**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**WALLACE RAFAEL DE SOUZA**

# Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel

**Piracicaba**
**2018**

**WALLACE RAFAEL DE SOUZA**

# Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro**

**Piracicaba**

**2018**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Souza, Wallace Rafael de
Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel / Wallace Rafael de Souza; orientador Regina Teresa Rosim Monteiro. - - Piracicaba, 2018.
121 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Bactérias fotossintéticas - Amazônia 2. Biocombustíveis 3. Cyanophyta 4. Efluente agroindustrial 5. Vinhaça I. Título.

CDU (579.66 + 631.879.3) 62-68

# AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha família, pelos amigos, pela saúde, agradeço humildemente.

À minha família pelo amor e apoio à busca dos meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pela orientação, amizade, disponibilidade e paciência nos momentos de felicidade e dificuldade. Agradeço pelo exemplo de dedicação e generosidade.

Ao Dr. Diego Bonaldo Genuário pela dedicação e esforço em contribuir o máximo possível para o sucesso desse trabalho. Obrigado pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade!

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela confiança na indicação à Profa. Dra. Regina, oportunidade de desenvolver o projeto junto com a sua equipe, e preciosos ensinamentos científicos e profissionais.

A todos os colegas, funcionários e amigos que auxiliaram no desenvolvimento e concretização deste trabalho, em especial:

Aos meus amigos de vida por compartilhar todos os momentos de felicidade e de dificuldades durante esse período. Agradeço em especial a Michelli, Regiane, Natália, Rodrigo Taketani, Jorge, Leonardo, Andressa e Lílian.

À Márcia Maria Parma e Débora Cassoli de Souza pela amizade e empenho no suporte com as análises de ácidos graxos.

Ao Rodrigo Castanha pelos inúmeros conselhos e esclarecimentos, principalmente com as análises de lipídios e ácidos graxos.

À Carol, Bruno e Josi pela imensa ajuda principalmente na finalização desse trabalho.

Aos meus queridos amigos Reginovers: Jorge, Juliana, Carol e Ana Paula, pelas inúmeras felicidades compartilhadas. Obrigado por fazerem tudo mais leve!

À Dr. Patrícia Da Rós pelo auxílio com a extração de lipídios.

Ao Dr. Marcelo Vaz pelas diversas contribuições com os experimentos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA/USP) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura oferecida para realização do projeto.

À Capes pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

# RESUMO

SOUZA, W. R. de. **Potencial de cianobactérias cultivadas em meio suplementado com vinhaça para produção de biodiesel**. 2018. 121 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Cianobactérias são micro-organismos procarióticos fotoautotróficos que apresentam ampla variedade morfológica e metabólica, o que favorece sua colonização nos mais diversos tipos de ambientes. Essa versatilidade favorece a sua utilização em inúmeras aplicações biotecnológicas em áreas como agricultura, energia, nutrição e tratamento de efluentes. Com o aumento da demanda energética e de alimentos, as cianobactérias são consideradas alternativas mais sustentáveis para a biossíntese de produtos de interesse industrial. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de cianobactérias em meios suplementados com vinhaça e seus efeitos na produção de lipídios e na composição de ácidos graxos, visando a produção de biodiesel. Para tanto, onze linhagens de cianobactérias isoladas de amostras de água coletadas em rios da Amazônia foram identificadas morfologicamente e geneticamente como pertencentes à quatro ordens - Nostocales, Chroococcidipsidales, Synecoccocales e Oscillatoriales. Essas linhagens tiveram o seu crescimento avaliado em meios de cultivo suplementados com vinhaça (1, 2,5, 5 e 10% v/v) e em vinhaça diluída em água ultrapura (2,5, 5 e 10% v/v). Todas as linhagens foram capazes de crescer nas concentrações testadas, porém, nas concentrações mais elevadas de vinhaça, observou-se a inibição do crescimento e/ou o aumento da proliferação de contaminantes heterotróficos. Nas diluições de vinhaça em água ultrapura, nenhuma linhagem apresentou crescimento. Duas linhagens foram selecionadas para análises subsequentes devido ao rápido crescimento (*Planktothrix mougeotii* CMAA1564) e ao perfil de ácidos graxos favoráveis à produção de biodiesel (*Amazoninema brasiliense* CMAA1602, gênero inédito). Essas linhagens tiveram seu crescimento investigado nos meios BG11, BG11+1% e BG11+2,5% de vinhaça utilizando os métodos gravimétrico (biomassa seca) e espectrofométrico (densidade ótica - $DO_{680nm}$ e $DO_{750nm}$), para a identificação das fases de crescimento. As maiores taxas de produtividade lipídica e de biomassa foram observadas nas biomassas coletadas na fase log em meio suplementado com vinhaça a 1%, com destaque para *P. mougeotii* CMAA1564 (3,18 e 35,87 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$, respectivamente). A análise do perfil de ácidos graxos das frações lipídicas mostrou a predominância dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados nos óleos das biomassas cultivadas em meio com vinhaça, sendo majoritários os ácidos palmítico, palmitoleico, oleico e alfa-linolênico. A partir da composição de ácidos graxos das frações lipídicas foi possível estimar 11 parâmetros de qualidade do biodiesel derivado dessa matéria-prima lipídica. A maioria das propriedades avaliadas estavam de acordo com as especificações de qualidade do biodiesel estabelecidas na legislação nacional e internacional, com exceção para a viscosidade cinemática que apresentou valores inferiores. Esses resultados são promissores visto a oportunidade de exploração da biodiversidade de cianobactérias ainda pouco estudada para fins biotecnológicos. Essa pesquisa demonstra a viabilidade de utilização do conteúdo lipídico desses organismos como matéria-prima lipídica alternativa para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: Bactérias fotossintéticas. Biocombustíveis. Efluente agroindustrial. Óleos cianobacterianos

## ABSTRACT

SOUZA, W. R. de. **Potential of cyanobacteria cultivated in medium supplemented with vinasse for biodiesel production**. 2018. 121 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Cyanobacteria are photoautotrophic prokaryotes that show a wide morphological and metabolic variety, which favors the colonization of the most diverse types of environments. This versatility reflects in its numerous biotechnological applications in areas such as agriculture, energy, nutrition and effluent treatment. With the increasing in energy and food demand, cyanobacteria are considered a more sustainable alternative for the biosynthesis of products of industrial interest. In this context, the aim of this study was to evaluate the cyanobacteria growth in media supplemented with vinasse and its effect on lipid production and fatty acid composition, with focus on biodiesel production. So, eleven cyanobacterial strains from water samples from Amazonian rivers were morphologically and genetically identified as belonging to four orders - Nostocales, Chroococciodipsidales, Synecoccocales e Oscillatoriales. These strains had their growth evaluated in culture media supplemented with vinasse (1, 2,5, 5 and 10% v/v) and in vinasse diluted in ultrapure water (2,5, 5 and 10% v/v). All strains were able to grow at the concentrations tested, however, at higher vinasse concentrations, growth inhibition and/or higher heterotrophic contaminants proliferation was observed. In vinasse diluted in ultrapure water, none of them were able to grow. Two cyanobacterial strains were selected for subsequent analysis due to rapid growth (*Planktothrix mougeotii* CMAA1564) and favorable fatty acid profile for biodiesel production (*Amazoninema brasiliense* CMAA1602, a new genus). Then, these strains had their gowth investigated in the media BG11, BG11+1% and BG11+2,5% of vinasse using the gravimetric (dry biomass) and spectrophotometric (optical density - $OD_{680nm}$ e $OD_{750nm}$) methods, for growth phases identification. The highest lipid and biomass productivities were observed in the biomass collected in the log phase in medium supplemented with 1% of vinasse, wtith the highest values observed for the *P. mougeotii* CMAA1564 (3,18 e 35,87 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$, respectively). The fatty acid profile of the lipid fraction showed the predominance of saturated and monounsaturated fatty acids in the oils of biomass grown in vinasse medium, with palmitic, palmitoleic, oleic and alpha-linolenic acids being the majority. From the fatty acid composition of the oils, it was possible to estimate eleven quality parameters of the biodiesel derived from these lipid feedstocks. Most of the properties evaluated werein accordance with the biodiesel quality specification estabilished in the national and international legislation, except for the kinematic viscosity that presented lower values. These results are promising given the opportunity for exploiting the underestimated cyanobacteria diversity for biotechnological purposes. This research shows the feasibility of using the lipid content of these organisms as an alternative lipid feedstock for biodiesel production.

Keywords: Photosynthetic bacteria. Biofuels. Agro-industrial wastewater. Cyanobacterial oils.

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de uma biofábrica cianobacteriana e suas possibilidades biotecnológicas (adaptado de Rajneesh et al. (2017)..... 24

Figura 2 – Principais etapas do processo de obtenção de biocombustíveis derivados de micro-organismos fotossintéticos (adaptado de Mata e Martins, 2012; Mubarak et al., 2014)..... 39

Figura 3 - Fluxograma da abordagem metodológica empregada..... 46

Figura 4 – Exemplo da disposição dos meios de cutivo (tratamentos) na placa de cultura de células. Tratamentos: 1. Meio de cultura. 2. Meio de cultura + 1% de vinhaça (v/v). 3. Meio de cultura + 2,5% de vinhaça (v/v). 4. Meio de cultura + 5% de vinhaça (v/v). 5. Meio de cultura + 10% de vinhaça (v/v). 6. Água ultrapura + vinhaça 2,5% (v/v). 7. Água ultrapura + vinhaça 5% (v/v). 8. Água ultrapura + vinhaça 10% (v/v)..... 51

Figura 5 – Ensaio para determinação do padrão de crescimento. (A) Culturas da linhagem *A. brasiliense* CMAA1602 cultivada em meio BG11, BG11 suplementado com vinhaça 1% e 2,5% (v/v). (B) Culturas da linhagem *P. mougeotii* CMAA1564 cultivada em meio BG11, BG11 suplementado com vinhaça 1% e 2,5% (v/v)..... 54

Figura 6 - Extração de lipídios de biomassa cianobacteriana pelo método de Folch et al. (1957) empregando ultrassom de sonda. (A) Sonicador ultrassônico. (B) Mistura da biomassa seca com os solventes. (C) Separação da fase orgânica. (D) Filtração. (E) Evaporação do solvente. (F) Extrato lipídico após a secagem..... 55

Figura 7 - Cromatograma dos 37 ésteres metílicos de ácidos graxos do padrão analítico da Supelco® 37 Component F.A.M.E. C4-C24 Mix, obtido em uma das análises..... 58

Figura 8 – Fotomicrografis das linhagens de cianobactérias estudadas. (A) *Alkalinema* sp. CMAA1554. (B) *Leptolyngbya* sp. CMAA1602. (C) *Pantanalinema* sp. CMAA1556. (D) *Cephalothrix* sp. CMAA1563. (E) *Planktothrix* sp. CMAA1564. (F) *Planktothrix* sp. CMAA1557. (G) *Microchaete* sp. CMAA1601. (H) *Chroococcidiopsis* sp. CMAA1599. (I) *Nostoc* sp. CMAA1610. (J) *Leptolyngbya* sp. CMAA1604. (K) *Leptolyngbya* sp. CMAA1660..... 61

Figura 9 – Análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S das 11 linhagens de cianobactérias gerada por inferência bayesiana. Os valores nos nós indicam as probabilidades posteriores bayseanas..... 63

Figura 10 - Crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 (A) logo após a inoculação, (B) 15 dias após a inoculação, e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 (C) logo após a inoculação, (D) 15 dias após a inoculação, em meios de cultura e água suplementados com concentrações crescentes de vinhaça. Tratamentos: i. meio BG11, ii. meio BG11+1% de vinhaça (v/v), iii. meio BG11+2,5% de vinhaça, iv. meio BG11+5% de vinhaça, v. meio BG11+10% de vinhaça, vi. água ultrapura + 2,5% de vinhaça, vii. água ultrapura + 5% de vinhaça e viii. água ultrapura + 10% de vinhaça..... 67

Figura 11 – Composição de ácidos graxos saturados (SS), monoinsaturados (MS), poli-insaturados (PS) e outros de nove linhagens cianobacterianas. SS: ácidos graxos saturados (10:0, 11:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0 e 19:0), MS: ácidos graxos monoinsaturados (16:1, 17:1 e 18:1), PS: ácidos graxos poli-insaturados (18:3 e 20:4) e ácidos graxos mistos (18:0+18:2 e 14:0+16:1), BG11, $BG11_0$ e AA: meios de cultivo de manutenção das culturas. As porcentagens representam a concentração de vinhaça (v/v) adicionada ao meio de cultura..... 70

Figura 12 – Curvas de crescimento de *A. brasiliense* CMAA1602 em (A) meio BG11 sem vinhaça, (B) meio BG11+1% de vinhaça, e (C) meio BG11+2.5% de vinhaça, e *P. mougeotii* CMAA1564 em (D) meio BG11 sem vinhaça, (E) meio BG11+1% de vinhaça, e (F) meio BG11+2.5% de vinhaça, baseadas nos dados de massa seca e absorbância ($DO_{680nm}$ e $DO_{750nm}$)..... 73

Figura 13 – Valores de pH dos meios de cultivo durante o período de coletas de biomassa. (A) *Amazoninema brasiliense* CMAA1602. (B) *Planktothrix mougeotii* CMAA1564..... 77

Figura 14 – Percentual de ácidos graxos saturados (SS), monoinsaturados(MS), poli-insaturados (PS) e não identificados (NI) na composição de ácidos graxos das frações lipídicas avaliadas..... 87

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biocombustíveis derivados de cianobactérias..... 26

Tabela 2 – Teor lipídico (%) em algumas linhagens de cianobactérias..... 34

Tabela 3 – Classificação baseada na composição de ácidos graxos de algumas cianobactérias (LOS e MIRONOV, 2015)..... 36

Tabela 4 – Linhagens de cianobactérias estudadas, sua origem e meio de cultivo. *Linhagem isolada de uma amostra de perifíton coletada no rio Solimões..... 48

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da amostra de vinhaça..... 50

Tabela 6 – Identificação morfológica das 11 linhagens cianobacterianas usadas neste estudo..... 60

Tabela 7 – Valores de Identidade (%) das sequências do gene RNAr 16S obtidas das linhagens de cianobactérias comparados com sequências disponíveis no *GenBank*..... 62

Tabela 8 – Duração das fases de crescimento e velocidade máxima de crescimento na fase log das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothix mougeotii* CMAA1564 em meios com e sem suplementação com vinhaça..... 74

Tabela 9 – Produtividade de biomassa, teor de lipídios totais e produtividade lipídica volumétrica das linhagens cianobacterianas em diferentes fases do seu crescimento em meio sem e com adição de vinhaça..... 79

Tabela 10 – Composição de ácidos graxos (%) das frações lipídicas das linhagens de cianobactérias em função do tipo de meio de cultivo e da fase de crescimento. N.I.: não identificados, - : não detectado..... 84

Tabela 11 - Parâmetros de qualidade dos biodieseis baseados no perfil de ácidos graxos dos óleos das linhagens de cianobactérias estudadas. Log: fase logarítmica; Est: fase estacionária. NC: número de cetano; IS: índice de saponificação (mg KOH $g^{-1}$); II: índice de iodo (g $I_2$ 100 $g^{-1}$); GI:grau de insaturação (%); FCLS: fator de cadeia longa saturada (ºC); PEFF: ponto de entupimento de filtro a frio (ºC); PN: ponto de névoa (ºC); PF: ponto de fluidez (ºC); υ: viscosidade cinemática (40ºC em $mm^2$ $s^{-1}$); ρ: densidade (20ºC em g $m^{-3}$); MVA: maior valor de aquecimento (MJ $Kg^{-1}$); -: não especificado..... 89

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| **ACP** | Acyl carrier protein |
| **ANOVA** | Análise de Variância |
| **ANP** | Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| **AOCS** | American Oil Chemists' Society |
| **ASP** | Aquatic Species Program |
| **ASTM** | American Society for Testing and Materials |
| **BLAST** | Basic Local Alighment Search Tool |
| **BS** | Biomassa seca |
| **CMAA** | Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental |
| **DBO** | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| **DGDG** | Digalactosil diacilglicerol |
| **DHA** | Ácido docosaexaenóico |
| **DO** | Densidade ótica |
| **DPA** | Ácido docosapentanóico |
| **EN** | European Norm |
| **EPA** | Ácido eicosapentanóico |
| **FAME** | Fatty acid methyl ester |
| **FCLS** | Fator de cadeia longa saturada |
| **FG** | Fosfatidildiacilglicerol |
| **FID** | Flame Ionization Detector |
| **GC** | Gas Chromatography |
| **GI** | Grau de Insaturação |
| **GLA** | Ácido gamma-linolênico |
| **GOLD** | Genome Online Database |
| **II** | Índice de iodo |
| **IS** | Índice de saponificação |
| **LD** | Limite de detecção |
| **LT** | Lipídios Totais |
| **MGDG** | Monogalactosil diacilglicerol |
| **MIDI** | Sherlock Microbial Identification System |
| **MTBE** | Éter metil-*terc*-butílico |
| **MVA** | Maior valor de aquecimento |

| | |
|---|---|
| **NC** | Número de cetano |
| **NCBI** | National Center for Biotechnology Information |
| **NREL** | National Renewable Energy Laboratory |
| **PEFF** | Ponto de entupimento de filtro a frio |
| **PF** | Ponto de fluidez |
| **PHB** | Polihidroxibutirato |
| **PL** | Produtividade lipídica volumétrica |
| **PN** | Ponto de névoa |
| **PNPB** | Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel |
| **P** | Produtividade de biomassa |
| **Proálcool** | Programa Nacional do Álcool |
| **SQDQ** | Sulfoquinovosil diacilglicerol |
| **TAGs** | Triacilglicerídeos |
| $\boldsymbol{\upsilon}$ | Viscosidade cinemática |
| $\boldsymbol{\rho}$ | Densidade |

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** .....17

**2. REVISÃO DE LITERATURA**.....19
2.1. Cianobactérias .....19
2.2. Aplicações biotecnológicas de cianobactérias.....22
2.3. Biodiesel: contexto geral .....28
2.4. Lipídios em cianobactérias .....32
2.5. Produção de biodiesel a partir da biomassa de micro-organismos fotossintéticos e qualidade do biodiesel de cianobactérias.....38
2.6. A vinhaça como meio de cultivo para micro-organismos fotossintéticos .....43

**3. HIPÓTESE**.....45

**4. OBJETIVOS** .....45
4.1. Objetivo principal.....45
4.2. Objetivos específicos.....45

**5. MATERIAL E MÉTODOS** .....46
5.1. Obtenção, cultivo e manutenção das linhagens de cianobactérias .....47
5.2. Identificação morfológica.....48
5.3. Caracterização molecular .....48
5.3.1. Extração de DNA e amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S .....48
5.3.2. Clonagem e transformação .....49
5.3.3. Confirmação da inserção dos fragmentos de interesse e sequenciamento .....49
5.3.4. Processamento e análise filogenética das sequências.....49
5.4. Teste de tolerância em meio suplementado com vinhaça .....50
5.4.1. Coleta, armazenamento e utilização da vinhaça.....50
5.4.2. Ensaio de crescimento em meio suplementado com vinhaça.....50
5.4.3. Análise da composição de ácidos graxos das biomassas cianobacterianas .....51
5.5. Análise do crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 .....52
5.5.1. Preparação dos pré-inóculos.....52

5.5.2. Análise do crescimento ..... 53
5.6. Extração de lipídios ..... 54
5.7. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos das frações lipídicas ..... 56
5.8. Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa ..... 56
5.9. Parâmetros empíricos de qualidade do biodiesel baseado na composição de ácidos graxos ..... 58

**6. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... 60
6.1. Identificação morfológica e caracterização molecular ..... 60
6.2. Crescimento das linhagens de cianobactérias em meio suplementado com vinhaça ..... 66
6.2.1. Seleção das cianobactérias para cultivo em vinhaça ..... 66
6.2.2. Análise do perfil de ácidos graxos das biomassas (MIDI/FAME) ..... 69
6.3. Avaliação das linhagens cianobacterianas selecionadas para produção de biodiesel ..... 71
6.3.1. Análise do crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 ..... 71
6.3.2. Produtividade da biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica ..... 78
6.3.3. Composição de ácidos graxos das frações lipídicas ..... 84
6.3.4. Parâmetros empíricos de qualidade do biodiesel baseado na composição de ácidos graxos ..... 89

**7. CONCLUSÕES** ..... 94

**REFERÊNCIAS** ..... 95

# 1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional tem contribuído para o aumento da demanda de *commodities* e energia, que consequentemente comprometem a disponibilidade quantitativa e qualitativa dos recursos naturais. Nesse cenário, a busca por modelos de desenvolvimento mais sustentáveis tem encorajado as pesquisas em novas tecnologias e processos que eliminem/minimizem os impactos dos modelos tradicionais. Nesse sentido, o biodiesel destaca-se como um combustível alternativo com grande potencial na substituição ao diesel comum. A nível global, o Brasil tem destaque na produção desse biocombustível, o que favorece investimentos nesse setor. Entretanto, faz-se necessário a busca pela diversificação das fontes utilizadas na sua produção. Assim, o uso de microalgas e cianobactérias como matéria-prima alternativa as de origem fóssil, representa uma das formas mais sustentáveis de obtenção desse biocombustível (CHISTI, 2007; DUONG et al., 2012). De acordo com Sharma e Stal (2014) a participação de biocombustíveis derivados desse tipo de matéria-prima, já corresponde a cerca de 4% da produção total de biocombustíveis, e a tendência é de crescimento nos próximos anos.

Quando comparados com as matérias-primas tradicionalmente usadas para a produção de biocombustíveis, esses micro-organismos fotossintéticos apresentam vantagens como rápido ciclo de vida, alta produtividade lipídica e de biomassa, baixa exigência nutricional e maior resistência a condições de estresse. Em razão das suas características procarióticas, as cianobactérias apresentam paredes celulares de menor complexidade e diversidade do que as microalgas, toleram condições mais extremas (COHEN et al., 1986; CASTENHOLZ e WATERBURY, 1989) e são manipuladas geneticamente com maior facilidade. Apesar das cianobactérias produzirem menor quantidade de lipídios, sua produtividade de biomassa pode ser alta. No entanto, os altos custos de produção e a redução da produtividade em sistemas de larga escala, ainda impedem a sua competitividade comercial. Dentre as principais estratégias que têm sido estudadas para reduzir os custos de produção destacam-se o isolamento e melhoramento de linhagens, otimização do cultivo, utilização de resíduos como fonte de nutrientes, melhoria dos sistemas de cultivo, processamento e conversão dos combustíveis e subprodutos de valor agregado. Considerando que as informações sobre a diversidade microbiana em rios da Amazônia são escassas (PEIXOTO et al., 2011), e que esses ambientes apresentam características específicas como alto teor de nutrientes e baixo pH, a busca por linhagens cianobacterianas adaptadas a tais condições visando o seu cultivo em vinhaça pode

ser bastante promissora. Ainda, esse resíduo agroindustrial de pH ácido e cor escura, é produzido em grande quantidade no processamento da cana-de-açúcar e traz preocupação devido ao seu alto poder poluente. Assim, sua ampla oferta associada ao seu elevado potencial nutricional pode representar uma fonte viável para o cultivo de cianobactérias.

Com base nessa premissa, esse estudo buscou-se avaliar o potencial de utilização de linhagens de cianobactérias provenientes de rios da Amazônia, como matéria-prima para a produção de biodiesel, com base nas suas características de crescimento, produção de lipídios e composição de ácidos graxos.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Cianobactérias

As cianobactérias são micro-organismos procariotos e fotoautotróficos capazes de converter dióxido de carbono ($CO_2$) diretamente em compostos orgânicos por meio do processo de fotossíntese (KAUFF; BÜDEL, 2011; DVOŘÁK et al., 2015). Em geral, elas realizam a fotossíntese oxigênica onde a água é o doador de elétrons e há liberação de oxigênio, mas existem espécies capazes de fazer fotossíntese anoxigênica utilizando o sulfeto como doador de elétrons (CASTENHOLZ, 2001; COHEN et al., 1986; ABED et al., 2009). Atualmente, estima-se que elas sejam responsáveis por cerca de 20-30% da produção fotossintética primária global, e, portanto apresentam importante função como fixadoras de carbono (WATERBURY et al., 1979; KNOLL, 2008). Com origem estimada em cerca de 3,5 bilhões de anos atrás e considerados os organismos fotossintetizantes mais antigos no planeta, acredita-se que as cianobactérias tenham participado grandemente no aumento dos níveis de oxigênio na atmosfera primitiva no "Grande Evento de Oxigenação", quando esta passou de anóxica para oxigenada (SCHOPF, 1996; HEDGES et al., 2001; BEKKER et al., 2004; LAU et al., 2015). Além disso, esse grupo de micro-organismos é considerado fundamental para origem das algas na Terra há aproximadamente de 900 a 1900 milhões de anos atrás quando, por endosimbiose primária, o engolfamento de uma cianobactéria por um eucarioto heterotrófico levou a formação dos cloroplastos (BROCKS et al., 2017). Evidências encontradas em estromatólitos revelaram estruturas fossilizadas com morfologia parecida com as das espécies de cianobactérias atuais, corroborando para os indícios da abundância desses micro-organismos durante o período Pré-cambriano (SCHOPF, 1974; SCHOPF, 2012).

Do ponto de vista morfológico, essas bactérias gram-negativas apresentam uma ampla variedade morfológica compreendendo formas unicelulares (solitárias ou coloniais) e formas filamentosas (homocitadas ou heterocitadas) com diferentes níveis de complexidade (WATERBURY, 2006). Apesar de a maioria das cianobactérias reproduzirem-se assexuadamente por fissão binária, algumas apresentam reprodução por brotamento ou por fissão múltipla (RIPPKA et al., 1979; ANGERT, 2005). De acordo com Flores e Herrero (2010), no caso das filamentosas três tipos de células diferenciadas podem ser encontradas: os heterócitos, que são responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico; os acinetos, estruturas de resistência similares a esporos; e os hormogônios, que consistem em filamentos curtos que conferem mobilidade a algumas espécies bentônicas.

Recentemente, Biller e colaboradores (2014) relataram pela primeira vez a liberação de vesículas extracelulares (contendo proteínas, DNA e RNA) em culturas de *Prochlorococcus*. Segundo os autores, esse gênero de cianobactérias é dominante nos ecossistemas marinhos e a produção dessas vesículas suporta o crescimento de bactérias heterotróficas influenciando o fluxo de carbono nesse ambiente. Apesar da grande variedade morfológica, filogeneticamente as cianobactérias representam um grupo coerente com o domínio *Bacteria* (BONEN, 1979; SHI; FALKOWSKI, 2008; VAZ, 2014).

A atividade fotossintética em cianobactérias acontece nas membranas dos tilacóides (envaginações intracelulares) que são utilizadas como características taxonômicas importantes de acordo com a sua organização em relação à célula (parietal, radial, longitudinal e aleatório) (KOMÁREK et al., 2014; HERRERO et al., 2016). Elas possuem fotossistemas do tipo I (PSI) e tipo II (PSII) conectados em série, com predominância da coloração azul-verde devido a presença de pigmentos acessórios característicos como a ficocianina (azul) e aloficocianina (azul), e de clorofila *a* (STAL, 1995). No entanto, algumas espécies podem apresentar clorofila *b* e *d*, e pigmentação avermelhada devido a presença de ficoeritrina (STAL, 1995). Uma característica bastante importante relacionada ao aparato fotossintético das cianobactérias é a sua alteração em resposta a quantidade e qualidade de luz (MARSAC; HOUMARD, 1993). As duas principais estratégias de ajuste a intensidade luminosa utilizadas são a mudança no tamanho da antena de recepção de luz do fotossistema e a alteração da quantidade de unidades fotossintéticas (WYMAN; FAY, 1986; FALKOWSKI; LAROCHE, 1991). Além disso, elas podem apresentar adaptações fisiológicas, como as vesículas de gás intracelulares, a fim de ajustar sua posição vertical na coluna de água em função da disponibilidade de luz (WALSBY, 1994).

O principal modo nutricional presente em cianobactérias é o fotoautotrófico, no qual o dióxido de carbono ($CO_2$) atmosférico é utilizado como fonte de carbono, e a energia da luz é utilizada para redução de $CO_2$ em compostos orgânicos. Entretanto, há espécies que apresentam metabolismo heterotrófico, quimioheterotrófico e mixotrófico (FAY, 1965, RIPPKA, 1972) conferindo maior sucesso adaptativo a esse grupo de micro-organismos. Na ausência de luz, o carboidrato armazenado na célula (glicogênio, por exemplo) é consumido durante a respiração aeróbica usando o oxigênio como receptor de elétrons ou pela via fermentativa (SCHWARZ et al., 2013). Assim como muitas arqueobactérias, algumas espécies utilizam o enxofre elementar durante a respiração anaeróbica e na ausência de luz (OREN; SHILO, 1979), como a espécie *Oscillatoria amphigranulata* (CASTENHOLZ, 1976). A versatilidade metabólica desses organismos fotossintetizantes resulta em vantagens

adaptativas para a colonização de ambientes onde outros organismos fotoautotróficos não conseguiriam se estabelecer, sendo, portanto, consideradas uma das formas mais bem sucedidas na Terra. Elas podem ser amplamente encontradas nos mais diversos tipos de meios como água doce e salgada, solos e rochas, fontes termais neutras e alcalinas e regiões polares, apresentando adaptações morfológicas para prosperar em tais condições (WILMOTTE; HERDMAN, 2001; OREN, 2004). A capacidade dessas bactérias de se estabelecer em condições típicas de regiões semi-áridas e desérticas (alta radiação, dessecação, estresse salino), por exemplo, está relacionada com seus mecanismos eficientes de reparo do DNA e fotossistema (MAKHALANYANE et al., 2015). Nos polos, cianobactérias filamentosas dos gêneros *Oscillatoria*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Nostoc* produzem matéria orgânica, incluindo exopolissacarídeos, essencial para a nutrição de outros organismos em ecossistemas como superfície de gelos e rochas (BOETIUS et al., 2015).

Em ambientes aquáticos de clima tropical, subtropical e temperado, as cianobactérias podem formar florações perifítica e planctônica, comumente identificadas a olho nu, favorecidas por fatores ambientais como alta incidência luminosa e temperaturas mais elevadas (PAERL; HUISMAN, 2008; WOOD et al., 2010; MARTINEAU et al., 2013). As florações consistem em comunidades microbianas compostas por reduzido número de espécies contendo elevada abundância celular (KRUMBEIN et al., 1977). Além disso, elas podem ser formadas por espécies tóxicas o que deteriora a qualidade dos recursos hídricos (potabilidade e balneabilidade) e traz preocupação a respeito da saúde da população (KOREIVIENĖ et al., 2014, BOUVY et al., 2000; O'NEIL et al., 2012).Existe também uma preocupação crescente sobre os distúrbios ecológicos causados pelas abundantes e intensas florações sobre os níveis tróficos superiores (PAERL; HUISMANN, 2008; WILSON et al., 2006; GER et al., 2016).

Em relação à taxonomia, as cianobactérias foram inicialmente classificadas como algas e inseridas no Código Internacional de Nomenclatura Botânica (OREN, 2004). Porém, com a introdução dos estudos baseados nas técnicas moleculares e de identificação ultraestrutural, a característica procariótica desse grupo de micro-organimos ficou evidente (OREN, 2004; KOMÁREK, 2017) o que justificou sua inclusão no Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana (OREN, 2004; STANIER et al., 1978). Entretanto, divergências entre botânicos e bacteriologistas acerca da taxonomia de cianobactérias continuam a representar um empecilho para uma classificação mais natural e unificada (SARMA, 2013; NABOUT et al., 2013). Além disso, muitas vezes há o desconhecimento dos dois códigos nomenclaturais e de conhecimentos conceituais básicos (OREN; VENTURA, 2017)

acarretando identificações e designações inconsistentes (KOMÁREK, 2016). No entanto, publicações recentes têm buscado conciliar as informações de ambos os códigos nomenclaturais ao utilizar uma abordagem polifásica para a caracterização de novos gêneros cianobacterianos como *Fortiea* (HAUER et al., 2014), *Pantanalinema* (VAZ et al., 2015), *Ancylothrix* (MARTINS et al., 2016), *Lusitaniella* (BRITO et al., 2017), *Neolyngbya* (CAIRES et al., 2018), e ou sua validação como no caso de *Scytolyngbya* (SONG et al., 2015). Nessa abordagem polifásica, segundo Komárek (2016), a análise genética é combinada com outros critérios como, por exemplo, avaliação morfológica, ecofisiológica e ecológica, selecionados de acordo com a natureza das amostras.

Nas últimas décadas, as cianobactérias têm despertado interesse crescente devido ao seu potencial biotecnológico, tanto na produção de biomassa para nutrição humana e de animais, quanto para a prospecção de compostos bioativos como antibióticos e substâncias anticancerígenas (ABED et al., 2009). De acordo com Grewe e Pulz (2012), as cianobactérias representam uma das fontes mais promissoras para descoberta de novos produtos e aplicações, devido a sua ampla biodiversidade e os avanços da engenharia genética. Para Parmar et al. (2011), as cianobactérias possuem o potencial de impactar profundamente alguns dos principais problemas atuais relacionados aos recursos energéticos, aquecimento global e segurança alimentar. Com o advento das técnicas de biologia molecular e os investimentos em projetos que visam o sequenciamento de genomas completos, um número considerável de genomas cianobacterianos já estão disponíveis (cerca de 527, segundo o banco de dados Genomes Online Database – GOLD – https://gold.jgi.doe.gov/). O aumento do número de genomas sequenciados desses organismos tem permitido a exploração de novas oportunidades a respeito da sua diversidade e metabolismo nos mais diversos ecossistemas (BECK et al., 2012).

## 2.2. Aplicações biotecnológicas de cianobactérias

O interesse na exploração de micro-organismos fotossintéticos para fins biotecnológicos teve início na década de 40 e, objetivou a busca por fontes alternativas de energia e de alimento (HARDER; VON WITSCH, 1942; BOROWITZKA, 2013; TAMIYA et al., 1953; VELEA et al., 2017). Nas duas décadas seguintes, Japão, Taiwan, Alemanha, Peru, Índia, França e Estados Unidos da América (EUA) investiram na produção comercial e em escala piloto da cianobactéria *Arthrospira* sp. e de microalgas como *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Haematococcus* (BOROWITZKA, 2013). Nos anos de 1970, foi desenvolvido o primeiro sistema em escala industrial para a produção de *Arthrospira maxima*

(Spirulina) no México, e consistia na coleta de sua biomassa do Lago Texcoco, onde florações desse organismo ocorrem constantemente (CIFERRI, 1983).

Durante esse período, ocorreu a primeira crise do petróleo que estimulou o aumento dos investimentos na busca por fontes alternativas de energia em relação às de origem fóssil em países como Brasil (Programa Nacional do Álcool - Proálcool) e EUA.

Em 1978, o Laboratório Nacional de Energia Renovável dos EUA (*National Renewable Energy Laboratory* – NREL), lançou o *Aquatic Species Program* (ASP) que tinha entre seus objetivos, o estudo da bioquímica e fisiologia de micro-organismos fotossintetizantes oleaginosos para produção de biocombustíveis (SHEEHAN et al., 1998). Apesar dos avanços consideráveis acerca da manipulação do metabolismo desses organismos e dos bioprocessos envolvidos no seu crescimento, esse projeto somente foi exitoso no setor de suplementos alimentares com a produção comercial de produtos derivados desses organismos como β-caroteno de *Dunaliella salina* (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1989) e astaxantina de *Haematococcus pluvialis* (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

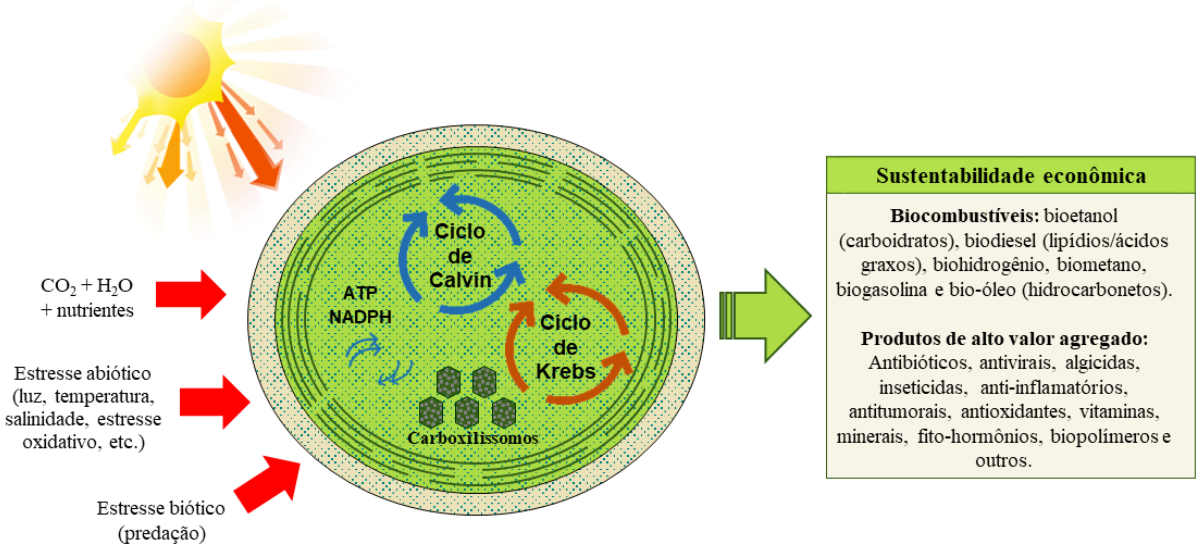
Atualmente, Spirulina é a denominação comercial do produto biológico (biomassa) originado das espécies de cianobactéria *Arthrospira platensis* e/ou *Arthrospira maxima* e representa a maior produção de biomassa cianobacteriana na indústria (BELAY, 2015). A elevada produção dessas espécies de cianobactérias como fonte alimentícia está diretamente relacionada ao reconhecimento pela Organização Mundial da Saúde como um superalimento devido a composição da sua biomassa ser rica em proteínas (60-70%), vitaminas A, C e E, minerais (ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco), ácido γ-linolênico (GLA) e ainda pigmentos naturais como a clorofila *a*, ficocianina e carotenos caracterizando-o como um alimento funcional (SONI et al., 2017). Ainda, esse grupo de micro-organismo é rico em vitaminas do complexo B e, segundo Switzer (1981), 20 g de Spirulina fornece 70% da necessidade diária recomendada para adultos da vitamina tiamina (B1), 50% de riboflavina (B2) e 12% de niacina (B3).

A produção anual de biomassa seca de Spirulina excede 10000 ton/ano com crescimento de 15% ao ano e representa o dobro da produção da microalga *Chlorella* sp. (VONSHAK, 2014; SLOCOMBE; BENEMANN, 2016; IEA, 2017). Atualmente a China é a maior produtora desse tipo de biomassa contribuindo com cerca de dois terços do mercado, vendendo o quilo da biomassa por valores que variam de 10 a 25 dólares (IEA, 2017).

Esse cenário demonstra a viabilidade da produção de cianobactérias em larga escala ao mesmo tempo em que destaca a necessidade da exploração de outros gêneros, visto a diversidade desse grupo de micro-organismos.

As cianobactérias apresentam inúmeras possibilidades biotecnológicas, e são consideradas "biofábricas" por serem capazes de utilizar sua ampla versatilidade metabólica e pouca demanda nutricional pra sintetizar vários bioprodutos de interesse para áreas como agricultura, energia e indústria de alimentos, cosméticos e fármacos (Figura 1) (LAU et al., 2015; RAJNEESH et al., 2017).

Figura 1 - Representação esquemática de uma biofábrica cianobacteriana e suas possibilidades biotecnológicas (adaptado de Rajneesh et al. (2017))




Os compostos bioativos produzidos por cianobactérias tem importância ecológica e industrial, e podem ser comercializados na forma de herbicidas, algicidas e inseticidas (RAJNEESH et al., 2017). De acordo com Gross (2003), no ambiente aquático as cianobactérias secretam metabólitos secundários (alcalóides, peptídios cíclicos e compostos orgânicos voláteis) por alelopatia, que apresentam efeitos inibitórios sob o crescimento de outros organismos presentes no mesmo ambiente. Cianobactericina é uma substância produzida por *Scytonema* sp. que apresenta atividade inibitória sobre o funcionamento do fotossistema II, podendo ser utilizado em baixas concentrações no controle de florações algais ou de cianobactérias (GLEASON; CASE, 1986).

Em relação ao potencial antibacteriano, Asthana et al. (2006) observaram que o extrato metanólico de *Fischerella* sp. foi ativo contra *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterobacter aerogens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *E. coli* e mais

três linhagens de *E. coli* multiresistentes. Najdenski et al. (2013) testaram nove linhagens de cianobactérias contra oito patógenos de alimentos e observaram um amplo espectro inibitório dos extratos etanólicos, aquosos e dos ácidos graxos de *Synechocystis* sp. sob os patógenos testados. Ainda, vários representantes desse grupo de micro-organismos são produtores de substâncias anticancerígenas como *Lyngbya bouillonii* (apratoxina E; LEUSCH et al., 2001), *Nostoc linckia* (criptoficina- 1; MOZZACHIODI et al., 2001), *Oscillatoria acutissima* (acutificina; BARCHI et al., 1984) e antivirais como *Nostoc sphaericum* (indolocarbazoles; COHEN, 1999) e *Scytonema varium* (scitovirina; XIONG et al., 2006).

Os pigmentos encontrados nas cianobactérias também possuem alto valor agregado (MAZARD et al., 2016). As ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina) e os carotenóides (β-caroteno, nostoxantina e licopeno) são empregados na indústria farmacêutica e de alimentos como corantes, aditivos, e como suplementos alimentares (LAU et al., 2015). Esses corantes naturais têm sido utilizados como uma alternativa aos corantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos e também por apresentarem propriedades terapêuticas como ação antioxidante (PANDEY et al., 2013). Além disso, algumas espécies podem ser capazes de produzir compostos fotoprotetores como os aminoácidos tipo micosporina e a scytonemina que as protegem contra a exposição à alta radiação ultravioleta podendo ser utilizados na fabricação de protetor solar (RAJNEESH et al., 2017).

Na agricultura, além da exploração de móleculas bioativas como inseticidas e herbicidas, as cianobactérias podem ser utilizadas na promoção do crescimento de plantas, pois sintetizam naturalmente fitohormônios como auxinas (*Anabaena* sp., *Anabaenopsis* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Nostoc* sp., *Plectonema* sp., *Synechocystis* sp.), giberelinas (*Anabaenopsis* sp., *Cylindromum* sp.) e citocinina (*Anabaena* sp., *Chlorogloeopsis* sp., *Calothrix* sp.) (PRASANNA et al., 2010). Muitas espécies de cianobactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico contribuindo para a manutenção da fertilidade do solo, principalmente em áreas de cultivo de arroz (RAJNEESH et al., 2017). O nitrogênio fixado pode ser liberado na forma de excretas e/ou durante a degradação da biomassa microbiana após a morte celular na forma de amônia, polipeptídios, aminoácidos livres, vitaminas e substâncias tipo auxinas (SUBRAMANIAN; SHANMUGASUNDARAM, 1986; SINGH et al., 2016). Segundo Prasanna et al. (2013), nos solos auxiliam na disponibilização de fósforo, melhoram a estrutura do solo por meio da liberação de exopolissacarídeos e reduzem as perdas de água e erosão. Apesar de poucos estudos serem voltados para a questão comercial de biofertilizantes cianobacterianos, algumas espécies como *Anabaena varianilis*, *Nostoc muscorum*, *Aulosira fertissima* e *Tolypothrix tenuis* apresentam grande potencial (SINGH et

al., 2016). Dessa forma, inoculantes a partir desses organismos podem contribuir para a redução no consumo de agroquímicos e fertilizantes nitrogenados na agricultura moderna.

Modelos mais sustentáveis de produção energética têm sido buscados visando a redução da dependência de fontes energéticas não renováveis, como o petróleo o qual apresenta reserva finita e é geradora de gases do efeito estufa. Nesse sentido, a utilização de micro-organismos fotossintéticos mostra-se bastante promissora visto sua capacidade de reduzir os níveis de $CO_2$ na atmosfera por meio da sua conversão em biomassa, biocombustíveis e outros bioprodutos (NOZZI et al., 2013; GUPTA et al., 2013; RAJNEESH et al., 2017). Atualmente, empresas estadunidenses como Algenol Biofuels, Sapphire Energy e Solix Biofuels possuem projetos voltados para a produção de biocombustíveis a partir desses micro-organismos (SU et al., 2017). Membros do filo das Cianobactérias são capazes de produzir diferentes matérias-primas para geração de energia como hidrogênio, lipídios, combustível de motores a jato, hidrocarbonetos, isoprenoides para gasolina e carboidratos para produção de etanol (PARMAR et al., 2011; ROSGAARD et al., 2012; SINGH et al., 2016). Na Tabela 1 são apresentados alguns exemplos de biocombustíveis derivados de cianobactérias

Tabela 1 – Biocombustíveis derivados de cianobactérias

| Micro-organismo | Biocombustível | Produção | Referências |
|---|---|---|---|
| *Arthrospira platensis* | etanol | 1,08 g $L^{-1}$ dia | Markou et al., 2013 |
| *Synechococystis* sp. PCC 6803 | etanol | 5,50 g $L^{-1}$ | Gao et al., 2012 |
| *Synechococcus* sp. PCC7942 | biodiesel | 97,1%* | Silva et al., 2014 |
| *Trichormus* sp. | biodiesel | 80%* | Da Rós et al., 2017 |
| *Oscillatoria annae* | biodiesel | 86%* | Vimalarasan et al., 2011 |
| *Arthrospira platensis* | biodiesel | 42%* | Baunillo et al., 2012 |
| *Synechococcus* sp. PCC 7002 | hidrogênio | 14,1 mol/dia/1017 células | McNeely et al., 2010 |
| *Anabaena cylindrical* | hidrogênio | 30 $mL^{-1}$ $L^{-1}$ h | Jeffries et al., 1978 |
| *Arthrospira platensis* | biogás | 293 mL $gVS^{-1}$ | Mussugnug et al., 2010 |
| *Synechocystis salina* | biometano | 348 $m^3_n$ t $VS^{-1}$ | Meixner et al., 2018 |
| *Synechocystis* PCC 6803 | isobutanol | 60,8 mg $L^{-1}$ | Miao et al., 2017 |
| *Synechococcus elongatus* PCC7942 | isobutiraldeído | 6230 µg $L^{-1}$ $h^{-1}$ | Atsumi et al., 2009 |
| *Synechococcus elongatus* | isopreno | 1.26 g $L^{-1}$ | Gao et al., 2016 |
| *Synechocystis* 6803 | etileno | 718±19 µL $L^{-1}$ $h^{-1}$ por $A_{730nm}$ | Xiong et al., 2015 |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | acetona | 36 mg $L^{-1}$ | Zhou et al., 2012 |

*Percentual de conversão dos lipídios em biodiesel.

Certamente, um dos grandes alvos de pesquisas em biocombustíveis derivados de cianobactérias é a produção biológica de hidrogênio (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

Atualmente, a maior parte do hidrogênio é produzida a partir de matérias-primas de origem fóssil como gás natural, nafta e carvão, sendo os métodos mais empregados a pirólise e a reforma de hidrocarbonetos, os quais apresentam custos aceitáveis de produção (TURNER, 2004; NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017). A produção de hidrogênio a partir de fontes renováveis é classificada de acordo com o tipo de matéria-prima: a) água, onde a molécula de água é quebrada e o hidrogênio é liberado (eletrólise, decomposição térmica e fotoeletrólise); e b) biomassa, que pode ser convertido por três tipos de processos: os termoquímicos (pirólise, gaseificação, combustão e liquefação), os biológicos (biofotólise direta e indireta, fermentação na ausência de luz, fotofermentação); e as duas últimas combinadas em sequência (NIKOLAIDIS; POULLIKKAS, 2017).

Algumas espécies de cianobactérias são capazes de produzir naturalmente esse biocombustível como subproduto da fixação biológica de nitrogênio quando cultivadas na ausência desse elemento no meio, e pela atividade reversa das enzimas nitrogenase e nitrogenase de assimilação (ABED et al., 2009). As cianobactérias heterocitadas são as mais eficientes nesse processo, sendo que a maior produção de hidrogênio reportada na literatura é de 30 $mL^{-1}$ $L^{-1}$ hora por uma linhagem de *Anabaena cylindrica* cultivada na ausência de nitrogênio no meio (JEFFRIES et al., 1978; RISHI; AWASTHI et al., 2015). Apesar desse potencial, existem algumas barreiras técnicas que dificultam a comercialização do $H_2$ produzido por cianobactérias como a identificação de linhagens mais produtivas, a sensibilidade das enzimas nitrogenases ao $O_2$, o consumo do $H_2$ pela hidrogenase bidirecional e a oxidação de $H_2$ pela hidrogenase de assimilação (GHIRARDI et al., 2007). Nesse sentido, Esteves-Ferreira et al. (2017) acreditam que aplicação de técnicas de engenharia metabólica e melhoria das condições de cultivo deverão contribuir cada vez mais para a viabilização comercial desse biocombustível.

A produção de etanol a partir de biomassa de cianobactérias é uma alternativa sustentável que tem dispertado interesse. Segundo Parmar et al. (2011) as cianobactérias são capazes de secretar glucose e sucrose os quais podem ser fermentados anaerobicamente na ausência de luz gerando etanol. Além disso, Quintana et al. (2011) destacam que elas também podem realizar a fotofermentação, na qual a fermentação ocorre sem a necessidade de adição de leveduras como é tradicionalmente feito para matérias-primas de origem agrícola. Apesar dessa potencialidade, o etanol produzido a partir desse tipo de biomassa ainda não é considerado o substituto mais adequado à gasolina devido a sua baixa densidade energética e higroscopia (NOZZI et al., 2013). Assim, há um direcionamento das pesquisas em energia

para substitutos a esse biocombustível que apresentem cadeias de carbono maiores como o isobutiraldeído, o isobutanol e o isopreno (NOZZI et al., 2013).

Por serem organismos procarióticos, as cianobactérias possuem características genéticas que facilitam a sua manipulação para a produção de biocombustíveis. Nos últimos anos, a manipulação genética tem sido aplicada a linhagens modelo como *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Synechococcus elongatus* e *Nostoc* sp. PCC 7002, para os estudos acerca da sua fisiologia e bioquímica (LEA-SMITH; HOWE, 2017). Nesse contexto, quatro estratégias de otimização metabólica podem ser aplicadas as cianobactérias: a) aumento da taxa de fixação de $CO_2$, b) otimização das vias metabólicas, c) aumento da tolerância a produtos tóxicos e d) eliminação de vias concorrentes (SARSEKEYEVA et al., 2015). Um dos primeiros trabalhos publicados sobre manipulação genética de cianobactérias para produção de biocombustíveis foi com a linhagem *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (DENG; COLEMAN, 1999). Essa linhagem foi manipulada geneticamente para a produção de etanol, por meio da inserção dos genes das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase 2 que realizam a degradação e fermentação de açúcares e piruvato, produzindo etanol e $CO_2$ como produtos da reação (DENG; COLEMAN, 1999; SARSEKEYEVA et al., 2015). Mais recentemente, Lan e Liao (2011), fizeram a inserção de genes de *Clostridium acetobutylicum*, *Treponema denticola* e *E. coli* em uma linhagem selvagem de *S. elongatus* PCC 7942 para produzir 1-butanol na ausência de oxigênio.

Os avanços nas técnicas de engenharia genética, biologia sintética e do entendimento do metabolismo desses organismos têm contribuído cada vez mais para o desenvolvimento de novas possibilidades biotecnológicas. De acordo com Al-Haj et al. (2016), a maior parte do trabalho desenvolvido nessa área tem buscado o entendimento dos sistemas metabólicos para gerar linhagens cianobacterianas mais resilientes e produtivas.

## 2.3. Biodiesel: contexto geral

A maior parte da necessidade energética global é, atualmente suprida por fontes não renováveis como carvão, gás natural e petróleo (SRIVASTAVA e PRASAD, 2000; MEHER et al., 2006). Com o crescimento da demanda de energia nas últimas décadas, associada à redução nas reservas naturais e o aumento da poluição gerada por esses recursos, a busca por fontes de energia renováveis e o desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis têm ganhado destaque (CHYNOWETH et al., 2001).

A utilização do biodiesel como alternativa a combustíveis fósseis, por exemplo, pode reduzir a emissão de hidrocarbonetos e óxidos de enxofre e carbono, contribuindo para

desacelerar o processo de aquecimento global (GASHAW et al., 2015). Segundo Fukuda et al. (2001), com a utilização de biodiesel em uma mistura com diesel comum em 20% (B20), pode-se reduzir a emissão de dióxido de carbono em 15,66%. Esse biocombustível é formado por ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de óleos e gorduras, tradicionalmente de origem vegetal ou animal, que apresenta propriedades ideais para ser utilizado em motor a diesel (VAN GERPEN, 2007; LAPUERTA, 2008, KNOTHE, 2010). A obtenção do biodiesel ocorre pela conversão dos ésteres de glicerol e ácidos graxos (glicerídeos ou triglicerídeos) por uma reação de transesterificação (MA; HANNA, 1999). Essa reação química de triglicerídeos com alcoóis (metanol ou etanol) ocorre na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático), o que resulta na substituição do grupo éster do glicerol pelo grupo etanol ou metanol, tendo glicerina como subproduto (SILVA; FREITAS, 2008). O biodiesel pode ser utilizado na sua forma pura ou em misturas com o diesel de origem fóssil, método mais comumente utilizado com o objetivo de melhorar algumas propriedades como o teor de enxofre e compostos aromáticos, ponto de fulgor e biodegradabilidade (KNOTHE et al., 2005; ATABANI et al., 2013). Geralmente, as misturas recebem sua identificação de acordo com a porcentagem do biodiesel presente e com isso, uma mistura identificada como B20 indica a presença de 20% de biodiesel com 80% de diesel comum (KNOTHE et al., 2005). Ainda, a comercialização do biodiesel segue padrões de qualidade estabelecidos em normas técnicas, que definem os valores limites de diferentes propriedades desse biocombustível e os métodos aplicáveis na sua determinação. Algumas das propriedades do biodiesel relacionam-se diretamente com a composição de ácidos graxos da matéria-prima (densidade, viscosidade, ponto de turvação e fluidez, ponto de fulgor, número de cetano, estabilidade oxidativa, etc.), enquanto que outras são afetadas pelo processo de produção e estocagem (teor de cinzas, corrosidade ao cobre, e teor de água, glicerina e carbono residual) (KNOTHE et al., 2005; QUIRINO et al., 2014). As especificações para o biodiesel puro (B100) estabelecidas pelas normas estadunidense (ASTM 6751, 2012 – American Society for Testing and Materials) e européia (EN 14.214, 2012 – European Norm) são utilizadas como referências para outros países. No Brasil, essas especificações estão dispostas nas resoluções da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP nº 45, de 25/08/2014 para biodiesel puro e ANP nº 30 de 23/06/2016 para óleo diesel BX a B30. Segundo Quirino et al. (2014), as normas estadunidense e a brasileira são aplicadas tanto para ésteres metílicos quanto para ésteres etílicos de ácidos graxos e apresentam diferenças devido a principalmente, particularidades regionais de mercado e tipo de matéria-prima utilizada (QUIRINO et al., 2014). Essas diretrizes asseguram

a qualidade do biodiesel produzido, bem como as emissões da sua queima, desempenho e integridade do motor e a segurança no seu transporte e manuseio. Segundo o Ministério de Minas e Energia (BRASIL, 2017), a produção anual de biodiesel puro (B100) foi de 3.801.339 $m^3$ e 3.937.269 $m^3$ em 2016 e 2015, respectivamente, tendo como principais matérias-primas o óleo de soja (72%) e o sebo bovino (14%). Apesar da redução de 3,5% em 2016, o Brasil continua a ocupar o segundo lugar na lista de maiores produtores de biodiesel no mundo (REN21, 2017) com participação de 12% do biodiesel total produzido globalmente. A maior parte dessa produção é consumida nacionalmente devido à obrigatoriedade do uso e comercialização de misturas de biodiesel ao diesel superiores a 7% (B7), conforme a Lei nº 13.033/2014 (ANP, 2017).

Embora o Brasil apresente condições favoráveis para produção desse tipo de combustível renovável, fica evidente a necessidade de investimento em matérias-primas alternativas mais sustentáveis (KLIGERMAN; BOUWER, 2015). A grande participação da soja na produção nacional de biodiesel é preocupante, pois favorece os grandes produtores, contrapondo-se as principais diretrizes do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) que visam o fortalecimento das potencialidades regionais para a produção de matéria-prima e a integração da agricultura familiar na cadeia de produção do biodiesel. Diferentes matérias-primas oleaginosas têm sido utilizadas e estudadas para a produção de biodiesel em função da sua disponibilidade e potencialidade. Em geral elas são categorizadas por geração com base no seu histórico crescente de utilização (AHMAD et al., 2011). Esses autores classificam as matérias-primas lipídicas em três categorias: as de primeira geração compreendem os óleos comestíveis tradicionais como soja, girassol, colza e palma; as de segunda geração incluem as culturas não comestíveis como pinhão manso, algodão e moringa, e resíduos graxos como sebo bovino, óleos residuais de fritura e gordura de frango; e as de terceira geração referem-se aos micro-organismos fotossintéticos.

A utilização da biomassa de macroalgas, microalgas e cianobactérias têm sido amplamente estudadas como matéria-prima alternativa às culturas agrícolas para a produção de biodiesel (DEMIRBAS, 2011; BEHERA et al., 2015). Para Chisti (2007; 2008), elas demonstram ser a fonte com maior potencial de substituição ao diesel de origem fóssil. Esse interesse não está unicamente relacionado aos avanços que a crise do petróleo e as preocupações ambientais propiciaram a essa área, mas também a possibilidade de emprego de técnicas da engenharia genética (melhoramento e biologia sintética) nesses grupos de organismos fotossintéticos (WIJFFELS et al., 2013). Além disso, várias vantagens são atribuídas a eles quando comparados com as culturas oleaginosas tradicionais e incluem:

a) maior eficiência fotossintética e taxa de crescimento permitindo a coleta da biomassa em períodos menores (SHEEHAN et al., 1998; MATA et al., 2010); b) não requerem água potável para o cultivo, tolerando o uso de resíduos industriais e domésticos com redução dos custos com fertilizantes (RAWAT et al., 2011; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011), pois utilizam compostos inorgânicos ($NH_4^+$, $NO_3^-$, $PO_4^{3-}$) e nutrientes orgânicos desses efluentes para seu crescimento, podendo ser aplicados na biorremediação (SAMANTARAY et al, 2011; ABDEL-ROUF et al., 2012); c) não precisam de solos férteis para cultivo, reduzindo os riscos de competição por áreas para produção de alimentos (CHISTI, 2007); d) podem ser utilizados na fixação do $CO_2$ em efluentes gasosos industriais (KUMAR et al., 2010); e) podem ser produzidos durante todo o ano, e várias espécies apresentam produtividade lipídica maior (SCHENK et al., 2008); e f) produzem biocombustíveis atóxicos e biodegradáveis (SCHENK et al., 2008), contribuindo para a redução da emissão de material particulado, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e dióxido de enxofre (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A produção de micro-organismos fotossintéticos em larga escala no Brasil apresenta grande potencial. Fatores como disponibilidade hídrica (12% da água doce disponível no mundo), grandes áreas para produção, principalmente a região costeira, altas taxas de insolação (8-22 MJ $m^2$ $dia^{-1}$) e uma grande diversidade desses micro-organismos ainda pouco estudada, contribuem para confirmar seu grande potencial (QUIRINO et al., 2014; BRASIL et al., 2016; RIGONATO et al., 2017). Nas últimas três décadas, avanços consideráveis foram conquistados pelo Brasil devido aos esforços da comunidade científica e apoio de instituições públicas (Petrobrás e Agência Nacional do Petróleo – ANP) e privadas (MENDES, 2017). Empresas de biotecnologia também têm investido na produção desses organismos para diferentes propósitos como a *joint venture* entre a Bunge e a TerraVia em Orindiúva em São Paulo (produção de óleos de alto valor agregado), a *startup* brasileira Algae Biotecnologia em Piracicaba em São Paulo (tratamento de efluentes líquidos e gasosos, suplementos para alimentação humana e ingredientes para nutrição animal, e produção de biocombustíveis) e a Fazenda Tamanduá em Santa Terezinha na Paraíba que produz biomassa de *Arthrospira platensis* para consumo humano. Apesar desse potencial, os custos elevados de produção e a baixa produtividade em sistemas de larga escala, ainda dificultam a viabilidade econômica e competitividade desse tipo de matéria-prima para produção de biocombustíveis (MATA et al., 2010; PERALTA-YAHYA et al., 2012; MILANO et al., 2016; SHUBA; KIFLE, 2018). De acordo com Qari et al. (2017) para que os biocombustíveis obtidos desses

micro-organismos possam concorrer com os combustíveis fósseis no mercado internacional, ainda é necessária uma redução no custo de produção em pelo menos dez vezes. Por conseguinte, muitas pesquisas têm sido direcionadas para a seleção, caracterização e domesticação de linhagens altamente produtivas adaptadas as condições locais como apresentado nos estudos de Nascimento et al. (2013), Talebi et al. (2013), Zhou et al. (2011) e Santana et al. (2017). Segundo Chisti (2007), a busca por micro-organismos fotossintéticos ideais para a produção desse tipo de biocombustível devem concentrar-se em linhagens que apresentam altas produtividades de biomassa, eficiente síntese de lipídios, facilidade de coleta da biomassa e de manipulação genética.

## 2.4 Lipídios em cianobactérias

Os lipídios são biomoléculas caracterizadas por sua solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água (SCRIMGEOUR; HARWOOD, 2007). Eles ocorrem em todos os tipos de células participando da manutenção de processos biológicos essenciais como regulação de vias metabólicas, das respostas fisiológicas, contribuindo para a estrutura celular e fornecimento de energia (GURR et al., 2002). Esse grupo de substâncias inclue lipídios neutros como os monoglicerídios, diglicerídios, triglicerídios, ácidos graxos livres, e lipídios polares como os fosfolipídios, esteróis, carotenóides, vitaminas A e D, dentre outros (RÍOS et al., 2013). Os triacilgligerídeos (TAGs) são lipídios de armazenamento constituídos por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol (SCRIMGEOUR; HARWOOD, 2007). A composição de ácidos graxos e as suas propriedades físico-químicas são os principais parâmetros que influenciam as características desses óleos (KNOTHE, 2005; LAM et al., 2010). Os triacilcligerídeos representam os principais componentes lipídicos das matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel e se assemelham aos óleos de origem fóssil, podendo ser utilizados como substitutos na indústria química (CAGLIARI et al., 2011).

Tradicionalmente, a determinação do conteúdo lipídico na biomassa de micro-organismos fotossintéticos é realizada por métodos baseados na extração dos lipídios com solventes orgânicos seguido por sua determinação gravimétrica de acordo com metodologias clássicas como as de Folch et al. (1957) e de Bligh e Dyer (1959) empregadas em diferentes matrizes. Entretanto, a utilização de corantes lipossolúveis fluorescentes como o Vermelho do Nilo e o Biodipy para quantificação de lipídios neutros têm sido cada vez mais utilizados, principalmente devido a suas vantagens em relação à quantidade de amostra necessária e

tempo de análise (CHEN et al., 2009; GOVENDER et al., 2012; RATTANAPOLTEE; KAEWKANNETRA, 2013; JOHNSON et al., 2017).

Em geral, maior atenção tem sido direcionada às macro e microalgas devido a sua capacidade de acumular grandes quantidades de TAGs úteis como fonte alternativa de lipídeos direcionadas para a produção de biodiesel (HU et al., 2008). Essas algas acumulam grandes quantidades de lipídios (até 85% da biomassa seca) na forma de material de reserva sob condições de estresse e crescimento lento, sendo que sob limitação de nutrientes esses valores ficam normalmente acima de 40% (RITTMANN, 2008; RODOLFI et al., 2009). Por outro lado, as cianobactérias armazenam preferencialmente carbono na forma de glicogênio e/ou polihidroxialanoatos (POSEWITZ, 2014; LYNCH et al., 2015), e alguns autores reportam a presença de TAGs em espécies cianobacterianas como *Nostoc punctiforme* (PERAMUNA; SUMMERS, 2014), *Nostoc commune* (TARANTO et al., 1993), *Arthrospira platensis* (RAMADAN et al., 2008) e *Arthrospira* sp. (AMOR et al., 2017). Nas cianobactérias o acúmulo de lipídeos está naturalmente associado à altas taxas de fotossíntese e crescimento rápido (RITTMANN, 2008), podendo corresponder a até 45% da biomassa seca (KARATAY; DÖNMEZ, 2011; DA RÓS et al., 2017). Assim, apesar de muitas cianobactérias possuírem teor lipídico menor que as microalgas, sua produtividade de biomassa pode atingir níveis consideravelmente maiores (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Nesse sentido, Griffiths e Harrison (2009) e Abomohra et al. (2013) destacam que para seleção de linhagens potenciais, um dos principais parâmetros a serem analisados é a produtividade lipídica, que considera o teor lipídico e a produtividade de biomassa. Além disso, Kumar et al. (2015) resaltam que quando produzidas em grandes quantidades, até mesmo linhagens com teores lipídicos por volta de 10% são viáveis para a produção de biodiesel. Na Tabela 2 são apresentados os teores lipídicos de algumas espécies de cianobactérias com base nos dados de literatura.

Tabela 2 – Teor lipídico (%) em algumas linhagens de cianobactérias

| **Linhagem cianobacteriana** | **Teor lipídico (%)** | **Produtividade lipídica (mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$)** | **Referências** |
|---|---|---|---|
| *Anabaena sphaerica* MBDU 105 | 18,65 | 1,68 | Anahas; Muralitharam (2015) |
| *Calothrix* sp. MBDU013 | 11,22 | 2,36 | |
| *Nostoc* sp. MBDU 009 | 7,90 | 1,34 | |
| *Nostoc calciola* MBDU 602 | 18,92 | 3,26 | Anahas; Muralitharam (2018) |
| *Desmonostoc muscorum* MBDU 105 | 13,50 | 2,42 | |
| *Synechococcus* sp. HS01 | 12,33 | 23,42 | Modiri et al. (2015) |
| *Nodosilinea* sp. AK01 | 8,33 | 3,43 | |
| *Romeria gracilis* M6C | 11,10 | 24,40 | Calixto et al. (2018) |
| *Aphanothece* sp. M27C | 10,30 | 29,90 | |
| *Planktothrix isothrix* D39Z | 6,00 | 16,80 | |
| *Myxosarcina* sp. | 12,20 | 3,40 | Jawaharraj et al. (2015) |
| *Trichormus* sp. | 14,50 | 41,50 | Da Rós et al. (2017) |
| *Synechococcus* sp. PCC7942 | 29,00 | 35,90 | Silva et al. (2014) |

Os lipídios cianobacterianos são formados por ésteres de glicerol e ácidos graxos, que podem ser saturados ou insaturados (SINGH et al., 2002). Eles estão localizados em suas membranas (citoplasmática e fotossintéticas – tilacóides) e contém majoritarimente três tipos de glicolipídios: o monogalactosil diacilglicerol (MGDG), o digalactosil diacilglicerol (DGDG) e o sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG), e um tipo de fosfolipídio, o fosfatidilglicerol (FG) (MURATA; WADA, 1995; SINGH et al., 2002). As cianobactérias que desenvolvem células diferenciadas, podem apresentar uma composição lipídica distinta, visto que os acinetos apresentam glicolipídios particulares que não são encontrados nas células vegetativas e nos heterócitos (REDDY, 1983), e este último tipo de célula também contém glicerolipídios e hidrocarbonetos não usuais (NICHOLS; WOOD, 1968; MURATA; NISHIDA, 1987; MURATA; WADA, 1995).

Avanços recentes na identificação de genes envolvidos na síntese de lipídios nos tilacóides de cianobactérias e plantas superiores têm contribuído para o entendimento da relação entre a biossíntese e a função desses lipídios no processo de fotossíntese nesses organismos (KOBAYASHI et al., 2016). Recentemente, Kóbori et al. (2018) demonstraram que o FG é essencial para a tranferência fotossintética de elétrons e para a oligomerização do aparato fotossintético em *Synechococcus elongatus* PCC7942.

Em cianobactérias, a biossíntese de ácidos graxos é mediada pelo complexo enzimático da ácido graxo sintase tipo II utilizando a proteína transportadora de acil (ACP, do inglês, "*acyl carrier protein*") que interage especificamente com seis enzimas envolvidas nesse processo (FROEHLICH et al., 1990). A incorporação dos ácidos graxos nas membranas ocorre pela ação das aciltransferases que utilizam como substrato os produtos de ácidos graxos liberados na forma de acil-ACPs (FRENTZEN et al., 1983). Como resultado da especificidade dessas enzimas, um padrão de ácidos graxos típicos de procariotos (C16 esterificado na prosição $\Delta^2$) é estabelecido nesses organismos (KACZMARZYK; FULDA, 2010). No processo de alongamento dos ácidos graxos saturados de C14:0 para C16:0 e deste para C18:0, a proteína ACP e o complexo enzimático NADPH são utilizados, porém ele não requer as enzimas acetil-CoA ou NADH (LEM; STUMPF, 1984; WADA; MURATA, 1998). No caso do processo de dessaturação, enzimas dessaturases inserem ligações duplas em posições específicas das cadeias de ácidos graxos ligadas a fração de glicerol dos glicerolipídios polares (LOS; MURATA, 1998). *Synechocystis* sp. PCC 6803, por exemplo, possui quatro genes que codificam acil-desaturases, *desA*, *B*, *C* e *D*, responsáveis pela inserção de ligações duplas nas posições $\Delta^6$, $\Delta^9$, $\Delta^{12}$ e $\Delta^{15}$ das cadeias acil do glicerolipídio (MURATA; WADA, 1995).

Um sistema de classificação baseado na composição de ácidos graxos de cianobactérias foi proposto por Kenyon (1972) e Kenyon et al. (1972), e modificado por Murata et al. (1992) e por Los e Mironov (2015) (Tabela 3). Nessa classificação, as cianobactérias são divididas em quatro grupos. No grupo 1 estão incluídas as cianobactérias que sintetizam apenas ácidos graxos saturados e monoinsaturados com a ligação dupla na posição $\Delta^9$. O grupo 2 compreende as espécies que têm os ácidos graxos C16 e C18 dessaturados nas posições $\Delta^9$ e $\Delta^{12}$ para produzir os ácidos monoenóico e dienóico. O grupo 3 comporta os organismos que produzem ácidos graxos trienóicos como produtos finais da dessaturação ($\alpha$-18:3 $\Delta^{9,12,15}$ e $\gamma$-18:3 $\Delta^{6,9,12}$) e são subdividos em função desses produtos em 3$\alpha$ e 3$\gamma$. No grupo 4 estão incluídas as cianobactérias com quatro dessaturares ($\Delta^6$, $\Delta^9$, $\Delta^{12}$ e $\Delta^{15}$) que sintetizam o ácido estearidônico (18:4 $\Delta^{6,9,1215}$) a partir do ácido esteárico.

Tabela 3 – Classificação baseada na composição de ácidos graxos de algumas cianobactérias (LOS; MIRONOV, 2015)

| Micro-organismo | Composição de ácidos graxos (% total) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **14:0** | **14:1** | **16:0** | **16:1** | **16:2** | **18:0** | **18:1** | **18:2** | **α-18:3** | **γ-18:3** | **18:4** |
| | | $\Delta^{9}$ | | $\Delta^{9}$ | $\Delta^{9,12}$ | | $\Delta^{9}$ | $\Delta^{9,12}$ | $\Delta^{9,12,15}$ | $\Delta^{6,9,12}$ | $\Delta^{6,9,12,15}$ |
| **Grupo 1** | | | | | | | | | | | |
| *Synechococcus elongatus* PCC 7942 | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Mastigocladus laminosus* | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Synechococcus lividus* | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Synechococcus vulcanus* | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202 | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Cyanobacterium* sp. B-1200 | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| *Synechococcus cedrorum* | - | - | + | + | - | + | + | - | - | - | - |
| **Grupo 2** | | | | | | | | | | | |
| *Prochlorococcus marinus* | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| *Synechococcus* sp. | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - | - |
| *Prochlorothrix hollandica* | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| **Grupo 3α** | | | | | | | | | | | |
| *Leptolyngbya boryana* | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| *Nostoc* sp. | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| *Anabaena* sp. | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| *Synechococcus* sp. PCC 7002 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| *Gloeobacter violaceus* | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| *Trichodesmium erythraeum* | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| **Grupo 3γ** | | | | | | | | | | | |
| *Arthrospira platensis* B-256 | + | - | + | + | - | + | + | + | - | + | - |
| *Synechocystis* sp. PCC 6714 | - | - | + | + | - | + | + | + | - | + | - |
| *Synechocystis* sp. B-274 | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - |
| **Grupo 4** | | | | | | | | | | | |
| *Tolypothrix tenuis* | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| *Synechocystis* sp. PCC 6803 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| *Lyngbya* sp. PCC 8106 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| *Nodularia spumigena* | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + |

Em geral, a composição lipídica das cianobactérias é semelhante à encontrada na membrana interna dos cloroplastos e dos tilacóides em plantas, e difere da composição das membranas da maioria das outras bactérias que contêm fosfolipídios como glicerolipídios (WADA; MURATA, 1995; ŘEZANKA et al., 2018). De acordo com Gunstone e Harwood (2007), a composição lipídica em cianobactérias é mais simples do que em microalgas, e seu perfil de ácidos graxos é similar ao dos óleos de origem vegetal utilizados na produção de biodiesel (SINGH et al., 2002), podendo ser diretamente convertidos a esse biocombustível (KARATAY; DÖNMEZ, 2011).

Em cianobactérias, os ácidos graxos majoritários possuem cadeias carbônicas de tamanho entre C14 e C18 (LOS; MIRONOV, 2015). Entretanto, alguns estudos demonstram a predominância de outros tipos de ácidos graxos (ABOIM et al., 2016; PARKER et al., 1967). Aboim e colaboradores (2016) identificaram que o ácido capróico (C6:0) foi o majoritário em linhagens de *Microcystis aeruginosa* CACIAM03, *Synechocystis* sp. CACIAM05, *Lyngbya* sp. CACIAM07, *Cyanobium* sp. CACIAM14, *Leptolyngbya* sp. CACIAM18, *Limnothrix redekei* CACIAM25 e *Planktothix pseudoagardhii* CACIAM27 com teores de até 78% do total de ácidos graxos detectados. Semelhantemente, Parker e colaboradores (1967) observaram que *Trichodesmium erythraem* Trico possui teores de ácido cáprico (C10:0) correspondente a 50% dos ácidos graxos totais. Ainda, nas espécies *Lyngbya limnetica* e *Oscillatoria foreaui* a porcentagem de ácido graxo láurico (C12:0) variou de 17% a 44% de biomassa (RAJESHWARI; RAJASHEKHAR, 2011).

A produção e a composição de lipídios em cianobactérias podem variar quantitativa e qualitativamente em função de fatores ambientais e condições de cultivo como disponibilidade de nutrientes, intensidade luminosa e temperatura. O aumento da produção de lipídios sob limitação da disponibilidade de fontes de nitrogênio, fósforo e enxofre (KUMAR et al., 2017) e a influência de baixas temperatura na manutenção da fluidez da membrana pelo aumento do número de ácidos graxos insaturados (MURATA; NISHIDA, 1987; SINGH et al., 2002; CHINTALAPATI et al., 2007) são mecanismos de adaptação ja reportados.

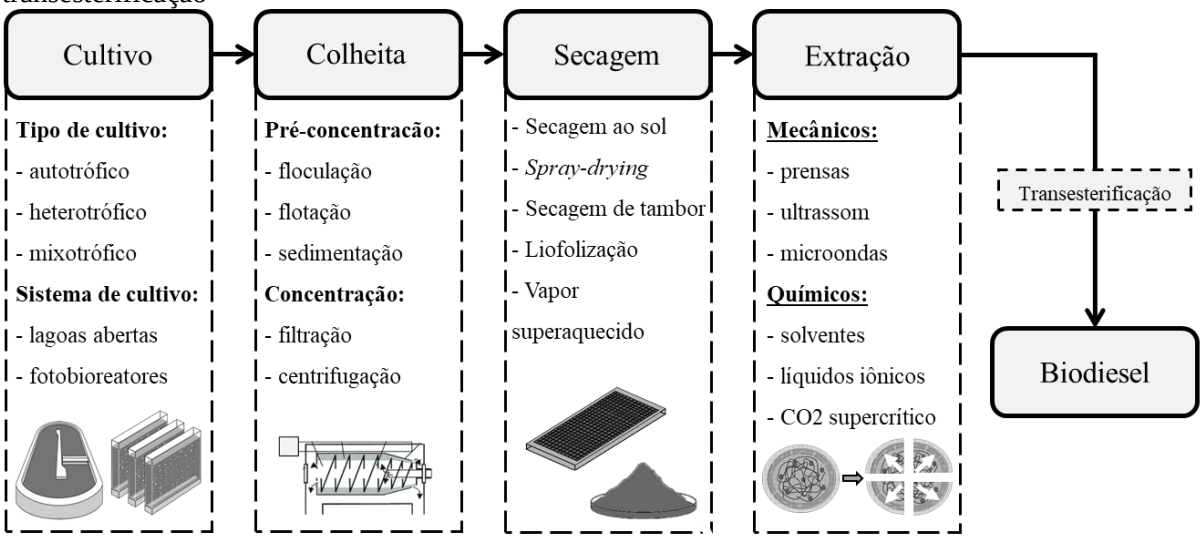
Ainda, o aumento das insaturações em lipídios contribuiu para a tolerância de um mutante de *Synechococcus* sp. PCC 7942 à altas intensidades luminosas (GOMBOS et al., 1997). Cuellar-Bermudez et al. (2015) detectaram que a limitação da luminosidade e o baixo fornecimento de $CO_2$ provocaram a redução do teor lipídico em *Synechocystis* sp. PCC6803, enquanto os seus maiores percentuais (>14% da massa seca) estavam associados com alta intensidade luminosa (>1600 µmol/m$^2$ s). Karatay e Dönmez (2011) avaliaram o acúmulo de lipídios em linhagens de cianobactérias termofílicas (*Synechococcus* sp., *Cyanobacterium aponinum* e *Phormidium* sp.) submetidas a diferentes concentrações de $NaNO_3$ e observaram que o maior teor lipídico (45%) foi detectado na menor concentração de $NaNO_3$ (0,25 g L$^{-1}$) para a linhagem *Synechococcus* sp.. Macedo e Alegre (2001) ao reduzirem a disponibilidade de nitrogênio (0,2 N) no meio de cultivo e a temperatura de incubação (25°C) verificaram aumento médio de 3 vezes na produção de lipidios em relação ao meio padrão para *Arthrospira maxima*. Cañizares-Villanueva et al. (1995) observaram o aumento da fração lipídica em *Arthrospira maxima* e *Phormidium* sp. cultivadas em efluente de suinocultura com

aeração comparadas ao meio de cultivo sintético. Em relação à fase de crescimento, Vargas et al. (1998) verficaram que o conteúdo lipídico de *Nostoc paludosum* dobrou da fase lag para a fase log, e aumentou em 70% na ausência da fonte de nitrogênio. Liu et al. (2014) observaram o aumento da proporção de SQDG/FG na fase estacionária de três linhagens cianobacterianas testadas ao avaliar o efeito das fases de crescimento sobre a fração lipídica.

## 2.5 Produção de biodiesel a partir da biomassa de micro-organismos fotossintéticos e qualidade do biodiesel de cianobactérias

A produção de biodiesel a partir da biomassa de micro-organismos fotossintéticos envolve múltiplas etapas que incluem o cultivo para obtenção de biomassa, a sua separação do meio de cultivo, a extração da fração lipídica e sua conversão em biodiesel (GULDHE et al., 2014). A Figura 2 apresenta, em sequência, as principais etapas utilizadas no processamento de biomassa seca para obtenção do biodiesel, bem como exemplos de métodos e tecnologias aplicáveis a cada uma delas. A seleção dos métodos e tecnologias mais adequados e eficientes em cada etapa do processo produtivo deve ser feita criteriosamente para que a sua viabilidade econômica seja alcançada. Segundo Machado e Atsumi (2012), cerca até 50% do custo total de produção desse biodiesel está diretamente relacionado com a obtenção da matéria-prima lipídica a ser utilizada (rompimento celular, extração e separação). Os altos custos de produção global do biodiesel derivado de micro-organismos fotossintéticos ainda representam um dos principais problemas para a sua competitividade frente ao diesel comum (COLLET et al., 2014). Com isso, a busca por soluções mais economicamente viáveis e sustentáveis é essencial para ampliação desse mercado. Recentemente, Zhu et al. (2017) apontaram as principais estratégias para redução dos seus custos de produção: manipulação metabólica e gênica, isolamento de linhagens promissoras, desenvolvimento de biorreatores de alta eficiência, cultivo em efluentes e $CO_2$ residual, cultivo contínuo e semi-contínuo, cultivo em consórcios, cultivo com a água residuária do próprio sistema, coleta máxima da biomassa, e desenvolvimento de métodos de extração de lipídios e transesterificação de alta eficiência. Além disso, é necessário o desenvolvimento de processos integrados que permitam o completo aproveitamento da matéria-prima utilizada (CARDOZO et al., 2007) e de subprodutos como, por exemplo, a valorização do glicerol derivado da transesterificação do óleo e a digestão anaeróbica da biomassa residual.

Figura 2 – Principais etapas do processo de obtenção de biocombustíveis derivados de micro-organismos fotossintéticos (adaptado de Mata e Martins, 2012, e Mubarak et al., 2014). Nesse processo, os micro-organismos fotossintéticos são cultivados em sistemas abertos ou fechados. A biomassa gerada é concentrada, coletada e seca. Em seguida ela passa por um processo de lise celular e a fração lipídica é extraída. Os lipídios são convertidos a biodiesel pelo processo de transesterificação




Na etapa de cultivo, a utilização de efluentes líquidos (industriais e domésticos) e gasosos ($CO_2$) têm sido uma das principais estratégias propostas (MARKOU e GEORGAKAKIS, 2011). Cañizares e Domínguez (1993) e Cañizares-Villanueva et al. (1994) testaram *Arthrospira maxima* e *Phormidium* sp. no tratamento de efluentes de suinocultura e obtiveram sucesso na remoção de nutrientes. Similarmente, El-Sheekh et al. (2014) reportaram a utilização de *Nostoc muscorum* e *Anabaena subcylindrica* no tratamento de efluentes domésticos e industriais destinados a produção de sal e refrigerantes. De acordo com Bhatnagar et al. (2011) os custos totais com fornecimento de carbono orgânico em sistemas de cultivo mixotrófico em larga escala podem chegar a 80%. Considerando que o cultivo mixotrófico de cianobactérias pode ser utilizado para a remoção de contaminates orgânicos em efluentes (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011), com consequente geração de biomassa cianobacteriana, uma estratégia de biorrefinarias pode ser utilizada reduzindo custos de produção e valorando a biomassa formada.

Alguns trabalhos destacam sistemas de cultivo que propiciam a coleta da biomassa mais facilmente ou utilizam cianobactérias filamenosas que favoreçam sua separação do meio de cultivo. Esson et al. (2011) cultivaram linhagens de cianobactérias bentônicas (que crescem aderidas a algum substrato) com morfologia filamentosa em fotobiorreatores plásticos, as quais ao se desprenderem da superfície aderida, elas formam uma densa camada flutuante, facilitando sua coleta. De acordo com Quintana et al. (2011) as cianobactérias

unicelulares apresentam os melhores perfis de ácidos graxos para a produção de biodiesel (alta quantidade de ácidos graxos monoinsaturados), no entanto são difíceis de serem coletadas. Assim, como demonstrado Miranda et al. (2015), essas espécies podem ser cultivadas em consórcio com micro-organismos filamentosos o que facilita sua recuperação do meio de cultivo. Nesse estudo, a linhagem fúngica *Aspergillus fumigatus* foi cultivada em consórcio com a cianobactéria unicelular *Synechocystis* PCC6803 e seus mutantes modificados para permitir a secreção de ácidos graxos livres no meio de cultivo, com o objetivo de facilitar a floculação da biomassa para produção de biocombustíveis em larga escala. Os resultados demonstraram um processo eficiente de coleta da biomassa, acúmulo de lipídios e otimização da composição de ácidos graxos.

A utilização de biomassa seca para a extração de lipídios e produção de biodiesel é mais eficiente do que a extração de biomassa úmida (WAHLEN et al., 2011). Entretanto, os altos custos envolvidos para a secagem da biomassa representam um problema comum nessa etapa. Dessa forma, o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas de transesterificação *in situ* direto da biomassa úmida tem ganhado destaque. Nesse método, a extração dos lipídios e a transesterificação ocorrem simultaneamente em um reator (LEPAGE; ROY, 1984; WAHLEN et al., 2011), tornando possível a obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de fosfolipídios polares, ácidos graxos livres e triglicerídeos.

Outra dificuldade encontrada para produção de biodiesel é a extração dos lipídios intracelulares de micro-organismos fotossintéticos eucarióritos, pois esses organismos apresentam paredes celulares bastante robustas e espessas com componentes de sílica (diatomáceas), celulose (*Chlorella* sp.) e quitina (D'HONDT et al., 2017). Nesse sentido, as cianobactérias apresentam vantagens em relação aos micro-organismos eucarióticos tais como melhor degradabilidade da biomass e uma parede celular igualmente espessa, mas de menor complexidade e diversidade (DOMOZYCH, 2011; MÖLLERS et al., 2014), e a secreção de ácidos graxos livres (LIU; SHENG; CURTISS III, 2011).

A secreção de ácidos graxos livres no meio extracelular representa uma estratégia promissora em cianobactérias e têm sido considerada uma das tecnologias com maior potencial para a produção de biodiesel em larga escala (SARSEKEYEVA et al., 2015). Os ácidos graxos livres podem, então, ser convertidos a biodiesel pelo processo de esterificação que consiste na reação do ácido graxo com um álcool na presença de um catalisador ácido. De acordo com Liu, Sheng e Curtiss III (2011), a habilidade de secretar ácidos graxos livres, pode contribuir para redução de no mínimo 70% do processo de produção do biocombustível. Para tanto, é necessário a utilização de técnicas de engenharia

metabólica como a eliminação de vias inibitórias/concorrentes de síntese de ácidos graxos e promoção do fluxo de carbono em vias metabólicas de ácidos graxos e fotossíntese (PARMAR et al., 2011). Recentemente, Motwalli et al. (2017) desenvolveram um método de seleção de linhagens cianobacterianas para a produção de ácidos graxos livres baseado nas suas características genéticas (proteômica). Por meio desse método, os autores observaram um maior potencial de produção desse tipo de ácido graxo por linhagens unicelulares como *Prochlorococcus marinus* e *Synechococcus* sp.

A qualidade do biodiesel é determinada por meio da análise de sua composição química e das suas propriedades físicas. Considerando o perfil de ácidos graxos (tamanho de cadeia carbônica e presença de insaturações) encontrado na matéria-prima lipídica é possível estimar a qualidade do combustível produzido. Assim com base na identificação desse perfil e utilizando equações empíricas pode-se calcular os principais parâmetros de qualidade do biodiesel e, consequentemente avaliar de forma preliminar o potencial dessas fontes (KNOTHE, 2005; 2012). Essa abordagem tem sido bastante explorada nos estudos que buscam micro-organismos fotossintéticos com potencial para a produção de biodiesel (FRANCISCO et al., 2010; STANSELL et al., 2012; TALEBI et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015; ANAHAS; MURALITHARAN, 2018). Entretanto, informações sobre as propriedades do biodiesel derivado desse tipo de matéria-prima são escassas principalmente por ser uma área de pesquisa emergente.

Nascimento et al. (2013) selecionaram linhagens de microalgas com potencial para produção de biodiesel utilizando como critério os perfis dos ácidos graxos. Com base na estimativa de número de cetano, índice de iodo, estabilidade oxidativa e outros esses autores conseguiram classificar as linhagens em grupos distintos e concluíram que para a obtenção da melhor qualidade de biodiesel seria necessário uma mistura de óleos obtidos de diferentes culturas. Seguindo a mesma abordagem, Talebi et al. (2013) aplicaram uma análise de componentes principais (PCA) e obtiveram 5 grupos distintos de microalgas. Igualmente, esses autores propuseram uma mistura de óleos provenientes de diferentes culturas para obter um biodiesel de melhor qualidade.

Da Rós et al. (2012) investigaram a produção de biodiesel derivado da linhagem cianobacteriana *Microcystis aeruginosa* NPCD-1 cultivada em meio ASM-1 sob iluminação constante. Esses autores detectaram produtividade de biomassa de 46,92 ± 3,84 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ e teor lipídico de 28,10 ± 1,47%, sendo o processo de conversão da fração lipídica em biodiesel realizada por transesterificação enzimática empregando uma preparação comercial de lipase (Novozym® 435). Os autores notaram a semelhança do perfil de ácidos graxos do óleo

cianobacteriano com o óleo de palma, com a predominância de ácidos graxos como o palmítico (C16:0) e o oleico (C18:1). Para a transesterificação dos ácidos graxos, diferentes solventes foram testados e os autores obtiveram rendimentos entre 80 a 100%, com a melhor solubilidade e miscibilidade observada quando o terc-butanol foi utilizado como solvente para condução da etanólise. De modo esperado, o biodiesel resultante apresentou propriedades similares aos encontrados para o biodiesel derivado de óleo de palma como teor de éster (98,1%), número de cetano (59,5), índice de saponificação (210) e índice de iodo (57 g $I_2$ 100 $g^{-1}$).

Em estudo realizado por Anahas e Muralitharan (2015), análises multicritério foram aplicadas aos parâmetros físico-químicos obtidos de onze linhagens de cianobactérias heterocitadas, e confirmaram a importância do perfil FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) na determinação de tais parâmetros de qualidade. Dentre as linhagens estudadas, dois isolados apresentaram características promissoras para a produção de biodiesel: *Calothrix* sp. MBDU 013 e *Anabaena sphaerica* MBDU 105. De forma geral, a estimativa dos parâmetros de qualidade dos biodieseis das linhagens testadas demonstrou que (i) o número de cetano foi superior ao mínimo estabelecido nas normas estadunidense (47) e européia (51); (ii) que o índice de iodo ficou abaixo do limite máximo de 120 (EN 14214), com exceção da linhagem *Nostoc piscinale* MBDU 013; (iii) que o ponto de entupimento de filtro a frio (propriedade relacionada à performance do biodiesel em condições de baixa temperatura) variou de -0,49 a 69,84ºC; (iv) que o fator de cadeia longa saturada variou de 5,08% a 27,47% (*Anabaena* sp. MBDU 006 e *Nostoc piscinale* MBDU 013, respectivamente); (v) que o valor de aquecimento permaneceu entre 39,8 e 10,4 MJ $Kg^{-1}$ (faixa esperada para o biodiesel, 10-12% inferior ao diesel de origem fóssil que é em média de 46 MJ $Kg^{-1}$,*Ramirez-Veruzco et al., 2012); e (vi) que a densidade estimada para todas as linhagens ficou na faixa ideal de acordo com as normas EN 14214 e ASTM D6751-02 (0,86 e 0,90 g $m^{-3}$).

Mais recentemente, Anahas e Muralitharan (2018) utilizaram abordagem semelhante e selecionaram três linhagens cianobacterianas (*Nostoc calcicola* MBDU 602, *Desmonostoc muscorum* MBDU 105 e *Anabaena variabils* MBDU 013) com base nos parâmetros de qualidade calculados. As principais características observadas foram número de cetano alto (53 a 72), baixo índice de iodo (5,15 a 98,85 g $l_2$ / 100 g de biodiesel), baixo grau de insaturações (17,59 a 49,93%), ponto de entupimento de filtro a frio maior do que o disposto na legislação, densidade entre 0,87 e 0,88 g $cm^3$ e valores de aquecimento entre 39,8 e 40,4 MJ $Kg^{-1}$. Diferentemente, Aboim et al. (2016) estimaram as propriedades dos biodieseis derivados de oito linhagens de cianobactérias cultivadas em dois meios de cultivo distintos,

utilizando o *software* BiodieselAnalyzer© (TALEBI et al., 2014). Os resultados obtidos indicaram que duas linhagens unicelulares cultivadas em meio BG11 foram as que apresentaram as características mais adequadas para produção desse biocombustível. *Synechocystis* sp. CACIAM05 apresentou resultados satisfatórios para propriedades como número de cetano (57,92) e índice de iodo (7,19 g $I_2$ 100 $g^{-1}$), enquanto que *Microcystis aeruginosa* CACIAM03 apresentou número de cetano maior que 51, índice de iodo de 7,30 g $I_2$ 100 $g^{-1}$ e maior porção de ácidos graxos monoinsaturados (55,93%). Ainda, do total de ácidos graxos detectados, 46,76% corresponderam ao ácido oleico (C18:1), importante na produção de biodiesel com alta qualidade (TALEBI et al., 2014).

## 2.6 A vinhaça como meio de cultivo para micro-organismos fotossintéticos

A vinhaça, também conhecida como vinhoto, tiborna ou restilo, é um líquido residual derivado da destilação do vinho, que é gerado a partir de um processo fermentativo para obtenção de álcool. Nesse processo, diferentes tipos de matérias-primas podem ser utilizadas como a cana-de-açúcar (América do Sul) e a beterraba (Europa), resultando em características distintas do resíduo formado (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Alta concentração de matéria orgânica, baixo pH, corrosividade acentuada e alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), são características que conferem a esse efluente de cor escura grande potencial poluidor e alto valor fertilizante (SILVA et al., 2007).

Em geral, a vinhaça gerada nas usinas de cana-de-açúcar no Brasil, é aproveitada na fertiirrigação das lavouras de cana da própria usina a fim de reduzir custos com adubo comercial e consumo de água. Entretanto, esse tipo de atividade deve ser controlada para que reduza os riscos de lixiviação de elementos minerais e orgânicos (tipicamente em quantidades desbalanceadas na vinhaça) e consequente contaminação das águas subterrâneas (SILVA et al., 2007). Considerando que o Brasil é atualmente o maior produtor de etanol e açúcar do mundo (FILOSO et al., 2015) e que, de acordo com Buss et al. (1978) para se obter um litro de álcool, cerca de 13 litros de vinhaça é produzida, a necessidade de reaproveitamento desse resíduo se torna uma questão primordial no contexto da sustentabilidade.

Kligerman e Bouwer (2015) destacam que o pioneirismo do Brasil na produção de etanol de forma economicamente viável pode refletir no interesse do país na busca pela diversificação das fontes de energia disponíveis, favorecendo a proteção ambiental, a segurança na disponibilidade de combustível e envolvimento social. Nesse sentido, as microalgas e as cianobactérias podem colaborar significativamente para o desenvolvimento de um modelo produtivo sustentável baseado no cultivo desses micro-organismos em efluentes

agroindustriais e esgotos domésticos visando à produção de biomassa com valor agregado e mitigação de $CO_2$ (RAWAT et al., 2011; USHER et al., 2014; SANTAN et al., 2017). Além da remoção dos nutrientes, esses micro-organismos modificam seu metabolismo como resposta à disponibilidade de nutrientes. Em estudos conduzidos por Samantaray et al. (2011), uma linhagem de cianobactéria diazotrófica (*Aulosira fertilissima)* foi utilizada para o tratamento de efluentes de aquicultura em um sistema recirculatório verificando o potencial de produção do polímero polihidroxibutirato (PHB). Os resultados revelaram a redução quase total de nutrientes como amônia, nitrito e fosfato, e a produção de até 92 $g.m^{-2}$ de polihidroxibutirato que corresponde a uma produção anual de aproximadamente 14 toneladas de PHB.

A aplicação dessa abordagem integrada pode resolver dois dos principais problemas atuais: o manejo de resíduos e a crise energética. Entretanto, a baixa competitividade em relação às culturas agrícolas continua a representar o maior empecilho para viabilidade econômica do biodiesel obtido de microalgas (QUINTANA et al., 2011; VADNA et al., 2015). Com isso, os esforços para reduzir os custos de produção tem incentivado as pesquisas voltadas para a otimização do processo produtivo. Em estudo realizado por Jawaharraj et al. (2015), meios de cultivo suplementados com resíduos de processamento de cana-de-açúcar e cloreto de sódio (fonte de nutrientes de baixo custo) foram utilizados para o crescimento de *Myxosarcina* sp., resultando no aumento da produção de biomassa e da produtividade lipídica. Budiyono et al. (2014) avaliaram o potencial uso da vinhaça de melaço de cana-de-açúcar digerida como meio de cultivo para *Spirulina platensis*, com diferentes configurações de nutrientes. Os resultados revelaram que a utilização de 0,8% da vinhaça digerida com nutrientes sintéticos (50%) representou a melhor opção para o cultivo do isolado com uma taxa de crescimento de 0,220 $dia^{-1}$.

# 3. HIPÓTESE

A produção de lipídios e a composição de ácidos graxos de cianobactérias são influenciadas pelo cultivo em meios de cultura suplementados com vinhaça e pelas fases de crescimento.

# 4. OBJETIVOS

## 4.1. Objetivo principal

Esse estudo tem como objetivo principal avaliar o crescimento de cianobactérias em meios de cultivo suplementados com vinhaça e seus efeitos na produção de lipídios totais e na composição de ácidos graxos.

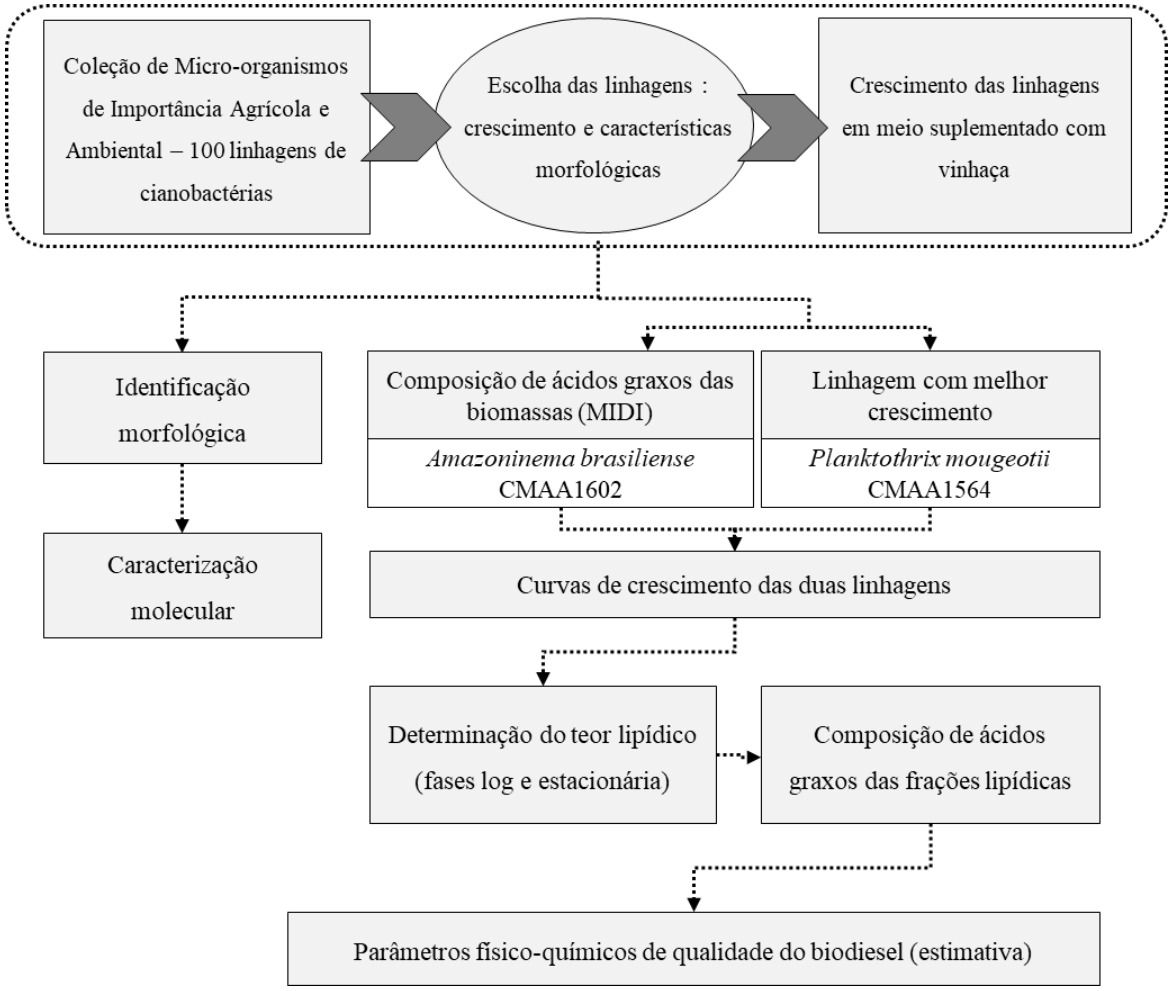
## 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de crescimento de cianobactérias de diferentes grupos morfológicos em meios de cultura e água ultrapura suplementados com concentrações crescentes de vinhaça.
- Determinar a composição de ácidos graxos nas biomassas das linhagens cultivadas em meio com e sem a adição de vinhaça.
- Caracterizar morfologicamente e filogeneticamente utilizando sequências do gene de codifica para o rRNA 16S as linhagens selecionadas.
- Avaliar as curvas de crescimento de duas linhagens com características de interesse (elevada taxa de crescimento e perfil de ácidos graxos da biomassa) cultivadas em meios com e sem adição de vinhaça, e relacionar suas fases de crescimento com a produção de lipídios totais e sua composição de ácidos graxos.
- Estimar a qualidade dos biodieseis derivados dessas linhagens a partir da composição de ácidos graxos de suas frações lipídicas utilizando equações empíricas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica empregada neste trabalho seguiu a sequência apresentada no fluxograma da Figura 3. Após a seleção das linhagens de cianobactérias, o trabalho seguiu três caminhos distintos: i) identificação e caracterização molecular das linhagens de cianobactérias, ii) análise da composição de ácidos graxos das suas biomassas sob as mesmas condições de cultivo, e iii) análise da curva de crescimento duas linhagens mais promissoras, determinação do teor lipídico e composição de ácidos graxos da fração lipídica, e estimativa da qualidade do biodiesel derivado desses óleos.

Figura 3 - Fluxograma da abordagem metodológica empregada



### 5.1. Obtenção, cultivo e manutenção das linhagens de cianobactérias

Neste trabalho, foram utilizadas 11 linhagens de cianobactérias isoladas de amostras de água coletadas em três rios da Amazônia - Amazonas, Solimões e Negro (Tabela 4) (GENUÁRIO et al., 2017) e depositadas na Coleção de Micro-organismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA/Embrapa – Jaguariúna, SP). A coleção possui 100 linhagens de cianobactérias obtidas no âmbito do projeto "Análise do microbioma do Rio Amazonas e seus afluentes: biogeografia e sua contribuição na fixação de $N_2$" (FAPESP: 14/26131-7).

Para a seleção das linhagens, buscou-se observar características fenotípicas de interesse como velocidade de crescimento, produção de biomassa e variedade morfológica (unicelulares, filamentosas homocitadas e heterocitadas), visto a importância dessas para a produção em larga escala (BOROWITZKA, 1992; GRIFFITHS; HARRISON, 2009). Além disso, priorizou-se a escolha de representantes de grupos de cianobactérias já descritos na literatura com potencial para a produção de biodiesel (ANAHAS; MURALITHARAN, 2015; JAWAHARRAJ et al., 2015, 2016; MODIRI et al., 2015; ABOIM et al., 2016), baseado na identificação morfológica.

Durante todo o período de experimentos, as linhagens foram mantidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL de volume, contendo 50 mL de meio de cultura específico: BG11 (STANIER et al., 1971), $BG11_0$ (BG11 sem a fonte de nitrogênio) e AA (ALLEN, 1968; ALLEN; ARNON, 1955) (Tabela 1), em câmara de crescimento. Após a repicagem, as culturas foram incubadas a 25 ± 1 ºC, sob iluminação fluorescente com irradiância de 2500 lux e fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro, em condições estáticas. Esporadicamente as culturas foram agitadas manualmente e suas condições monoespecíficas foram verificadas com frequência.

Tabela 4 – Linhagens de cianobactérias estudadas, sua origem e meio de cultivo. *Linhagem isolada de uma amostra de perifíton coletada no rio Solimões

| Morfologia | Linhagem (código) | Identificação morfológica | Origem (rio) | Meio de cultivo |
|---|---|---|---|---|
| Unicelular | CMAA1599 | *Chroococcidiopsis* sp. | Negro | BG11 |
| Heterocitadas | CMAA1601 | *Microchaete* sp. | Amazonas | $BG11_0$ |
| | CMAA1610 | *Nostoc* sp. | Amazonas | AA |
| Homocitadas | CMAA1554 | *Alkalinema* sp. | Amazonas | BG11 |
| | CMAA1556 | *Pantanalinema rosaneae* | Amazonas | BG11 |
| | CMAA1557* | *Planktothrix mougeotti* | Solimões | BG11 |
| | CMAA1660 | *Leptolyngbya* sp *latu sensu* | Amazonas | BG11 |
| | CMAA1604 | *Leptolyngbya* sp. *latu sensu* | Amazonas | BG11 |
| | CMAA1602 | *Amazoninema brasiliense* | Solimões | BG11 |
| | CMAA1563 | *Cephalothrix komarekiana* | Solimões | BG11 |
| | CMAA1564 | *Planktothrix mougeotiii* | Amazonas | BG11 |

## 5.2. Identificação morfológica

A avaliação morfológica das linhagens de cianobactérias foi feita com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica DM5000B) equipado com uma câmera Leica DFC500. A caracterização morfológica baseou-se no levantamento dos caracteres morfológicos diacríticos das linhagens de cianobactérias e comparação com bibliografia especializada, seguindo a chave de classificação descrita pelo Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology (CASTENHOLZ, 2015), Anagnostidis e Komárek (1985; 1988; 1990), Komárek e Anagnostidis (1986; 1989; 1999), Hoffmann et al. (2005) e Komarék et al. (2014), e artigos com a descrição de novos gêneros de cianobactérias (VAZ et al., 2015; MALONE et al., 2015; BAGCHI et al., 2017).

## 5.3. Caracterização molecular

### 5.3.1. Extração de DNA e amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S

A extração de DNA dos isolados foi realizada utilizando o *kit* MOBIO UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do gene RNAr 16S foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o conjunto de iniciadores oligonucleotídeos: 27F1 (5'-AGAGTTTGATCCTGCTCAG-3') e 1494Rc (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (NEILAN et al., 1997) sob as seguintes condições: 95 ºC/3 min; 30 ciclos 94 ºC/10 s, 50 ºC/20 s, 72 ºC/1 min; extensão final a 72 ºC/7 min., em termociclador. A verificação da integridade e qualidade dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose 1,2%, após corrida eletroforésica (GENUÁRIO et al., 2013; 2017).

### 5.3.2. Clonagem e transformação

Os produtos de PCR obtidos foram clonados utilizando o *kit* “pGEM®-T Easy Vector System I” (Promega) e a transformação por choque térmico foi realizada conforme as recomendações do fabricante. A presença dos insertos nas células transformadas foi verificada por meio de PCR das colônias (GENUÁRIO et al., 2013; 2017).

### 5.3.3. Confirmação da inserção dos fragmentos de interesse e sequenciamento

Os produtos de PCR clonados foram reamplificados por PCR utilizando *kit* “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems/Life Technologies, Foste City, CA, USA). Na reação utilizou-se 200 ηg de DNA plasmidial contendo o inserto [extraído pelo método de hidrólise alcalina descrita por Birnboim e Doly (1979)], 5 ρmol do iniciador M13F (5’-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3’) e SP6 (5’-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3’), além de outros seis iniciadores (357F, 357R, 704F, 704R, 1114F, 1114R) (LANE et al., 1991), visando o fechamento interno das sequências de RNAr 16S. Após a amplificação dos fragmentos de interesse, as amostras foram submetidas à precipitação e sequenciamento dos fragmentos de DNA (GENUÁRIO et al., 2013; 2017).

### 5.3.4. Processamento e análise filogenética das sequências

As sequências de nucleotídeos geradas foram processadas para a remoção de bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade > 20) e assentadas em *contigs* por meio do pacote que contém os programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998). Essas sequências foram então comparadas com outras depositadas no banco público *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta *Basic Local Alighment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção da árvore filogenética do gene que codifica para o RNAr 16S, foi usado o programa MrBayers v.3.2.5 com 5,000,000 de gerações (RONQUIST; HUELSENBEL, 2003), usando o modelo evolutivo GTR+I+G indicado pelo programa jModelTest (POSADA, 2008). As sequências das linhagens utilizadas neste trabalho e outras obtidas do *GenBank*, foram alinhadas e editadas usando o pacote de programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011).

## 5.4. Teste de tolerância em meio suplementado com vinhaça

### 5.4.1. Coleta, armazenamento e utilização da vinhaça

A vinhaça usada em todos os experimentos foi coletada em maio de 2016 em uma usina de prdução de açúcar e álcool na região de Iracemápolis-SP. Cerca de 30 L de vinhaça foi coletada de um duto logo após a etapa de destilação e resfriamento do resíduo. Em seguida, a amostra foi levada ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa em Jaguariúna-SP, onde foi imediatamente congelada e mantida em freezer a -20 ºC até o momento de sua utilização. A caracterização físico-química da amostra bruta de vinhaça foi realizada e os resultados são apresentados na Tabela 5. Para a sua utilização, a vinhaça foi submetida a uma filtração simples com algodão e foi incorporada ao meio de cultivo sempre antes de ser esterelizado.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos da amostra de vinhaça

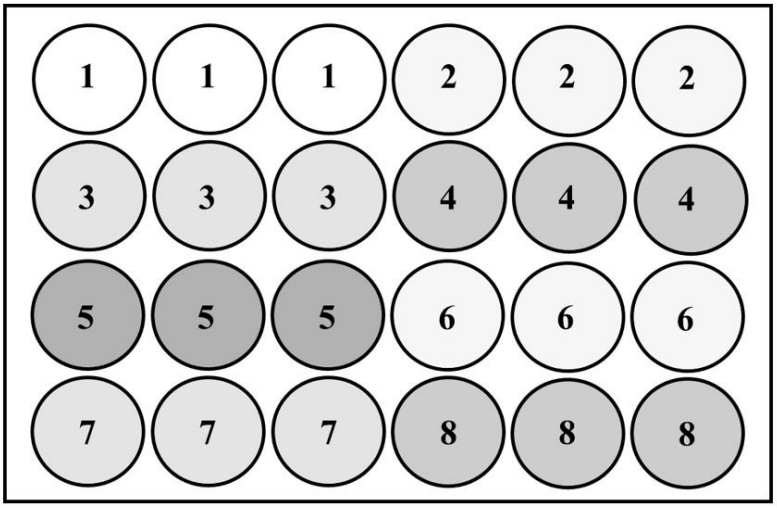
| Parâmetro | Resultados | Unidades |
|---|---|---|
| Cálcio | 991,3 | mg $L^{-1}$ Ca |
| Carbono Orgânico Total | 71,6 | % C |
| DBO (5dias – 20 ºC) | 62122 | mg $L^{-1}$ $O_2$ |
| DQO | 166148 | mg $L^{-1}$ $O_2$ |
| Fósforo | 44,97 | mg $L^{-1}$ P |
| Magnésio | 510,1 | mg $L^{-1}$ Mg |
| Nitrogênio Total | 82,1 | mg $L^{-1}$ N |
| Sólidos Dissolvidos Totais | 6917 | mg $L^{-1}$ |
| Sólidos Suspensos Totais | 2590 | mg $L^{-1}$ |
| Sólidos Totais | 46756 | mg $L^{-1}$ |
| Sólidos Totais Voláteis | 31104 | mg $L^{-1}$ |

### 5.4.2. Ensaio de crescimento em meio suplementado com vinhaça

Para avaliar a capacidade das linhagens cianobacterianas de crescer em meio suplementado com vinhaça em concentrações crescentes, todas as linhagens foram pré-cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 125 mL do seu respectivo meio de manutenção (BG11, $BG11_0$ e AA) por 15 dias sob as mesmas condições descritas no item 4.1. Após o crescimento, a biomassa de cada linhagem foi centrifugada (9000 rpm, 5 min.), lavada (duas vezes), ressuspendida com meio de cultura fresco e homogeinizada com auxílio de seringas estéreis (fluxo com seringa para o rompimento de agregados celulares).

Em placas para cultura de células de 24 poços (Jet Biofil, China), 2 mL de cada combinação de meio de cultura sem e com adição de vinhaça nas concentrações de 1%, 2,5%, 5% e 10% (v/v) e de vinhaça diluída em água ultrapura em 2,5%, 5% e 10% (v/v) com pH ajustado para 7,0, foram adicionados em cada poço em triplicatas, como disposto na Figura 4. Em seguida, 250 µL dos inóculos cianobacterianos foram transferidos para cada poço. As placas foram incubadas sob as mesmas condições descritas no item 4.1. Após 15 dias, o crescimento foi avaliado visualmente e a linhagem com melhor crescimento foi selecionada. Além disso, as células foram coletadas por centrifugação para análise da sua composição de ácidos graxos.

Figura 4 – Exemplo da disposição dos meios de cutivo (tratamentos) na placa de cultura de células




Tratamentos: 1. Meio de cultura. 2. Meio de cultura + 1% de vinhaça (v/v). 3. Meio de cultura + 2,5% de vinhaça (v/v). 4. Meio de cultura + 5% de vinhaça (v/v). 5. Meio de cultura + 10% de vinhaça (v/v). 6. Água ultrapura + vinhaça 2,5% (v/v). 7. Água ultrapura + vinhaça 5% (v/v). 8. Água ultrapura + vinhaça 10% (v/v).

### 5.4.3. Análise da composição de ácidos graxos das biomassas cianobacterianas

A extração de ácidos graxos direto das biomassas das cianobactérias foi realizada seguindo as etapas de saponificação, metilação, extração e lavagem, conforme metodologia de Sasser (1990). Após a transferência das biomassas para o tubo adequado (Kimax – 100 x 13 mm), foi adicionado 1 mL do reagente de saponificação (45g de NaOH em 150 mL de metanol:água – 1:1) seguido de agitação por 10 segundos (vortex) e incubação em banho-maria (95-100 ºC) por 5 minutos. Após o seu resfriamento em banho com água à temperatura ambiente, os tubos foram agitados por 10 segundos, retornados ao banho-maria por mais 25 minutos e novamente resfriados em água à temperatura ambiente. Em seguida, a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos teve início com a adição do reagente de metilação (1:1,32 metanol: 6 N HCl), seguido por agitação durante 10 minutos, incubação em

banho-maria a 80 ºC por mais 10 minutos e resfriamento em banho com água à temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se 1,25 mL do reagente de extração (hexano:éter metil *terc*-butílico - MTBE) e as amostras foram levadas ao rotator clínico (FISHER M346) por 10 minutos. A fase aquosa (inferior) foi descartada e 3 mL do reagente de lavagem básica (NaOH 1,2% v/v) foram adicionados às amostras que, retornaram ao rotator clínico por mais 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 3 minutos (Fanem Excelsa Baby 2 206-R) e 300 µL da fase superior foram transferidos para vials de 2 mL. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa usando o Sherlock Microbial Identification System (MIDI, Inc. Newark, NJ, USA), versão 6.1, 2008.

## 5.5. Análise do crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564

Nessa etapa, buscou-se direcionar os ensaios para a identificação das principais características de crescimento de duas linhagens: *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothix mougeotii* CMAA1564. A primeira foi selecionada devido a composição de ácidos graxos da biomassa quase que em sua totalidade composta por ácidos graxos saturados e monoinsaturados, favoráveis para a produção de biodiesel (ŘEZANKA et al., 2003; KNOTHE, 2009; JAWAHARRAJ et al., 2015). A segunda, foi selecionada devido ao maior acúmulo de biomassa observado durante o seu cultivo, quando comparado às demais linhagens.

### 5.1.1. Preparação dos pré-inóculos

Visando a obtenção de biomassa para os ensaios da curva de crescimento, as linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotti* CMAA1564 foram pré-cultivadas em 400 mL de meio BG11 por 15 dias a 25 ± 1 ºC, sob iluminação fluorescente com irradiância de 2500 lux e fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro, em condições estáticas. Após o crescimento, a biomassa foi centrifugada (9000 rpm por 5 minutos - Hettich Rotina 420R) e ressuspendida em 40 mL de meio de cultura BG11 com o auxílio de uma seringa. Essa suspensão celular foi particionada em alíquotas de 10 mL que foram inoculadas em frascos do tipo Erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL de meio BG11 sem e com a adição de vinhaça a 1% e 2,5% (v/v). Os frascos foram mantidos nas mesmas condições de cultivo anteriores. Um terceiro e último cultivo foi realizado sob as mesmas condições e as

biomassas, coletadas por centrifugação, foram ressuspendidas em 100 mL do seu respectivo meio de cultura e homogeinizadas com o auxílio de seringas plásticas estéreis.

### 5.5.2. Análise do crescimento

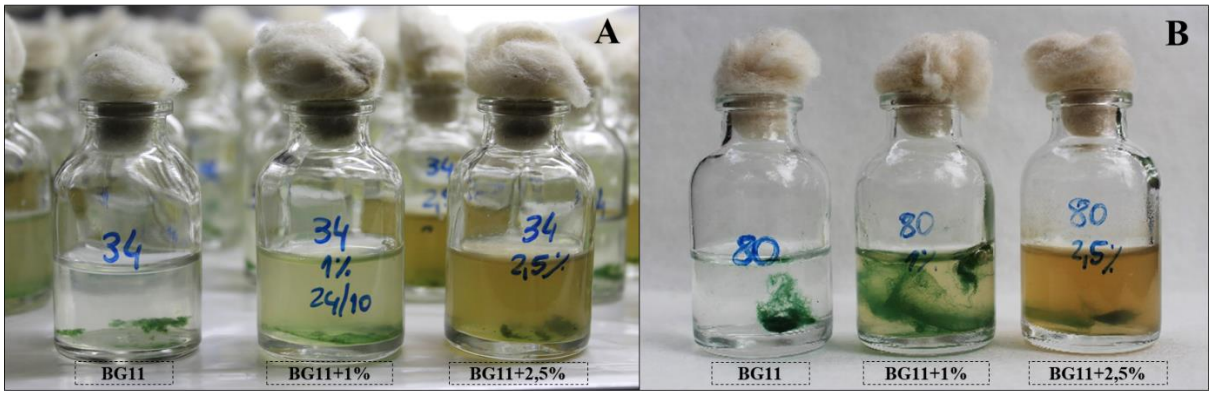
A identificação das fases de crescimento (lag, log e estacionária) das duas linhagens selecionadas foi realizada por meio da correlação entre os resultados obtidos pelos métodos gravimétrico (massa seca) e espectrofotométrico (densidade ótica - $DO_{680nm}$ e$DO_{750nm}$).

Para tanto, 1 mL de cada pré-inóculo preparado foi inoculado em 10 mL de do seu respectivo meio (sem e com a adição de vinhaça a 1% e 2,5% v/v), em frascos de penicilina de 25 mL e incubados em sala de cultivo com temperatura de 25 ± 1 ºC, sob iluminação fluorescente com irradiância de 2500 lux e fotoperíodo de 14 h claro: 10 h escuro, em condições estáticas (Figura 5). O pH dos meios foram ajustados para 7,0 antes de serem esterelizados. O acompanhamento do crescimento das culturas foi realizado por meio de coletas diárias nos 3 primeiros dias e a cada 3 dias, em triplicatas, até atingir a fase estacionária. Nos dias das coletas, também foi feita a medição do pH dos meios de cultura.

Com auxílio de um sistema de filtração com bomba a vácuo, alíquotas de 7 mL de cada frasco foram filtradas em membranas de nitrato de celulose de 0,22 µm de porosidade (Unifil), previamente secos em estufa a 60 ºC e pesados em balança analítica. Em seguida, as membranas foram alocadas em placas de Petri de vidro para secagem em estufa a 80 ºC por 24h. Após a secagem, as membranas foram colocadas em dessecador e tiveram sua massa determinada em balança analítica. A diferença entre o peso seco das membranas antes e após a filtragem das culturas foi utilizada para a determinação da biomassa seca de cada amostra coletada.

A partir dos resultados de biomassa seca utilizados na curva de crescimento, foi possível calcular a produtividade de biomassa (P) e a taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{máx}$). Para tanto, a equação a seguir foi aplicada: $P = (MSf-MSi) / t$ , onde, P representa a produtividade da biomassa (mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$), MSi é a massa seca no dia zero de cultivo (mg $L^{-1}$), MSf é a massa seca no último dia de cultivo e t é o tempo em dias entre o primeiro e o último dia. A $\mu_{máx}$ foi utilizada para determinar o ponto de maior incremento de biomassa na fase logaritmica (log).

Figura 5 – Ensaio para determinação do padrão de crescimento. (A) Culturas da linhagem *A. brasiliense* CMAA1602 cultivada em meio BG11, BG11 suplementado com vinhaça 1% e 2,5% (v/v). (B) Culturas da linhagem *P. mougeotii* CMAA1564 cultivada em meio BG11, BG11 suplementado com vinhaça 1% e 2,5% (v/v)



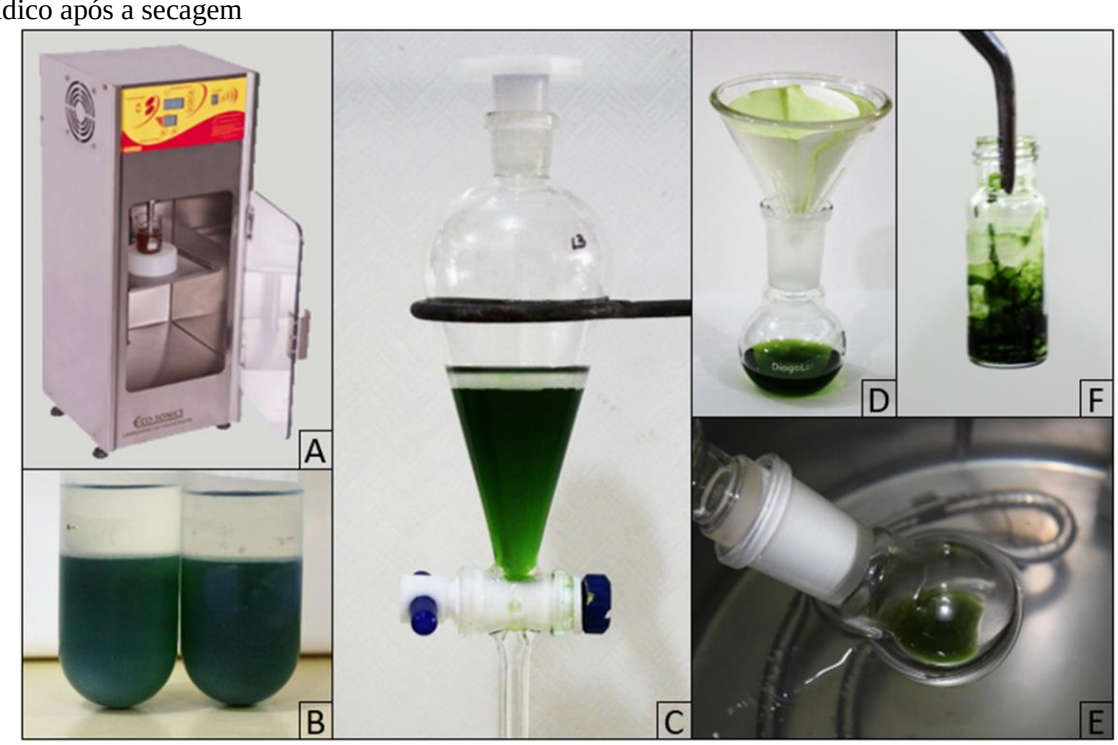

## 5.6. Extração de lipídios

Com a identificação das fases de crescimento, as linhagens *A. brasiliense* CMAA1602 e *P. mougeotti* CMAA1564 foram cultivadas sob as mesmas condições descritas no item 4.5. Os dias de coletas das biomassas foram definidos para a fase log no ponto de coleta com o maior valor de $\mu_{máx}$ encontrado e na fase estacionária como o ponto seguinte após a entrada nessa fase. Assim, após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação (9000 rpm por 5 minutos), e lavadas três vezes com água deionizada para retirada de sais presentes no meio de cultivo. Em seguida, elas foram congeladas a -80 ºC, liofilizadas e armazenadas a -20 ºC. O método utilizado para a extração dos lipídios foi o método de Folch et al. (1957) empregando ultrassom de sonda e outras modificações propostas por Silva et al. (2014). Para tanto, cerca de 50 mg de cada biomassa liofilizada foi pesada (triplicatas) em balança analítica (Ohaus Adventure™ Pro AV264CP) e sua umidade ajustada para 45% (DA RÓS et al., 2017).

Em tubos com capacidade de 30 mL, adicionou-se 5 mL de uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1) a biomassa, juntamente com um terço do volume de clorofórmio. Os tubos foram levados ao sonicador ultrassônico (Ultronique, Modelo QR500) a uma potência ultrassônica de 200 W por 10 minutos, para a completa homogenização e rompimento das células. A separação da mistura de solventes da biomassa foi realizada por centrifugação a 2000g por 5 minutos (centrífuga Sorvall RC 5B Plus) e o sobrenadante foi coletado. Esse procedimento foi realizado três vezes e os sobrenadantes coletados foram armazenados no mesmo tubo. Em seguida, 1/4 do volume total de sobrenadante recolhido foi adicionado de uma solução aquosa de KCl 0.88%. Após agitação vigorosa por alguns

segundos, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e tiveram a fase inferior transferida para funis de separação (Figura 6). Uma mistura de metanol:água (2:1) foi então adicionada e, após a separação das fases, a fase aquosa superior foi descartada e a fase clorofórmica (inferior) contendo os lipídios foi transferida para um novo tubo. Na sequência, foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água e o conteúdo foi filtrado em papel de filtro quantitativo (Unifil). Os extratos lipídicos foram evaporados em rota-evaporador para remoção do solvente, transferidos para frascos de 2 mL com massa conhecida e armazenados em estufa a 60 ºC até a obtenção de massa constante. Após a pesagem, os frascos contendo os extratos lipídicos foram armazenados a 5 ºC no escuro, como descrito por Halim et al. (2010).

Figura 6 - Extração de lipídios de biomassa cianobacteriana pelo método de Folch et al. (1957) empregando ultrassom de sonda. (A) Sonicador ultrassônico. (B) Mistura da biomassa seca com os solventes. (C) Separação da fase orgânica. (D) Filtração. (E) Evaporação do solvente. (F) Extrato lipídico após a secagem




O teor lipídico da biomassa foi determinado por método gravimétrico em triplicatas e calculado pelo percentual de lipídios em g/100 g de biomassa, seguindo a equação 1, onde $M_{LF}$ é a massa final de lipídios e $M_{BS}$ é a massa da biomassa seca:

$$\text{Lipídios Totais (LT) (\%)} = [M_{LF}\ (g) / M_{BS}\ (g)] \times 100 \qquad (1)$$

A produtividade lipídica volumétrica (PL) foi determinada a partir dos resultados de produtividade de biomassa (P) e teor de lipídios totais (LT), por meio da equação 2 (LIU et al., 2011).

$$PL = P \times LT \quad (2)$$

Os valores obtidos para o teor de lipídios totais e produtividade lipídica volumétrica foram testados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre as fases de crescimento e os meios de cultivos.

### 5.7. Obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos frações lipídicas

Para a extração de ácidos graxos das frações lipídicas, adicionou-se 1,5 mL de clorofórmio nos frascos onde elas estavam armazenadas para a solubilização do extrato e, em seguida, as amostras foram transferidas para os tubos Kimax (100 x 13 mm). A fase orgânica foi evaporada em atmosfera de nitrogênio antes de iniciar a etapa de saponificação.

Para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos, a metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 4.4.3. Para a análise da composição de ácidos graxos, o cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) foi utilizado, como descrito no próximo item (4.8).

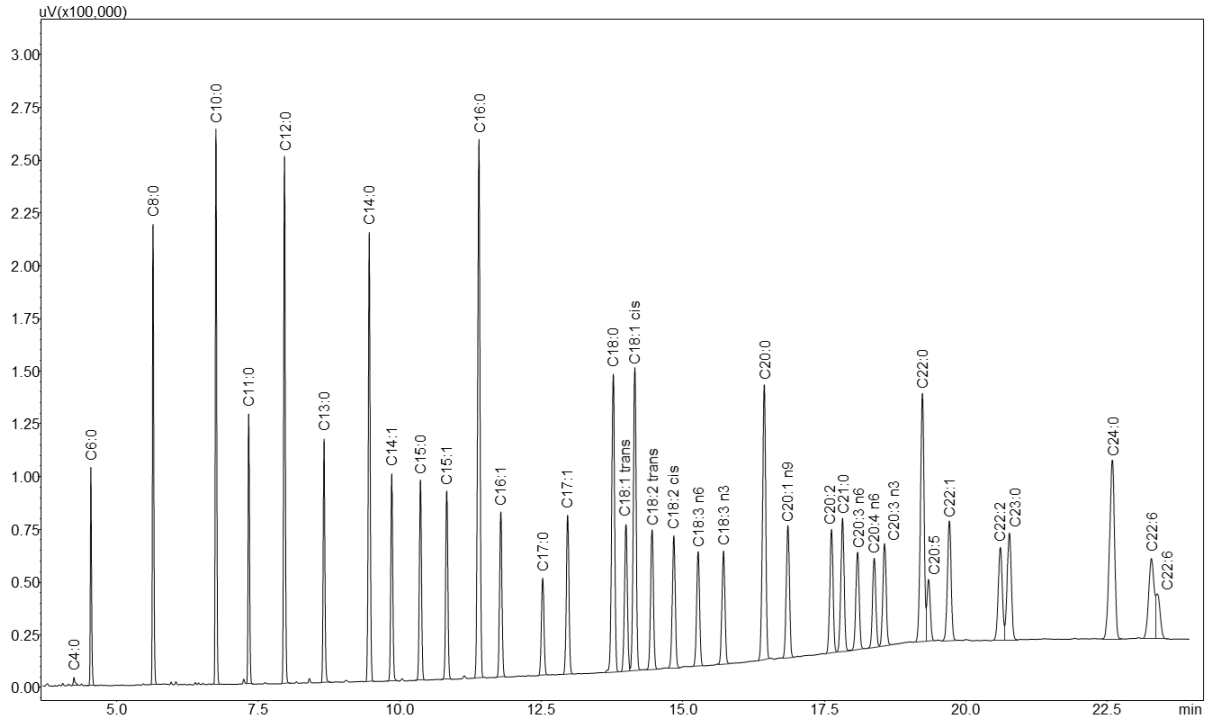
### 5.8. Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa

A composição de ácidos graxos das amostras de biomassa e fração lipídica das linhagens cianobacterianas foi determinada qualitativamente por cromatografia gasosa após a preparação dos ésteres metílicosde ácidos graxos, seguindo o método Ce 1-62 da American Oil Chemists' Society (AOCS) (2004). As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com injetor do tipo *split-splitless*, autoinjetor AOC-5000 Shimadzu e detector de ionização por chama (FID, do inglês *Flame Ionization detector*). Os dados foram obtidos através do software GC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão). Uma coluna capilar do tipo DB-23 Agilent (50% cianopropil – metilpolisiloxano) com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme, foi utilizada. O gás de arraste utilizado foi o $N_2$ com fluxo de 1,0 mL $min^{-1}$. A programação do forno foi inicialmente 70 ºC por 1 min com rampa de

aquecimento de 25 ºC/min até 175 ºC seguida de 4 ºC/min até 230 ºC mantendo-se nessa temperatura constante por 20 minutos. No detector, a temperatura utilizada foi 280 ºC e os fluxos dos gases para alimentação do detector foram mantidos em 40 e 450 mL $min^{-1}$ de $H_2$ e ar sintético, respectivamente, o $N_2$ como gás de makeup foi utilizado com fluxo de 30 mL $min^{-1}$. As injeções (em duplicatas) foram realizadas no modo *split*, com a split:ratio de 20:1, volume de injeção de 1 µL com temperatura do injetor a 250 ºC.

A caracterização dos componentes graxos foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção dos 37 ésteres metílicos de um padrão analítico da Supelco® (37 Component F.A.M.E. C4-C24 Mix) com os das amostras (Figura 7). Para a preparação do padrão, o conteúdo da ampola (100 mg) foi diluído em, aproximadamente, 2 mL de hexano:MTBE (1:1) e transferido para frascos de 20 mL de vidro. Após a evaporação em atmosfera de nitrogênio, o frasco foi pesado novamente, e procedeu-se a preparação da solução estoque (20 mg $mL^{-1}$) com a adição de 5 mL de hexano:MTBE. A solução foi armazenada em freezer (-20 ºC) em frasco de borosilicato vedado com Teflon (PTFE). A partir da solução estoque, soluções de trabalho foram preparadas por meio da sua diluição nas concentrações de 2,5 mg $mL^{-1}$ e 5 mg $mL^{-1}$. Para cada sequência de análises, o padrão foi injetado no equipamento nessas concentrações para confirmação dos tempos de retenção e posterior caracterização. O limite de detecção (LD) para cada éster metílico de ácido graxo foi calculado como sendo três vezes a área do pico do ruído. Assim, os picos com concentração abaixo do limite de detecção, nos tempos de retenção do padrão, não foram considerados.

Figura 7 - Cromatograma dos 37 ésteres metílicos de ácidos graxos do padrão analítico da Supelco® 37 Component F.A.M.E. C4-C24 Mix, obtido em uma das análises




## 5.9. Parâmetros empíricos de qualidade do biodiesel baseado na composição de ácidos graxos

A partir dos perfis de ácidos graxos obtidos das frações lipídicas das linhagens *A. brasiliense* CMAA1602 e *P. mougeotti* CMAA1564, equações matemáticas foram utilizadas para estimar a qualidade do biodiesel derivado desses óleos. Um total de 11 propriedades físico-químicas foi calculado: i) número de cetano (NC) - Eq. (3), ii) índice de saponificação (IS) - Eq. (4), iii) índice de iodo (II) - Eq. (5), iv) grau de insaturação (GI) - Eq. (6), v) fator de cadeia longa saturada (FCLS) - Eq. (7), vi) ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF) - Eq. (8), vii) ponto de névoa (PN) – Eq. (9), viii) ponto de fluidez (PF) - Eq. (10), ix) viscosidade ($\upsilon$) – Eq. (11), x) densidade ($\rho$) – Eq. (12) e xi) maior valor de aquecimento (MVA) – Eq. (13) (FRANCISCO et al., 2010; KNOTHE, 2002; SARIN et al., 2009; RAMIREZ-VERDUZCO et al., 2012; ANAHAS; MURALITHARAN, 2015).

$$NC = 46{,}3 + (5458/IS) - (0{,}225 \times II) \quad (3)$$

Os valores de IS (mg KOH $g^{-1}$)e II (g $I_2$ 100 $g^{-1}$ de óleo) foram obtidos a partir das equações (4) e (5), onde o *D* é o número de ligações duplas, *M* é a massa molecular do ácido graxo (g/mol) e *N* é a porcentagem de cada açido graxo na mistura.

$$IS = \Sigma(560 \times N) / M \quad (4)$$

$$II = \Sigma (240 \times D \times N) / M \quad (5)$$

O GI (%) foi calculado de acordo com a equação (6), onde MS é a soma das porcentagens dos ácidos graxos monoinsaturados e PS a soma dos poli-insaturados.

$$GI = MS + (2x\ PS) \quad (6)$$

Para o cálculo do FCLS (%) considerou-se os valores dos ácidos graxos de cadeia longa (C16, C18, C20,C22 e C24, em %), conforme a equação (7).

$$FCLS = (0{,}1 \times C16) + (0{,}5 \times C18) + (1 \times C20) + (1{,}5 \times C22) + (2 \times C24) \quad (7)$$

O PEFF (ºC) foi calculado segundo a equação (8), relacionada com o resultado de FCLS.

$$PEFF = (3{,}1417 \times FCLS) – 16{,}477 \quad (8)$$

Para a estimativa do ponto de névoa (ºC) e de fluidez (ºC), apenas a porcentagem do ácido palmítico (C16:0) foi utilizada (C16) nas equações (9) e (10), respectiva.

$$PN = (0{,}526 \times C16) – 4{,}992 \quad (9)$$

$$PF = (0{,}571 \times C16) – 12{,}240 \quad (10)$$

A viscosidade cinemática ($\upsilon$) a 40 ºC em $mm^2\ s^{-1}$, densidade ($\rho$) a 20 ºC em g $m^{-3}$ e o valor de aquecimento (VA) em MJ $kg^{-1}$ foram determinados seguindo as equações (11), (12) e (13), respectivamente.

$$\ln(\upsilon_i) = -12{,}503 + 2{,}496 \times \ln(M_i) – 0{,}178 \times N \quad (11)$$

$$\rho i = 0{,}8463 + 4{,}9/Mi + 0{,}0118 \times N \quad (12)$$

$$MVA = -46{,}19 – 1794/Mi – 0{,}021 \times N \quad (13)$$

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 6.1. Identificação morfológica e caracterização molecular

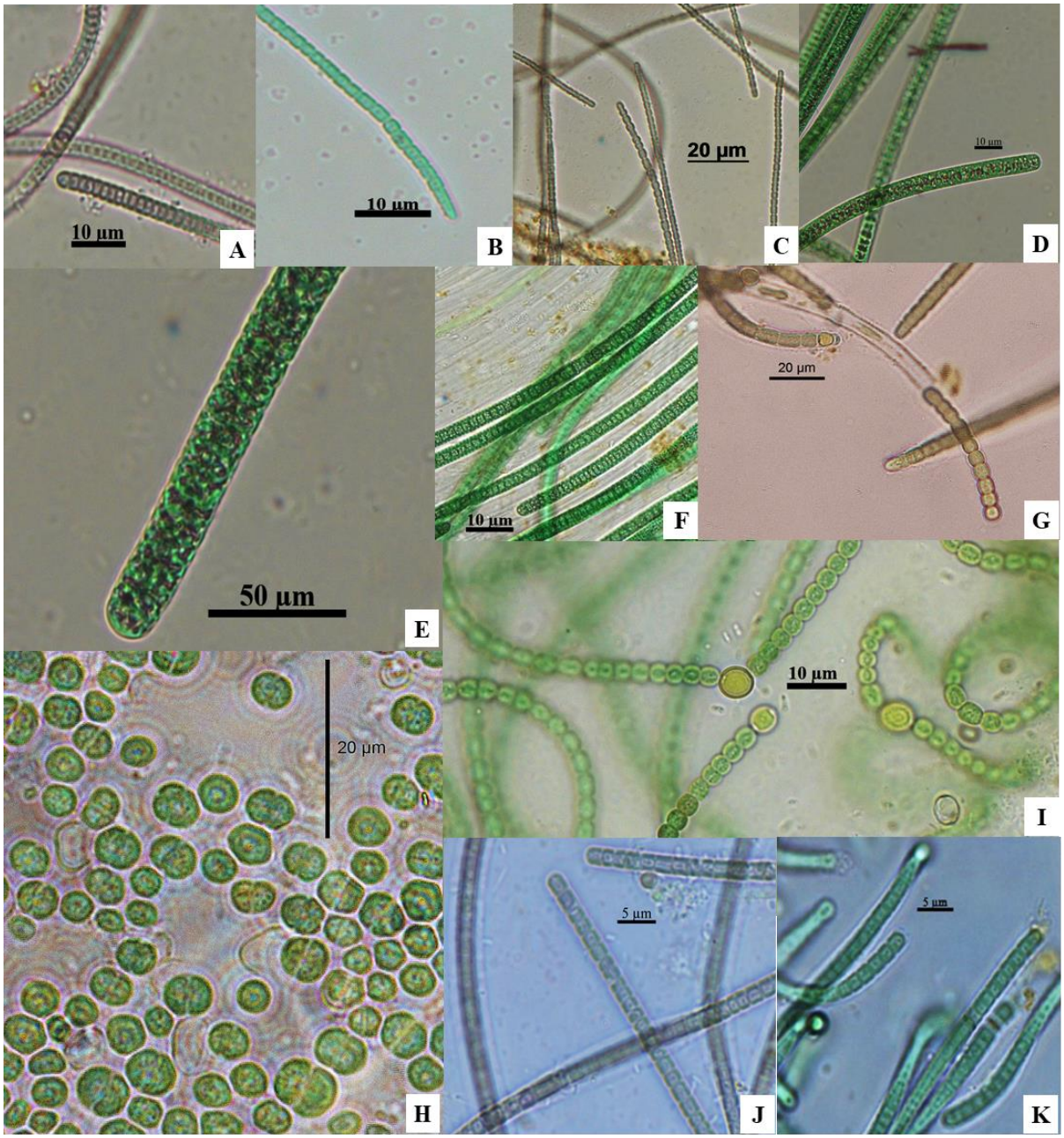
As onze linhagens de cianobactérias utilizadas nesse trabalho foram identificadas com base em critérios morfológicos como pertencentes a quatro ordens distintas: Synechococcales (cinco linhagens), Nostocales (duas linhagens), Oscillatoriales (três linhagens) e Chroococcales (uma linhagem) (KOMÁREK et al., 2014) (Tabela 6).

Tabela 6 – Identificação morfológica das 11 linhagens cianobacterianas usadas neste estudo

| Ordem | Família | Identificação morfológica | Código CMAA |
|---|---|---|---|
| Chroococcidiopsidales | Chroococcidiopsidaceae | *Chroococcidiopsis* sp. | CMAA1599 |
| Nostocales | Rivulareaceae | *Microchaete* sp. | CMAA1601 |
| | Nostocaceae | *Nostoc* sp. | CMAA1610 |
| Synechococcales | Pseudanabaenaceae | *Alkalinema* sp. | CMAA1554 |
| | | *Pantanalinema* sp. | CMAA1556 |
| | Leptolyngbyaceae | *Leptolyngbya* sp. | CMAA1660 |
| | | *Leptolyngbya* sp. | CMAA1604 |
| | | *Leptolyngbya* sp. | CMAA1602 |
| Oscillatoriales | Oscillatoriaceae | *Cephalothrix* sp. | CMAA1563 |
| | Microcoleaceae | *Planktothrix* sp. | CMAA1557 |
| | | *Planktothrix* sp. | CMAA1564 |

Na Figura 8 são apresentadas fotomicrografias de microscopia óptica das linhagens identificadas.

Figura 8 – Fotomicrografis das linhagens de cianobactérias estudadas. (A) *Alkalinema* sp. CMAA1554. (B) *Leptolyngbya* sp. CMAA1602. (C) *Pantanalinema* sp. CMAA1556. (D) *Cephalothrix* sp. CMAA1563. (E) *Planktothrix* sp. CMAA1564. (F) *Planktothrix* sp. CMAA1557. (G) *Microchaete* sp. CMAA1601. (H) *Chroococcidiopsis* sp. CMAA1599. (I) *Nostoc* sp. CMAA1610. (J) *Leptolyngbya* sp. CMAA1604. (K) *Leptolyngbya* sp. CMAA1660




Visando a confirmação das identificações morfológicas e seguindo os critérios da taxonomia polifásica, foi realizado o sequenciamento do gene que codifica para o rRNA 16S das linhagens utilizadas nesse estudo. Com base nas sequencias obtidas foi realizada a comparação dessas sequências com aquelas disponíveis nos bancos de dados públicos do NCBI/GenBank (Tabela 7).

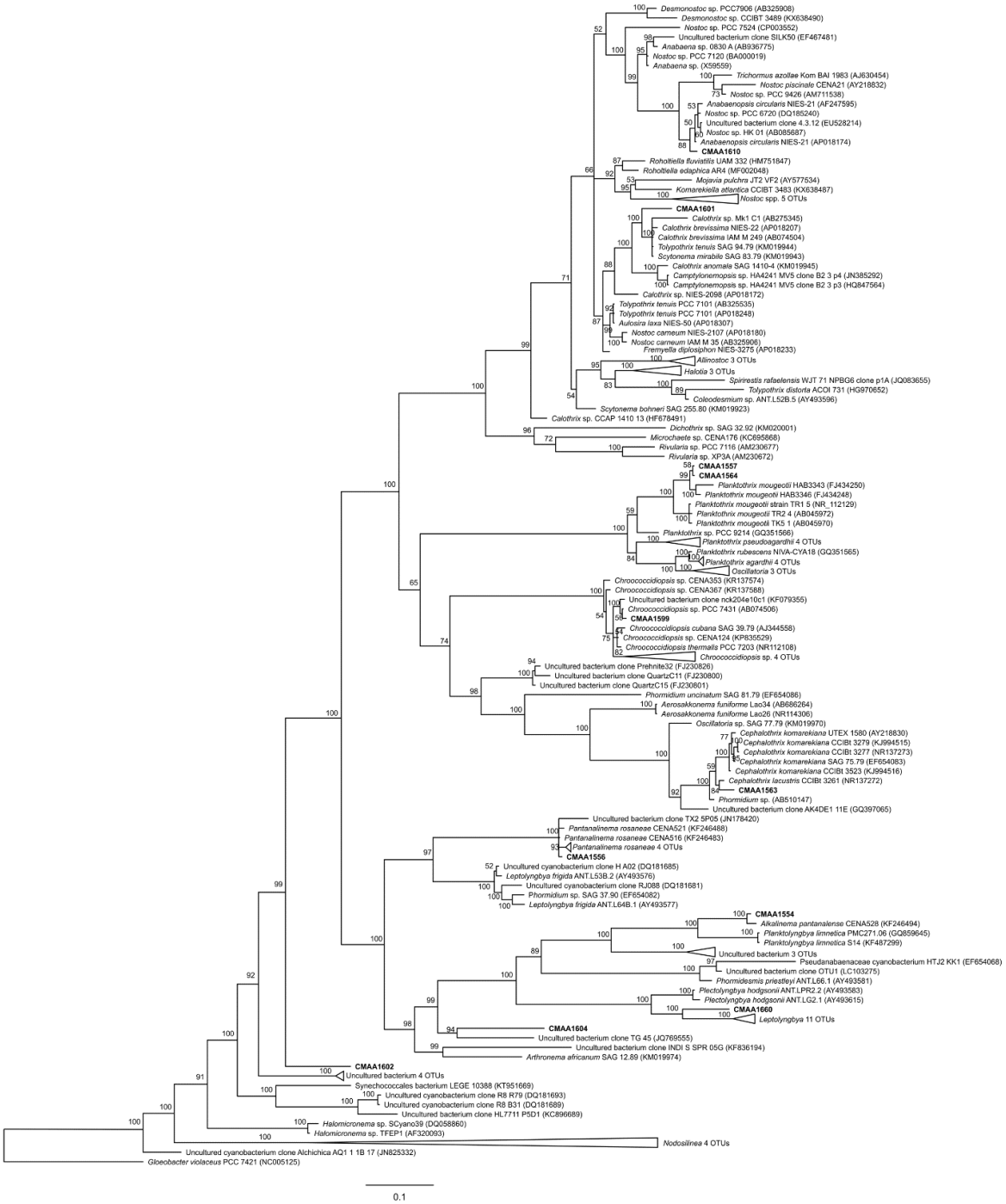
Tabela 7 – Valores de Identidade (%) das sequências do gene RNAr 16S obtidas das linhagens de cianobactérias comparados com sequências disponíveis no *GenBank*

| Linhagem | Tamanho do fragmento (pb) | Organismo mais próximo (número de acesso) | C (%)* | I (%)** |
|---|---|---|---|---|
| | | *Alkalinema pantanalense* CENA531 (KF246497) | 98 | 99 |
| CMAA1554 | 1452 | *Alkalinema pantanalense* CENA529 (KF246495) | 98 | 99 |
| | | *Alkalinema pantanalense* CENA530 (KF246496) | 98 | 99 |
| | | *Pantanalinema rosaneae* CENA516 (KF246483) | 98 | 99 |
| CMAA1556 | 1455 | *Pantanalinema rosaneae* CENA521 (KF246488) | 98 | 99 |
| | | *Pantanalinema rosaneae* CENA539 (KF246503) | 98 | 99 |
| | | *Planktothrix mougeotii* HAB3346 (FJ434248) | 99 | 99 |
| . CMAA1557 | 1455 | *Planktothrix mougeotii* HAB3343 (FJ434250) | 98 | 99 |
| | | *Planktothrix mougeotii* HAB3348 (FJ434249) | 98 | 99 |
| | | *Cephalothrix lacustris*CCIBt 3261 (NR_137272) | 98 | 99 |
| CMAA1563 | 1454 | *Cephalothrix komarekiana* CCIBt 3523 (KJ994516) | 100 | 99 |
| | | *Cephalothrix komarekiana* SAG 75.79 (EF654083) | 99 | 99 |
| | | *Planktothrix mougeotii* HAB3346 (FJ434248) | 99 | 99 |
| CMAA1564 | 1455 | *Planktothrix mougeotii* HAB3343 (FJ434250) | 98 | 99 |
| | | *Planktothrix mougeotii* HAB3348 (FJ434249) | 98 | 99 |
| | | *Chroococcidiopsis* sp. PCC 7431 (AB074506) | 98 | 99 |
| CMAA1599 | 1458 | *Chroococcidiopsis thermalis* sp. PCC 7203 (NR_112108) | 98 | 99 |
| | | *Chroococcidiopsis* sp. CENA124 (KP835529) | 97 | 99 |
| | | *Calothrix brevissima* NIES-22 (AP018207) | 100 | 99 |
| CMAA1601 | 1452 | *Calothrix brevissima* IAM M-249 (AP074504) | 98 | 98 |
| | | *Tolypothrix tenuis* SAG 94.79 (KM019944) | 98 | 98 |
| | | Uncultured bacterium clone SGUS38 (FJ202307) | 98 | 94 |
| . CMAA1602 | 1455 | Uncultured bacterium clone SGUS1412 (FJ202607) | 98 | 94 |
| | | Uncultured bacterium clone HL7711_P5D1 (KC896689) | 100 | 94 |
| | | *Pantanalinema rosaneae* CENA516 (KF246483) | 98 | 94 |
| CMAA1604 | 1452 | *Pantanalinema rosaneae* CENA539 (KF246503) | 98 | 94 |
| | | *Pantanalinema rosaneae* CENA537 (KF246501) | 98 | 94 |
| | | *Anabaenopsis circulans* NIES-21 (AP018203) | 100 | 99 |
| CMAA1610 | 1454 | *Nostoc* sp. HK-01 (AB085687) | 98 | 99 |
| | | *Nostoc* sp. PCC6720 (DQ185240) | 97 | 99 |
| | | *Leptolyngbya boryana* NIES-2135 (AP018203) | 100 | 96 |
| CMAA1660 | 1457 | *Leptolyngbya boryana* dg5 (AP014642) | 100 | 96 |
| | | *Leptolyngbya boryana* IAM M-101 (AP018203) | 100 | 96 |

*Cobertura. **Identidade

Os valores de identidade das sequências obtidas variaram de 97 a 100% quando comparadas com as sequências mais próximas disponíveis no banco de dados do NCBI. Utilizando as sequências gênicas de RNAr 16S geradas a partir das linhagens estudadas e aquelas que apresentaram maiores porcentagens de identidade, foi construída uma árvore filogenética para avaliar suas relações evolutivas (Figura 9).

Figura 9 – Análise filogenética de sequências do gene RNAr 16S das 11 linhagens de cianobactérias gerada por inferência bayesiana. Os valores nos nós indicam as probabilidades posteriores bayseanas




A árvore filogenética (Figura 9) contendo cada linhagem revelou um agrupamento coerente, indicando uma nítica separação entre as ordens. As análises moleculares ajudaram a identificar, portanto, o gênero ao qual pertence cada organismo estudado.

A linhagem CMAA1599 se posicionou em um clado robusto com outras linhagens do gênero *Chroococcidiopsis*. Organismos deste gênero apresentam colônias esféricas ou semi-

esféricas envoltas bainha, ou solitárias, reprodução típica por fissão múltipla e formação de baeócitos. Essas cianobactérias são bem conhecidas por sua resistência a condições extremas, tendo sido encontrados em fontes termais, em águas geladas da Antártida, em águas hipersalinas e, no Brasil, já foram relatados em solo de manguezais e em filosfera de plantas da Mata Atlântica (GONÇALVES, 2011; BRANCO et al., 1996; DOR et al., 1991; POINTING et al., 2009).

As linhagens CMAA1554 e CMAA1556 foram identificadas tanto morfologicamente quanto por métodos moleculares como pertencentes aos gêneros *Alkalinema* e *Pantanalinema*, respectivamente. Esses dois gêneros foram descritos a partir de linhagens isoladas de ambientes alcalinos extremos do Pantanal brasileiro. *Alkalinema* é caracterizada como uma cianobactéria filamentosa, homocitada, com coloração verde oliva em meio de cultivo, filamentos emaranhados e flexíveis, possuindo células levemente constrictas, bainha firme, hialina e ligada ao tricoma, com célula apical arredondada. Já a *Pantanalinema* é caracterizada por filamentos homocitados, de coloração avermelhada ou amarronzada, com tricomas geralmente organizados em um agregado, semelhante a um biofilme; as células são isodiamétricas e apresentam uma mucilagem difluente, e são imóveis; a célula apical é estreita e arredondada (VAZ et al., 2015). Inicialmente, dada as características extremas do ambiente em que foi isolada, hipotetizou-se que esses gêneros pudessem ter uma distribuição mais limitada, entretanto este trabalho é o segundo registro destes gêneros no ambiente amazônico (LIMA et al., 2017), revelando que estes organismos provavelmente têm sua distribuição mais ampla.

A linhagem CMAA1601 inicialmente foi classificada como uma *Microchaete* sp., devido a presença de tricomas heteropolares, com heterócitos basais, bainha filme e estreita. Entretanto, essa linhagem apresentou um percentual de identidade de 99% com sequências do gênero *Calothrix* (Tabela 7) e agrupou-se com outras linhagens desse gênero próximo da espécie-tipo *Calothrix brevissima* IAM M-249 e distante das sequências de *Microchaete*. O gênero *Calothrix* é caracterizado por apresentar filamentos heteropolares, formando talos que se assemelham a tufos presos ao substrato pela parte basal; a bainha é evidente, firme e homogênea, com células cilíndricas ou discoides na porção basal. No Brasil, esse gênero não é muito comumente relatado, mas algumas espécies já foram reportadas na região sudeste do país (SANT'ANNA et al., 1991).

As linhagens CMAA1557 e CMAA1564 foram classificadas tanto pela morfologia como pelos métodos moleculares como pertencentes ao gênero *Planktothrix*, provavelmente sendo classificado como a espécie *P. mougeotii*, dado a formação de um clado único, robusto

e separado das demais espécies do gênero. As espécies deste gênero são cacacterizadas por apresentarem tricomas solitários, retos ou levemente constritos, sem bainha mucilaginosa e imóveis. As células são, normalmente, quadráticas a subquadráticas, verde-azuladas, com presença de aerótopos e célula apical cônica (ANAGNOSTIDIS; KOMÁREK, 1988). Os membros desse gênero são frequentementes relacionados a florações intensas em regiões temperadas e produção de cianotoxinas (LIN et al., 2010).

A linhagem CMAA1563 posicionou-se em um clado robusto com predominância de linhagens do gênero *Cephalotthrix*, confirmando a identificação morfológica. O gênero *Cephalothrix* surgiu a partir de um desdobramento de linhas do gênero *Phormidium* isoladas de diferentes ambientes (alcalinos, água doce e água de aquários) e é a primeira vez que é descrito na região amazônica. A caracterização desse gênero se dá pela presença de talo fasciculado, com tricomas verde-azulados, cilíndricos, retos e levemente atenuados, podendo apresentar leve constricção nas paredes celulares; apresenta bainha firme e hialina, com células mais largas que compridas e presença de caliptra (MALONE et al., 2015). Embora as maiores identidades tenham sido com sequências da espécie *C. komarekiana*, na árvore esta linhagem ficou agrupada com a *Cephalothrix lacustris* CCIBt 3261, de modo que análises mais robustas, como a análise de região intergênica ou de outros genes marcadores devem ser feitas para melhor a definição taxonômica.

A linhagem CMAA1610 foi morfologicamente identificada como *Nostoc*, um gênero com filogenia conhecidamente controversa e em constante mudança (BAGCHI et al., 2017). Vários gêneros já foram descritos a partir de desdobramentos de linhagens anteriormente classificadas como sendo pertencentes ao gênero *Nostoc*, *como Allinostoc*, *Desmonostoc*, *Halotia*, *Nodularia*, *Roholtiella* e *Trichormus* (BAGCHI et al., 2017; HROUZEK et al., 2013; GENUÁRIO et al., 2013). A linhagem CMAA1610 mostrou agrupamento com um clado de sequências de linhagens de *Nostoc*, *Anabaenopsis* e *Trichormus*, necessitanto também de análises mais aprofundadas para definição filogenética deste organismo. Por essa razão, neste trabalho, a classificação morfológica foi mantida para esta linhagem.

Duas linhagens, CMAA1604 e CMAA1660 foram morfologicamente classificadas como *Leptolyngbya* sp. Entretanto podem se tratar de novas espécies ou gêneros. A linhagem CMAA1660 mostrou maiores valores de identidade com sequências de *Leptolyngbya boryana*, entretanto estes valores foram de apenas 96%. Na árvore filogenética, essa linhagem formou um ramo externo ao grupo com onze linhagens da espécie *L. boryana*. Embora desses indícios, estudos mais aprofundados são necessários para a identificação desta linhagem como uma espécie nova. Já a linhagem CMAA1604, mostrou identidade de 94% com sequências de

linhagens de *Pantanalinema*, mas posicionou-se bem distante deste gênero na árvore filogenética, agrupando-se com uma sequência de bactéria não cultivável. Este pode ser um gênero novo, mas é preciso a identificação de outros isolados para aumentar a robustez deste agrupamento e a confirmação do novo clado.

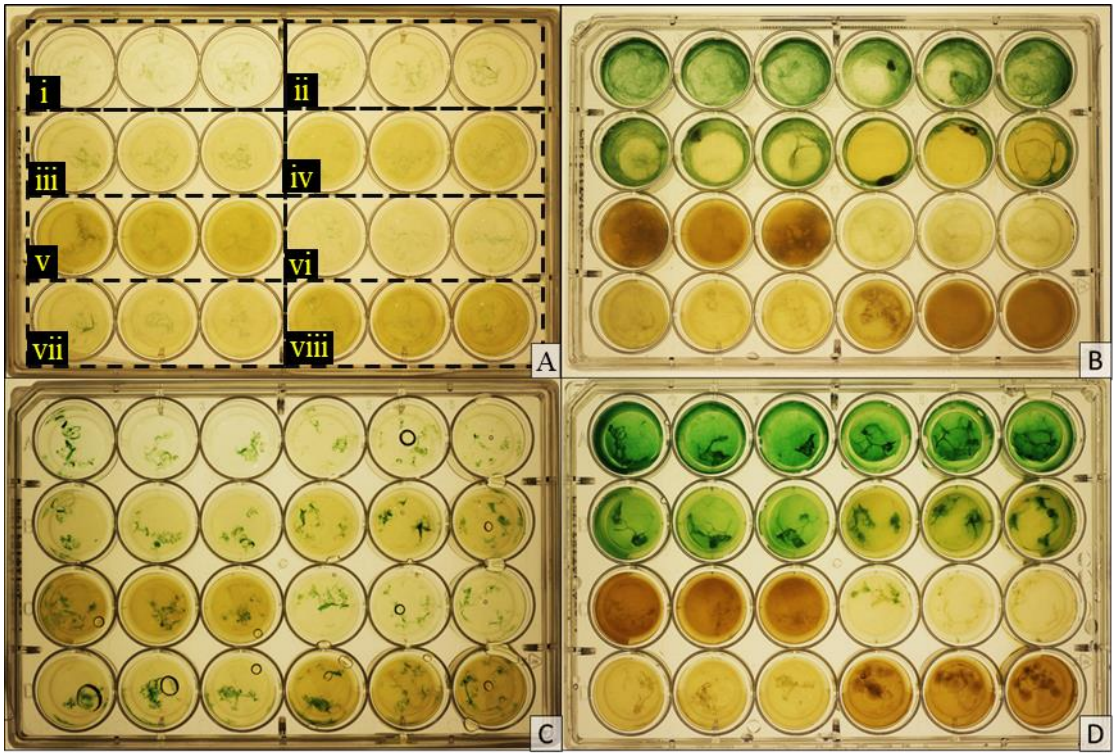
Umas das linhagens identificadas morfologicamente como *Leptolyngbya* sp. CMAA1602 apresentou apenas 94% de similaridade com sequências desse gênero depositadas no banco de dados do NCBI. Entretanto, em outras análises, essa linhagem formou um clado isolado que se agrupa apenas com outras linhagens (não incluídas neste trabalho) isoladas da mesma região e com a mesma morfologia dando origem a um novo gênero, *Amazoninema* (GENUÁRIO et al., 2018). Morfologicamente, o novo gênero descrito apresenta filamentos emaranhados, não ramificados e móveis; bainha rara, hialina, inconspícua e presa às células; tricomas flexíveis, constrictos, levemente atenuados no final, com células geralmente subquadráticas e célula apical cilíndrica, com ápice arredondado ou cônico (GENUÁRIO et al., 2018).

## 6.2. Crescimento das linhagens de cianobactérias em meio suplementado com vinhaça

### 6.2.1. Seleção das cianobactérias para cultivo em vinhaça

Todas as linhagens de cianobactérias estudadas foram capazes de crescer nos tratamentos com os respectivos meios de cultura suplementados com vinhaça até 5% (v/v). Contrariamente, não foi verificado o crescimento de nenhuma linhagem em meio de cultura com 10% de vinhaça (v/v) e, nos tratamentos com água suplementados com vinhaça. Em geral, nos tratamentos com crescimento cianobacteriano (1% a 5%), observou-se a redução da biomassa produzida em resposta ao aumento das concentrações de vinhaça. Por esse motivo, nos experimentos subsequentes, as linhagens foram cultivadas apenas nas concentrações de 1% e 2,5% de vinhaça. A Figura 10 apresenta o crescimento de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 durante o ensaio em placas de cultura de células.

Figura 10 - Crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 (A) logo após a inoculação, (B) 15 dias após a inoculação, e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 (C) logo após a inoculação, (D) 15 dias após a inoculação, em meios de cultura e água suplementados com concentrações crescentes de vinhaça. Tratamentos: i. meio BG11, ii. meio BG11+1% de vinhaça (v/v), iii. meio BG11+2,5% de vinhaça, iv. meio BG11+5% de vinhaça, v. meio BG11+10% de vinhaça, vi. água ultrapura + 2,5% de vinhaça, vii. água ultrapura + 5% de vinhaça e viii. água ultrapura + 10% de vinhaça




Apesar da vinhaça ser um resíduo líquido rico em nutrientes como nitrogênio, fósforo, cálcio e potássio, ela também contém alta concentração de compostos fitotóxicos, antibacterianos e recalcitrantes (fenóis, polifenóis e metais pesados) (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Os compostos fenólicos como os ácidos tânico e húmico, melanoidina são resultantes da combinação de açúcares e aminoácidos durante a reação de Maillard, enquanto que açúcares caramelizados e furfurals são proveniente da hidrólise ácida (WILKIE et al., 2000; DOS SANTOS, 2016). De acordo com Martins e Van Boekel (2005), a melanoidina é um complexo de biopolimeros de baixo e alto peso molecular recalcitrante à atividade microbiana. Kalavathi et al. (2001) estudando o potencial de biorremediação de melanoidina pura pela linhagem cianobacteriana *Oscillatoria boryana* BDV 92181 observaram a capacidade dessa linhagem em utilizar melanoidina como fonte de carbono e nitrogênio por meio da geração de íons hidroxila. No entanto, essa espécie não apresentou crescimento em concentrações superiores a 0,5% de melanoidina, e sua degradação foi relacionada

principalmente a produção de peróxido de hidrogênio (0,538 µmol $\mu g^{-1}$ $Chl^{-1}$ $h^{-1}$). Assim, esses compostos podem inviabilizar a utilização de vinhaça em altas concentrações para o cultivo de cianobactérias devido a potencial inibição do seu crescimento. A redução da produção de biomassa em resposta ao aumento da concentração de vinhaça observada no presente estudo também foi reportada por Budiyono et al. (2014). Esses autores avaliaram o crescimento de *Arthrospira platensis* em meio de cultivo sintético suplementado com concentrações crescentes de vinhaça de melaço de cana-de-açúcar digerida até a concentração de 4,8% (v/v). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a suplementação em concentrações crescente de vinhaça resultou na redução da taxa de crescimento da cianobactéria sendo que as maiores concentrações utilizadas levaram a degradação de membranas e pigmentos fotossintéticos (BUDIYONO et al., 2014). Em outro trabalho, Barrocal et al. (2010) cultivaram a linhagem de *Arthrospira maxima* em meio com adição de vinhaça de melaço de beterraba fermentada em concentrações de 1 g $L^{-1}$ a 7 g $L^{-1}$, e não observaram o seu crescimento na maior concentração. Na literatura, diversos autores destacam a dificuldade de cultivar micro-organismos fotossintéticos (microalgas e cianobactérias) em altas concentrações de vinhaça (KADIOĞLU; ALGUR, 1992; ÖZTÜRK; DEMIR, 2001; DOS SANTOS et al., 2016; CANDIDO; LOMBARDI, 2018; BARROCAL et al., 2010; BUDIYONO et al., 2014; KLEIN et al., 2017; VALDERRAMA et al., 2002; RAMIREZ et al., 2014, CANDIDO, 2015; ENGIN et al., 2018). De acordo com Candido e Lombardi (2017; 2018), apesar do alto valor nutricional da vinhaça, o seu uso no cultivo de micro-organismos fotossintéticos é um desafio, pois, além da redução da penetração de luz, a sua alta condutividade pode causar problemas osmóticos nas células e a presença de micro-organismos heterotróficos aumenta a competitividade por recursos. Para Kadioğlu e Algur (1992), essa dificuldade de crescimento em concentrações mais altas de vinhaça no meio pode estar relacionada à necessidade de minerais essenciais em concentrações ideais e/ou toxicidade de metais pesados como Zn, Mn e Fe em concentrações elevadas.

Dentre as alternativas adotadas para facilitar a entrada de luminosidade ao meio de cultivo contendo vinhaça, o processo de clarificação pode ser mencionado. Esse método consiste na adição de 3 g $L^{-1}$ de cal hidratada ($Ca(OH)_2$), seguido por um período de descanso de 40 min, centrifugação e coleta do sobrenadante (SANTANA et al., 2017). Com a aplicação desse método, esses autores obtiveram a maior produtividade de biomassa (222,22 mg $L^{-1}$ $d^{-1}$) para a microalga *Clamydomonas biconvexa* Embrapa LBA40 quando comparado ao cultivo em meio Bold's basal e vinhaça diluída em água (50%). Outra estratégia que pode ser utilizada é o pré-tratamento anaeróbico da vinhaça que permite uma redução considerável da

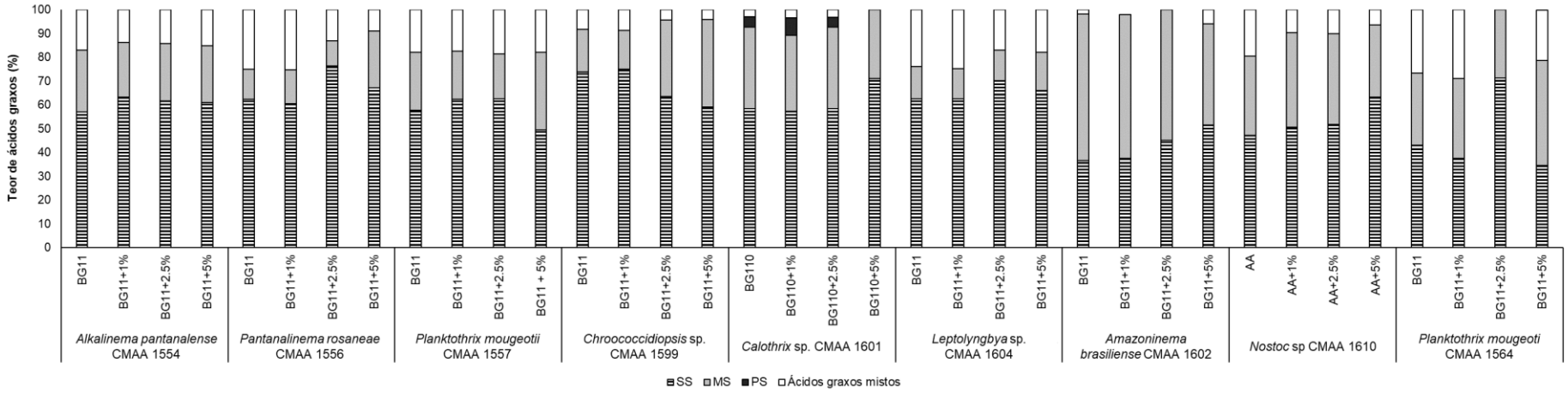
demanda química de oxigênio e o biogás produzido pode ser aproveitado para fins energéticos porém, altas concentrações de potássio, metais pesados, sulfatos e compostos fenólicos, comprometem sua eficiência (WILKIE et al., 2000; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). A vinhaça biodigerida pode então ser utilizada como meio para o cultivo de microalgas e cianobactérias ou como um suplemento nutricional, como demonstrado por Barrocal et al. (2010), Marques et al. (2013), Ramirez et al. (2014), Candido e Lombardi (2017).

Por se tratar de um experimento inicial, não foi realizado um processo de aclimatação das linhagens de cianobactérias em meios com adição de vinhaça previamente ao teste de tolerância, o que pode ter influenciado no seu crescimento dado as condições mencionadas acima. Segundo Candido e Lombardi (2018), o processo de aclimataçao é uma etapa importante no cultivo de micro-organismos fotossintéticos em resíduos. Em seu trabalho, esses autores observaram a aceleração do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça após a sua aclimatação no resíduo, mesmo na presença de contaminantes residuais e biológicos. Portanto, a partir desse teste as linhagens de cianobactérias foram mantidas nos seus respectivos meios de cultivo e com suplementação de vinhaça, e suas biomassas utilizadas nos experimentos subsequentes. Com base na observação do crescimento das linhagens, a linhagem *Plantothrix mougeotii* CMAA1564 foi selecionada para os experimentos futuros devido ao seu rápido crescimento quando comparado às demais linhagens testadas.

### 6.2.2. Análise do perfil de ácidos graxos das biomassas (MIDI/FAME)

A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada utilizando as biomassas resultantes do experimento de tolerância empregando o método MIDI/FAME (SASSER, 1990). Essa análise visou a seleção da linhagem com maiores percentuais de ácidos graxos monoinsaturados, dado a importância destes para a obtenção de biodiesel de alta qualidade (KNOTHE, 2008; QUINTANA et al., 2011; KIAEI et al., 2015). Devido a presença de contaminantes (principalmente fungos), duas linhagens cianobacterianas foram excluídas da análise, e, portanto os dados de somente nove linhagens são apresentadas na Figura 11. Os tipos de ácidos graxos detectados foram agrupados em função da sua estrutura química em saturados (SS), monoinsaturados (MS) e poli-insaturados (PS) (Figura 7).

Figura 11 – Composição de ácidos graxos saturados (SS), monoinsaturados (MS), poli-insaturados (PS) e outros de nove linhagens cianobacterianas. SS: ácidos graxos saturados (10:0, 11:0, 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0 e 19:0), MS: ácidos graxos monoinsaturados (16:1, 17:1 e 18:1), PS: ácidos graxos poli-insaturados (18:3 e 20:4) e ácidos graxos mistos (18:0+18:2 e 14:0+16:1), BG11, $BG11_0$ e AA: meios de cultivo de manutenção das culturas. As porcentagens representam a concentração de vinhaça (v/v) adicionada ao meio de cultura



A principal dificuldade encontrada nessa análise foi a limitação do equipamento para a separação de alguns ácidos graxos como C14:0 + C16:1 e C18:0+C18:2 , e portanto esses resultados são apresentados como ácidos graxos mistos (Figura 7). O percentual dos ácidos graxos que não foram separados adequadamente variou de 0 a 28% do total de ácidos graxos identificados. Além disso, é importante salientar que não houve uma padronização da quantidade de biomassa úmida utilizada para a extração dos ácidos graxos e, portanto, células em excesso pode ter resultado na extrapolação dos limites do padrão no equipamento e sobrecarga da coluna, com subsequente alteração nos tempos de retenção (OLSON, 1996).

Dentre as linhagens analisadas, *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 foi a que apresentou o maior teor de ácidos graxos monoinsaturados (principalmente C16:1 e C18:1) com uma variação de 40% a 60% do total de ácidos graxos identificados, e baixo percentual de ácidos graxos mistos (<6%). Na biomassa dessa linhagem, não foram detectados ácidos graxos poli-insaturados. Segundo Hoekman et al. (2012), a relação inversa de maior teor dos ácidos graxos monoinsaturados e menor percentual dos poli-insaturados confere melhor qualidade ao biodiesel produzido, pois reduz os problemas relacionados a fluidez em baixas temperaturas e estabilidade à oxidação. Por essa razão, essa linhagem foi selecionada para os experimentos subsequentes. A linhagem unicelular *Chroococcidiopsis* sp. CMAA 1599 foi a linhagem com maior percentual de ácidos graxos saturados, chegando a 74,95% do total de ácidos graxos detectados em meio BG11+1% de vinhaça. Quanto aos ácidos graxos poli-insaturados, apenas na biomassa da linhagem heterocitada *Calothrix* sp. CMAA1601 foi observado a presença deste tipo (especificamente o C18:3), em percentuais menores que 8% entre os tratamentos.

## 6.3. Avaliação das linhagens cianobacterianas selecionadas para produção de biodiesel

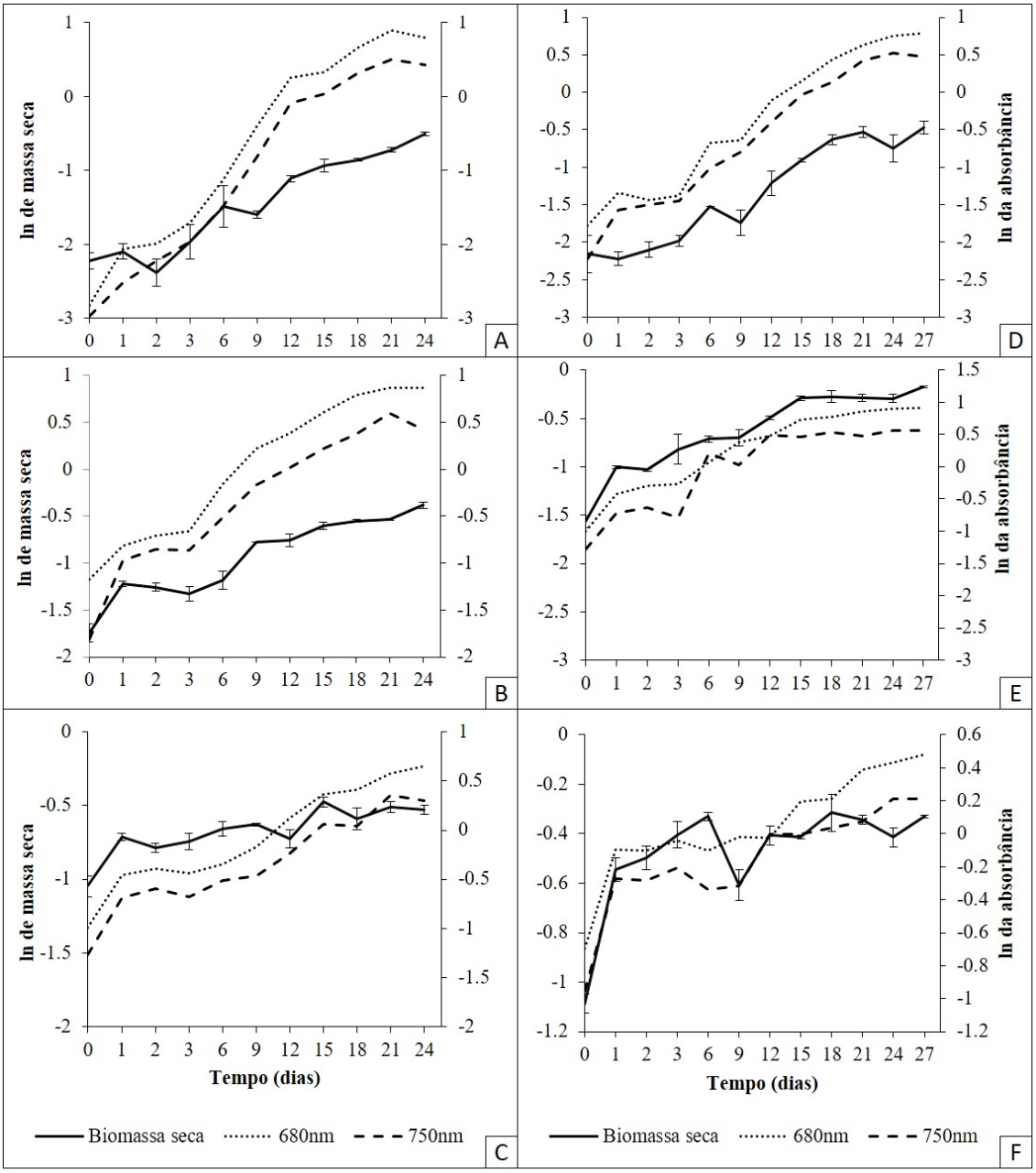
### 6.3.1. Análise do crescimento das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564

De acordo com os testes iniciais, foi possível selecionar as linhagens *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 e *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 com base na rápida taxa de crescimento e na composição de ácidos graxos, respectivamente. Assim, realizou-se as curvas de crescimento dessas linhagens em meio BG11, BG11 com 1% e 2,5% de vinhaça de modo a comparar a produção de biomassa e lipídios totais em função das fases de crescimento.

Dois métodos (gravimétrico e espectrofotométrico) foram utilizados para análise do perfil de crescimento das linhagens selecionadas em diferentes tratamentos com vinhaça visando à confirmação de suas fases de crescimento. O método gravimétrico leva em consideração a biomassa seca das linhagens, enquanto que o método espectrofotométrico avalia a absorbância em determinados comprimentos de onda. Devido a característica da clorofila (um dos principais pigmentos fotossintéticos encontrados em cianobactérias) em absorver comprimento de onde em 680 nm, esse comprimento de onda foi utilizado para avaliação pelo método espectrofotométrico (DU et al., 2016). Ainda, devido a interferência de outros pigmentos na medição da densidade ótica em 680 nm, Griffiths et al. (2011) recomendam a avaliação em comprimentos de onda fora da faixa de absorção desses pigmentos, tais como 750 nm, o qual também foi empregado nesse trabalho.

As curvas de biomassa seca e absorbância apresentaram perfis de crescimento semelhantes em cada tratamento (Figura 12). Alguns pontos das curvas não apresentaram uma tendência linear, porém esses desvios são comuns, visto a dificuldade analítica de determinar o padrão de crescimento de cianobactérias.

Figura 12 – Curvas de crescimento de *A. brasiliense* CMAA1602 em (A) meio BG11 sem vinhaça, (B) meio BG11+1% de vinhaça, e (C) meio BG11+2.5% de vinhaça, e *P. mougeotii* CMAA1564 em (D) meio BG11 sem vinhaça, (E) meio BG11+1% de vinhaça, e (F) meio BG11+2.5% de vinhaça, baseadas nos dados de massa seca e absorbância ($DO_{680nm}$ e $DO_{750nm}$)




Diferentemente da maioria dos trabalhos encontrados (ANDRADE; COSTA, 2007; BARROCAL et al., 2010; BUDIYONO et al., 2014; CORDEIRO et al., 2017), o presente estudo levou em consideração ambos os métodos de avaliação e os resultados apresentaram grande congruência. Em geral, muitos estudos utilizam apenas a densidade ótica ou a correlacionam com o peso seco em determinados pontos da curva (em geral, início e fim do experimento). A densidade ótica é um método amplamente aplicado a micro-organismos

fotossintéticos principalmente devido a sua rapidez e praticidade, sendo que os comprimentos de onda mais utilizados são os de 550 e 750 nm (MOHEIMANI et al., 2013). Apesar da densidade ótica ser utilizada como único método em muitos trabalhos, Griffiths et al. (2011), reinteram a necessidade de correlação com outros métodos como o de peso seco. Esse tipo de abordagem permite a obtenção de resultados mais robustos e de maior confiabilidade. Modiri et al. (2015), por exemplo utilizaram os métodos gravimétrico e densidade ótica para avaliar o crescimento de quatro linhagens filamentosas (ex. *Nodosilinea* sp. AK01) e uma unicelular (*Synechococcus* sp. HS01). Além desses métodos, alguns autores avaliam as características de crescimento de micro-organismos fotossintéticos por meio de observação em microscópio (contagem e tamanho das células). A contagem de células é um método principalmente utilizado para microalgas e é influenciado por características como tamanho da célula (em geral, maiores que as das cianobactérias) e sua morfologia, principalmente unicelulares e não-filamentosas (MOHEIMANI et al., 2013). Nos trabalhos de Mezzomo et al. (2010), Song et al. (2013) e Calixto et al. (2018), esse método foi aplicado à linhagens cianobacterianas como *Arthrospira platensis*, *Lyngbya kuetzingii* e *Synechococcus nidulans* D827. Assim, a escolha e validação do método aplicado são fundamentais nos estudos que buscam explorar o potencial biotecnológico desses micro-organismos (MOHEIMANI et al., 2013).

Com base na determinação da curva de crescimento de cada uma das linhagens, foi possível determinar os períodos de duração das fases de crescimento de cada linhagem nos seus respectivos meios de cultivo, bem como a sua velocidade máxima de crescimento na fase log ($\mu_{máx}$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Duração das fases de crescimento e velocidade máxima de crescimento na fase log das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothix mougeotii* CMAA1564 em meios com e sem suplementação com vinhaça

| **Linhagem** | **Meio de cultivo** | **Fase lag (dias)** | **Fase log (dias)** | **Fase estacionária (dias)** | **Velocidade máxima de crescimento ($\mu_{máx}$)*** |
|---|---|---|---|---|---|
| *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 | BG11 | 0-2 | 2-12 | 12-24 | 0,21 |
| | BG11+1% | 0-3 | 3-15 | 15-24 | 0,09 |
| | BG11+2,5% | 0-6 | 6-15 | 15-24 | 0,31 |
| *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 | BG11 | 0-3 | 3-18 | 18-27 | 0,14 |
| | BG11+1% | 0-3 | 3-15 | 15-27 | 0,07 |
| | BG11+2,5% | - | 0-1 | 1-27 | n.d. |

* Estimado durante a fase log a partir dos resultados de Ln das médias (n=3). n.d. não determinado

De modo geral, observou-se que a adição de vinhaça ao meio de cultivo modificou as fases de crescimento das duas linhagens estudadas. No caso da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, o aumento da concentração de vinhaça resultou no prolongamento da fase lag em um e quatro dias em meio BG11 suplementado com 1 e 2,5% de vinhaça respectivamente, em relação ao meio sem adição de vinhaça. Por outro lado, esse padrão não foi observado para a linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564, que teve uma fase lag de três dias nos meios BG11 e BG11+1% de vinhaça, e não apresentou essa fase quando cultivada em meio BG11+2,5% de vinhaça. Neste último caso, a linhagem mostra uma tendência de entrada na fase log ainda nas primeiras 24h, sendo este o período de maior incremento de biomassa observado nas curvas. Entretanto, apesar da similaridade entre as curvas (Figura 8E), não foi possível definir com precisão os limites de duração das fases posteriores de crescimento. Esse fato pode estar associado ao processo de aclimatação realizado que pode ter favorecido a adaptação da linhagem nessa condição de cultivo, dispensando uma fase lag. Além disso, a proliferação de micro-organismos heterotróficos presentes no próprio resíduo ou em associação com as linhagens estudadas, pode ter influenciado esse resultado. Durante a fase log, foi verificado que o seu período de duração variou em função dos meios de cultivo suplementado com vinhaça para ambas as linhagens. A maior duração dessa fase ocorreu no meio BG11+1% de vinhaça para as duas linhagens estudadas, com 12 dias (entre o 3° e 15° dias para *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564), enquanto que em meio com 2.5% de adição de vinhaça houve uma redução para 9 dias (entre o 6° e 15° dias para *Amazoninema brasiliense* CMAA1602). O início da fase estacionária na linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 ocorreu no 12° e 15° dias de cultivo quando cultivada em meio BG11 e BG11 suplementado com vinhaça (1 e 2.5%), respectivamente (Figuras 8B e 8C, Tabela 1). Para a linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 a fase estacionária teve início após 18 e 15 dias nos meios BG11 e BG11+1% de vinhaça, respectivamente.

A partir da análise das curvas de crescimento foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) durante a fase log, a qual evidencia o ponto da curva com maior incremento de biomassa. Esse índice foi calculado baseando-se nos resultados da curva de biomassa seca das linhagens (Figura 8). A linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 teve seu maior valor de $\mu_{máx}$ (0,31) em meio BG11+2,5% de vinhaça, enquanto o menor valor (0,09) foi verificado no cultivo em meio BG11 suplementado com 1% de vinhaça (Tabela 1). Semelhantemente, o menor valor de $\mu_{máx}$ (0,07) foi encontrado para a linhagem

*Planktothrix mougeotii* CMAA1564 quando cultivada em BG11+1% de vinhaça. Os resultados obtidos para a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 evidenciam que não há uma relação direta entre o aumento da concentração de vinhaça no meio com a diminuição dos valores de $\mu_{máx}$. Essa relação foi relatada por Budiyono et al. (2014) no cultivo de uma linhagem de *Arthrospira platensis* em meio sintético suplementado com vinhaça, com valores de $\mu_{máx}$ que variaram entre 0,17 no tratamento controle a 0,01 no meio suplementado com 4,8% de vinhaça.

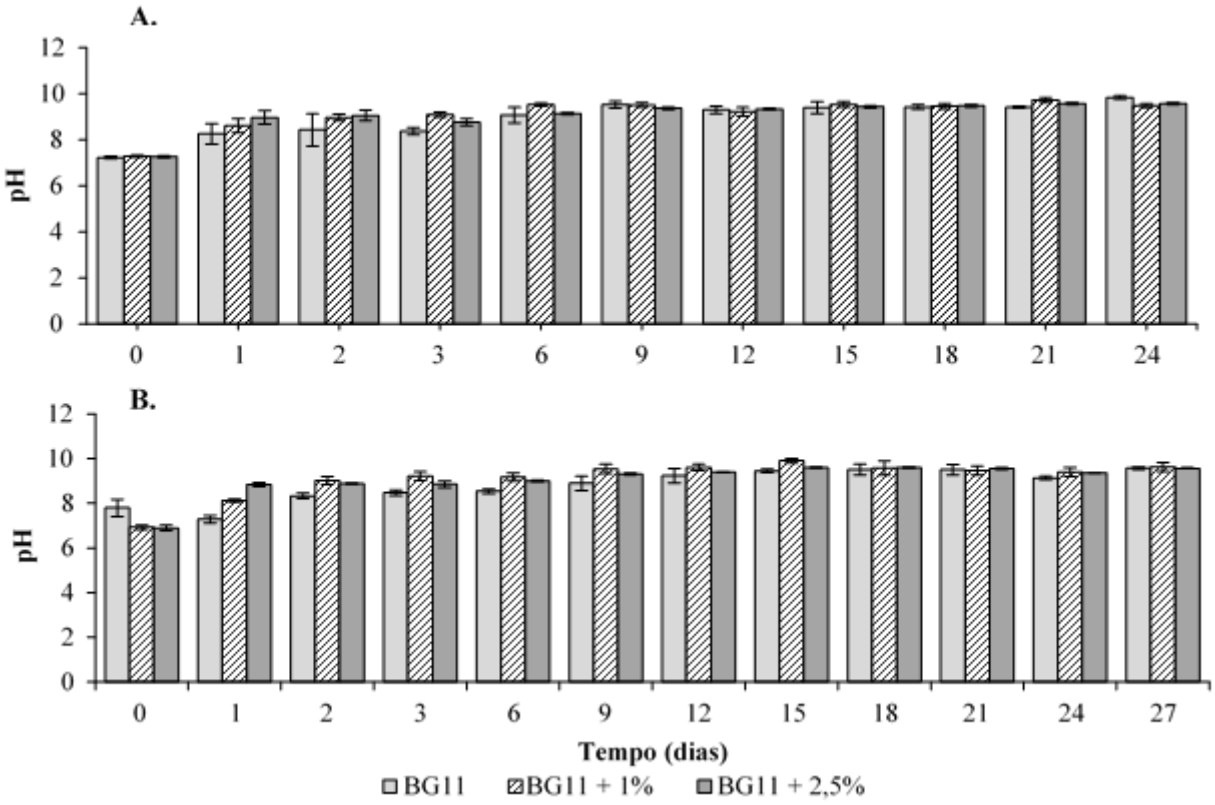
A adição de vinhaça em meio de cultivo convencional representa um fator determinante no padrão de crescimento de cianobactérias visto que compostos orgânicos são disponibilizados e o cultivo pode ser realizado de forma heterotrófica ou mixotrófica. No metabolismo heterotrófico apenas compostos orgânicos são utilizados como fontes de energia e carbono, enquanto no mixotrófico os compostos orgânicos e o $CO_2$ são assimilados durante a realização da fotossíntese e da respiração (PACHECO et al., 2015). De acordo com Subashchandrabose et al. (2013), este último é comum em cianobactérias, principalmente em resposta a limitação de luz e nutrientes. O cultivo mixotrófico aumenta a produção de biomassa como observado no trabalho de Chojnacka e Noworyta (2004), onde o crescimento de *Arthrospira* sp. foi avaliado em condição fotoautotrófica (luz), heterotrófica (glicose) e mixotrófica (luz e glicose), e a maior taxa de crescimento específico foi obtida nesta última (0,055 $h^{-1}$). De acordo com Subashchandrabose et al. (2013), os fatores críticos no cultivo mixotrófico são luminosidade e disponibilidade de carbono orgânico no substrato. Santos et al. (2016) avaliaram o crescimento de uma linhagem de *Arthrospira maxima* em meio AO sem e com suplementação com vinhaça nas condições autotrófica (controle), heterotrófica e mixotrófica. Eles observaram que apesar da maior taxa de crescimento específico ter sido obtida no cultivo heterotrófico, a associação de luz e carbono orgânico no cultivo mixotrófico proporcionou uma maior concentração de biomassa na fase estacionária (0,676 g $L^{-1}$ e 0,716 g $L^{-1}$ em meio suplementado com 0,1% e 1% v/v, respectivamente). Com base nesses resultados, os autores ressaltam que a utilização da vinhaça como fonte de carbono no período com ausência de luz pode acelerar o crescimento cianobacteriano, ao passo que a presença de luz pode prolongar o período de cultivo. Vonshak et al. (2000) demonstraram que o cultivo mixotrófico de *Arthrospira platensis* em meio suplementado com glicose (g $L^{-1}$) acelerou o crescimento dessa linhagem, em relação ao cultivo fotoautotrófico. Barrocal et al. (2010) também avaliaram o crescimento de uma linhagem de *Arthrospira maxima* em meio suplementado com concentrações crescentes de vinhaça. Eles observaram que esssa suplementação favoreceu o aumento da produção de biomassa (4,8 g $L^{-1}$ nas concentrações de

1 e 5 g $L^{-1}$ de vinhaça no meio) e o aumento da duração da fase lag em até 12 dias, quando comparado ao cultivo autotrófico. Essa tendência de prolongamento da fase lag também foi observada nos resultados obtidos para a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602. Além disso, esses autores evidenciaram a completa remoção da betaína presente na vinhaça, sugerindo que esta foi utilizada pela linhagem de *Arthrospira maxima* como principal fonte de nitrogênio.

Quando comparado o crescimento entre as linhagens, observa-se que a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 apresentou um crescimento mais acelerado do que *Planktothrix mougeotii* CMAA1564, nos meios BG11 e BG11+1% de vinhaça.

Ainda, os valores de pH dos meios de cultivo foram avaliados durante o experimento para a avaliação das fases de crescimento das linhagens de cianobactérias. Notou-se que o pH do meio de cultivo das duas linhagens apresentaram a tendência de aumento do pH em função do tempo, independentemente do meio de cultivo, com poucas variações durante as fases log e estacionária (Figura 13).

Figura 13 – Valores de pH dos meios de cultivo durante o período de coletas de biomassa. (A) *Amazoninema brasiliense* CMAA1602. (B) *Planktothrix mougeotii* CMAA1564



Durante o cultivo de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 o pH dos meios variou de 7,2 a 9,8, com o maior valor registrado no último dia de coleta da biomassa em meio BG11. No caso do meio BG11+1%, o maior valor de pH encontrado foi de 9,53 no 15º dia de coleta. Em meio BG11+2,5%, o valor mais alto de pH foi 9,58 no 24º dia. Para a linhagem *Planktothrix mougeotti* CMAA1564, a variação nos valores de pH ocorreu entre 6,9 e 9,6. Em meio BG11 e BG11+2,5%, o pico de pH ocorreu no 18º dia. Uma das principais características da vinhaça é o pH ácido, resultado da grande quantidade de matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos e cátions como K, Ca e Mg (LAIME, 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Em geral, organismos fotossintéticos aquáticos como as cianobactérias demonstram a tendência de aumento do pH do meio em função de sua atividade fotossintética (ANDRADE; COSTA, 2007). Durante esse processo, esses organismos produzem a enzima superóxido dismutase que leva a formação de $OH^-$ e, consequente mudança do pH para alcalino (CAMPBELL; LAUDENBACH, 1995; GROBBELARR, 2004; PRIYA et al., 2010). Assim, organismos que apresentam capacidade fotossintética associada à habilidade de consumo de matéria orgânica (metabolismo mixotrófico) (GROBBELARR, 2004), se mostram vantajosos para o cultivo em vinhaça, uma vez que consomem simultanemente os compostos orgânicos presentes na vinhaça e aumentam o pH em resposta a produção da enzima peróxido dismutase. Entretanto, é importante destacar também que a vinhaça apresenta um forte efeito tamponante como observado no trabalho de Lopes et al. (2013) onde esta foi aplicada ao solo e, apesar da sua característica ácida, resultou no aumento do pH.

### 6.3.2. Produtividade da biomassa, teor lipídico e produtividade lipídica

A partir dos resultados de massa seca obtidos no experimento da curva de crescimento microbiano, as produtividades de biomassa (P) foram calculadas para as linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 em meio com e sem adição de vinhaça durante as fases de crescimento log e estacionária. Os valores obtidos foram multiplicados pelos resultados dos teores de lipídios totais (LT) para determinar a produtividade lipídica volumétrica (PL). Os valores encontrados para esses três parâmetros são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Produtividade de biomassa, teor de lipídios totais e produtividade lipídica volumétrica das linhagens cianobacterianas em diferentes fases do seu crescimento em meio sem e com adição de vinhaça

| **Linhagens** | **Meio de cultivo** | **Fase de crescimento** | **Produtividade de biomassa - P (mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$)** | **Teor de lipídios totais - LT (%)** | **Produtividade lipídica volumétrica - PL (mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$)** |
|---|---|---|---|---|---|
| *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 | BG11 | Logarítima | 22.22 | 8.19±0.28$^{b}$ | 1.82±0.06$^{c}$ |
| | | Estacionária | 19.05 | 8.09±0.16$^{b}$ | 1.54±0.03$^{d}$ |
| | BG11+1% | Logarítima | 31.75 | 8.18±0.13$^{b}$ | 2.60±0.04$^{a}$ |
| | | Estacionária | 22.22 | 9.02±0.24$^{a}$ | 2.00±0.05$^{b}$ |
| *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 | BG11 | Logarítima | 18.73 | 8.84±0.21$^{A}$ | 1.66±0.04$^{C}$ |
| | | Estacionária | 22.22 | 6.14±0.28$^{B}$ | 1.37±0.06$^{D}$ |
| | BG11+1% | Logarítima | 35.87 | 8.87±0.39$^{A}$ | 3.18±0.14$^{A}$ |
| | | Estacionária | 30.69 | 9.32±0.18$^{A}$ | 2.86±0.05$^{B}$ |

*Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)., sendo as minúsculas para a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, e maiúsculas para *Planktothrix mougeotii* CMAA1564.

Os resultados mostram que a produtividade de biomassa das linhagens variou de 19,1 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ a 31,8 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, e de 18,7 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ a 35,9 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Os maiores valores desse parâmetro foram observados na fase log de ambas as linhagens cultivadas em meio com adição de vinhaça. A suplementação do meio com esse resíduo resultou em um aumento de até 70% para *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e mais de 90% para *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Em relação às fases de crescimento, as maiores produtividades de biomassa foram encontradas na fase log, com exceção para a *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 cultivada em meio BG11, onde houve o aumento da produtividade de 18,7 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ na fase log para 22,2 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ na fase estacionária. Os valores de produtividade de biomassa obtidos estão de acordo com os resultados encontrados para outras linhagens de cianobactérias cultivadas em meios de cultura tradicionais. Aboim et al. (2016) avaliaram a produtividade de biomasssa de sete linhagens cianobacterianas isoladas do Lago Bolonha (Belém, Pará) e do reservatório de água da usina hidrelétrica de Tucuruí (PA) nos meios BG11 e ASM1. Esses autores reportaram valores de produtividade de biomassa entre 0,4 e 14,72 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para as linhagens *Lyngbya* sp. CACIAM07 e *Cyanobium* sp. CACIAM14 em meio ASM1, respectivamente. Anahas e Muralitharan (2018) determinaram esse parâmetro em 15 linhagens de cianobactérias heterocitadas e obtiveram valores

de 8,25 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para *Nostoc entophylum* MBDU 679 a 24,39 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para *Nostoc carneum* MBDU 709. No trabalho de Bruno et al. (2012), três linhagens tiveram suas produtividades de biomassa determinadas e os valores obtidos foram 17 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ (*Anabaena augstumalis* VRUC 163), 40 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ (*Trichormus variabilis* VRUC 162) e 55 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ (*Phormidium autumnale* VRUC 164). O aumento da produtividade de biomassa nos tratamentos com vinhaça também foi evidenciado por Barrocal et al. (2010). Esses autores observaram que a suplementação do meio Schlösser com 1 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ de vinhaça de beterraba no cultivo de *Arthrospira maxima* resultou no aumento da produtividade de biomassa de 0,20 g $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para 0,24 g $L^{-1}$ $dia^{-1}$ em relação ao meio sem adição do resíduo. Essa tendência também foi observada por Santos et al. (2016) que utilizaram uma estratégia de cultivo cíclico em dois estágios (autotrófico durante a fase clara e heterotrófico na fase escura) para a cianobactéria *Arthrospira maximum* apresentando um aumento de 0,495 para 0,609 g $L^{-1}$, do ciclo autotrófico para o heterotrófico.

Os maiores valores de produtividade de biomassa observados para a linhagem de *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 podem estar relacionados a sua adaptabilidade a condições de baixa luminosidade e alto teor de nutrientes do meio encontrados na vinhaça. Tendência similar foi observado em duas outras espécies do gênero *Planktothrix*. Ammar et al. (2014) compararam as características de crescimento de *Planktothrix agardhii* e *Cylindrospermopsis raciborskii* expostas separadamente e conjuntamente em condições variadas de luminosidade e concentração de nutrientes. Eles observaram que a linhagem *P. agardhii* teve sua taxa de crescimento acelerada em condições de baixa intensidade luminosa e altas concentrações de nutrientes, em contraste com a cianobactéria *C. raciborskii*. Para *P. rubescens* foi observada altas taxas de crescimento em condições de baixa luminosidade e altas concentrações de nitrato e carbono inorgânico (ZOTINA et al., 2013). Deve-se ressaltar que membros do gênero *Planktothrix* são associados ao processo de eutrofização em corpos d'água (PANCRACE et al., 2017), onde condições semelhantes às descritas são comuns.

Os conteúdos lipídicos totais encontrados na biomassa seca dessas linhagens tiveram uma variação de 8,11% a 9,13% em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, e de 6,14% a 9,33% em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Esses valores estão de acordo com os teores reportados na literatura para algumas linhagens de cianobactérias como *Planktothrix isothrix* D39Z (6%) (CALIXTO et al., 2018), *Nodosilinea* sp. AK01 (8,33%) (MODIRI et al., 2015), *Anabaena* sp. MBDU 006 (8,62%) (ANAHAS; MURALITHARAN, 2015) e *Oscillatoria* sp. $50^{A}$ (9,6%) (JAWAHARRAJ et al., 2016). Ainda, esses valores estão nas

faixas intermediárias para os teores lipídios encontrados em cianobactérias que é de 5 a 13% (GRIFFITHS; HARRISON, 2009; GREWE; PULZ, 2012). No entanto, para que sejam considerados micro-organismos oleaginosos é necessário que apresentem um teor de lipídios totais de pelo menos 20% em relação à massa seca (SHARMA et al., 2011), o que não foi observado. Porém, o conteúdo lipídico não deve ser considerado como único parâmetro para seleção de linhagens para produção de biodiesel, visto que a produtividade lipídica volumétrica fornece resultados mais adequados e robustos, pois representa os efeitos combinados de conteúdo lipídico e produtividade de biomassa (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), os teores lipídicos (LT) não apresentaram uma variação significativa ($p \leq 0,05$) em relação à fase de crescimento, com exceção da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 cultivada em BG11+1% de vinhaça e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 cultivada em meio BG11 (Tabela 3). Foi observado aumento significativo no teor lipídico *de Amazoninema brasiliense* CMAA1602 entre as fases log e estacionária cultivada em meio BG11+1% de vinhaça que passou de 8,1% para 9,0% da biomassa seca. Em contrapartida houve redução significativa ($p \leq 0,05$) do teor lipídico da fase log (8,87%) para a estacionária (6,14%) na biomassa cultivada em meio sem adição de vinhaça de *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Essa redução pode estar associada a maior duração da fase log dessa linhagem que pode ter consumido parte desse lipídio no seu metabolismo. Considerando que no cultivo das linhagens testadas a aeração não foi constante e não houve suplementação com $CO_2$, as linhagens podem ter utilizado a energia disponível nas células para a síntese de carboxissomos e de componentes dos mecanismos de concentração de dióxido de carbono (SARSEKEYEVA et al., 2015).

Em relação à produtividade lipídica volumétrica, os valores obtidos variaram de 1,37 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ a 3,18 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$. As maiores produtividades foram observadas nas linhagens cultivadas em meio com adição de vinhaça e fase de crescimento log. Para a linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 cultivada em meio BG1+1% de vinhaça os valores encontrados foram 2,58 e 2,03 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$, nas fases log e estacionária, respectivamente. Dentre as duas linhagens, *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 apresentou os maiores valores de produtividade lipídica quando cultivada em meio suplementado com vinhaça tanto na fase log quanto na fase estacionária. Os resultados obtidos estão de acordo aqueles encontrados por Anahas e Muralitharan (2015) (0,65 a 2,36 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$) e Jawaharraj et al. (2016) (1,9 e 2,5 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$). Ainda, os resultados de produtividade lipídica

volumétrica apresentam seus maiores valores na fase log de ambas as linhagens, independente do meio de cultivo. Isso demonstra que a coleta da biomassa para extração dos lipídios durante a fase log pode representar uma vantagem em relação à produtividade lipídica volumétrica duas linhagens avaliadas nesse estudo, independentemente do tipo de meio de cultura utilizado (BG-11 e BG11+1% vinhaça). Muitos trabalhos de seleção de micro-organismos fotossintéticos para produção de biodiesel não consideram as particularidades nutricionais e fisiológicas de cada grupo de micro-organismo, em decorrência da falta de conhecimento das mesmas, negligenciando táxons promissores. Song et al. (2013), por exemplo, avaliaram o potencial de nove linhagens de microalgas e uma de cianobactéria para produção de biodiesel. As biomassas foram coletadas na fase estacionária para extração da fração lipídica, e eles observaram que a linhagem cianobacteriana *Lyngbya kuetzingii* apesar de apresentar uma das maiores concentrações de biomassa, teve baixa produtividade lipídica quando comparada com as microalgas. Portanto, a exclusão dessa espécie cianobacteriana como uma boa candidata para produção de biodiesel, pode estar relacionada à coleta de sua biomassa apenas na fase estacionária. Considerando que ela apresentou uma alta taxa de crescimento (0,26 $d^{-1}$) em relação às demais linhagens, a melhor fase para a coleta da biomasa pode ter sido anterior ao das microalgas testadas.

Diferentemente do conhecimento acumulado sobre os mecanismos envolvidos na produção de lipídios em microalgas (em respostas a condições de estresse), as alterações do conteúdo lipídico de cianobactérias em resposta aos nutrientes disponibilizados e fases de crescimento não são totalmente compreendidas (PIORRECK et al., 1984; VARGAS et al., 1998). No trabalho de Singh et al. (2014), uma linhagem endolítica de *Leptolyngbya* sp. foi cultivada em três meios distintos (BG11, BG11 suplementado com 50 mM de NaHCO3 e meio artificial de água do mar) e teve sua produção de lipídios avaliada em duas fases de crescimento (exponencial e início da estacionária). Os autores observaram que não houve uma diferença significativa no teor de lipídios totais dessa linhagem nas duas fases de crescimento, independente do meio de cultura. Entretanto, no que se refere às classes de lipídios, observou-se uma variação em função da fase de crescimento, mas com uma tendência semelhante entres os meios, com o aumento dos triaciglicerídeos na fase estacionária. Em outro estudo, Vargas et al. (1998) observaram que o teor lipídico dobrou da fase lag para a fase log em *Nostoc paludosum*, porém os autores não avaliaram esse parâmetro na fase estacionária. No que se refere ao teor lipídico em condições limitadas de nitrato, por exemplo, Walach et al. (1987) e Sassano et al. (120) observaram tendências opostas para a espécie *Arthrospira platensis*.

Enquanto o primeiro relatou o aumento do conteúdo lipídico, o segundo observou uma redução de 20,9% pra 8,10% do teor lipídico em função da diminuição da concentração de cloreto de amônio no meio de cultivo (1 mol $m^{-3}$ a 10 mol $m^{-3}$).

Dentre as estratégias utilizadas para viabilizar a produção de biodiesel de cianobactérias está a otimização das condições de cultivo. Da Rós et al. (2017) otimizaram a produção de lipídios na linhagem de cianobactéria filamentosa *Trichormus* sp. CENA77 em função de duas variáveis independentes, intensidade luminosa e concentração de $Na_2CO_3$. Eles observaram uma relação positiva com o aumento das duas variáveis para o incremento na produção desse componente celular, sendo que o maior conteúdo lipídico (14,5% ± 2,80) foi alcançado na maior intensidade luminosa (150 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) e concentração de $Na_2CO_3$ (1,5 g $L^{-1}$). A produtividade lipídica (41,5 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$) e de biomassa (286,5 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$) aumentaram em cerca de seis e nove vezes, respectivamente, em relação às condições normais. Silva et al. (2014) otimizaram o cultivo de *Synechococcus* sp. PCC7942 alterando as mesmas variáveis. Nas condições ótimas (150 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ de luminosidade e 1,5 g $L^{-1}$ de $Na_2CO_3$), obteve-se o teor lipídico de 29,0%, produtividade de biomassa de 124 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ e produtividade lipídica de 35,9 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ para a linhagem estudada. Queiroz et al. (2011) cultivaram uma linhagem de *Aphanothece microscopica* em condições heterotróficas em água residuária de processamento de peixe em diferentes temperaturas (10ºC, 20ºC e 30ºC). Eles evidenciaram uma relação negativa entre o conteúdo lipídico e o aumento da temperatura. Apesar do maior teor lipídico (15,3%) ter sido encontrado a 10ºC, as maiores produtividades lipídicas (0,05 g $L^{-1}$ $dia^{-1}$) e de biomassa (0,44 g $L^{-1}$ $dia^{-1}$) foram verificadas nas temperaturas de 20ºC e 30ºC, respectivamente. No trabalho de Modiri et al. (2015), o cultivo mixotrófico de *Synechococcus* sp. HS01 usando óleo de avestruz como fonte de carbono resultou no melhor resultado de produtividade lipídica para essa linhagem (54,77 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$).

Considerando a produtividade de biomassa, o teor de lipídios totais e produtividade lipídica volumétrica para escolha da melhor fonte de matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel, a linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 cultivada em meio com adição de vinhaça e coletada na fase log seria a melhor opção, já que apresenta os maiores valores desses parâmetros nessas condições. Apesar de apresentar resultados um pouco menores, *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 cultivada em meio com vinhaça, também apresenta resultados promissores, principalmente devido a sua alta produtividade lipídica na fase log. Esses resultados contribuem positivamente para a viabilidade do uso de vinhaça no cultivo de cianobactérias para produção de biomassa e óleos para produção de biodiesel, principalmente se utilizada em ensaios de otimização das condições de cultivo para aumentar sua

produtividade. A importância desses dados está diretamente relacionada com o tempo necessário para a obtenção da matéria-prima lipídica, visto que a produção em larga escala busca a maior produção no menor tempo possível.

### 6.3.3. Composição de ácidos graxos das frações lipídicas

A análise da composição de ácidos graxos das frações lipídicas de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 foi realizada e é apresentada na Tabela 10. Vinte e um tipos de ácidos graxos com tamanho de cadeia variando entre C10 a C20 foram detectados nos óleos obtidos da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, enquanto que dezoito tipos foram observados na linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 com variações de tamanho de cadeia entre C12 a C20. O percentual de ácidos graxos não identificados variou de 12,67% a 19,08%. Em relação aos ácidos graxos minoritários, 15 apresentaram valores abaixo de 3% ou não estavam presentes em todas as amostras de óleos.

Tabela 10 – Composição de ácidos graxos (%) das frações lipídicas das linhagens de cianobactérias em função do tipo de meio de cultivo e da fase de crescimento. N.I.: não identificados, - : não detectado

| Ácidos Graxos | *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 | | | | *Planktothrix mougeitii* CMAA1564 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BG11 | | BG11+1% | | BG11 | | BG11+1% | |
| | Log | Est. | Log | Est. | Log | Est. | Log | Est. |
| C10:0 (Cáprico) | - | - | - | 0,19±0,01 | - | - | - | - |
| C11:0 (Undecanóico) | 1,15±0,05 | 0,85±0,04 | 0,70±0,17 | 0,44±0,12 | - | - | - | - |
| C12:0 (Laurico) | - | 0,45±0,04 | 0,36±0,06 | 0,40±0,06 | - | - | 0,70±0,01 | 0,57±0,06 |
| C13:0 (Tridecanóico) | 1,40±0,10 | 1,27±0,04 | 0,64±0,02 | 0,65±0,07 | 1,65±0,10 | 1,65±0,01 | 1,06±0,06 | 1,08±0,06 |
| C14:0 (Mirístico) | 0,57±0,04 | 1,32±1,04 | 0,99±0,09 | 1,11±0,04 | 0,80±0,02 | - | 0,67±0,00 | 0,63±0,01 |
| C14:1 (Miristoléico) | 0,81±0,08 | 1,27±1,04 | 1,84±0,05 | 1,67±0,09 | - | - | 2,09±0,06 | 2,08±0,00 |
| C15:0 (Pentadecanóico) | - | - | 0,35±0,05 | - | - | - | - | - |
| C15:1 (Pentadecenóico) | 0,78±0,06 | 0,45±0,04 | 1,58±0,06 | 1,07±0,08 | - | - | 1,04±0,00 | 0,66±0,05 |
| C16:0 (Palmítico) | 37,53±0,50 | 32,15±0,39 | 24,60±0,82 | 20,75±0,36 | 23,48±0,05 | 24,09±0,01 | 25,44±0,02 | 25,48±0,04 |
| C16:1 (Palmitoleico) | 2,40±0,13 | 2,77±0,04 | 15,87±0,98 | 12,11±0,97 | 19,60±0,02 | 20,47±0,01 | 19,07±0,03 | 18,16±0,15 |
| C17:0 (Heptadecanóico) | - | 0,93±0,01 | - | - | - | - | - | 0,43±0,00 |
| C17:1 (cis-10-heptadecanóico) | - | 0,36±0,00 | 8,09±0,25 | 6,24±0,43 | - | 0,56±0,00 | 1,84±0,00 | 2,08±0,02 |

**continua**

**conclusão**

| Ácidos Graxos | *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 | | | | *Planktothrix mougeitii* CMAA1564 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BG11 | | BG11+1% | | BG11 | | BG11+1% | |
| | Log | Est. | Log | Est. | Log | Est. | Log | Est. |
| C18:0 (Esteárico) | 1,28±0,21 | 1,29±0,06 | 1,04±0,07 | 1,25±0,25 | 1,45±0,01 | 2,46±0,08 | 1,88±0,02 | 1,63±0,04 |
| C18:1 cis (Oleico) | 1,89±0,02 | 2,14±0,06 | 13,66±0,31 | 11,10±0,34 | 1,95±0,08 | 3,46±0,03 | 8,94±0,01 | 9,14±0,03 |
| C18:1 trans (Elaídico) | - | - | - | 0,56±0,04 | - | - | 0,63±0,01 | 0,65±0,02 |
| C18:2 cis (Linoleico) | 12,44±0,29 | 10,81±0,26 | 3,43±0,42 | 3,44±0,33 | 18,60±0,06 | 19,31±0,01 | 10,43±0,01 | 8,80±0,11 |
| C18:2 trans (Linolelaídico) | - | - | - | - | 1,44±0,01 | - | - | - |
| C18:3 n3 (α-linolênico) | 20,31±0,83 | 21,47±0,05 | 14,14±2,86 | 14,28±1,65 | 14,38±0,01 | 11,99±0,00 | 10,63±0,02 | 11,53±0,43 |
| C18:3 n6 (γ-linolênico) | 1,12±0,51 | 1,15±0,11 | - | 4,90±2,14 | 2,34±0,03 | 2,37±0,05 | 1,65±0,04 | 2,00±0,64 |
| C20:0 (Araquídico) | - | - | - | 0,42±0.10 | - | - | - | 0,33±0,03 |
| C20:1 n9 (Gondoico) | 0,98±0,10 | 1,73±0,10 | - | - | - | - | - | 0,62±0,02 |
| C20:4 n6 | - | 0,37±0,04 | - | - | - | - | - | - |
| NI | 17,34±0,07 | 19,23±0,54 | 12,72±0,39 | 19,40±3,40 | 14,30±0,00 | 13,65±0,01 | 13,92±0,07 | 14,12±0,05 |
| C16-C18 | 76,95±0,18 | 71,93±0,56 | 72,68±0,55 | 69,34±3,39 | 82,19±1,83 | 84,51±0,64 | 79,13±0,80 | 77,20±0,37 |

A composição de ácidos graxos dos óleos cianobacterianos extraídos das linhagens estudadas apresentou composições similares ao reportados na literatura para óleos desse grupo de micro-organismos. De acordo com Sarsekeyeva et al. (2015), em geral, a produção de ácidos graxos de cadeia carbônica longa é incomum em cianobactérias, visto que elas não apresentam enzimas enlongases específicas (C18 e C20), que são encontradas no retículo endoplasmático de organismos eucarióticos como as microalgas, fungos e plantas superiores. Ainda, Iliev et al. (2011) acreditam que a detecção de ácidos graxos com cadeias maiores que 18 carbonos está relacionada a interpretações errôneas dos resultados em função da ausência de procedimentos analíticos que antecedam a análise como, por exemplo, a purificação das amostras antes da injeção no cromatógrafo. A ausência dessa etapa pode ter influenciado tanto a alta presença de ácidos graxos não identificados nas amostras avaliadas e, também, dos ácidos graxos C20:0, C20:1 n9 e C20:4 n6. Os ácidos tridecanóico (C13:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e alfa-linolênico (C18:3 n3) (ALA) foram encontrados em todas as amostras analisadas. Com exceção do ácido tridecanóico, os outros cinco tipos de ácidos graxos foram encontrados em quantidades superiores aos demais ácidos graxos. Esses ácidos graxos correspondem aos ideais para produção de biodiesel com boa qualidade como destacado por Knothe (2009).

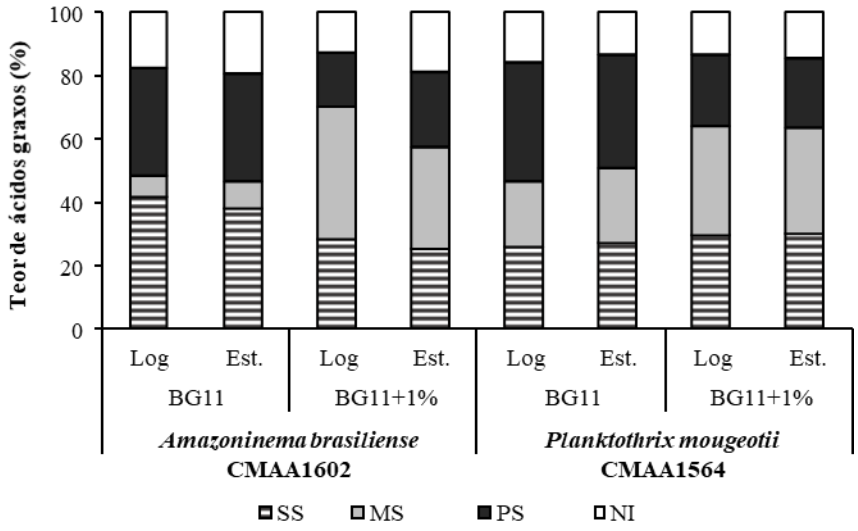
Similarmente, esses resultados estão em acordo com o apresentado por Los e Mironov (2015) a respeito dos ácidos graxos majoritários em cianobactérias (C14 a C18). O ácido pamíltico foi o ácido graxo majoritário em todas as amostras, com valores que variaram entre 21% a 37% em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e entre 23% a 25% em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Esse ácido graxo saturado é naturalmente o mais abundante e encontrado nos mais diversos tipos de matrizes biológicas, compreendendo de 20 a 30% do total de ácidos graxos em lipídios animais, 10 a 40% em sementes em geral, e mais de 40% no óleo de palma (SCRIMGEOUR; HARWOOD, 2007). Em estudo realizado por Guedes et al. (2011), o perfil de ácidos graxos de 14 linhagens de cianobactérias como *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Oscillatoria splendida* ACOI 778, *Lyngbya majuscula* CCAP 1446/4, *Anabaena variabils* ATCC 29413, *Leptolyngbya* sp. PCC 73110 e *Scytonema obscurum* ACOI 778 foi determinado. Os autores observaram a predominância de ácidos graxos C16 e C18, com destaque para os ácidos palmítico, palmitoleico, linoleico e linolênico. Resultados semelhantes foram encontrados por Bruno et al. (2012) para três linhagens de cianobactérias formadoras de biofilme (*Trichormus variabilis* VRUC162, *Anabaena augstumalis* VRUC163 e *Phormidium autumnale* VRUC 164), sendo que os ácidos graxos saturados e monoinsaturados representaram a maior porção. López et al. (2009) também observaram os ácidos palmítico (39%), alfa-linolênico (37%), palmitoleico (10%) e linoleico (6%) como majoritários em *Anabaena variabilis* ATCC 33047. Entretanto Aboim et al. (2016), reportaram percentuais elevados (até 79%) do ácido capróico (C6:0) nas seis linhagens avaliadas o qual é incomumente encontrado em cianobactérias.

Na soma dos ácidos graxos C16 e C18, evidenciou que não houve diferença nas duas linhagens estudadas quando considerados o meio de cultivo e a fase de crescimento. Os extratos lipídicos de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 apresentaram valores de ácidos graxos C16 e C18 que variaram de 69% (meio BG11+1%, fase estacionária) a 77% (meio BG11, fase log). Em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 esses valores variaram de 77% (meio BG11+1%, fase estacionária) a 85% (meio BG11, fase estacionária). Esses percentuais são superiores aos encontrados para as linhagens *Planktothrix isothrix* D39Z e *Synechococcus nidulans* D109WC (~50%) (CALIXTO et al. 2018).

A composição dos óleos cianobacterianos extraídos sofreu leve alteração em resposta a coleta/extração nas diferentes fases de crescimento principalmente em relação aos ácidos graxos minoritários e seus percentuais. A maior alteração observada ocorreu na fração lipídica da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 cultivada em meio BG11, na qual o ácido graxo principal (palmítico) variou de 38% para 32%. Contrariamente, a adição de vinhaça ao

meio de cultivo alterou de modo mais marcante a proporção dos ácidos graxos majoritários em especial o grupo dos monoinsaturados.. Em ambas as linhagens estudadas, a suplementação com o resíduo resultou no aumento do ácido oleico e diminuição dos ácidos poli-insaturados linoleico e alfa-linolênico. Entretanto, para o ácido palmítico houve uma redução nos óleos derivados de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e aumento em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 (Figura 14).

Figura 14 – Percentual de ácidos graxos saturados (SS), monoinsaturados(MS), poli-insaturados (PS) e não identificados (NI) na composição de ácidos graxos das frações lipídicas avaliadas




A fração lipídica de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 derivada do cultivo em meio BG11 apresentou um teor maior de ácidos graxos saturados (42,14% e 38,42%) e baixo teor de monoinsaturados (6,80% e 8,69%). Entretanto, o óleo obtido dessa mesma linhagem cultivada em meio suplementado com vinhaça, apresentou um aumento considerável dos ácidos graxos monoinsaturados (mais de seis vezes na fase log e três vezes na fase estacionária), com a consequente redução dos saturados e poli-insaturados. Situação semelhante foi observada nas biomassas lipídicas derivadas de *Planktothrix mougeotii* CMAA1564, na qual a classe de ácidos graxos majoritária em meio BG11, os poli-insaturados (38,03% e 35,29%), reduziu no meio com adição de vinhaça, simultaneamente ao aumento dos saturados e mono-insaturados. Assim como em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, os monoinsaturados passaram a ser os principais ácidos graxos da fração lipídica na biomassa (cerca de 34%) de *P, mougeotii* CMAA1564, Em geral, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados conferem melhor estabilidade à oxidação, enquanto os poli-insaturados

contribuem para melhorar as características de fluxo a frio do biodiesel derivado desses óleos, no entanto esses são mais suscetíveis a oxidação (KNOTHE, 2009; HOEKMAN et al., 2012). Dessa forma, a suplementação do meio com vinhaça pode favorecer o aumento das proporções de ácidos saturados e moninsaturados em cianobactérias. Em estudo realizado por Jawaharraj et al. (2015), a vinhaça foi utilizada juntamente com cloreto de sódio para otimizar o cultivo da cianobactéria *Myxosarcina* sp. objetivando a produção de biodiesel. Os autores obtiveram um perfil de ácidos graxos composto apenas por ácidos graxos saturados (39%) e monoinsaturados (61%), corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Ainda, a composição de ácidos graxos em cianobactérias pode ser alterada durante o seu cultivo. Dentre as variáveis que influenciam a composição de ácidos graxos reportadas na literatura estão a intensidade luminosa (WALSH et al, 1997), concentração de nutrientes (OLGUÍN et al., 2001), temperatura (WADA; MURATA, 1990) e agitação do meio (SANTOS et al., 2017). Portanto, variações nas condições de cultivo podem favorecer a exploração desses lipídios/ácidos graxos cianobacterianos para outros mercados que não somente o de biocombustíveis.

O ácido alfa-linolênico (C18:3 n3) é um ácido graxo comumente encontrado nos lipídios de folhas de plantas e de sementes como linhaça (>50%), soja e canola (8 a 10%) (SCRIMGEOUR; HARWOOD, 2007). Nas frações lipídicas avaliadas nesse trabalho, ele representou de 14 a 21% do total de ácidos graxos em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e de 11 a 14% em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Classificado como ácido graxo essencial aos seres humanos por não ser sintetizado naturalmente por mamíferos, o ácido alfa-linolênico é reconhecido como precursor dos ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3) de cadeia longa eicosapentaenóico (C20:5 n3; EPA), docosapentanóico (C22:5 n3, DPA) e o docosaexaenóico (C22:6 n3; DHA) (BARCELÓ-COBLIJN; MURPHY, 2009; BRENNA, 2002). Sheng et al. (2011), avaliaram os efeitos da temperatura no perfil de ácidos graxos de *Synechocystis* sp. PCC6803, e observaram que o cultivo em temperaturas baixas baixas (18 e 22ºC) levou o aumento dos ácidos graxos poli-insaturados alfa e gama-linolênico. Ainda, percentuais consideráveis dos ácidos palmitoleico (C16:1) e linoleico (C18:2) foram detectados em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 (2 a 16% e 3 a 13%, respectivamente) e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 (18 a 20% e 9 a 19%, respectivamente). De acordo com Ronda e Lele (2008), as cianobactérias podem apresentar também altos percentuais do ácido gama-linolênico que é precursor de prostaglandina E1, um importante composto bioativo que reduz inflamações e pressão arterial. Em condições ótimas de cultivo, esses autores conseguiram uma produção de até 14,6 mg/g peso seco desse ácido graxo em

*Arthrospira platensis*. Nos extratos lipídicos avaliados, um baixo percentual desse ácido graxo foi encontrado (entre 1 e 4,9%).

### 6.3.4. Parâmetros empíricos de qualidade do biodiesel baseado na composição de ácidos graxos

Com base na composição de ácidos graxos das biomassas lipídicas estudadas, equações empíricas foram aplicadas com o objetivo de estimar a qualidade dos biodieseis derivados desses óleos cianobacterianos. Assim, os parâmetros NC, IS, II, GI, FCLS, PEFF, PT, PF, υ, *ρ e* VA foram calculados e são apresentados na Tabela 11, bem como os seus limites estabelecidos nas legislações brasileira (ANP 45/2014), européia (EN 14214) e americana (ASTM D6751-02).

Tabela 11 - Parâmetros de qualidade dos biodieseis baseados no perfil de ácidos graxos dos óleos das linhagens de cianobactérias estudadas. Log: fase logarítmica; Est: fase estacionária. NC: número de cetano; IS: índice de saponificação (mg KOH $g^{-1}$); II: índice de iodo (g $I_2$ 100 $g^{-1}$); GI:grau de insaturação (%); FCLS: fator de cadeia longa saturada (ºC); PEFF: ponto de entupimento de filtro a frio (ºC); PN: ponto de névoa (ºC); PF: ponto de fluidez (ºC); υ: viscosidade cinemática (40ºC em $mm^2$ $s^{-1}$); ρ: densidade (20ºC em g $m^{-3}$); MVA: maior valor de aquecimento (MJ $Kg^{-1}$); -: não especificado

| Parâmetros | *Amazoninema brasiliense* CMAA 1602 | | | | *Planktothrix mougeotii* CMAA 1564 | | | | Normas | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BG11 | | BG11+1% | | BG11 | | BG11+1% | | ANP 45/2014 | EN 14214 | ASTM D6751-02 |
| | Log | Est | Log | Est | Log | Est | Log | Est | | | |
| NC | 57,75 | 57,72 | 56,95 | 57,00 | 52,91 | 53,31 | 56,59 | 57,36 | - | ≥51 | ≥47 |
| IS | 175,48 | 171,39 | 186,36 | 172,87 | 178,52 | 182,50 | 185,05 | 182,23 | - | - | - |
| II | 87,36 | 90,79 | 82,81 | 92,79 | 106,49 | 101,74 | 85,35 | 83,96 | - | ≤120 | - |
| GI | 74,20 | 76,31 | 75,22 | 79,77 | 96,34 | 94,59 | 79,19 | 77,17 | - | - | - |
| FCLS | 4,43 | 3,89 | 3,02 | 3,20 | 2,97 | 3,59 | 3,48 | 3,68 | - | - | - |
| PEFF | -2,57 | -4,27 | -7,00 | -6,42 | -7,14 | -5,21 | -5,54 | -4,92 | lim. de 5-14 | ≤5/ -20 | - |
| PN | 14,82 | 11,97 | 8,08 | 5,99 | 6,80 | 7,24 | 8,45 | 8,52 | - | - | -3 a 12 |
| PF | 9,27 | 6,17 | 1,95 | -0,32 | 0,56 | 1,04 | 2,35 | 2,42 | - | - | - |
| υ | 0,85 | 2,14 | 0,43 | 1,92 | 0,21 | 0,92 | 1,14 | 2,12 | 3,0 a 6,0 | 3,5-5,0 | 1,9-6,0 |
| ρ | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | 0,87 | - | 0,86-0,90 | 0,86-0,90 |
| MVA | 39,03 | 38,12 | 39,77 | 38,81 | 37,53 | 39,39 | 39,07 | 39,26 | - | - | - |

Todas as amostras avaliadas apresentaram o número de cetano maior que os mínimos especificados pelas normas estadunidense e européia, acima de 51 e 47 respectivamente. Esse parâmetro é um indicador da qualidade de ignição do motor a diesel e é determinado pelo tempo de retardamento da ignição (KNOTHE, 2005), sendo que quanto maior o seu valor, melhor é a combustão e menor é a emissão de óxido de nitrogênio (NOx)

(QUIRINO et al., 2014). De acordo com Quirino et al. (2014), o biodiesel puro têm um valor médio de número cetano igual a 55, enquanto diesel comum apresenta valores entre 48 e 52. Os valores encontrados para as linhagens neste trabalho estão de acordo com os resultados reportados por Franscisco et al. (2010) para as linhagens *Aphanothece microscopica* (Rsman92) (55,8) e *Phormidium* sp. (54,6), e por Selvan et al. (2013) para *Lyngbya* sp. (55,01) e *Synechococcus* sp. (55,2). Além disso, esses valores são bem próximos do NC encontrado para o óleo de palma (61) e colza (55) (JACOB-LOPEZ; FRANCO, 2013).

Os índices de saponificação encontrados para as linhagens variou de 171,32 a 185,50 mg KOH $g^{-1}$. Segundo Gopinath et al. (2009), esse parâmetro representa a quantidade necessária de KOH (mg) para saponificar 1 g de lipídios em condições específicas. Apesar de não ter seus limites especificados na legislação consultada, esses resultados são coerentes com os obtidos por Gayathri et al. (2018) para cinco linhagens cianobacterianas (115,46 a 217,52).

Das três normas consultadas, apenas a européia estabece como 120 g $I_2$ 100 $g^{-}1$ o limite para o índice de iodo. Esse parâmetro representa a quantidade de $I_2$ (mg) consumido por 100 g de substrato em uma reação química (PATEL et al., 2017). De acordo com Quirino et al. (2014), ele é um indicador do número de ligações duplas presentes no biodiesel, mas não distingue suas posições, o que dificulta a sua utilização na estimativa da estabilidade oxidativa e sua tendência em formar depósitos no motor. O índice de iodo apresenta uma correlação com o grau de insaturação onde quanto maior a insaturação no óleo, maior é o seu valor (KNOTHE, 2002; RAMOS et al., 2009). Partindo dessa premissa, os altos valores encontrados para o índice de iodo (82,81 a 106,49) e para o grau de insaturação (74,20 a 96,34) podem ser justificados pelo maior teor de ácidos graxos poli-insaturados nas amostras, principalmente nos extratos lipídicos obtidos da biomassa cultiva em meio sem vinhaça. Deve-se ressaltar também, que valores para esses dois parâmetros foram reportados por Da Rós et al. (2013) (II = 57 a 100; GI = 60,7 a 105,5) e por Anahas e Muralitharan (2015) (II = 32,51 a 117,39; GI = 83,19 a 132,67). Além disso, esses valores de índice de iodo encontrados para os óleos cianobacterianos são menores que os reportados por Hoekman et al. (2012) para matérias-primas lipídicas utilizadas na produção de biodiesel como a soja (125,5) e o girassol (128,7) e semelhantes ao de sebo bovino (65,9) e óleo de fritura (88,9).

Dentre as propriedades relacionadas às características do biodiesel em baixas temperaturas, nomeadamente ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF), fator da cadeia longa saturada (FCLS), ponto de névoa (PT) e ponto de fluidez (PF), apenas a primeira tem seus limites especificados pela legislação européia e brasileira.

O PEFF representa a temperatura mais baixa (ºC) na qual o biodiesel passa facilmente pelo sistema de filtros padronizado em um espaço de tempo específico (KNOTHE, 2005). Esse parâmetro é importante para regiões mais frias, visto que as baixas temperaturas propiciam a cristalização das moléculas saturadas no biodiesel ocasionando o entupimento dos canais e filtros dos motores (DWIVEDI; SHARMA, 2014). Em função do clima, as especificações desse parâmetro varia de acordo com a região. Na Europa, os valores de PEFF são definidos por cada país, enquanto no Brasil a norma ANP 45/2014 estabelece o limite máximo por região e estação do ano, podendo variar de 5 a 14ºC. Os valores obtidos para as biomassas analisadas (-7,14 a -2,57 ºC) estão de acordo com os limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira em todas as regiões e pela norma européia EN 14214 (-20 a 5 ºC). Resultados semelhantes foram reportados por Nascimento et al. (2013) para linhagens de microalgas (-12,23 a -0,55 ºC) e por Da Rós et al. (2017) para a cianobactéria *Trichormus* sp. CENA77 (-2,3 ºC). Esses trabalhos também apresentaram resultados similares para o fator de cadeia longa saturada (FCLS) que variou de 3,02 a 4,43% para os óleos da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, e de 2,97 a 3,68% para *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Esse parâmetro refere-se as cadeias carbônicas que são totalmente saturadas com hidrogênio e é utilizado no cálculo do PEFF (HOEKMAN et al., 2012; PATEL et al., 2017).

Outras duas propriedades relacionadas à baixas temperaturas também avaliadas foram o ponto de névoa (PN) e ponto de fluidez (PF), que têm limites estabelecidos pela ASTM D6751-02 em -3 a 12ºC, e -15 a 20 ºC, respectivamente. O primeiro parâmetro corresponde a menor temperatura na qual o óleo começa o processo de cristalização, enquanto o segundo é definido como a temperatura mais baixa na qual o biodiesel escoa livremente nas tubulações (KNOTHE, 2008; GAYATHRI et al., 2018). Uma maior variação nos valores encontrados para esses parâmetros foi verificado na linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 (PN = 5,99 a 14,82ºC. PF = -0,32 a 9,27ºC). Para a linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 observou-se valores do PN entre 6,80 a 8,52ºC, e de PF de 0,56 a 2,35ºC. No estudo realizado por Tsolcha et al. (2018), uma linhagem de *Leptolyngbya* sp. foi cultivada em consórcio com a microalga *Ochromonas* sp. (menos de 5% da população fotossintética) para produção de biodiesel. Os autores estimaram as propriedades do biodiesel derivado da biomassa gerada, e reportaram uma variação no ponto de névoa (6,62 a 9,9 ºC) semelhante ao encontrado para a *Amazoninema brasiliense* CMAA1602.

No que se refere a viscosidade cinemática (υ), todos os resultados ficaram abaixo dos valores típicos para o diesel comum (2-3 $mm^2$ $s^{-1}$ a 40ºC) e para o biodiesel (4-5 $mm^2$ $s^{-1}$ a 40ºC) (HOEKMAN et al., 2012). Quando comparados aos limites estabelecidos na legislação, observou-se que apenas três amostras estavam na faixa estabelecida na ASTM D6751-02 e todas apresentaram valores inferiores aos mínimos definidos nas normas brasileira e européia. O aumento da viscosidade do biodiesel está diretamente relacionado a cadeias carbônicas maiores e grau de insaturações elevado, influenciando diretamente o processo de queima do combustível na câmara de combustão do motor (KNOTHE, 2005; LÔBO et al., 2009). Quando a viscosidade cinemática é muito baixa, a lubrificação das bombas de injeção do biocombustível não é eficaz ocasionando vazamentos e aumento do desgaste do sistema injetor (JAHIRUL et al., 2015). Alguns autores encontraram, por meio de equações empíricas, valores baixos para esse parâmetro em óleos cianobacterianos de linhagens como *Mycrocystis aeruginosa* CACIAM03 (0,79 $mm^2$ $s^{-1}$; ABOIM et al., 2016), *Calothrix marchica* MBDU602 (1,59 $mm^2$ $s^{-1}$; ANAHAS; MURALITHARAN, 2015) e *Anabaena variabilis* MBDU 013 (0,87 $mm^2$ $s^{-1}$; ANAHAS; MURALITHARAN, 2018).

Os valores de densidade estimados para os biodieseis derivados das amostras de óleos cianobacterianos foram iguais (0,87 MJ $Kg^{-}1$) e estão dentro dos limites dispostos nas normas internacionais (0,86-0,90 MJ $Kg^{-1}$). Além disso, se assemelham aos valores encontrados por Gayathri et al. (2018). Segundo Patel et al. (2017), a densidade do combustível está relacionada com outras propriedades como a viscosidade, o valor de aquecimento, número de cetano, teor de água e teor de ácidos graxos livres no biodiesel. Ainda, combustíveis com maior densidade fornece mais energia do que aqueles de menor densidade (ISLAM et al., 2017).

O maior valor de aquecimento (MVA), também conhecido como poder calorífico, não tem seus limites definidos nas normas consultadas. Os resultados de parâmetro para os óleos obtidos das linhagens *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 (38,12 a 39,77 MJ $Kg^{-1}$) e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 (37,53 a 39,39 MJ $Kg^{-1}$), corroboram com os dados de Hoekman et al. (2012) para os biodieseis derivados dos óleos de soja (39,7 MJ $Kg^{-1}$), côco (38,1 MJ $Kg^{-1}$) e sebo (39,7 MJ $Kg^{-1}$), e para a cianobactéria *Trichormus* sp. CENA77 (37,1). O MVO é um importante parâmetro utilizado para determinar o consumo do biodiesel nos motores, sendo que quanto maior é seu valor, menor é o consumo do biocombustível (KNOTHE, 2008). Ainda, de acordo com Ramirez-Verduzco et al. (2012), o biodiesel tem um valor de MVO entre 39,57 e 41,33 MJ $Kg^{-1}$ enquanto que para o diesel mineral esse valor fica por volta de 46 MJ $Kg^{-1}$, uma diferença de 12%.

As propriedades do biodiesel podem ser melhoradas por meio de diferentes abordagens. De acordo com Knothe e Razon (2017), existem cinco abordagens possíveis atualmente: a) uso de aditivos, b) uso de outros ésteres além do metil, e modificando o perfil de ácidos graxos por c) métodos físicos, d) modificações genéticas, ou e) utilizando matérias-primas com diferentes composições de ácidos graxos. Nesse sentido, considerando que as amostras de óleos cianobacterianos apresentaram valores semelhantes entre si e na maioria dos casos esses resultados estavam de acordo com a legislação pertinente, eles poderiam ser utilizados como matéria-prima lipídica para síntese de biodiesel. Entretanto, deve-se ressaltar que a melhoria da qualidade de suas propriedades são necessárias para que atendam os requerimentos de cada mercado. Uma possibilidade é, caso o mercado visado seja o nacional, a mistura do biodiesel obtido desses óleos cianobacterianos com outros que apresentem maior viscosidade e alto PEFF, como o óleo de palma ($\upsilon$ = 4,61 $mm^2$ $s^{-1}$ a 40ºC; PEFF = 9 ºC) (HOEKMAN et al., 2012).

## 7. CONCLUSÕES

Em geral, todas as linhagens de cianobactérias estudadas foram capazes de crescer em meio suplementado com vinhaça, porém nenhuma cresceu nas diluições de vinhaça em água ultrapura. Apesar do efeito inibitório sobre o crescimento nas concentrações mais elevadas de vinhaça, nas concentrações mais baixas houve um incremento da biomassa, principalmente para a linhagem *Planktothrix mougeotii* CMAA1564. Além disso, a análise da composição de ácidos graxos das biomassas desses micro-organismos permitiu a seleção da linhagem *Amazoninema brasiliense* CMAA1602, devido ao ao seu alto teor de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (40% a 60% do total de ácidos graxos detectados).

A análise das fases de crescimento de *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 demonstrou que a coleta da biomassa na fase de crescimento logarítmica (log) permitiu a obtenção das melhores produtividades de biomassa e lipídica. Por outro lado, a composição de ácidos graxos das frações lipídicas não apresentou alterações consideráveis nos percentuais dos ácidos graxos majoritários. Já a suplementação do meio de cultivo com vinhaça favoreceu o aumento da produtividade de biomasssa para ambas as linhagens. A maior produtividade lipídica foi de 2,60 mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$ em *Amazoninema brasiliense* CMAA1602 e 3,18 mg $L^{-1}$ dia-1 em *Planktothrix mougeotii* CMAA1564 alcançada em meio de cultura suplementado com vinhaça. Sua adição também influenciou na composição de ácidos graxos das frações lipídicas dessas linhagens, favorecendo um maior teor de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e, consequente redução dos poli-insaturados.

A estimativa das propriedades dos biodieseis derivados desse óleos cianobacterianos, demonstrou que a maioria dos parâmetros de qualidade analisados estavam dentro dos limites determinados na legislação nacional e internacional. Diante disso, o presente estudo demonstrou que a utilização de um resíduo agroindustrial como a vinhaça na suplementação do meio de cultivo para cianobactérias, pode pode estimular a produção de biomassa visando não somente o biodiesel, como outros biocombustíveis. Ainda, a caracterização das 11 linhagens estudadas evidenciou a presença de possíveis novos táxons, como no caso do gênero *Amazoninema* sp. descrito recentemente. Esses resultados destacam a importância de buscar em ambientes pouco explorados, cianobactérias com potencial de produção de biomoléculas com interesse comercial.

## REFERÊNCIAS


ABDEL-ROUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEN, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 19, p. 257-275, 2012.

ABED, R. M. M.; DOBRETSOV, S.; SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, p. 1-12, 2009.

ABOIM, J. B.; OLIVEIRA, D.; FERREIRA, J. E.; SIQUEIRA, A. S.; DALL'AGNOL, L. T.; ROCHA FILHO, G. N.; GONÇALVES, E. C.; NASCIMENTO, L. A. Determination of biodiesel properties based on a fatty acid profile of eight Amazon cyanobacterial strains grown in two different culture media. **RSC Advances**, Cambridge, v. 6, p. 109751-109758, 2016.

ABOMOHRA, A.E.F.; WAGNER, M.; EL-SHEEKH, M.; HANELT, D. Lipid and total fatty acid productivity in photoautotrophic fresh water microalgae: Screening studies towards biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 25, p. 931–936, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBSUTÍVEIS - ANP. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. Rio de Janeiro, 2017.

AHMAD, A.; YASIN, N.; DEREK, C.; LIM, J. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 584–593, 2011.

AL-HAJ, L.; LUI, Y. T.; ABED, R. M. M.; GOMAA, M. A.; PURTON, S. Cyanobacteria as chassis for industrial biotechnology: progress and prospects. **Life**, Basel, v. 6, p. 42, 2016.

ALLEN, M. B., ARNON, D. I.: Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, p. 366–372, 1955.

ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Applied Phycology,** Heidelberg, v. 4, p.1-4, 1968.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology,** London, v.215, p. 403-410, 1990.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign: AOCS, 2004.

AMMAR, M.; COMTE, K.; TRAN, T. D. C.; BOUR, M. E. Initial growth phases of two bloom-forming cyanobacteria (*Cylindrospermopsis raciborskii* and *Planktothrix agardhii*) in monocultures and mixed cultures depending on light and nutrient conditions. **International Journal of Limnology**, Cambridge, v. 50, p. 231-240, 2014.

AMOR, F. B.; BARKALLAH, M.; ELLEUCH, F.; KARKOUCH, N.; DAMMAK, M.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; ABDELKAFI, S.; FENDRI, I. Cyanobacteria as sources of marine bioactive compounds - molecular specific detection based on delta9 desaturase gene. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 105, p. 1440-1445, 2017.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK; J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 5 – Stigonematales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 59, p. 1-73, 1990.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK; J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 1 – Introduction. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 38, p. 291-302, 1985.

ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK; J. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 – Oscillatoriales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 50, p. 327-472, 1988.

ANAHAS A. M. P., MURALITHARAN G. Isolation and screening of heterocytous cyanobacterial strains for biodiesel production by evaluating the fuel properties from fatty acid methyl ester (FAME) profiles. **Bioresource Technology**, Barking, v. 184, p. 9–17, 2015.

ANAHAS, A. M. P.; MURALITHARAN, G. Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 157, p. 423–437, 2018.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 264, p. 130-134, 2007.

ANGERT, E. R. Alternatives to binary fission in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 214–224, 2005.

ASTHANA, R. K.; SRIVASTAVA, A.; KAYASTHA, A. M.; NATH, G.; SINGH, S. P. Antibacterial potential of gamma-linolenic acid from *Fischerella* sp. colonizing Neem tree bark. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 443–448, 2006.

ATABANI, A. E.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; BADRUDDIN, I. A.; YUSSOF, H. W.; CHONG, W. T.; LEE, K. T. A comparative evaluation of physical and chemical properties of biodiesel synthesized from edible and non-edible oils and study on the effect of biodiesel blending. **Energy**, Amsterdam, v. 58, p. 296–304, 2013.

ATSUMI, S.; HIGASHIDE, W.; LIAO, J. C. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. **Nature Biotechnology,** New York, v. 27, p. 1177–1180, 2009.

BAGCHI, S. N.; DUBEY, N.; SINGH, P. Phylogenetically distant clade of Nostoc-like taxa with the description of *Aliinostoc* gen. nov. and *Aliinostoc morphoplasticum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 67, p. 3329–3338. 2017.

BARCHI, J. J.; MOORE, R. E.; PATTERSON, G. M. L. Acutiphycin and 20,21-didehydroacutiphycin, new antineoplastic agents from the cyanophyte *Oscillatoria acutissima*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 106, p. 8193–8197. 1984.

BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010.

BAUNILLO, K. E.; TAN, R. S.; BARROS, H. R.; LUQUE, R. Investigations on microalgal oil production from *Arthrospira platensis*: towards more sustainable biodiesel production. **RSC Advances**, Cambridge, v. 2, p. 11267−11272. 2012.

BECK, C.; KNOOP, H.; AXMANN, I. M.; STEUER, R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. **BMC Genomics**, London, v. 13, p. 56, 2012.

BEHERA, S.; SINGH, R.; ARORA, R.; SHARMA, N. K.; SHUKLA, M. AND KUMAR, S. Scope of algae as third generation biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 2, p. 90, 2014.

BEKKER, A.; HOLLAND, H. D.; WANG, P. L.; RUMBLE, D.; STEIN, H. J.; HANNAH, J. L.; COETZEE, L. L.; BEUKES, N. J. Dating the rise of atmospheric oxygen. **Nature**, London, v. 427, p. 117–120, 2004.

BELAY, A. Biology and industrial production of *Arthrospira (Spirulina*). In: RICHMONDAND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgae culture**. 2. ed. New York: Wiley, 2013. p. 339-358.

BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M.; DAS, K. C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n.10, p. 3425–3431, 2011.

BILLER, S. J.; SCHUBOTZ, F.; ROGGENSACK, S. E.; THOMPSON, A. W.; SUMMONS, R. E.; CHISHOLM, S.W. Bacterial vesicles in marine ecosystems. **Science**, Washington, DC, v. 343, p. 183–186, 2014.

BIRNBOIM, H.; DOLY, C. J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 6, p. 1513–1523, 1979.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, p. 911–917, 1959.

BOETIUS, A.; ANESIO, A. M.; DEMING, J. W.; MIKUCKI, J. A.; RAPP, J. Z. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 13, n.11, p. 677-690, 2015.

BONEN, L.; DOOLITTLE, W. F.; FOX, G. E. Cyanobacterial evolution: results of 16s ribosomal ribonucleic acid sequence analyses. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 57, p. 879-888, 1979.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β-Carotene (Provitamin A) production with algae. In: VANDAMME, E. J. (Ed.). **Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors**. London: Elsevier Applied Science, 1898. p. 15–26.

BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes: Matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 4, p. 267–279. 1992.

BOROWITZKA, M. A. Energy from microalgae: a short history. In: BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI N. R. (Ed.). **Algae for biofuels and energy**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 1-15.

BOUVY, M.; FALCAO, D.; MARINHO, M.; PAGANO, M.; MOURA, A. Occurrence of Cylindrospermopsis (Cyanobacteria) in 39 Brazilian tropical reservoirs during the 1998 drought. **Aquatic Microbial Ecology**, Oldendorf, v. 23, p. 13-27, 2000.

BRANCO, L. H. Z.; SANT`ANA, C. L.; AZEVEDO, M. T. P.; SORMUS, L. Cyanophyte flora from Cardoso Island mangrove, São Paulo state, Brazil. 1. Chroococales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 80, p. 99-111, 1996.

BRASIL, B.; SILVA, F.; SIQUEIRA, F. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 39, p. 90-98, 2017.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Relatório Energético Nacional 2017** - ano base 2016. Brasília, DF, 2017. 296 p.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae–a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 14, p. 557-577, 2010.

BRITO, Â.; RAMOS, V.; MOTA, R.; LIMA, S.; SANTOS, A.; VIEIRA, J.; VIEIRA, C. P.; KAŠTOVSKÝ, J.; VASCONCELOS, V.M.; TAMAGNINI, P. Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 111, p. 18-34, 2017.

BROCKS, J. J.; JARRETT, A. J. M.; SIRANTOINE, E.; HALLMANN, C.; HOSHINO, Y.; LIYANAGE, T. The rise of algae in Cryogenian oceans and the emergence of animals. **Nature**, London, v. 548, n. 7669, p. 578-581, 2017.

BRUNO, L.; DI PIPPO, F.; ANTONAROLI, S.; GISMONDI, A.; VALENTINI, C.; ALBERTANO, P. Characterization of biofilm-forming cyanobacteria for biomass and lipid production. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 5, p. 1052-1064, 2012.

BUDIYONO, I. S.; SUMARDIONO, S.; SASONGKO, S. B. Production of *Spirulina platensis* biomass using digested vinasse as cultivation medium. **Trends in Applied Sciences Research**, Faisalabad, v. 9, n. 2, p. 93–102, 2014.

BUSS, A.; GLÓRIA, N. A.; JACINTHO, O. A. Viabilidade do uso de herbicidas em mistura com vinhaça para o controle de plantas daninhas em soqueiras de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 1, n. 2, p. 49-58, 1978.

CAGLIARI, A.; MARGIS, R.; DOS SANTOS MARASCHIN, F.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; LOSS, G.; MARGIS-PINHEIRO, M. Biosynthesis of Triacylglycerols (TAGs) in plants and alga. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 2, p. 40–52, 2011.

CAIRES, T. A.; DE MATTOS LYRA, G.; HENTSCHKE, G. S.; DE GUSMÃO PEDRINI, A.; SANT'ANNA, C. L.; DE CASTRO NUNES, J. M. *Neolyngbya* gen. nov.(*Cyanobacteria*, *Oscillatoriaceae*): A new filamentous benthic marine taxon widely distributed along the Brazilian coast. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 120, p. 196-211, 2018.

CALIXTO, C. D.; SANTANA, J. K. S.; TIBÚRCIO, V. P.; DE PONTES, L. F. B. L.; SASSI, R. Productivity and fuel quality parameters of lipids obtained from 12 species of microalgae from the northeastern region of Brazil. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 122, p. 507-516, 2018.

CAMPBELL, W. S.; LAUDENBACH, D. E. Characterization of four superoxide dismutase genes from a filamentous cyanobacterium. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 177, p. 964–972, 1995.

CANDIDO, C. **Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas: uma abordagem ecofisiológica**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 29, p. 45–53, 2017.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodiegested treated vinasses. **Algal Research**, Amsterdam, v. 30, p. 79-85, 2018.

CAÑIZARES, R. O.; DOMÍNGUEZ, A. R. Growth of *Spirulina maxima* on swine waste. **Bioresource Technology,** Barking, v. 45, p.73–75, 1993.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; RAMOS, A.; CORONA, A. I.; MONROY, O.; DE LA TORRE, M.; GÓMEZ-LOJERO, C.; TRAVIESO L. *Phormidium* treatment of anaerobically treated swine wastewater. **Water Research**, Amsterdam, v. 28, p. 1891-1895, 1994.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; DOMÍNGUEZ, A. R.; CRUZ, M. S.; RÍOS-LEAL, E. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater. **Bioresource Technology**, Barking, v. 51, p. 111–116, 1995.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology,** London, v. 146, p. 60–78, 2007.

CASTENHOLZ, R. W. The effect of sulfide on the blue green algae of hot springs. I. New Zealand and Iceland. **Journal of Phycology**, New York, v. 12, p. 54–68, 1976.

CASTENHOLZ, R. W. Cyanobacteria. General characteristics of the cyanobacteria. In: BOONE, D. R.; CSTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**. 2. ed. New York: Spinger-Verlag, 2001. p. 474-487.

CASTENHOLZ, R. W. Cyanobacteria. Oxygenic photosynthetic bacteria. In: WHITMAN, W. B. (Ed.). **Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria**. Hoboken: Wiley, 2015. Doi: 10.1002/9781118960608.cbm00020.

CASTENHOLZ, R. W.; WATERBURY, J. B. Group I. Cyanobacteria. In: KROEG, N. R. (Ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. v. 3, p. 1710-1728.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 2, 1649-1655, 2011.

CHINTALAPATI, S., PRAKASH, J.S.S., SINGH, A.K., OHTANI, S., SUZUKI, I., MURATA, N., SHIVAJI, S. Desaturase genes in a psychrotolerant *Nostoc* sp. are constitutively expressed at low temperature. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 362, p. 81–87, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats ethanol. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 25, p. 294–306, 2007.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 34, p. 461-465, 2004.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, New York, v. 33, v. 12, p. 2752–2761, 2013.

CHYNOWETH, D. P.; OWENS, J. M.; LEGRAND, R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 22, p. 1–8, 2001.

CIFERRI, O. Spirulina, the edible microorganisms. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 47, p. 551-578, 1983.

COHEN, Z. **Chemical from microalgae**. London: CRC Press, 1999.

COHEN, Y.; JØRGENSEN, B. B.; REVSBECH, N. P.; POPLAWSKI, R. Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 51, p. 398–407, 1986.

COLLET, P.; LARDON, L.; HÉLIAS, A.; BRICOUT, S.; LOMBAERT-VALOT, I.; PERRIER, B.; LÉPINE, O.; STEYER, J.; BERNARD, O. Biodiesel from microalgae – Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 71, p. 525-533, 2014.

CORDEIRO, R. S.; VAZ, I. C.; MAGALHAES, S.; BARBOSA, F. A. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 2021-2031, 2017. Suplemento 3.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; ROMERO-OGAWA, M. A.; VANNELA, R.; LAI, Y. S.; RITTMANN, B. E.; PARRA-SALDIVAR, R. Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. **Algal Research**, Amsterdam, v. 12, p. 10–16, 2015.

D'HONDT, E.; MARTIN-JUAREZ, J.; BOLADO, S.; KASPEROVICIENE, J.; KOREIVIENE, L.; SULCIUS, S.; BASTIAENS, L. Cell disruption technologies. In: MUÑOZ, R.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publshing, 2017. p. 133-154.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P; SILVA-STENICO,M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F. Microbial oil derived from filamentous cyanobacterium *Trichormus sp.* as feedstock to yield fatty acid ethyl esters by enzymatic synthesis. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology**, Hooghly, West Bengal, v. 12, n. 4, p. 1-14, 2017.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; DE CASTRO; H. F. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 84, p. 177–182, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, C. S.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F. D. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. **Marine Drugs**, Basel, v. 11, n. 7, p. 2365-2381, 2013.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, Barking, v. 88, p. 3541–3547, 2011.

DENG, M. D.; COLEMAN, J. R. Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 523–528, 1999.

DOMOZYCH, D. S. Algal cell walls. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Hoboken: Wiley, 2011. p. 518-525.

DOR, L.; CARL, N.; BALDINGER, I. Polymorphism and salinity tolerance as a criterion for differentiation of three new species of *Chroococcidiopsis* (Chroococcales). **Algological Studies**, Stuttgart, v. 64, p. 411-421, 1991.

DU, W.; JONGBLOETS, J. A.; HERNÁNDEZ, H. P.; BRUGGEMAN, F. J.; HELINGWERF, K. J.; SANTOS, F. B. Photonfluxostat - a method for light-limited batch cultivation of cyanobacteria at different, yet constant, growth rates. **Algal Research,** Amsterdam, v. 20, p. 118-125, 2016.

DUONG, V. T., LI, Y.; NOWAK E.; SCHENK P. M. Microalgae isolation and selection for prospective biodiesel production. **Energies**, Basel, v. 5, p. 1835-1849, 2012.

DVOŘÁK, P.; POULÍČKOVÁ, A.; HAŠLER, P.; BELLI, M.; CASAMATTA, D. A.; PAPINI, A. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 24, n. 4, p. 739–757, 2015.

DWIVEDI, G.; SHARMA, M. P. Impact of cold flow properties of biodiesel on engine performance. **Renewable & Suitanable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 31, p. 650-656, 2014.

ENGIN, I. K.; CEKMECELIOGLU, D.; YÜCEL, A. M.; OKTEM, H. A. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 251, p. 128-134, 2018.

EL-SHEEKH, M.; EL-SHOUNY, W.; OSMAN, M.; EL-GAMMAL, E. Treatment of sewage and industrial wastewater effluent by the Cyanobacteria *Nostoc muscorum* and *Anabaena subcylenderica*. **Journal of Water Chemistry and Technology**, Heidelberg, v. 36, p. 354-371, 2014.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, London, v. 29, n. 12, p. 1235-1250, 2011.

ESSON, D.; WOOD, S. A.; PACKER, M. A. Harnessing the self-harvesting capability of benthic cyanobacteria for use in benthic photobioreactors. **AMB Express**, Heidelberg, v. 1, p. 19–26, 2011.

ESTEVES-FERREIRA, A. A.; CAVALCANTI, J. H. F.; VAZ, M. G. M. V.; ALVARENGA, L. V.; NUNES-NESI, A.; ARAÚJO, W. L. Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 40, p. 261–275, 2017.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, p. 175–185, 1998.

FALKOWSKI, P. G.; LAROCHE, J. Acclimation to spectral irradiance in algae. **Journal of Phycology**, New York, v. 27, n. 1, p. 8-14, 1991.

FAY, P. Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 39, n. 1, p. 11-20, 1965.

FILOSO, S.; DO CARMO, J. B.; MARDEGAN, S. F.; LINS, S. R. M.; GOMES, T. F.; MARTINELLI, L. A. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 52, p. 1847-1856, 2015.

FLORES, E.; HERRERO, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 39, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANCISCO, E. C.; Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 85, n. 3, p. 395-403, 2010.

FRENTZEN, M.; HEINZ, E.; MCKEON, T. A.; STUMPF, P. K. Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 129, n. 3, p. 629-636, 1983.

FROEHLICH, J. E.; POORMAN, R.; REARDON, E.; BARNUM, S.; JAWORSKI, J. G. Purification and characterization of acyl carrier protein from two cyanobacteria species. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 193, n. 3, p. 817-825, 1990.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GAO, X.; GAO, F.; LIU, D.; ZHANG, H.; NIE, X.; YANG, C. Engineering the methylerythritol phosphate pathway in cyanobacteria for photosynthetic isoprene production from CO2. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 1400-1411, 2016.

GAO, Z.; ZHAO, H.; LI, Z.; TAN, X.; LU, X. Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 9857-9865, 2012.

GASHAW, A.; GETACHEW, T.; TESHITA, A. A Review on biodiesel production as alternative fuel. **Journal of Forest Products & Industries**, Socchi, v. 4, p. 80-85, 2015.

GAYATHRI, M.; SHUNMUGAM, S.; MUGASUNDARI, A. V.; RAHMAN, P. K.; MURALITHARAN, G. Growth kinetic and fuel quality parameters as selective criterion for screening biodiesel producing cyanobacterial strains. **Bioresource Technology**, Barking, v. 247, p. 453-462, 2018.

GENUÁRIO, D. B.; CORRÊA, D. M.; KOMÁREK, J.; FIORE, M. F. Characterization of freshwater benthic biofilm-forming *Hydrocoryne* (Cyanobacteria) isolates from Antarctica. **Journal of Phycology**, New York, v. 49, n. 6, p. 1142-1153, 2013.

GENUÁRIO, D. B.; VAZ, M. G. M. V.; DE MELO, I. S. Phylogenetic insights into the diversity of *Homocytous* cyanobacteria from Amazonian rivers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 116, p. 120-135, 2017.

GENUÁRIO, D. B.; DE SOUZA, W. R.; MONTEIRO, R. T. R.; SANT'ANA, C. L.; MELO, I. S. *Amazoninema* gen. nov. (Synechococcales, Pseudanabaenaceae) a novel cyanobacteria genus from Brazilian Amazonian rivers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2018. Doi: 10.1099/ijsem.0.002821.

GER, K. A.; URRUTIA-CORDERO, P.; FROST, P. C.; HANSSON, L. A.; SARNELLE, O.; WILSON, A. E.; LÜRLING, M. The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 54, p. 128-144, 2016.

van GERPEN, J. Biodiesel prodution. In: RANALLI, P. **Improvement of crop plants for industrial end uses**. Dordrecht: Springer, 2007, p. 281-289.

GHIRARDI, M. L.; POSEWITZ, M. C.; MANESS, P. C.; DUBINI, A.; YU, J.; SEIBERT, M. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 71-91, 2007.

GLEASON, F. K.; CASE, D. E. Activity of the natural algicide, cyanobacterin, on angiosperms. **Plant Physiology**, Rockville, v. 80, n. 4, p. 834-837, 1986.

GOMBOS, Z.; KANERVO, E.; TSVETKOVA, N. SAKAMOTO, T.; ARO, E. M.; MURATA, N. Genetic enhancement of the ability to tolerate photoinhibition by introduction of unsaturated bonds into membrane glycerolipids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 551-559, 1997.

GONÇALVES, J. N. J. N. **Diversidade de cianobactérias na filosfera da Mata Atlântica do estado de São Paulo**. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GOPINATH, A.; PUHAN, S.; NAGARAJAN, G. Theoretical modeling of iodine value and saponification value of biodiesel fuels from their fatty acid composition. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 34, n. 7, p. 1806-1811, 2009.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GOVENDER, T.; RAMANNA, L.; RAWAT, L.; BUX, F. BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, Barking, v. 114, p. 507-511, 2012.

GREWE, C. B.; PULZ, O. The biotechnology of cyanobacteria. In: WHITTONJ, B. A. **Ecology of cyanobacteria II**: their diversity in space and time. Heidelberg: Springer, 2012. p. 707-739.

GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 119-123, 2011.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 21, n. 5, p. 493-507, 2009.

GROBBELAAR, J. U. Algal nutrition – Mineral nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. chap. 6, p. 95-115.

GROSS, E. M. Allelopathy of aquatic autotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raaton, v. 22, n. 3-4, p. 313-339, 2003.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; BARBOSA, C. R.; PEREIRA, R. D.; MALCATA, F. X. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α-linolenic acids for eventual dietary uses. **Food Research International**, Amsterdam, v. 44, n. 9, p. 2721-2729, 2011.

GULDHE, A.; SINGH, B.; RAWAT, I.; RAMLUCKAN, K.; BUX, F. Efficacy of drying and cell disruption techniques on lipid recovery from microalgae for biodiesel production. **Fuel,** Amsterdam, v. 128, p. 46-52, 2014.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L. Occurrence and characterization of oils and fats. In: GUNSTONE F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The lipid handbook**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 37-142.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R. New insights into the biodiversity and applications of cyanobacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 79-97, 2013.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid Bbiochemistry**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2002.

HALIM, R.; GLADMAN, B.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 1, p. 178-185, 2011.

HARDER, von R.; VON WITSCH, H. Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Microorganismen. **Forschungsdienst Sonderheft**, Berlin, v. 16, p. 270-275, 1942.

HAUER, T.; BOHUNICKÁ, M. jOHANSEN, J. R. MARES, J.; BERRENDERO-GOMEZ, E. Reassessment of the cyanobacterial family *M icrochaetaceae* and establishment of new families *Tolypothrichaceae* and *Godleyaceae*. **Journal of Phycology**, New York, v. 50, n. 6, p. 1089-1100, 2014.

HEDGES, S. B.; CHEN, H.; KUMAR, S.; WNAG, D. Y.; THOMPSON, A. S.; WATANABE, H. A genomic timescale for the origin of eukaryotes. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 1, n. 1, p. 4, 2001.

HERRERO, A.; STAVANS, J.; FLORES, E. The multicellular nature of filamentous heterocyst-forming cyanobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 40, n. 6, p. 831-854, 2016.

HOFFMANN, L.; KOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J. System of *cyanoprokaryotes* (cyanobacteria)–state in 2004. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 117, n. 1, p. 95-115, 2005.

HOEKMAN, S. K.; BROCH, A.; ROBBINS, C.; CENICEROS, E.; NATARAJAN, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 143-169, 2012.

HROUZEK, P.; LUKEŠOVÁ, A.; MAREŠ, J.; VENTURA, S. Description of the cyanobacterial genus *Desmonostoc* gen. nov. including *D. muscorum* comb. nov. as a distinct, phylogenetically coherent taxon related to the genus *Nostoc*. **Fottea**, Praha, v. 13, n. 2, p. 201-213, 2013.

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

ILIEV, I.; PETKOV, G.; LUKAVSKY, J.; FURNADZHIEVA, S.; ANDREEVA, R. Do cyanobacterial lipids contain fatty acids longer than 18 carbon atoms? **Zeitschrift für Naturforschung C**, Berlin, v. 66, n. 5-6, p. 267-276, 2011.

INTERNTATIONAL BIOENERGY AGENCY - IEA. **State of technology review –** Algae bioenergy: an IEA bioenergy inter-task strategic project. Golden, CO: IEA, 2017. (Task, 39).

ISLAM, M. A.; HEIMANN, K.; BROWN, R. J. Microalgae biodiesel: current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 79, p. 1160-1170, 2017.

JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. From oil refinery to microalgal biorefinery. **Journal of $CO_2$ Utilization**, Amsterdam, v. 2, p. 1-7, 2013.

JAHIRUL, M. I.; BROWN, R. J.; SENADEERA, W.; ASHWATH, N.; RASUL, M. G.; RAHMAN, M. M.; HOSSAIN, F. M.; MOGHADDAM, L.; ISLAM, M. A.; O'HARA, I. M. Physio-chemical assessment of beauty leaf (*Calophyllum inophyllum*) as second-generation biodiesel feedstock. **Energy Reports**, Amsterdam, v. 1, p. 204-215, 2015.

JAWAHARRAJ, K.; KARPAGAM, R.; ASHOKKUMAR, B.; KATHIRESAN, S.; VARALAKSHMI, P.; Green renewable energy production from *Myxosarcina* sp.: media optimization and assessment of biodiesel fuel properties. **RSC Advances**, Cambridge, v. 5, n. 63, p. 51149-51157, 2015.

JAWAHARRAJ, K.; KARPAGAM, R.; ASHOKKUMAR, B.; PRATHEEBA, C. N.; VARALAKSCHMI, P. Enhancement of biodiesel potential in cyanobacteria: using agro-industrial wastes for fuel production, properties and acetyl CoA carboxylase D (accD) gene expression of *Synechocystis* sp. NN. **Renewable Energy**, Amsterdam, v. 98, p. 72-77, 2016.

JEFFRIES, T. W.; TIMOURIAN, H.; WARD, R. L. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effects of varying ammonium and ferric ions, pH, and light. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 35, n. 4, p. 704-710, 1978.

JOHNSON, Z.; BIDIGARE, R. R.; BLINEBRY, S.; BROWN, S. K.; CULLEN, J. J.; LOFTUS, S. E.; VAN MOOY, B. A. Screening for lipids from marine microalgae using Nile Red. In: LEE, S. (Ed.). **Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids**: Production of fuels and chemicals. Dordrecht: Springer International Publishing, 2017. p. 1-22.

KACZMARZYK, D.; FULDA, M. Fatty acid activation in cyanobacteria mediated by acyl-acyl carrier protein synthetase enables fatty acid recycling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 152, n. 3, p. 1598-1610, 2010.

KADIOĞLU, A.; ALGUR, Ö. F. Tests of media with vinasse for *Chlamydomonas reinhardii* for possible reduction in vinasse pollution. **Bioresource Technology**, Barking, v. 42, p. 1-5, 1992.

KALAVATHI, D. F.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Degradation and metabolization of the pigment - melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 29, n. 4-5, p. 246-251, 2001.

KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 11, p. 3632-3635, 2011.

KAUFF, F.; BÜDEL, B. Phylogeny of cyanobacteria: an overview. In: LÜTTGE, U. et al. (Ed.). **Progress in Botany 72.** Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 209-224.

KENYON, C. N. Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 109, n. 2, p. 827-834, 1972.

KENYON, C. N.; RIPPKA, R.; STANIER, R. Y. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 216-236, 1972.

KIAEI, E.; SOLTANI, N.; MAZAHERI ASSADI, M; KHAVARINEJAD, R. A.; DEZFULIAN, M. Screening of cyanobacterial strains as a smart choice for biodiesel. **Journal of Applied Environmental Biology and Science**, Socchi, v. 5, n. 8, p. 236-245, 2015.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 82, p. 1376-1392, 2017.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 52, p. 1834-1846, 2015.

KNOLL, A. H. Cyanobacteria and earth history. In. HERRERO, A.; FLORES, E. (Ed.). **The cyanobacteria**: molecular biology. 1. ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2008. p. 1-20.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chamapign, v. 79, n. 9, p. 847-854, 2002.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. **Fuel Processing Technology**, Amsterdam, v. 86, n. 10, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. **Energy & Fuels**, Washington, DC, v. 22, n. 2, p. 1358-1364, 2008.

KNOTHE, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. **Energy & Environmental Science**, Cambridge, v. 2, n. 7, p. 759-766, 2009.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: a comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 364-373, 2010.

KNOTHE, G. Fuel properties of highly polyunsaturated fatty acid methyl esters. Prediction of fuel properties of algal biodiesel. **Energy & Fuels**, Washington, DC v. 26, n. 8, p. 5265-5273, 2012.

KNOTHE, G; KRAHL, J.; VAN GERPEN, J. (Ed.). **The biodiesel handbook**. Elsevier: Amsterdam, 2015.

KNOTHE, G.; RAZON, L. F. Biodiesel fuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 58, p. 36-59, 2017.

KOBAYASHI, K.; ENDO, K.; WADA, H. Roles of lipids in photosynthesis. In: NAKAMURA, Y.; LI-BEISSON, Y. (Ed.). **Lipids in plant and algae development.** 1. ed. Cham: Springer, 2016. p. 21-49.

KÓBORI, T. O.; UZUMAKI, T.; KIS, M. KOVÁCS, L.; DOMONKOS, L.; ITOH, S.; SZILÁK, L. Phosphatidylglycerol is implicated in divisome formation and metabolic processes of cyanobacteria. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 223, p. 96-104, 2018.

KOMÁREK, J. Coccoid and colonial cyanobacteria. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. (Ed.). **Freshwater Algae of North America.** Ecology and classification. New York: Academic Press, 2003. p. 59-116.

KOMÁREK, J. A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 51, n. 3, p. 346-353, 2016.

KOMÁREK, J. Several problems of the polyphasic approach in the modern cyanobacterial system. **Hydrobiologia**, Heidelberg, v. 811, n. 1, p. 7-17, 2018.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2-Chroococcales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 43, p. 157-226, 1986.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. **Algological Studies**, Stuttgart, v. 56, p. 247-345, 1989.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. CYANOPROKARYOTA, 1. Teil: Chroococcales. In: ETTL, H. (Ed.). **Süsswasserflora von Mitteleupora**. Stuttgart: Gustave Fisher, 1999. v. 19/1, p. 1-548.

KOMÁREK, J.; KASTOVSKY, J.; MARES, J.; JOHANSEN, J. R. Taxonomic classification of *Cyanoprokaryotes* (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. **Preslia**, Praha, v. 86, n. 4, p. 295-335, 2014.

KOREIVIENĖ, J.; ANNE, O.; KASPEROVICIENĖ, J.; BURSKYRTE, V. Cyanotoxin management and human health risk mitigation in recreational waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 186, n. 7, p. 4443-4459, 2014.

KRUMBEIN, W. E.; COHEN, Y.; SHILO, M. Solar Lake (Sinai). 4. Stromatolitic cyanobacterial mats. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 22, n. 4, p. 635-656, 1977.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO2 fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p 371-380, 2010.

KUMAR, R.; BISWAS, K.; SINGH, P. K.; ELUMALAI, S.; SHUKLA, P.; PABBI, S. Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of acc D gene in cyanobacteria under different N and P regimes. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 10, n. 1, p. 94, 2017.

KUMAR, R.; HANUMANTHA RAO, P.; ARUMUGAM, M. Lipid extraction methods from microalgae: a comprehensive review. **Frontiers in Energy Research**, Lausanne, v. 2, p. 61, 2015.

LAIME, E. M. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, n. 3, p. 16-29, 2011.

LAM, M. K; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 500-518, 2010.

LAN, E. I.; LIAO, J. C. Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 13, n. 4, p. 353-363, 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LAPUERTA, M.; ARMAS, O.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 198-223, 2008.

LAU, N.; MATSUI, M.; ABDULLAH, A. Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1-9, 2015.

LEA-SMITH, D. J.; HOWE, D. J.; LOVE, J.; BRYANT, J. A. The use of cyanobacteria for biofuel production. In: LOVE, J.; BRYANT, J. A. **Biofuels and bioenergy**. Hoboken: Wiley, 2017. p. 143-155.

LEM, N. W.; STUMPF, P. K. In vitro fatty acid synthesis and complex lipid metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 71, p. 134-138, 1984.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **Journal of Lipid Research**, Menphis, v. 25, n. 12, p. 1391-1396, 1984.

LIMA, A. R. J.; CASTRO, W. D. O.; MORAES, P. H. G.; SIQUEIRA, A. S.; AGUIAR, D. C. F.; DE LIMA, C. P. S.; VIANEZ-JÚNIOR, J. L. S. G.; NUNES, M. R. T.; DALL'AGNOL, L. T.; GONÇALVES, E. C. Draft genome sequence of *Alkalinema* sp. strain CACIAM 70d, a cyanobacterium isolated from an Amazonian freshwater environment. **Genome Announcements**, Washington, DC, v. 5, n. 28, e. 00635-17, 2017.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; DA CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LIN. S.; WU, Z.; GONGLIANG, Y.; XHU, M.; YU, B.; LI., R. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 9, p. 87-97, 2010.

LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella Zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 1, p. 106-110, 2011b.

LIU, X.; SHENG, J.; CURTISS III, R. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 108, n. 17, p. 6899-6904, 2011a.

LIU, Y.; ZHANG, J.; NIE, H.; DONG, C.; LI, Z.; ZHENG, Z.; ZHAO, J. Study on variation of lipids during different growth phases of living cyanobacteria using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washngton, DC, v. 86, n. 14, p. 7096-7102, 2014.

LOPES, O.; COSTA, L.; LOPES-ASSAD, M. L. Solubilização de pó de basalto por meio de vinhaça: variação de pH e nutrientes disponíveis. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, Espírito Santo do Pinhal, v. 10, n. 2, p. 175-188, 2013.

LÓPEZ, C. G.; FERNÁNDEZ, F. A.; SEVILLA, J. F.; FERNÁNDEZ, J. S.; GARCÍA, M. C.; GRIMA, E. M. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in $CO_2$ removal processes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 23, p. 5904-5910, 2009.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* Microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 4, p. 160-167, 2000.

LOS, D. A.; MIRONOV, K. S. Modes of fatty acid desaturation in cyanobacteria: an update. **Life**, Basel, v. 5, n. 1, p. 554-567, 2015.

LOS, D. A.; MURATA, N. Structure and expression of fatty acid desaturases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 1394, n. 1, p. 3-15, 1998.

LUESCH, H.; MOORE, R. E.; PAUL, V. J.; MOOBERRY, S. L.; CORBETT, T. H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca Species* VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 64, n. 7, p. 907-910, 2001.

LYNCH, F.; SANTANA-SANCHEZ, A.; JÄMSÄ, M.; SIVONE, K.; ARO, E. M.; ALLAHVERDIYEVA, Y. Screening native isolates of cyanobacteria and a green alga for integrated wastewater treatment, biomass accumulation and neutral lipid production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 11, p. 411-420, 2015.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Barking, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina Maxima* em dois níveis de temperatura: Parte II: produção de lipídios. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 183-186, 2001.

MACHADO, I. M. P.; ATSUMI, S. Cyanobacterial biofuel production. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 50-56, 2012.

MAKHALANYANE, T. P.; VALVERDE, A.; GUNNIGLE, E.; FROSSARD, A.; RAMOND, J. B.; COWAN, D. A. Microbial ecology of hot desert edaphic systems. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 203-221, 2015.

MALONE, C. F.; RIGONATO, J.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; SCHIMIDT, É. C., BOUZON, Z. L.; WILMOTTE, A.; SANT'ANNA, C. L. *Cephalothrix* gen. nov.(Cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, n. 9, p. 2993-3007, 2015.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) platensis. **Energies**, Basel, v. 6, n. 8, p. 3937-3950, 2013.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.

MARQUES, S. S. I.; NASCIMENTO, I. A.; DE ALMEIDA, P. F.; CHINALIA, F. A. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 171, n. 8, p. 1933-1943, 2013.

MARSAC, N.; HOUMARD, J. Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 119-189, 1993.

MARTINEAU, E.; WOOD, S. A.; MILLER, M. R.; JUNGBLUT, A. D.; HAWES, I.; WEBSTER-BROWN, J.; PACKER, M. A. Characterisation of Antarctic cyanobacteria and comparison with New Zealand strains. **Hydrobiologia**, Heidelberg, v. 711, n. 1, p. 139-154, 2013.

MARTINS, M. D.; RIGONATO, J.; TABOGA, S. R.; BRANCO, L. H. Z. Proposal of *Ancylothrix* gen. nov., a new genus of *Phormidiaceae (Cyanobacteria*, *Oscillatoriales*) based on a polyphasic approach. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 66, n. 6, p. 2396-2405, 2016.

MARTINS, S. I.; VAN BOEKEL, M. A. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 1-2, p. 257-269, 2005.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANE, N. S. Microalgae processing for biodiesel production. In: LUQUE, R.; MELERO, J. A. **Advances in biodiesel production**. Oxford: Woodhead Publishing, 2012. p. 204-231.

MAZARD, S.; PENESYAN, A.; OSTROWSKI, M.; PAULSEN, I. T.; EDGAN, S. Tiny microbes with a big impact: the role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. **Marine Drugs**, Basel, v. 14, n. 5, p. 1-19, 2016.

MCNEELY, K.; XU, Y.; BENNETTE, N.; BRYANT, D. A.; DISMUKES, G. C. Redirecting reductant flux into hydrogen production via metabolic engineering of fermentative carbon metabolism in a cyanobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 76, n. 15, p. 5032-5038, 2010.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 248-268, 2006.

MEIXNER, K.; KOVALCIK, A.; SYKACEK, E.; GRUBER-BRUNHUMER, M.; ZELLINGER, W.; MARKL, K.; NEUREITER, M. Cyanobacteria biorefinery—production of poly (3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis Salina* and utilisation of residual biomass. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 265, p. 46-53, 2018.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MENDES, L. B. B. Recent advances of micro-algal biotechnology in Brazil. **Journal of Aquaculture & Marine Biology**, Edmond, v.5, 2017. Doi: 10.15406/jamb.2017.05.00135.

MIAO, R.; LIU, X.; ENGLUND, E.; LINDBERG, P.; LINDBLAD, P. Isobutanol production in *Synechocystis* PCC 6803 using heterologous and endogenous alcohol dehydrogenases. **Metabolic Engineering Communications**, Amsterdam, v. 5, p. 45-53, 2017.

MILANO, J.; ONG, H. C.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; LAM, M. K.; LOH, P. K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 58, p. 180-197, 2016.

MIRANDA, C. T.; PINTO, R. F.; DE LIMA, D. V.; VIEGAS, C. V.; DA COSTA, S. M.; AZEVEDO, S. M. Microalgae Lipid and Biodiesel Production: A Brazilian Challenge. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, n. 15, p. 2522, 2015.

MODIRI, S.; SHARAFI, H.; ALIDOUST, L.; HAJFARAJOLLAH, H.; HAGHIGHI, O.; AZARIVAND, A.; NOGHABI, K. A. Lipid production and mixotrophic growth features of cyanobacterial strains isolated from various aquatic sites. **Microbiology**, Reading, v. 161, n. 3, p. 662-673, 2015.

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A.; ISDEPSKY, A.; SING, S. F. Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: BOROWITZKA, M. A.; MOHEIMANI, N R. (Ed.). **Algae for biofuels and energy**. Dordrecht: Springer, 2013. p. 265-284.

MÖLLERS, K. B.; JORGENSEN, H.; FRIGAARD, N. U. Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, n. 1, p. 64, 2014.

MOTWALLI, O.; ESSACK, M.; JANKOVIC, B. R.; JI, B.; LIU, X.; ANSARI, H. R.; ARCHER, J. A. In silico screening for candidate chassis strains of free fatty acid-producing cyanobacteria. **BMC Genomics**, London, v. 18, n. 1, p. 33, 2017.

MOZZACHIODI, R.; SCURI, R.; ROBERTO, M. BRUNELLI, M. Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa Taxifolia*, depresses afterhyperpolarization in invertebrate neurons. **Neuroscience**, Oxford, v. 107, n. 3, p. 519-526, 2001.

MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 7, p. 117-123, 2015.

MUKHERJEE, S.; STAMATIS, D.; BERTSCH, J.; OVCHINNIKOVA, G.; VEREZEMSKA, O.; ISBANDI, M.; THOMAS, A. D.; ALI, R.; SHARMA, K.; KYRPIDES, C.; REDDY, T. B. K. **Genome Online Database (GOLD) v.6**: data updates and feature enhancements. Berkeley, 2018. Disponível em: <https://gold.jgi.doe.gov/> Acesso em 17 mar. 2018.

MURATA, N.; NISHIDA, I. Lipids of blue-green algae (cyanobacteria). In: STUMPF, P. K.; MUDD, J. B.; NES, W. D. **Lipids**: Structure and function**.** New York: Academic Press, 1987. p. 315-347.

MURATA, N.; WADA, H. Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. **Biochemical Journal**, London, v. 308, n. pt 1, p. 1, 1995.

MURATA, N.; WADA, H.; GOMBOS, Z.; Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 33, n. 7, p. 933-941, 1992.

MUSSGNUG, J. H.; KLASSEN, V.; SCHLÜTER, A.; KRUSE, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 150, n. 1, p. 51-56, 2010.

NABOUT, J. C.; DA SILVA ROCHA, B.; CARNEIRO, F. M. SANT'ANNA, C. L. How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 22, n. 12, p. 2907-2918, 2013.

NAJDENSKI, H. M.; GIGOVA, L. G.; LLIEV, I. I.; PILARSKI, P. S.; LUKAVSKÝ, J.; TSVETKOVA, I. V.; KUSSOVSKI, V. K. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1533-1540, 2013.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; DOS SANTOS, J. N.; NASCIMENTO, M. A.; SOUSA, L.; SANSONE, G. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO2-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research**, Amsterdam, v. 8, p. 53-60, 2015.

NASCIMENTO, I. A.; MARQUES, S. S. I.; CABANELAS, I. T. D.; PEREIRA, S. A.; DRUZIAN, J. I.; DE SOUZA, C. C. O.; NASCIMENTO, M. A.; Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenergy Research**, New York, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.

NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L. L.; HAWKINS, P. R.; COX, P. T.; GOODMAN, A. E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 47, n. 3, p. 693-697, 1997.

NICHOLS, B. W.; WOOD, B. J. B. New glycolipid specific to nitrogen-fixing blue-green algae. **Nature**, London, v. 217, n. 5130, p. 767, 1968.

NIKOLAIDIS, P.; POULLIKKAS, A. A comparative overview of hydrogen production processes. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 67, p. 597-611, 2017.

NOZZI, N. E.; OLIVER, J. W. K.; ATSUMI, S. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 1, p. 7, 2013.

O'NEIL, J. M.; DAVIS, T. W.; BURFORD, M. A.; GOBLER, C. J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 14, p. 313-334, 2012.

ÖZTÜRK, L.; DEMIR, Y. The effects of vinasse on some growth parameters of algae. **Fresenius Environmental Bulletin**, Basel, v. 10, n. 10, p. 766-771, 2001.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, Barking, v. 77, n. 1, p. 19-24, 2001.

OLSON, W. P. (Ed.). **Automated microbial identification and quantitation:** technologies for the 2000s. Boca Raton: CRC Press, 1996.

OREN, A. A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1895-1902, 2004.

OREN, A.; SHILO, M. Anaerobic heterotrophic dark metabolism in the cyanobacterium O*scillatoria Limnetica*: sulfur respiration and lactate fermentation. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 122, n. 1, p. 77-84, 1979.

OREN, A.; VENTURA, S. The current status of cyanobacterial nomenclature under the "prokaryotic" and the "botanical" code. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 110, n. 10, p. 1257-1269, 2017.

PACHECO, M. M.; HOELTZ, M.; MORAES, M. S.; SCHNEIDER, R. C. Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. **Journal of Environmental Science and Health**, **Part A,** New York, v. 50, n. 6, p. 585-601, 2015.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5872, p. 57-58, 2008.

PANCRACE, C.; BARNY, M.; UEOKA, R.; CALTEAU, A.; SCALVENZI, T.; PÉDRON, J.; BARBE, V.; PIEL, J.; HUMBERT, J.; GUGGER, M. Insights into the *Planktothrix* genus: genomic and metabolic comparison of benthic and planktic strains. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 41181, 2017. Doi: 10.1038/srep41181.

PANDEY, V. D.; PANDEY, A.; SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 2, p. 89-97, 2013.

PARKER, P. L.; VAN BAALEN, C.; MAURER, L. Fatty acids in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. **Science**, Washington, DC, v. 155, n. 3763, p. 707-708, 1967.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, S.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.

PATEL, A.; ARORA, N.; MEHTANI, J.; PRUTHI, V.; PRUTHI, P. A. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 77, p. 604-616, 2017.

PEIXOTO, J. C. C.; LEOMIL, L.; SOUZA, J.V.; PEIXOTO, F. B S.; ASTOLFI-FILHO, S. Comparison of bacterial communities in the Solimões and Negro River tributaries of the Amazon River on small subunit rRNA gene sequence. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 3783-3793, 2011.

PERALTA-YAHYA, P.; ZHANG, F.; DEL CARDAYRE, S. B.; KEASLING, J. D. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. **Nature**, London, v. 488, n. 7411, p. 320, 2012.

PERAMUNA, A.; SUMMERS, M. L. Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium *Nostoc Punctiforme*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 196, n. 12, p. 881-890, 2014.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

POINTING, S. B.; CHAN, Y,; LACAP, D. C.; LAU, M. C. Y.; JURDENS, J. A.; FARRELLL, R. L. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. **Proceedings of the Nation Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, p. 19964-19969, 2009.

POSADA, D. jModelTest:Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

POSEWITZ, M. C. Engineering pathways to biofuels in photoautotrophic microorganisms. **Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 67-78, 2014.

PRASANNA, R. SOOD, A. JAISWAL, P.; NAYAK, S.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; NATARAJAN, C.; Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 46, n. 2, p. 119-134, 2010.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; RATHA, S. K.; SINGH, P. Cyanobacteria as a "green" option for sustainable agriculture. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. **Cyanobacteria**: an economic perspective. Hoboken: Wiley, 2013. p. 145-166.

PRIYA, B.; SIVAPRASANTH, R. K.; JENSI, V. D.; UMA, L.; PRABAHARAN, D. Characterization of manganese superoxide dismutase from a marine cyanobacterium *Leptolyngbya Valderiana* BDU20041. **Saline Systems**, London, v. 6, n. 1, p. 6, 2010.

QARI, H.; REHAN, M.; NIZAMI, A. Key issues in microalgae biofuels: a short review. **Energy Procedia**, Oxford, v. 142, p. 898-903, 2017.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; DA SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10, 3438-3443, 2011.

QUINTANA, N.; VAN DER KOOY, F.; VAN DE RHEE, M. D.; VERPOORTE, R. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 3, p. 471-490, 2011.

QUIRINO, B. F.; BRASIL, B. S.; LAVIOLA, B. G.; MENDONÇA, S.; ALMEIDA, J. R. Critical analysis of feedstock availability and composition, and new potential resources for biodiesel production in Brazil. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed.). **Biofuels in Brazil**. Dordrecht: Springer International Publishing, 2014. p. 331-350.

RAJESHWARI, K. R.; RAJASHEKHAR, M. Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic habitats of Western Ghats, Southern India. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 5, p. 849-857, 2011.

RAJNEESH; SINGH, S. P.; PATHAK, J.; SINHA, R. P. Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 69, p. 578-595, 2017.

RAMADAN, M. F.; ASKER, M. M.; IBRAHIM, Z. K. Functional bioactive compounds and biological activities of *Spirulina platensis* lipids. **Czech Journal of Food Sciences-UZPI**, Praha, v. 26, n. 3, p. 211-222, 2008.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; DEL RAYO JARAMILLO-JACOB, A. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 102-111, 2012.

RAMOS, M. J.; FERNÁNDEZ, C. M.; CASAS, A.; RODRÍGUEZ, L.; PÉREZ, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, n. 1, p. 261-268, 2009.

RATTANAPOLTEE, P.; KAEWKANNETRA, P. Nile red, an alternative fluorescence method for quantification of neutral lipids in microalgae. **International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering**, Ajerbaijan, v. 7, n. 9, p. 889-893, 2013.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, Barking, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.

REDDY, P. M. Lipid composition of akinetes, heterocysts and vegetative cells of cyanobacteria. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, Berlin, v. 178, n. 6-7, p. 575-578, 1983.

REN21. **Renewables 2017 Global Status Report**. Paris: REN21 Secretariat, 2017. Disponível em: http://www. ren21. net. Acesso em: 20 março de 2018.

ŘEZANKA, T. DOR, I.; PRELL, A.; DEMBITSHKY, V. M. Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. **Folia Microbiologica**, New York, v. 48, n. 1, p. 71-75, 2003.

ŘEZANKA, T. KOLOUCHOVÁ, I. GHARWALOVÁ, L.; PALYZOVÁ, A.; SIGLER, K. Lipidomic Analysis: From Archaea to Mammals. **Lipids**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 5-25, 2018.

RIGONATO, J.; ALVARENGA, D. O.; FIORE, M. F. Tropical Cyanobacteria and their Biotechnological Applications. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Ed.). **Diversity and benefits of microorganisms from the tropics**. Cham: Springer, 2017. p. 139-167.

RÍOS, S. D.; CASTAÑEDA, J.; TORRAS, C.; FARRIOL, X.; SALVADÓ, J. Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: screening studies toward biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 133, p. 378-388, 2013.

RIPPKA, R. Photoheterotrophy and chemoheterotrophy among unicellular blue-green algae. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 87, n. 1, p. 93-98, 1972.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, Reading, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

RISHI, V.; AWASTHI, A. K. A Brief Review on Potential Applications of Cyanobacteria. **Indian Journal of Biotechnology & Biochemistry**, New Dehli, v. 2, n. 1, p. 1-38, 2015.

RITTMANN, B. E. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 100, n. 2, p. 203-212, 2008.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G.; BASSI, N.; PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 102, n. 1, p. 100-112, 2009.

RONDA, S. R.; LELE, S. S. Culture Conditions stimulating high γ-linolenic Acid accumulation by *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 693-697, 2008.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayers 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

ROSGAARD, L.; DE PORCELLINIS, A. J.; JACOBSEN, J. H.; FRIGAARD, N. U. SAKURAGI, Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 134-147, 2012.

SAMANTARAY, S.; NAYAK, J. K.; MALLICK, N. Watewater utilization for poly-beta-hydroxybutyrate production by the cyanobacterium *Aulosira fertilissima* in a recirculatory aquaculture system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 77, n. 24, p. 8735-8743, 2011.

SANT'ANNA, C. L.; SILVA, S. M.; BRANCO, L. H. Z. Cyanophyceae da Gruta-que-Chora, Município de Ubatuba, SP, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 2, p. 75-97, 1991.

SANTANA, H.; CEREIJO, C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C.; FERNANDES, M. S.; BRUNALE, P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, Barking, v. 228, p. 133-140, 2017.

SANTOS, R. R.; ARAÚJO, O. Q. F.; MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, Barking, v. 204, p. 38–48, 2016.

SANTOS, A. S.; VIEIRA, K. R.; SARTORI, R. B.; SANTOS, A. M.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: study of effect of exogenous sources of organic carbon, absolute amount of nutrients, and stirring speed on biomass and lipid productivity. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Lausanne, v. 5, p. 12, 2017.

SARIN, A.; ARORA, R.; SINGH, N. P.; SARIN, R.; MALHOTRA, R. K.; KUNDU, K. Effect of blends of Palm-Jatropha-Pongamia biodiesels on cloud point and pour point. **Energy**, Amsterdam, v. 34, n. 11, p. 2016-2021, 2009.

SARMA, T. A. **Handbook of cyanobacteria**. Boca Raton: CRC Press, 2013.

SARSEKEYEVA, F.; ZAYADAN, B. K.; USSERBAEVA, A.; BEDNEVOV, A.; BEDBENOV, V. S. Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria. Reality and perspectives. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 125, n. 1-2, p. 329-340, 2015.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 1732-1738, 2010.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Netwark, DE: MIDI Inc., 1990. (MIDI Technical Note, 101).

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

SCHOPF, J. W. The development and diversification of Precambrian life. In: ORÓ, J.; MILLER, S. L.; PONNAMPERUMA, C. (Ed.). **Cosmochemical Evolution and the Origins of Life**. Dordrecht: Springer, 1974. p. 119-135.

SCHOPF, J. W. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. **Nova Hedwigia Beiheft**, Berlin, v. 112, p. 13-32, 1996.

SCHOPF, J. W. The fossil record of cyanobacteria. In: WHITTONJ, B. A. **Ecology of cyanobacteria II**: their diversity in space and time. Dordrecht: Springer, 2012. p. 15-36.

SCHWARZ, D.; ORF, I.; KOPKA, J.; HAGEMANN, M. Recent applications of metabolomics toward cyanobacteria. **Metabolites**, Basel, v. 3, n. 1, p. 72-100, 2013.

SCRIMGEOUR, C. M.; HARWOOD, J. L. Fatty acid and lipid structure. In: GUNSTONE F., D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A., J. **The lipid handbook**. 2. ed. New York: CRC Press, 2007. p. 1-36.

SHARMA, N. K.; STAL, L. J. The economics of cyanobacteria-based biofuel production: challenges and opportunities. In: SHARMA, N. K.; ASHWANI, K. R.; STAL., L. J. (Ed.). **Cyanobacteria**: an economic perspective. 1. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2014. cap. 10, p. 167-180.

SHARMA, Y. C.; SINGH, B.; KORSTAD, J. A critical on recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feedstock for synthesis of biodiesel. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 13, p. 2993-3006, 2011.

SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **Look back at the US department of energy's aquatic species program**: biodiesel from algae; close-out report. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 1998.

SHENG, J.; VANNELA, R.; RITTMANN, B. E. Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 2, p. 1697-1703, 2011.

SHI, T.; FALKOWSKI, P. G. Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 105, n. 7, p. 2510-2515, 2008.

SHUBA, E. S.; KIFLE, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 81, p. 743-755, 2018.

SILVA, M. A.; 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**, Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

SILVA, C. S. P.; SILVA-STENICO, M. E.; FIORE, M. F.; CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M. Optimization of the cultivation conditions for *Synechococcus* sp. PCC7942 (cyanobacterium) to be used as feedstock for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 3, p. 1-7, 2014.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: o ônus e o bônus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 843-851, 2008.

SINGH, J. S.; KUMAR, A.; RAI, A. N.; SINGH, D. P. Cyanobacteria: a precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 529, 2016.

SINGH, S. C.; SINHA, R. P.; HADER, D. P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. **Acta Protozoologica**, Warszawa, v. 41, n. 4, p. 297-308, 2002.

SINGH, J.; TRIPATHI, R.; THAKUR, I. S. Characterization of endolithic cyanobacterial strain, *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for prospective recycling of CO2 and biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 166, p. 345-352, 2014.

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. (Ed.). **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Raton: CRC Press, 2016.

SONG, G.; JIANG, Y.; LI, R. SONG et al., 2015 - *Scytolyngbya timoleontis*, gen. et sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria): a novel false branching Cyanobacteria from China. **Phytotaxa**, Auckland, v. 224, n. 1, p. 72-84, 2015.

SONG, M.; PEI, H.; HU, W.; MA, G. Evaluation of the potential of 10 microalgal strains for biodiesel production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 141, p. 245-251, 2013.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. Spirulina – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 69A, p. 157-171, 2017.

SRIVASTAVA, A.; PRASAD, R. Triglycerides-based diesel fuels. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 111-133, 2000.

STAL, L. J. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. **New Phytologist**, London, v. 131, n. 1, p. 1-32, 1995.

STANIER, R. Y.; KUNISAWA, R.; MANDEL, M.; COHEN-BAZIRE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). **Bacteriological Reviews**, Washington, DC, v. 35, n. 2, p. 171, 1971.

STANIER, R. Y.; SISTROM, W. R.; HANSEN, T. A.; WHITTON, B. A.; CASTENHOLZ, R. W.; PFENNING, N.; GHERNA, R. L. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 28, n. 2, p. 335-336, 1978.

STANSELL, G. R.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Microalgal fatty acid composition: implications for biodiesel quality. **Journal of Applied Phycology**, Heidelberg, v. 24, n. 4, p. 791-801, 2012.

SU, Y.; SONG, K.; ZHANG, P.; SU, Y.; CHENG, J.; CHEN, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 74, p. 402-411, 2017.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation. **Environment International**, Oxford, v. 51, p. 59-72, 2013.

SUBRAMANIAN, G.; SHANMUGASUNDARAM, S. Uninduced ammonia released by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 151-154, 1986.

SWITZER, L. **Spirulina**: the whole food revolution. New York: Bantam Books, 1981.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAE, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDIN, M.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 258-267, 2013.

TALEBI, A. F.; TABATABAEI, M.; CHISTI, Y. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, New Brunswick, v. 1, n. 2, p. 55-57, 2014.

TAMIYA, H.; HASE, E.; SHIBATA, K.; MITUYA, A.; IWAMURA, T.; NIHEI, T.; SASA, T. Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature. In: BURLEW, J. S. (Ed.). **Algal culture from laboratory to pilot plant**. Washington, DC: Carnegie Institution of Washington Publication, 1953. p. 204-232.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TARANTE, P. A.; KEENAN, T. W.; POTTS, M. Rehydration induces rapid onset of lipid biosynthesis in desiccated *Nostoc commune* (Cyanobacteria). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 1168, n. 2, p. 228-237, 1993.

TSOLCHA, O. N.; TEKERLEKOPOULOU, A. G.; AKRATOS, C. S.; ANTONOPOULOU, G.; AGGELIS, G.; GENITSARIS, S.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; VAYENAS, D. V. A *Leptolyngbya*-based microbial consortium for agro-industrial wastewaters treatment and biodiesel production. **Environmental Science and Pollution Research**, 2018. Doi: 10.1007/s11356-018-1989-z.

TURNER, J. A. Sustainable hydrogen production. **Science**, Washington, DC, v. 305, n. 5686, p. 972-974, 2004.

USHER, P.; LEA-LANGTON, A.; CAMARGO-VALERO, M. A.; GALE, W. F.; ROSS, A. Integrating microalgae into the Brazilian program for biodiesel production and use. **Biofuels**, London, v. 5, n. 1, p. 45-52, 2014.

VANDNA, P.; RAVINDRA, S.; PANKAJ, G.; KUMAR, P. R. Microalgae as emerging source of energy: a review. **Research Journal of Chemical Sciences**, Indore, India, v. 5, n. 3, p. 63-68, 2015.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella Vulgaris* and the *Macrophyte Lemna* minuscula. **Water Research**, Oxford, v. 36, n. 17, p. 4185-4192, 2002.

VARGAS, M. A.; RODRIGUES, H.; MORENO, J.; OLIVARES, H.; DEL CAMPOS, J. A.; RIVAS, J.; GUERRERO, M. G. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. **Journal of Phycology**, New York, v. 34, n. 5, p. 812-817, 1998.

VAZ, M. G. M. V. **Cianobactérias de ambiente costeiro:** filogenia, prospecção gênica e química de moléculas bioativas. 2014. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VAZ, M. G. M. V.; GENUÁRIO, D. B.; ANDREOTE, A. P. D.; MALONE, C. F. S.; SANT'ANNA, C. L.; BARBIERO, L.; FIORE, M. F. *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel *Pseudanabaenacean* genera (Cyanobacteria) isolated from saline–alkaline lakes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, n. 1, p. 298-308, 2015.

VELEA, S.; OANCEA, F.; FISCHER, F. Heterotrophic and mixotrophic microalgae cultivation. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Ed.). **Microalgae-based biofuels and bioproducts**. 1. ed. Duxford: Woodhead Publishing, 2017. p. 45-65.

VIMALARASAN, A.; PRATHEEBA, N.; ASHOKKUMAR, B.; SIVAKUMAR, N.; VARALAKSHMI, P. Production of biodiesel from cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) by alkali and enzyme mediated transesterification. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Dehli, v. 70, p. 959-967, 2011.

VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*):** physiology, cell-biology and biotechnology. **Boca Raton:** CRC Press, 2014.

VONSHAK, A.; CHEUNG, S. M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of Spirulina (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. **Journal of Phycology**, New York, v. 36, p. 675-679, 2000.

WADA, H.; MURATA, N. Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, n. 4, p. 1062-1069, 1990.

WADA, H.; MURATA, N. Membrane lipids in cyanobacteria. In: SIEGENTHALER, P.; MURATA, N. (Ed.). **Lipids in photosynthesis**: structure, function and genetics. Dordrecht: Springer, 1998. p. 65-81.

WAHLEN, B. D.; WILLIS, R. M.; SEEFELDT, L. C. Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria, and wild mixed-cultures. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 3, p. 2724-2730, 2011.

WALACH, M. R.; BAZIN, M. J.; PIRT, S. J.; BALYUZI, H. H. Computer control of carbon–nitrogen ratio in Spirulina platensis. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 29, n. 4, p. 520-528, 1987.

WALSBY, A. E. Gas vesicles. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 58, n. 1, p. 94-144, 1994.

WALSH, K.; JONES, G. J.; DUNSTAN, R. H. Effect of irradiance on fatty acid, carotenoid, total protein composition and growth of *Microcystis aeruginosa*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 44, n. 5, p. 817-824, 1997.

WATERBURY, J. B. et al. Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium. **Nature**, London, v. 277, n. 5694, p. 293, 1979.

WATERBURY, J. B. The cyanobacteria: isolation, purification and identification. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The Prokaryotes**. 3. ed. Singapure: Springer, 2006. p. 1053-1073.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 24, n. 3, p. 405-413, 2013.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 63-102, 2000.

WILMOTTE, A.; HERDMAN, M. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. In: GARRITY, G.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual od systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 487-493.

WILSON, A. E.; SARNELLE, O.; TILLMANNS, A. R. Effects of cyanobacterial toxicity and morphology on the population growth of freshwater zooplankton: Meta-analyses of laboratory experiments. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 51, n. 4, p. 1915-1924, 2006.

WOOD, S. A.; HEATH, M. W.; KUHAJEK, J.; RYAN, K. G. Fine-scale spatial variability in anatoxin-a and homoanatoxin-a concentrations in benthic cyanobacterial mats: implication for monitoring and management. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 109, n. 6, p. 2011-2018, 2010.

WYMAN, M.; FAY, P. Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (Cyanobacteria) I. The influence of light quantity. **Proceedings of the Royal Society of London B,** London, v. 227, n. 1248, p. 367-380, 1986.

XIONG, C.; O'KEEFE, B. R.; BYRD, R. A.; MCMAHON, J. B. Potent anti-HIV activity of *scytovirin* domain 1 peptide. **Peptides**, Fayetteville, v. 27, n. 7, p. 1668-1675, 2006.

XIONG, W.; MORGAN, J. A.; UNGERER, J.; WANG, B.; MANESS, P. C.; YU, J. The plasticity of cyanobacterial metabolism supports direct CO2 conversion to ethylene. **Nature Plants**, London, v. 1, p. 15053, 2015.

ZHOU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, Y.; LI, Y.; MA, Y. Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. **Metabolic Engineering**, Brugge, v. 14, n. 4, p. 394-400, 2012.