BRITO, G. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 6.2, p. 127-139, 2011.
- BUGARSKI, B. et al. Electrostatic droplet generation: investigation of mechanism of polymer droplet formation. **AIChE Journal**, v. 40, n. 6, p. 1026-1031, 1994.
- CARDOSO, S. M.; COIMBRA, M. A.; SILVA, J. A. Temperature dependence of the formation and melting of pectin–Ca²⁺ networks: a rheological study. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 6, p. 801-807, 2003.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). **Norma Técnica P4.231**. Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://bit.ly/2BewXmK>> Acesso em: 16/01/2018.
- CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 176–187, 2006.
- CHEVALIER P, DE LA NOÛE, J. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, p. 621–624, 1985.

- CHOI, B. Y. et al. Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: effects of CO₂ gas-forming agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 239, n. 1-2, p. 81-91, 2002.
- CHRISTOFOLETTI, C.A. et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, p. 2752-2761, 2013.
- CLARK, A.; ROSS-MURPHY, S.B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**. v. 83, p. 115-123, 1987.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar safra 2017/18**, v. 4 , n. 3 - Terceiro Levantamento, Brasília, p.1-77, 2017. Disponível em: <<http://bit.ly/2sIFq4P>> Acesso em: 28/01/2018.
- COUTO, S. R. et al. Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packedbed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 23, n. 3, p. 287-293, 2000.
- COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160. 2007.
- CP KELCO. **CP Kelco Pectin**. Disponível em: <<https://www.cpkelco.com/products/pectin/>> Acesso em: 02/10/2017.
- CRUZ, I. et al. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9847–9858, 2013.
- DA SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.1, p.38-43, 2014.
- DA SILVA, et al. Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical

- CO₂. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p.573-579, 2017.
- DE-BASHAN L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.
- DE MATTOS, L. F. A. **Tratamento físico-químico e cultivo de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar**. 2014. 149 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2014.
- DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus sp.* **Desalination and Water Treatment**, v. 57, p. 9465-9473, 2015.
- DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006.
- DIAS, J. C.; REZENDE, R. P.; LINARDI, V. R. Biodegradation of acetronile by cells of *Candida guilliermondii* UFMG-Y65 immobilized in alginate, k-carrageenan and citric pectin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 61-66, 2000.
- DONATI, I. et al. New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium alginates gels. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1031-1040, 2005.
- DOS SANTOS, V. A. et al. Relevance of rheological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 517–529, 1997.
- DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 47-55, 1997.
- DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. 2005. Alginates from algae. IN: DE BAETS,S.; VANDAMME, E.J.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers**, v. 6, Wiley-VCH, Weinheim, p. 215–244, 2002.
- FILHO, R. R. et al. Immobilization of lipase in pectin extracted from lobeira fruit (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.1, n.1, p. 9-14, 2012.

- FONTE, J. C. **Efeito da razão carbono: nitrogênio no cultivo heterotrófico de cianobactérias unicelulares e filamentosas em vinhaça de cana-de-açúcar.** 2016. 75 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2016.
- FORERO-CUJIÑO, M. A. et al. Immobilization of microalgae *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) and *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) in calcium alginate beads. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 437-442, 2016.
- FRANCISCO, G. A. **Biodegradação da vinhaça resíduo da produção de etanol.** 2008. 40 p. Monografia (Bacharel em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.
- FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar.** Série Engenharia Agrícola, v. 1. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203 p.
- GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.
- GIESE, E. C. Potencial biotecnológico do uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. **Série Tecnologia Ambiental**, v. 81, p. 47, 2015.
- GILIO, L.; CASTRO, N. R. Avaliação de aspectos limitantes ao crescimento do etanol e o setor sucroenergético no Brasil. **Revista Eletrônica de Energia**, v. 6, n. 1, p. 58-74, 2016.
- GONÇALVES, L. R. B; GIORDANO, R.L.C.; GIORDANO, R.C. **Hidrólise de maltose por amiloglicose imobilizada em sílica envolvida por gel de pectina.** In: XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, p.1496-1501, 1996, Rio de Janeiro.

- GRANATO, E. F. **Geração de energia através da biodigestão anaeróbica da vinhaça**. 2003. 124 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2003.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.
- HELBEL, A. F.; ANDRADE, L. R. **Caracterização e tratamento de efluentes gerados por destilaria de álcool**. Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR. Departamento de Engenharia Ambiental, Ji-Paraná, 2009.
- HERNANDEZ, J-P.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 190-198, 2006.
- HIORTH, M. et al. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 175-181, 2003.
- HOEK, C. et al. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, p. 623, 1995.
- HOURDET, D; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides II. Conformation and molecular size of high galacturonic acid content isolated pectin chains. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, n. 2, p. 113-135, 1991.
- JI, M.K. et al. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 142–148, 2013.
- JIMENEZ-PEREZ, M.V. et al. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 392–398, 2004.

- KNEZEVIC, Z. et al. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochemistry**, v.38, p. 313-318, 2002.
- LAU, P.S., TAM, N.F.Y., WONG, Y.S. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. **Environmental Technology**, v. 18, p. 945–951, 1997.
- LEE, B. B. et al. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion Dripping. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, n. 10, p. 1627–1642, 2013.
- LEE, B. B. et al. Calcium pectinate beads formation: shape and size analysis. **Journal of Engineering and Technological Sciences**, v. 46, n. 1, p. 78-92, 2014.
- LIAKOS, I. et al. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, p. 137-145, 2013.
- LIU, X. D. et al. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 6, p. 775-782, 2002.
- LIU, L. et al. Pectin in controlled drug delivery – a review. **Cellulose**, v. 14, n. 1, p. 15-24, 2007.
- LU, Y. et al. Diffusion of nicotinamide adenine dinucleotide in calcium alginate hydrogel beads doped with carbon and silica nanotubes. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 50, p. 1319-1323, 2005.
- LUONG, J. H. Cell immobilization in k-carrageenan for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 1652-1661, 1985.
- MACEDO, R.V.T. **Estudo da utilização do vinhoto como substrato para o crescimento de leveduras e bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre**. 1991. 151p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

- MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. **Biometals**, v. 15, p. 377–390, 2002.
- MALLICK, N.; RAI, L. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 439-443, 1994.
- MARTÍNEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 263-272, 2000.
- MARTINSEN, A. et al. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, n. 2, p. 171-193, 1991.
- MARUDOVA, M. et al. Pectin–chitosan interactions and gel formation. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 11, p. 1933-1939, 2004.
- MATA, T.M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and others applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MATOS, V. C.; BASTOS, R. G. Glucose profile on cultivation of *Aphanothece microscopica Nägeli* immobilized in calcium alginate beads. **Holos Environment**, v. 11, n. 1, p. 96, 2011.
- MAY, C. D. Pectins. In: IMESON, A. P. **Thickening and gelling agents for food**. Boston: Springer, p. 230-261, 1997.
- MONTEIRO, A. S. et al. Efeito da modificação química na solubilidade e intumescimento de microesferas à base de goma do cajueiro carboximetilada e quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 31-39, 2015.
- MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3949-3964, 2008.

- NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M.C.; RUBIO, M.C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management**, v. 20, p. 581-585, 2000.
- OLIVEIRA, H.T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b**. 1988. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.
- PAQUES, J. P. et al. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163-171, 2014.
- PEREZ-GARCIA, O. et al. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Phycology**, v. 46, n. 4, p. 800-812, 2010.
- PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v.45, p. 11-36, 2011.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.
- PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M. E. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, v. 21, p. 249-252. 1998.
- PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. IN: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial Volume 2 – Engenharia Bioquímica**, p. 355-372, 2001.
- QUONG, D.; NEUFELD, R. J. DNA protection from extracapsular nucleases, within chitosan- or poly-L-lysine-coated alginate beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 1, p. 124–134, 1998.
- REED, R.H.; ROWELL, P.; STEWART, W.D.P. Characterization of the transport of potassium ions in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* Kütz. **European Journal of Biochemistry**, v. 116, p. 323-330, 1981.

- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. **Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja**. In: 2nd International Workshop - Advances in Cleaner Production, 2009, São Paulo.
- RIAZ, A. et al. Immobilization of a thermostable α -amylase on calcium alginate beads from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 2883-2887, 2009.
- RICHTER, K. RÜHLEMANN, I.; BERGER, R. High performance fermentation with lactic acid bacterial entrapped in pectate gel. **Acta Biotechnologica**, v. 11, p. 229-341, 1991.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.
- ROSSETTO, R., SANTIAGO, A. **Adubação - resíduos alternativos**, 2017. Disponível em: <<http://bit.ly/2xDh85g>> Acesso em: 27.09.2016.
- SALOMON, K. R. **Avaliação técnico-econômica e ambiental da utilização do biogás proveniente da biodigestão da vinhaça em tecnologias para geração de eletricidade**. 247 p. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Itajubá, 2007.
- SAMORÌ, G. et al. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I. **Water Research**, v. 47, p. 791–801, 2013.
- SANTOS, L. A.; SOUSA, V. C.; VASCONCELOS, L. A. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Processo de obtenção de fibras de alginato e a fibra assim obtida**. Int CI: D01F 9/04. PI 1107193-1 A2. 09/12/2011. 08/11/2015. Revista de Propriedade Intelectual 2344.
- SANTOS, R. **Imobilização de lipases em gel de pectina**. 2003. 65 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.
- SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels, **Carbohydrate Polymers**, v. 10, p. 31–54, 1989.
- SOARES, M.R.; CASAGRANDE, J.C.; NICOLOSO, R. S. Uso da vinhaça da cana-de-açúcar como fertilizante: eficiência agrônômica e impactos ambientais. In: PALHARES, J.C.P.; Gebler, L. (Eds.). Gestão ambiental na agropecuária. Brasília: EMBRAPA, 2014. Cap. 4, p.145-198.
- SOSNIK, A. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1-17, 2014.
- STRAND, B.L.; MORCH, Y.A.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Minerva Biotecnologica**, v. 12, p. 223-233, 2000.
- TAM, N.F.Y., LAU, P.S., WONG, Y.S. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. **Water Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 369–374, 1994.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of ammonia concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 45-50, 1996.
- TOMASELLI, L. **The microalgal cell**. In: RICHMOND, A. (Ed.) Handbook of microalgal culture. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 3-19, 2004.
- TOMASKA, M. et al. G. Calcium pectate gel beads for cells entrapment: a study on the stability of *Kluyveromyces marxianus* whole-cell lactase entrapped in hardened calcium pectate and alginate gels. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 347-356, 1995.
- TURBIANI, F. R. B. et al. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 175-181, 2011.

- van FEETEN, P.; ZÜRRER, H.; BACHOFEN, R.; Production of molecular hydrogen with immobilized cells of *Rhodospirillum rubrum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, p. 467-472, 1993.
- VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). **Waster Research**, v. 35, n. 5, p. 1354-1357, 2001.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.; GRAILLE, M. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 9, p. 133-148, 2000.
- VOO, W-P. et al. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 294–299, 2011.
- WALKENSTRÖM, P. et al. Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 593-603, 2003.
- WILLATS, W. et al. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.
- WONG, T.W. et al. Pectin matrix as oral drug delivery vehicle for colon cancer treatment. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 201-214, 2011.
- XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 2010.
- YU, W. et al. Study on membrane characteristics of alginate–chitosan microcapsule with cell growth. **Journal of Membrane Science**, v. 377, p. 214-220, 2011.
- ZHOU, Z. D.; LI, G. Y.; LI, Y. J.. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 21-26, 2010.