

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA DA USP
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SUELLEN SILVA

Uso de vinhaça como meio de cultivo de microalgas e obtenção de biomoléculas de
interesse biotecnológico

Versão Corrigida

SÃO PAULO
2022

SUELLEN SILVA

Uso de vinhaça como meio de cultivo de microalgas e obtenção de biomoléculas de interesse biotecnológico

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Oller do Nascimento

SÃO PAULO
2022

Dissertação de autoria de Suellen Silva sob o título “Uso de vinhaça como meio de cultivo de microalgas e obtenção de biomoléculas de interesse biotecnológico”, apresentada à Escola Politécnica de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, aprovada em 11 de novembro de 2022 pela comissão julgadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. _Cláudio Augusto Oller do Nascimento

Instituição_: Universidade de São Paulo

Presidente

Prof. Dr. Magno José Alves

Instituição: UNIFESP- Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Louise Hase Gracioso

Instituição: Universidade de São Paulo

Aos meus pais, por tudo,
e por tanto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis e minha família Sandra Aparecida Silva e Orlando Silva, por todo o incentivo e auxílio durante a minha vida sem os quais não seria possível completar mais esta etapa.

Agradeço a minha companheira Gisele Barreto Brito por ter me incentivado a cada momento. Agradeço aos meus amigos Marcos Ruberson e Letícia Fernandes por todos os anos de convívio acreditando em mim, dividindo emoções e sempre crédulos nos resultados positivos.

Agradeço ao meu filho Valentin Silva Barreto por cada sorriso, olhar, carinho, afeto que me impulsionam a todo segundo.

Ao professor Dr. Cláudio Augusto Oller Nascimento, pela oportunidade de estar nesse projeto de aprender e trocar conhecimento, por ter acreditado no meu trabalho;

A professora Dra. Elen Aquino Perpetuo, pela recepção no laboratório, pela ajuda nos momentos em que mais precisei, por sua amizade, pois sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho;

As colegas do CEPEMA, Louise Hase Gracioso, Maria Luisa Bertelli Faron, Bruna Bacaro, Letícia Ueda, Letícia Cardoso, Camylle Guimarães Scheliga que me ajudaram em diversas etapas fundamentais, pela troca de conhecimento, pelas críticas e sugestões relevantes;

Agradeço aos professores da Banca Examinadora pela disponibilidade de tempo e por terem aceitado o convite;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A vinhaça é o principal resíduo da produção de biocombustível a partir da cana-de-açúcar. É produzida, em média, na proporção de 13 L para cada 1 L de etanol gerado em uma biorrefinaria. Trata-se de uma suspensão aquosa de sólidos orgânicos e minerais, não eliminados durante a destilação. Uma das características principais desta mistura é que suas propriedades físico-químicas e concentração de substâncias dissolvidas, é considerada altamente nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas doces. Com isto, o descarte deste resíduo deve levar em conta diversos fatores, como a quantidade de carbono dissolvido nesta mistura, ou uma concentração de compostos orgânicos, que pode alcançar até cem vezes mais do que aquela observada no esgoto doméstico. Outra possibilidade, além do descarte, é o uso da vinhaça para o cultivo de microalgas, que apresenta vantagens como tratar o resíduo e economizar com a produção de meio de cultura. Além disso, há a possibilidade de produção de biomassa e biomoléculas de valor agregado. Visando explorar essa questão, esse trabalho foi realizado em 3 etapas: 1º selecionar cepa adaptável a presença de efluente e identificá-la; 2º investigar a produção de biomassa em concentrações diferentes de vinhaça em meio sintético e a produção de lipídeos; 3º Avaliar parâmetros físico-químicos a fim de investigar o potencial da cepa selecionada em tratar a vinhaça de etanol a partir de cana-de-açúcar. A adaptação e análise de crescimento da cepa foi realizada a partir da biomassa produzida chegando a taxas de crescimento iguais a $0,0264\text{h}^{-1}$ e $0,0276\text{h}^{-1}$ com concentrações de 20% e 30% de vinhaça, respectivamente. A produção de lipídeos totais foi de 20,13% e 51,60%, também em 20% e 30% de vinhaça, respectivamente, e ambos os perfis de ácidos graxos apresentaram maiores concentrações de ácidos graxos saturados, sendo significativo para produção de biodiesel. Foram analisados parâmetros como nitrogênio, fósforo e DQO, que demonstraram a capacidade do cultivo de *Coelastrella* sp. em tratar a vinhaça, reduzindo 100% do nitrogênio amoniacal, 95,8% de fósforo e 49,82% de DQO.

Palavras-chaves: Vinhaça; Microalga; *Coelastrella*; Bioprocesso; Lipídeos; Biorremediação

ABSTRACT

The vinasse is the main residue of biofuel production from sugarcane. It is produced, on average, in the proportion of thirteen liters for every one liter of ethanol generated in a biorefinery. It is an aqueous suspension of organic solids and minerals, not eliminated during distillation. One of the main features of this mixture is that its physical-chemical properties and concentration of dissolved substances it is considered highly harmful to the fauna, flora, microfauna and microflora of the fresh water. With this, the disposal of this residue must be take in consideration several factors, such as the amount of carbon dissolved in this mixture, or a concentration of organic compounds, which can reach up to one hundred times more than the one observed in domestic sewage. Another possibility, besides disposal, is the use of vinasse for the cultivation of microalgae, which presents advantages such as treating waste, and saving with the production of culture medium. In addition, there is the possibility of producing biomass and biomolecules of added value. In order to explore this issue, this work was carried out in three stages: first, select strain adaptable to the presence of effluent and identify it; Second, investigate the biomass production at different concentrations of vinasse in synthetic medium and lipid production; third, Evaluate physical-chemical parameters in order to investigate the potential of the selected strain in treating the ethanol vinasse from the sugarcane. The adaptation and growth analysis of the strain was performed from the biomass produced reaching growth rates equal to 0.0264h^{-1} and 0.0276h^{-1} with concentrations of 20% and 30% vinasse, respectively. The total lipid production was 20.13% and 51.60%, also in 20% and 30% of vinasse, respectively, and both fatty acid profiles showed higher concentrations of saturated fatty acids, being significant for the production of biodiesel. Parameters such as nitrogen, phosphorus and chemical oxygen demand were analyzed, which demonstrated the ability of *coelastrella* sp. cultivation in treating vinasse, reducing 100% of ammoniacal nitrogen, 95.8% phosphorus and 49.82% of chemical oxygen demand

Keywords: Vinasse; Microalgae; *Coelastrella* biomass; bioprocess; lipids; bioremediation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exportações e importações brasileiras de etanol.	19
Figura 2: Evolução da produção total de etanol a partir da cana-de-açúcar.....	20
Figura 3: Representação das principais etapas da produção de açúcar e etanol em uma usina convencional.....	21
Figura 4: Evolução dos percentuais de adição para formulação de óleo diesel B.....	31
Figura 5: Reação de transesterificação de óleos.....	31
Figura 6: Perfil de ácidos graxos na fase estacionária da cepa <i>Tetraselmis suecica</i>	32
Figura 7: Esquema de clarificação da vinhaça e preparo do meio	36
Figura 8: Experimento preliminar para seleção de cepas.....	37
Figura 9: Sistema de cultivo.	38
Figura 10: Método para determinação de biomassa seca	39
Figura 11: Método colorimétrico para análise de nitrogênio amoniacal.....	41
Figura 12: Procedimento de utilização do kit Phosphat-test.	42
Figura 13: Variação na coloração com adição de $(CaOH)_2$ em vinhaça bruta antes e depois da correção do pH.....	43
Figura 14: Imagem para verificação do crescimento das cepas em meio 10% respectivamente: (a) A3; (b) A5; (c) MSC4P.	44
Figura 15: Cultivo da cepa A3 com e sem agitação.	45
Figura 16: Cepa A3 cultivada em concentração 20% (v/v) de vinhaça	45
Figura 17: Curva de crescimento (DO) das cepas selecionadas a 750 nm.....	46
Figura 18: Curva de crescimento em meio 10% vinhaça/BG-11.....	48
Figura 19: Curva de crescimento em meio 20% vinhaça/BG-11.	48
Figura 20: Curva de crescimento em meio 30% vinhaça/BG-11.....	49
Figura 21: Perfil de crescimento celular em meio com 20% e 30% (v/v Vinhaça/BG11).....	49
Figura 22: Perfil de crescimento celular em meio com 20% e 30% (v/v Vinhaça/BG11).....	50
Figura 23: Curva utilizada para a análise de lipídeos em meio 20% (v/v).....	51
Figura 24: Curva utilizada para a análise de lipídeos em meio 30% (v/v).....	51
Figura 25: Perfil de lipídeos em meio contendo 20% vinhaça/BG-11.....	53
Figura 26: Perfil de lipídeos em meio contendo 30% vinhaça/BG-11.....	54
Figura 27: Curva de calibração do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) – 640 nm.....	55
Figura 28: Curva de calibração fósforo.....	56
Figura 29: Curva de calibração para determinação de DQO.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de vinhaças conforme o tipo de mosto.	23
Tabela 2 - Meio BG11. Composição das soluções utilizadas e concentração.....	34
Tabela - 3: Percentual de lipídeos totais na microalga <i>Coelastrella</i> sp.....	52

LISTA DE SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG – Cromatografia em fase gasosa

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CNPE – Conselho Nacional de Política Energética

DBO – Demanda Biológica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FID – Detector de ionização de chama

GL – Glicolipídeos

NL – Lipídeo Neutro

PL - Fosfolipídeos

PNPB – Programa Nacional do Petróleo

Proálcool – Programa Nacional do Álcool

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

Ca – Cálcio

Ca(OH)₂ – Hidróxido de Cálcio

CH₄ – Metano

CO₂ – Dióxido de Carbono

HCl – Ácido Clorídrico

K – Potássio

Mg – Magnésio

μL – microlitro

mL – mililitro

mol.L⁻¹ – mol por litro

N – Nitrogênio

N-NH₃ – nitrogênio amoniacal

NaOH – Hidróxido de Sódio

Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio

NaNO₃ – Nitrato de Sódio

P – Fósforo

pH – Potencial hidrogeniônico

S - Enxofre

Zn - Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar	17
3.2	Resíduos industriais	21
3.3	A vinhaça e suas aplicações	23
3.4	Cultivo de microalgas	27
3.5	Bioprodutos	29
3.6	Biodiesel a partir de microalgas	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Pré-tratamento da vinhaça e preparo do meio de cultivo	34
4.1.1	Descrição dos materiais e procedimentos.....	34
4.1.2	Etapa I – Preparo do Meio de Cultura	34
4.2	Adaptação das cepas de microalgas em diferentes concentrações de vinhaça	36
4.3	Seleção e identificação da cepa A3	37
4.4	Condições de cultivo cepa A3 - <i>Coelastrella</i> sp.	38
4.5	Quantificação da biomassa	38
4.6	Análise da produção de lipídeos	39
4.7	Determinação dos lipídeos totais	39
4.7.1	Extração de lipídeos pelo método <i>National Renewable Energy Laboratory</i>	39
4.7.2	Cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector de ionização de chama (CG-FID)	40
4.8	Análise de nitrogênio amoniacal (NH₃-H)	40
4.8.1	Curva de calibração	40
4.8.2	Análises dos cultivos	40
4.9	Determinação de fósforo	41
4.9.1	Curva de calibração	41
4.9.2	Quantificação do cultivo.....	41

4.10	Análise de DQO.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Correção do pH e diminuição da turbidez da vinhaça	43
5.2	Experimento de crescimento das microalgas.....	45
5.3	Identificação da cepa A3	47
5.4	Crescimento quantificação biomassa.....	47
5.5	Análise da produção de lipídeos	51
5.6	Determinação dos lipídeos totais	52
5.6.1	Perfil de ácidos graxos	53
5.7	DQO	57
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Vias sustentáveis, como fontes de energia mais limpas, combustíveis menos poluentes e produtos menos agressivos ao meio ambiente têm se tornado uma tendência global, em função, principalmente, das mudanças climáticas. O aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera, por exemplo, tende a elevar a temperatura média da Terra em 3,2 °C até o final deste século se os níveis de emissões se mantiverem. Este cenário deve conduzir a graves consequências para a biosfera e, sobretudo, para a humanidade (SENADO, 2020).

Algumas alternativas que têm sido adotadas para reverter este cenário incluem a redução do consumo de combustíveis fósseis, como a substituição destes por biocombustíveis, além do desenvolvimento de bioprocessos para mitigação dos principais gases de efeito estufa. No Brasil, um dos pioneiros nesta corrida é o etanol da cana-de-açúcar, que se apresenta como um biocombustível competitivo, sendo o estado de São Paulo o principal produtor do país (CONAMA, 2020). No entanto, é importante ressaltar que a indústria sucroalcooleira gera uma grande quantidade de resíduos sólidos, líquidos e gasosos, sendo a vinhaça um dos principais.

Este efluente já vem sendo utilizado, principalmente, na fertirrigação, que é a aplicação da vinhaça no solo, para que este absorva os nutrientes ali presentes. Ainda assim, existem restrições para esta utilização. Por exemplo, a longo prazo, existe a tendência de acúmulo de certos minerais que tornam o solo ligeiramente mais tóxico para o cultivo, prejudicando o crescimento da cana-de-açúcar (CORREIA, 2019). Desta forma, é necessário apontar também alternativas para utilização da vinhaça a fim de, não apenas reduzir impactos ambientais, mas também gerar produtos de valor agregado.

Uma das possibilidades é o uso da vinhaça em processos biotecnológicos, como biodigestão para geração de biogás ou para o cultivo de micro-organismos, como as microalgas. Este processo é atrativo, pois o cultivo destes micro-organismos no efluente pode reduzir custos em comparação a meios de cultura sintéticos. Além disso, há a possibilidade de produção de biomassa e biomoléculas de valor agregado como lipídeos, pigmentos e carotenóides, embora seja necessário lançar mão de processos de pré-tratamento, dadas algumas de suas características, como turbidez, suspensão de sólidos e acidez (LÓIO, 2013; CANDIDO, 2019).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a utilização de vinhaça oriunda da produção de etanol como meio de cultura para crescimento de microalgas, a fim de obter biomassa para geração de produtos de interesse biotecnológico.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar o desempenho da vinhaça como meio de cultivo para crescimento de microalgas e produção de biomassa e/ou bioprodutos em escala laboratorial.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar cepas de microalgas tolerantes a diferentes concentrações de vinhaça, diluída em meio sintético nas proporções de 10%, 20% e 30%;
- Avaliar o crescimento das microalgas selecionadas na etapa anterior em diferentes condições de cultivo, com e sem agitação;
- Quantificar a biomassa produzida e caracterizá-la em termos de obtenção de lipídeos;
- Avaliar o cultivo de microalgas em meio composto por vinhaça quanto à remoção de nutrientes, para fins de verificação da aplicação deste método como forma de tratamento deste efluente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar

No Brasil, por volta de 1532, a cana-de-açúcar foi introduzida pelos portugueses, sendo fundamental para a formação econômica e inserção do país no mercado internacional através da exportação (FURTADO, 2003 *apud* MORAES, 2015). No século XX, dada a necessidade de diminuir as sucessivas crises do setor açucareiro e a dependência do petróleo importado, ocorreram as primeiras ações de introdução do etanol na matriz energética brasileira.

Conforme Moraes e Bacchi (2015), na década de 1970 os conflitos do petróleo em todo o mundo aqueceram a procura por fontes alternativas de energia, onde o Brasil, que dispunha de uma estrutura canavieira para produção de açúcar, lança o Programa Nacional do Álcool (Proálcool).

Na época, o país importava aproximadamente 80% do petróleo consumido, o que correspondia a cerca de 50% da balança comercial, e ainda não existia a percepção da influência de gás carbônico proveniente da queima de combustíveis fósseis de maneira negativa às condições de vida da humanidade, mesmo que alguns cientistas alertassem os governos e o público quanto ao aumento da concentração de gases de efeito estufa na atmosfera (LEITE e CORTEZ, 2008).

No século XXI, o país possuía um setor sucroalcooleiro intenso e competitivo. Isso se constituiu graças ao constante empenho para garantir o mercado interno do etanol e de ganhar novos mercados de açúcar. Contudo, foi a partir de 2003, com a chegada de veículos *flex fuel*, que o setor ganhou novo impulso (LEITE e CORTEZ, 2008).

O crescimento populacional, a demanda por combustíveis e as mudanças climáticas são motivações para um progresso tecnológico em prol de novos desafios econômicos e ambientais. Uma parte das novas tecnologias envolve as biorrefinarias, que são unidades de processamento de biomassa cuja concepção busca abranger o aproveitamento máximo da mesma, por meio da produção de biocombustíveis, bioprodutos e energia, e o aproveitamento dos resíduos gerados (BASTOS, 2012).

A produção de açúcar e/ou etanol a partir da cana-de-açúcar no Brasil advém de três principais tipos de plantas produtoras: usinas produtoras somente de açúcar, destilarias autônomas para produção somente do etanol e usinas integradas para produção de ambos (ALBARELLI, 2013).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em julho de 2022 existiam 405 instituições cadastradas no departamento de cana-de-açúcar e agroenergia pelo Sistema de Acompanhamento da Produção Canavieira, sendo 239 unidades mistas, 16 produtoras de açúcar, 122 produtoras de etanol e 28 sem lançamentos.

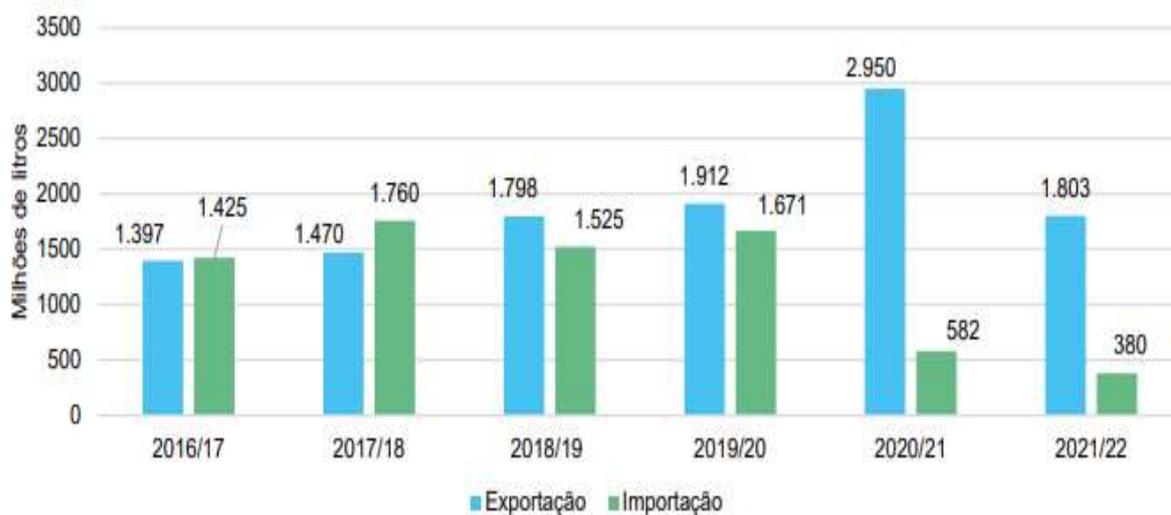
O Brasil é um país em desenvolvimento com grandes áreas agrícolas e, com isso, as transformações nas motivações da demanda de combustíveis, onde um elemento decisivo é a sustentabilidade, pode favorecer o país no desenvolvimento de novos produtos, redução do uso e dependência de combustíveis fósseis (PESSOA, 2007).

Existem duas razões principais pelas quais o etanol de cana-de-açúcar é muito superior a qualquer outro biocombustível produzido em larga escala: a produtividade, a quantidade de biomassa produzida por unidade de área e o balanço energético (LEITE e CORTEZ 2008).

O Proálcool trouxe ganhos econômicos ao reduzir a importação do petróleo, o que permitiu a expansão da oferta do etanol no mercado brasileiro. O processo de produção de etanol é conduzido a partir do caldo resultante da moagem da cana-de-açúcar que é chamado de etanol de primeira geração. Outra fonte para o aumento da oferta foi a obtenção de etanol por outras rotas produtivas, como a partir da biomassa da cana, com o etanol de segunda geração (ABARCA, 2005 *apud* SENNA e DE MATTOS, 2016).

Um levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento – Conab –, mostra que o mercado de etanol segue em demanda aquecida nos últimos anos. Isto se deve à tendência de valorização do petróleo e seus derivados, o que tem tornado o etanol hidratado um combustível mais competitivo. Quanto à produção, em 2019 foi registrada uma geração de 21,57 bilhões de litros de etanol hidratado, o que representa um aumento anual de 32,8%. É importante mencionar que na safra nacional de 2019/2020 foi registrado um recorde de produção, tendo sido produzidos 34 bilhões de litros, o que significa um aumento de 5,1% em relação à safra anterior. Em 2021/2022 o total produzido ficou em 16,18 bilhões de litros, apresentando uma redução de 20,8% em relação à safra anterior, fato que se deve a condições climáticas desfavoráveis (CONAB, 2022).

A exportação brasileira de etanol na safra 2021/2022 apresentou queda de 38,9% em relação ao ciclo anterior, enquanto a importação de etanol caiu 34,6% no mesmo período, como pode ser observado na Figura 1.

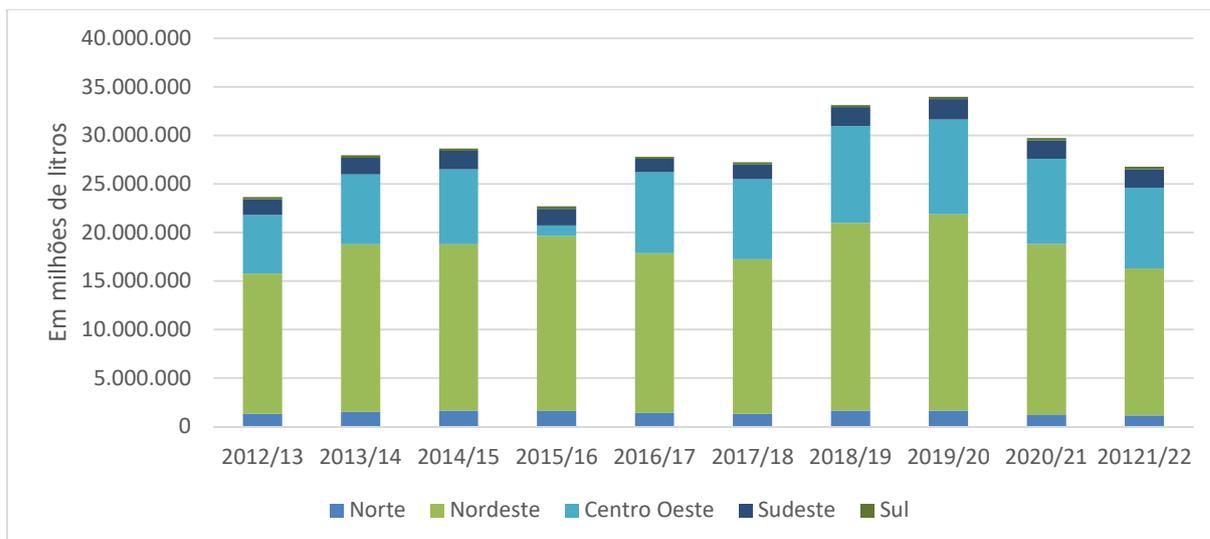
Figura 1: Exportações e importações brasileiras de etanol.

Fonte: CONAB (2022)

Projeções indicam a recuperação na produção brasileira de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, dos subprodutos devido à maior produtividade dos canaviais. O etanol no final da safra 2021/2022 foi marcado pela expressiva valorização do petróleo no mercado, fator que facilitou o aumento dos preços dos biocombustíveis neste início da safra 2022/2023. Outro fator que tende a influenciar o aumento dos preços do etanol na safra atual é o maior controle da pandemia de COVID-19, o que favorece o aquecimento da demanda de importação e exportação (CONAB, 2022).

A estimativa na produção de etanol 2022/2023 apresenta uma redução de aproximadamente 7,4% em relação ao período anterior, saindo de 26,78 bilhões de litros para 24,81 bilhões, contrariando o que ocorreu na safra 2021/2022. Tal seguimento foi impactado pela forte redução nos preços internacionais do petróleo (CONAB, 2022). Observa-se que a pandemia de COVID-19 debilitou a economia brasileira, impactando ainda mais a demanda e a confiança de investidores, em especial a cadeia de produção canavieira do Brasil. Sobre este período, pode-se ainda destacar que o quadro conjuntural negativo experimentado pelo mercado de açúcar possibilitou que a maior parte da produção fosse convertida em etanol, tornando a produção da safra de 2020 a maior da história do setor sucroenergético nacional, como observado na Figura 2.

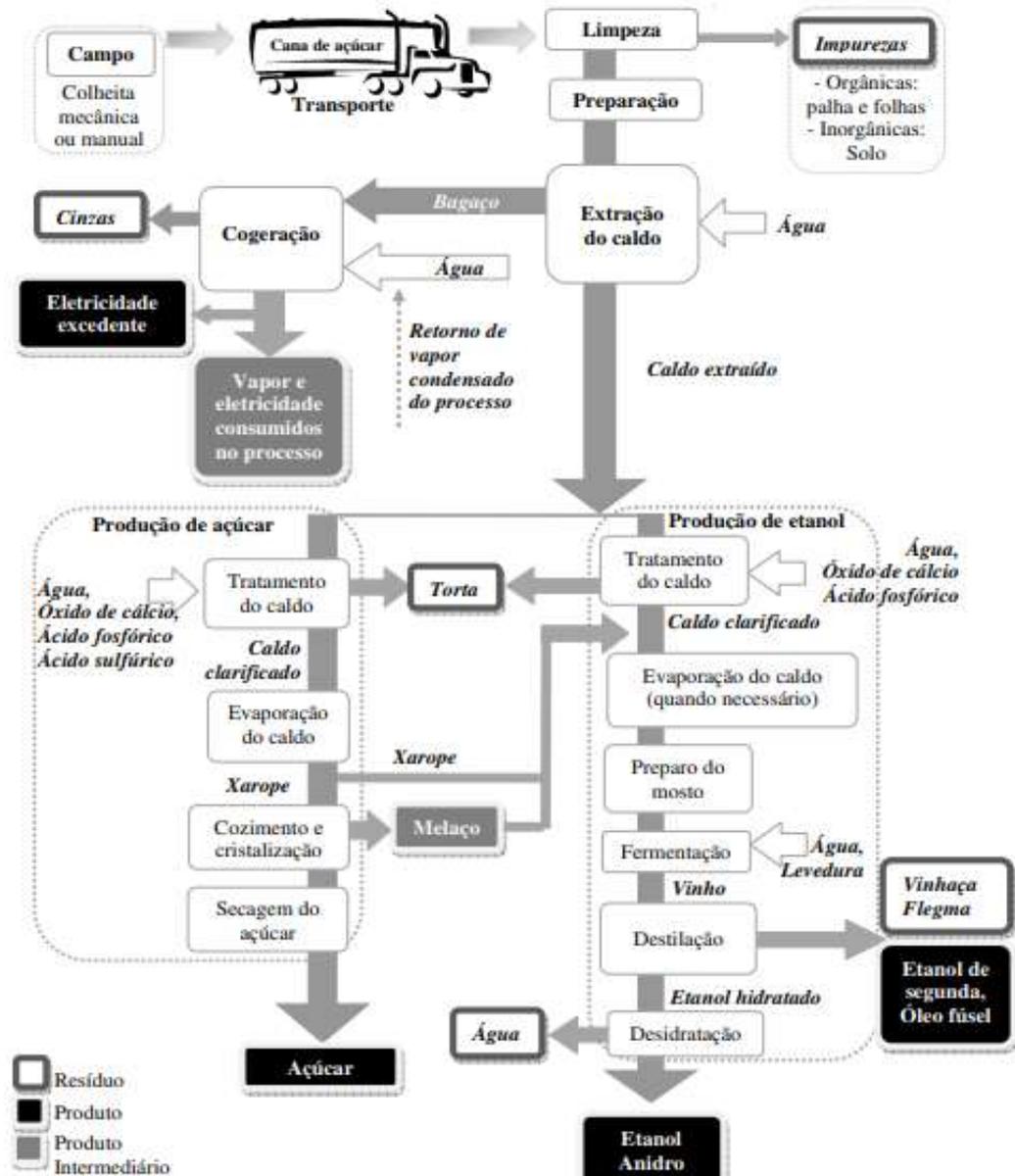
Figura 2: Evolução da produção total de etanol a partir da cana-de-açúcar.



Fonte: CONAB (2022)

A produção de etanol consiste em um processo complexo e envolve diferentes operações unitárias de alto consumo energético como evaporação e destilação, podendo ocorrer por rota bioquímica, através do processo fermentativo, ou ser sintetizado quimicamente. No entanto, ambos os processos geram resíduos: impurezas orgânicas e inorgânicas, torta, águas residuais, vinhaça e flegma (Figura 3). Deve-se levar em conta, nesse cenário, que o aproveitamento dos resíduos gerados, pode trazer além das vantagens ambientais, diversas vantagens econômicas (SILVA, 2008).

Figura 3: Representação das principais etapas da produção de açúcar e etanol em uma usina convencional.



Fonte: SILVA (2008)

3.2 Resíduos industriais

O gerenciamento de resíduos está associado ao controle de geração, armazenamento, coleta, transferência e processamento dos mesmos. Tal gerenciamento tem sido foco da política ambiental de diversos países desde a década de 1970, fornecendo informações apropriadas para lidar com o desperdício de maneira econômica e sustentável (PNRS, 2011).

O controle e caracterização são iniciados através da classificação quanto a origem e natureza do material. São três as alternativas básicas para descarte: o despejo direto de resíduos não-processados, que apresenta menor valor econômico, porém maior preocupação em relação ao espaço físico disponível em relação ao aumento populacional; o processamento dos resíduos antes da disposição final, com intuito de diminuir o volume de resíduos para o destino final; e a terceira categoria que inclui processos de recuperação de energia e ou materiais (DASKALOPOULOS, E.; BADR, O.; PROBERT, S. D., 1997).

“De acordo com a Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS –, os resíduos industriais são aqueles gerados por processos produtivos e instalações industriais. Segundo a resolução CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 313, 29 de outubro de 2002, Resíduo Sólido Industrial é todo resíduo que resulte de atividades industriais e que se encontre nos estados sólido, semissólido, gasoso – quando contido – e líquido, cujas particularidades tornem inviável o seu despejo na rede pública de esgoto ou em corpos d’água, ou exijam para isso soluções técnica ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível” (PNRS, 2011).

Os resíduos sólidos são classificados conforme ABNT NBR 10004/2004, de maneira que envolve a identificação do processo ou atividade que lhes deu origem, de seus constituintes e características, e a comparação desses com listagem de resíduos e substâncias cujo impacto à saúde e ao meio ambiente é conhecido.

Os efluentes líquidos oriundos de processos agroindustriais são compostos por matéria orgânica. A vinhaça é um desses resíduos, sendo o principal efluente das destilarias de álcool. Trata-se de uma água residuária complexa com concentrações de matéria orgânica de, em média, 200 vezes maiores que no esgoto doméstico. A demanda química de oxigênio (DQO) desse efluente pode ultrapassar 100 g/L (TRINDADE *et al*, 2017).

Sumariamente, a vinhaça é uma suspensão aquosa de sólidos orgânicos e minerais, que contém componentes do vinho, não eliminados no processo de destilação, constituída de vários componentes químicos como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), ferro (Fe), zinco (Zn), entre outros (ROCHA, 2012 *apud* DE AQUINO, *et al*. 2016). Dadas as suas propriedades físico-químicas e a concentração de substâncias solubilizadas que excedem ao máximo permitido pelos padrões de potabilidade da água, é classificada de acordo com a NBR 10004/2004 como um resíduo de classe IIA – não perigoso – não inerte, ou seja, apresenta propriedades tais como biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água.

O aumento expressivo na produção de etanol no Brasil, conseqüentemente, tem gerado aumento na produção de vinhaça, principal subproduto da indústria sucroalcooleira, agravando o problema de sua destinação (SZYMANSKI; BALBINOT e SCHIRMER 2010).

3.3 A vinhaça e suas aplicações

A vinhaça é o principal resíduo da produção de biocombustível a partir da cana-de-açúcar, sendo produzida, em média, na proporção de 13 L para cada 1 L de etanol gerado em uma biorrefinaria. Trata-se de uma suspensão aquosa de sólidos orgânicos e minerais de coloração marrom-escuro que contém compostos do vinho não eliminados durante a destilação (EMBRAPA, 2016).

A composição química da vinhaça varia conforme o tipo de mosto da qual foi originada, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Composição química de vinhaças conforme o tipo de mosto.

Parâmetro	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2 – 5,0	3,7 – 4,6	4,4 – 4,6
Temperatura (°C)	80 – 100	80 – 100	80 – 100
DBO (mg L ⁻¹ O ₂)	25.000	6.000 – 16.500	19.800
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	65.000	15.000 – 33.000	45.000
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mgL ⁻¹)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg L ⁻¹)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg L ⁻¹ N)	450 – 1.610	150 – 700	480 – 710
Fósforo (mg L ⁻¹ K ₂ O)	100 – 290	10 – 210	9 – 200
Potássio (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	3.740 – 7.830	1.200 – 2.100	3.340 – 4.600
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	450 – 5.180	130 – 1.540	1.330 – 4.570
Magnésio (mg L ⁻¹ MgO)	420 – 1.520	200 – 490	580 – 700
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄)	6.400	600 – 760	3.700 – 3.730
Carbono (mg L ⁻¹ C)	11.200 – 22.900	5.700 – 13.400	8.700 – 12.100
Relação C/N	16 – 16,27	19,7 – 21,07	16,4 – 16,43
Matéria orgânica (mg L ⁻¹)	63.400	19.500	3.800
Subst. redutoras (mg L ⁻¹)	9.500	7.900	8.300

Fonte: Marques (2006) *apud* Embrapa (2016).

Com alto poder poluente, a vinhaça é considerada como efluente devido sua composição rica em matéria orgânica, nível de acidez, elevada corrosividade e índices de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) danosa à fauna e a flora, das águas doces, além de repelir a

fauna marinha que vem às margens das costas brasileiras (FREIRE & CORTEZ, 2000 *apud* DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Desta maneira, as primeiras normas implementadas no Brasil sobre a destinação adequada da vinhaça começaram em meados da década de 1980, com o intuito de reciclar esta matéria para reutilização no cultivo. A motivação que levou ao estabelecimento destas regras foram os registros crescentes de problemas de anóxia em cursos d'água em que a vinhaça era descartada (BORDONAL *et al.*, 2018).

A principal utilização da vinhaça tratada no setor sucroalcooleiro é na fertirrigação, sistema de diluição da mesma na água de irrigação da cultura da cana-de-açúcar, sendo entre as aplicações possíveis, a mais simples, menos custosa e com mais vantagens (SILVA, 2011). Algumas destas vantagens são: aumento da produção de cana-de-açúcar por área cultivada, aumento da qualidade do solo, aumento da carga de carbono e nitrogênio no solo, redução da demanda de água potável para irrigação, e diminuição da demanda por fertilizantes sintéticos no cultivo.

Pode-se dizer, então, que a fertirrigação por vinhaça aumenta a produção de cana-de-açúcar na lavoura, tanto no médio quanto no longo prazo, pois além destas vantagens, tende a aumentar, com o tempo, o teor de potássio do solo. Entretanto, há riscos nessa estratégia de aproveitamento da vinhaça: uma dosagem inadequada de potássio pode levar ao acúmulo no solo e favorecer a lixiviação, que é a perda do potássio acumulado pelo escoamento de águas pluviais que, por sua vez, prejudicam cursos d'água na área vizinha ao cultivo (DA SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

Além deste, outro potencial impacto negativo do aproveitamento da vinhaça para fertirrigação é a emissão de gases de efeito estufa durante o seu transporte e armazenamento. Como se trata de matéria orgânica exposta à atividade microbiológica, possui como resultado a produção de CH₄ e CO₂, principalmente em canais abertos, pelo processo de fermentação ou degradação aeróbia. Estudos sugerem que uma das formas de mitigar este impacto é utilizar tubulações fechadas para o transporte de vinhaça, o que contribui para o desenvolvimento de uma indústria sucroalcooleira mais limpa (DE AQUINO *et al.*, 2016).

Outro risco ambiental a ser mencionado é o aumento das emissões de gases de efeito estufa na lavoura após a aplicação da vinhaça. Esta, em si, não influencia diretamente nas emissões de metano, mas reduz a aeração do solo enquanto aumenta a disponibilidade de carbono dissolvido para micro-organismos. Como resultado, aumenta a atividade microbiológica em regiões anaeróbicas do solo, o que leva ao aumento da emissão de N₂O. De

fato, em geral, os campos tratados com vinhaça apresentam maiores emissões de N_2O que aqueles tratados exclusivamente com fertilizante nitrogenado de origem mineral (BORDONAL *et al.*, 2018).

Segundo Correia (2019), o uso da vinhaça de cana-de-açúcar como fertilizante gera controvérsias entre seus benefícios e malefícios ambientais, embora a fertirrigação possibilite a obtenção de benefícios em curto prazo, a aplicação contínua da vinhaça na lavoura tem potencial para gerar inúmeros impactos adversos ao solo, recursos hídricos e produtividade da lavoura.

Em relação ao controle destes riscos, deve-se observar que as emissões de vinhaça por fertirrigação também dependem do método de aplicação no cultivo. Os estudos tendem a apontar que a aplicação de vinhaça concentrada reduz as emissões de N_2O em comparação à vinhaça fresca (ROCHA, 2012 e HOARAU *et al.*, 2018). Este dado pode ser uma das chaves para redução das emissões de gases de efeito estufa na cadeia produtiva do etanol no Brasil.

De acordo com a CETESB (2015), a disposição de vinhaça no solo agrícola do Estado de São Paulo foi regulamentada pela Norma Técnica P 4.231/2005, tendo como objetivo estabelecer os critérios e procedimentos para o armazenamento, transporte e aplicação da vinhaça, gerada pela atividade sucroalcooleira no processamento de cana-de-açúcar.

A vinhaça foi determinada como líquido derivado da destilação do vinho que é resultante da fermentação do caldo da cana-de-açúcar ou melaço. Para aplicação da mesma os resultados analíticos deverão ser comparados com valores orientados estabelecidos na Decisão de Diretoria da CETESB nº 045/E/C/I, de 20/02/2014 (CETESB, 2014) e com os padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.

Também sobre a forma de tratar a vinhaça, outra possibilidade estratégica para mitigar a emissão de gases de efeito estufa é a digestão anaeróbica. Por esta via, o metano e o gás carbônico produzidos por um processo controlado podem ser aproveitados. O CH_4 como combustível, que volta ao processo para fornecimento de energia, e esses produtos potenciais decorrentes de atividade microbiológica na lavoura tendem a ser reduzidos (POVEDA, 2014).

Vale mencionar que outras destinações podem ser aplicadas para utilização e tratamento da vinhaça, tais como métodos físico-químicos com a redução de volume, que consistem em aplicar à corrente a operação de evaporação, onde a corrente do efluente é continuamente concentrada por meio da evaporação da água contida na mistura. Esse vapor pode ser reaproveitado como fonte de energia ou a água pode ser reaproveitada para outras etapas do processo. Algumas desvantagens desta operação incluem o alto consumo energético e, por consequência, os custos econômicos para conduzi-la (HOARAU *et al.*, 2018).

A vinhaça pode ainda ser reaproveitada diretamente na destilaria por meio do reciclo da corrente formada, principalmente para os tanques de fermentação. Neste tratamento, o resíduo, rico em matéria orgânica e outros nutrientes minerais, é reciclado de volta e misturado ao meio fermentativo. As duas principais operações são separação da matéria sólida e aproveitamento de metano a partir do efluente. Ou seja, assim que a vinhaça é coletada em cada etapa na destilaria, passa por um processo de filtração para separação da matéria sólida da solução, e pode também passar por processo de biodigestão para produção e aproveitamento do CH₄ produzido a partir desta corrente (SZYMANSKI; BALBINOT e SCHIRMER 2010).

Uma das operações necessárias para o tratamento da vinhaça é a separação sólido-líquido, comumente conduzida em sistemas de filtração. As principais tecnologias empregadas nesta operação são a microfiltração e a nanofiltração presentes, em geral, como tratamento terciário para os efluentes de tratamento aeróbico. Uma das vantagens observada nesta operação é a melhoria significativa da DQO com a osmose reversa (HOARAU *et al.*, 2018).

Sistemas de adsorção são frequentemente utilizados para remoção de compostos dos efluentes industriais e, no tratamento da vinhaça, sua principal função é a remoção de íons potássio, cujo acúmulo é prejudicial a lavoura (HOARAU *et al.*, 2018). Outro processo ocorre através da termólise catalítica em condições anóxicas, cuja vantagem é a redução da DQO.

Existem também os processos microbiológicos, que podem ser aplicados por duas rotas: a digestão termofílica e a mesofílica. Estes têm como principal vantagem o decréscimo de poluentes, embora requeiram outras etapas de pós-tratamento (LEITE, 2015).

Há, ainda, micro-organismos específicos que atuam exclusivamente para remoção da coloração da vinhaça, um processo difícil, já que os compostos que provocam a coloração amarronzada são recalcitrantes. Outro tratamento microbiológico muito empregado é o uso de bactérias para remoção de metais tóxicos, como a *Streptomyces* sp. MC1, cujos estudos a respeito mostram ser capaz de remover Mn, Fe, Zn, As e Pb (HOARAU *et al.*, 2018).

A vinhaça também pode conter compostos de remoção ainda mais complicados, como fibras da matéria-prima, no caso, a cana-de-açúcar. Assim, reatores com enzimas dispersas no meio são usados como pré-tratamento da vinhaça para degradação de matéria fibrosa, como: D-glucanase, celobiohidrolase, e β -glicosidase (ROYCHOWDURRY *et al.*, 2015).

Alternativamente, a fitorremediação é uma tecnologia que usa plantas para reduzir e degradar poluentes orgânicos e pode ser uma estratégia de tratamento da vinhaça. Consiste basicamente em utilizar grandes áreas artificiais de cultivo destas plantas, como a *Pontederia sagittata*, que são irrigadas com a vinhaça. Apesar da desvantagem de ser um processo muito

demorado, tem como benefícios a remoção da DQO a baixas temperaturas e pressão atmosférica (ROYCHOWDURRY *et al.*, 2015).

A destinação da vinhaça em outras aplicações apresenta restrições quanto aos impactos ambientais. Estudos apontam que a mesma composição que apresenta na fertirrigação é viável para cultivo de microalgas. Estes micro-organismos fotossintetizantes demandam nutrientes minerais que estão presentes na vinhaça para seu crescimento autotrófico. Ademais, outras espécies de microalgas têm capacidade de absorver nutrientes orgânicos ali presentes pela via mixotrófica (MARCHELLO *et al.*, 2015; CANDIDO, 2019).

3.4 Cultivo de microalgas

Entre um dos mais modernos processos biotecnológicos estão os cultivos intensivos de microalgas. O cultivo desses organismos possui importância biológica, ecológica e econômica. Foram os primeiros organismos capazes de realizar fotossíntese e um dos principais agentes responsáveis pela criação da atual atmosfera terrestre (TOMASELII, 2004). A partir desses cultivos é possível obter-se, por exemplo, derivados alimentícios e diversos produtos empregados pela agricultura tradicional, com custos inferiores e em uma velocidade de produção muito mais rápida (CHISTI, 2007).

Há diferentes maneiras de definir as microalgas. Na ficologia aplicada, o termo microalga refere-se, em geral, a algas microscópicas eucarióticas e as cianobactérias procarióticas (TOMASELII, 2004).

Tradicionalmente, os sistemas de classificação das algas baseiam-se nos seguintes critérios principais: tipos de pigmentos, natureza química dos produtos de armazenamento e constituintes da parede celular, acompanhado de critérios adicionais que levam em conta os seguintes aspectos citológicos e caracteres morfológicos: ocorrência de células flageladas, estrutura da flagelos, esquema e trajetória da divisão nuclear e celular, presença de um envelope retículo endoplasmático ao redor do cloroplasto e possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (RICHMOND, 2008).

Diversas espécies de microalgas demonstram elevada eficiência em retirar nutrientes ou outros elementos químicos do meio aquoso, com isso apresentam potencial para sua aplicação em recuperação de ambientes aquáticos. Portanto, podem ser utilizadas na recuperação de águas residuais e, em seguida, sua biomassa pode ser utilizada para outras aplicações industriais (ANSILAGO; OTTONELLI; CARVALHO, 2016).

Neste sentido, a vinhaça, pode ser uma alternativa para cultivo de microalgas, pois é um efluente que demanda tratamento antes da sua reutilização ou liberação no ambiente. A utilização como meio de cultivo é mais benéfica ambientalmente comparada a tratamentos que utilizam resíduos químicos durante o processo (CANDIDO, 2019).

De acordo com Candido e Lombardi (2019), os estudos sobre produção de microalgas em vinhaça avaliam o crescimento destes micro-organismos por meio de diferentes parâmetros, como densidade celular, taxas de crescimento, biomassas secas e análises bioquímicas.

Entre as restrições deste processo, é importante ressaltar que a vinhaça bruta apresenta características como baixo pH e alta turbidez, que limitam o seu uso direto em cultivos autotróficos. Na verdade, a composição bioquímica da biomassa das microalgas não é determinada apenas pela natureza de cada espécie, mas de fatores como intensidade luminosa, temperatura, pH, nutrientes presentes no meio e agitação (MIA & WU, 2004 *apud* BERTOLDI, *et al.*, 2008). Além disto, meios de culturas alternativos, utilizados para produção de biomassa microalgal, com diferentes concentrações e tratamentos prévios, que envolvem correção das propriedades físico-químicas, resultará em diferentes taxas de crescimento para uma mesma espécie analisada (CANDIDO, 2019).

Em relação aos métodos de cultivo, naqueles conduzidos em batelada, as células são inoculadas no meio líquido fresco com condições físico-químicas favoráveis no início do cultivo, não havendo qualquer adição posterior de nutrientes (LOURENÇO, 2006). Outro fator relevante é a agitação da cultura. Isto permite otimizar condições essenciais relacionadas à produção de biomassa, como manter as células em suspensão evitando que fiquem depositadas ao fundo do biorreator, facilitar a passagem de luz, além de evitar processos de foto oxidação pela eliminação do oxigênio supersaturado no meio (RICHMOND, 2008).

Quanto ao tempo de crescimento, pode variar de acordo com as condições impostas. Em alguns casos, a biomassa pode ser estimada como uma colônia formando unidades (RICHMOND, 2008). Fatores químicos e biológicos atuam diretamente no crescimento, sendo assim, a composição do micro-organismo pode sofrer alterações no metabolismo das células e, conseqüentemente, na síntese dos compostos de interesse.

Quando o meio de cultura é favorável, e todos os nutrientes que as células demandam para o crescimento estão presentes em uma quantidade que não limita o crescimento, isto é, a concentrações altas o suficiente ao ponto de mudanças incrementais não afetarem a taxa de reação, a maioria das algas unicelulares se reproduz assexuadamente. O tamanho e a biomassa

das células crescem com o tempo, resultando em um crescimento de biomassa (RICHMOND, 2008).

Dentre os parâmetros importantes para crescimento de microalgas estão as fontes de carbono, que contribui em aproximadamente 50% da biomassa (LOURENÇO, 2006 *apud* ANDRADE, 2014). Luminosidade, temperatura, pH e fonte de nutrientes também influenciam no crescimento celular (SCHWENZFEIER; WIERENGA; GRUPPEN, 2011).

3.5 Bioprodutos

Nos últimos anos, a tecnologia de microalgas se desenvolveu e se diversificou significativamente devido sua importância nutricional, econômica e ecológica (CHISTI, 2007). Têm sido aplicadas na aquicultura para alimentação direta e/ou indireta de algumas espécies aquáticas de interesse econômico, para síntese de compostos nutracêuticos como ácidos graxos poli-insaturados, fármacos, bioquímicos, fertilizantes, suplementos alimentares e ração animal (FERREIRA, 2013).

Grupos fotossintetizantes como as microalgas armazenam a energia química na forma de polissacarídeos, lipídeos, proteínas e hidrocarbonetos, o que viabiliza sua obtenção e aplicação comercial como geração de matéria-prima para diferentes setores industriais (DA SILVA; VIEIRA; MARQUES, 2011). Todavia, a viabilidade econômica do cultivo em larga escala para produção de bioprodutos, como bioplásticos, polímeros e biocombustíveis ainda não demonstram custos de produção competitivos com derivados da indústria petroquímica (EMBRAPA, 2016).

Com forte apelo na diversificação das matérias-primas utilizadas na produção de biocombustíveis, bioprodutos e químicos renováveis, as microalgas entram no sistema de pesquisas como uma aposta do Governo Federal, visto que o país apresenta condições climáticas favoráveis ao cultivo e vasta diversidade de espécies (ORTENZIO *et al.* 2015)

Neste contexto, a produção anual global de bioprodutos a partir de microalgas apresentou um crescimento significativo no período de 2013 a 2014, quando foi estimada a marca de 15 mil toneladas anuais em base seca. Entre as espécies que mais foram empregadas no cultivo estão aquelas que pertencem aos gêneros *Arthrospira (Spirulina)* e *Chlorella*, utilizadas como fontes de pigmentos para indústria de cosméticos ou como suplementos proteicos para alimentação humana (EMBRAPA, 2016).

Diferentes pesquisas mostram, entre várias matérias-primas disponíveis, as microalgas como uma alternativa sustentável na produção de biocombustíveis como biodiesel, bioetanol e gás de síntese. Segundo Andrade (2014), microalgas são consideradas uma das melhores candidatas para produção de biocombustíveis, devido ao seu alto teor de lipídeos e, por esse motivo, a identificação e quantificação desses são fundamentais.

O aumento de produção referente aos biocombustíveis, no ponto de vista industrial, pode ocorrer de duas maneiras: por aperfeiçoamentos da tecnologia para produção do etanol de primeira geração ou através do desenvolvimento científico e tecnológico de produção do etanol de segunda geração. Já o processo para geração de bioetanol a partir de microalgas é classificado como terceira geração e não apresenta as desvantagens inerentes aos demais (FERNÁNDEZ-LINARES *et. al.*, 2012; MIRANDA, 2011; DE SOUZA, 2012)

3.6 Biodiesel a partir de microalgas

No país, os primeiros estudos relacionados à utilização de óleos e seus derivados como alternativa ao diesel de petróleo tiveram início logo após a Primeira Guerra Mundial. O biodiesel é um combustível biodegradável provindo de fontes renováveis, como óleos vegetais novos ou já utilizados e/ou gordura animal. De modo geral, é considerado um combustível natural usado em motores ciclo-diesel atendendo especificações da ANP – Agência Nacional do Petróleo (ENGEL, 2014).

O biodiesel é uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de lipídeos de ocorrência natural. A sua síntese ocorre por meio da reação estequiométrica de um alquil glicerol com álcool em presença de um catalisador e pode ser obtido a partir de três principais rotas: a transesterificação, o craqueamento térmico e a esterificação (RAMOS, *et al.*, 2017).

Conforme dados da ANP, o PNPB - Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, que teve início em 2004 apenas em caráter experimental, a comercialização voluntária ocorreu entre 2005 e 2007, e a partir de 2008 passou a ter obrigatoriedade na utilização, conforme a Lei nº 11.097/2005 que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE – Conselho Nacional de Política Energética, que procura atingir 15% conforme pode ser visto na Figura 4.

Figura 4: Evolução dos percentuais de adição para formulação de óleo diesel B.



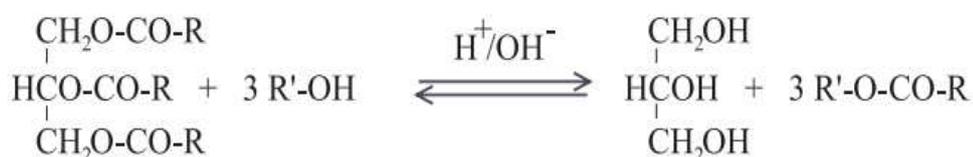
Fonte: ANP (2021)

A resolução ANP n°4, de 25 de agosto de 2014, estabeleceu a especificação do biodiesel comercializado no país para ser misturado ao óleo diesel A. “A nota técnica conjunta n° 10/2021/ANP propôs novo modelo de comercialização de biodiesel para atendimento da mistura obrigatória ao diesel B, de forma a atender o disposto na Resolução CNPE n° 14/2020”.

No que tange à produção de biodiesel, as microalgas se destacam entre os micro-organismos oleíferos. Algumas de suas vantagens são maior produtividade em óleo, menor área de cultivo requerida e ciclo de vida significativamente curto, da ordem de poucos dias. Entre outras vantagens, este processo, além de contribuir para a atenuação das mudanças climáticas, à medida em que captura CO₂ da atmosfera, também constitui como um método de tratamento de águas residuárias (RAMOS; *et al.*, 2017). Além disto, as microalgas podem ser cultivadas para fins de extração de produtos de alto valor agregado, tais como vitaminas, antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados (ENAMALA *et al.*, 2018).

De acordo com (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012) os lipídeos presentes em microalgas são geralmente classificados em três grupos: lipídeo neutro (NL), fosfolipídeos (PL) e glicolipídeos (GL) polares. Os lipídeos neutros são acumulados como reserva energética e podem ser facilmente convertidos em biodiesel a partir da esterificação (Figura 5), enquanto os fosfolipídeos e glicolipídeos são encontrados frequentemente nas membranas celulares.

Figura 5: Reação de transesterificação de óleos.



Fonte: Autora (2022)

O perfil de ácidos graxos extraídos a partir de uma determinada microalga é fortemente influenciado pelas condições de cultivo, como composição do meio, temperatura, intensidade luminosa, ciclo de luz/escuridão e taxa de aeração. De modo geral, as microalgas submetidas a extração na fase estacionária apresentam menor conteúdo de lipídeos que na fase logarítmica. Determinadas espécies se destacam por apresentar aumento no conteúdo de lipídeos da ordem de 10% para 20% em condição de escassez de oxigênio (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012). Em geral, as microalgas reagem à privação de nutrientes acelerando a via metabólica de síntese de lipídeos neutros. Todavia, este aumento na produção de lipídeos não tende a resultar em um aumento geral na produtividade em óleo, à medida em que esse processo ocorre com inibição do crescimento e interrupção da divisão celular (EM; VEGETAL; MARTINS, 2014). Dados todos estes aspectos, a viabilidade da utilização de lipídeos a partir de microalgas para produção de biodiesel é um tanto desafiadora e demanda uma análise particular.

O perfil de ácidos graxos presentes em microalgas apresenta cadeias que variam de 12 a 22 carbonos, sejam saturados ou insaturados. O número de cadeias duplas, porém, nunca excede 6 e quase todas as cadeias insaturadas são cis isoméricas. Uma das microalgas que apresenta potencial para extração de lipídeos para síntese de biodiesel é a *Tetraselmis suecica*, cujo perfil de ácidos graxos na fase estacionária está apresentado na Figura 6.

Figura 6: Perfil de ácidos graxos na fase estacionária da cepa *Tetraselmis suecica*.

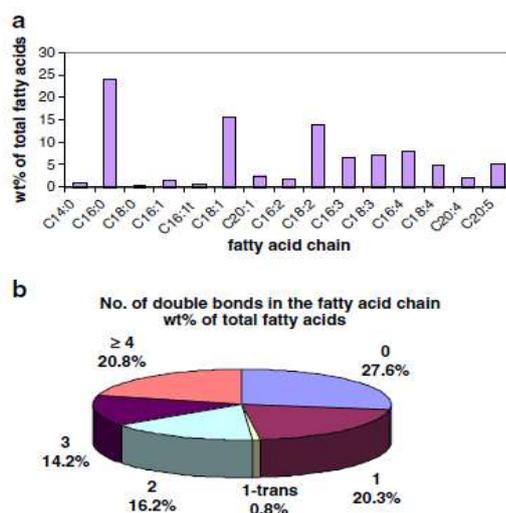


Figura 6: a) Composição de ácidos graxos de lipídeos extraídos da espécie *Tetraselmis suecica* no fim da fase logarítmica (início da fase estacionária): a) em termos de cadeia de ácidos graxos; b) em termos de ligações duplas na cadeia. Na figura a), a letra t após o nome do ácido graxo denota trans isomerismo e a ausência da letra, indica que o ácido graxo é cis isomérico. Na figura b), a palavra -trans após o número de cadeias duplas denota que os ácidos graxos são trans isoméricos.

FONTE: Halim *et al.* (2012).

A presença de cadeias C16:0, C18:1 e C18:2 como ácidos graxos predominantes indicam que os lipídeos da *Tetraselmis suecica* apresentam os requerimentos de um perfil de ácidos graxos necessários para síntese de biodiesel de alta qualidade. Além disso, o conteúdo de ácidos graxos saturados é relativamente baixo em comparação com o conteúdo de ácidos graxos cis insaturados. Isto é muito desejável para a síntese de ésteres metílicos de ácidos graxos, pois provê ao biodiesel melhores propriedades de escoamento, como baixo ponto de nuvem e baixo ponto de fluidez, ao contrário do que acontece com cadeias saturadas que rapidamente se tornam semicristalinas com a diminuição da temperatura (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

Os lipídeos extraídos também apresentam conteúdo relativamente baixo de cadeias de ácidos graxos poli insaturadas, com não mais que 4 ligações duplas. Isto também é muito desejado para a síntese de biodiesel, uma vez que essas cadeias são responsáveis por uma volatilidade mais baixa, menor estabilidade em relação à oxidação e maior tendência à formação de cola, como se observa no biodiesel derivado de sementes oleaginosas (ENAMALA *et al.*, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pré-tratamento da vinhaça e preparo do meio de cultivo

A vinhaça foi obtida de uma usina sucroalcooleira do Estado de São Paulo - Brasil. Trata-se de uma amostra referente à segunda safra do ano de 2020, armazenada em galões plásticos de 1 L e mantida a temperatura de 5 – 10°C. A caracterização físico-química da vinhaça bruta quanto aos parâmetros de interesse potencial hidrogeniônico (pH) e turbidez foram realizadas no laboratório Bio4Tec situado no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA – POLI/USP).

4.1.1 Descrição dos materiais e procedimentos

As microalgas foram mantidas em frascos do tipo Erlenmeyer, por meio de repiques, com intervalos de aproximadamente 15 dias. Todo o material, vidrarias e meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C por um período de 20 minutos e as devidas manipulações realizadas em fluxo laminar.

4.1.2 Etapa I – Preparo do Meio de Cultura

Primeiramente foi preparado um meio de cultura BG-11, acompanhando a metodologia de Gracioso *et al.* (2021), para manutenção das cepas e produção de biomassa. A composição do meio está descrita na Tabela 2. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Tabela 2 - Meio BG11. Composição das soluções utilizadas e concentração.

	Componentes	Concentração (g L⁻¹)
Solução I	EDTA	0,1
	Citrato férrico de amônio	0,6
	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	0,6
	Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	3,6

Solução II	Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	7,5
	Fosfato de potássio bibásico (K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O)	4,0
Solução III	Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	2,86
	Cloreto de Manganês (MnCl ₂ .4H ₂ O)	1,81
Solução IV	Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,222
	Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	0,079
	(CoCl ₂ .6H ₂ O)	0,050
	Molibidato de sódio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	0,391
-	Hepes 1,0 M	

Fonte: Autora (2020)

A preparação do meio foi realizada adicionando-se 10 mL das soluções I, II e III, 1 mL da solução IV, 0,02g de carbonato de sódio (Na₂CO₃), 1,5 g de nitrato de sódio (NaNO₃) e 10 mL da solução de Hepes. Avolumou-se com água ultrapura Milli Q e seu pH ajustado para 7,5, utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M ou ácido clodrítrico (HCl) 1,0 M.

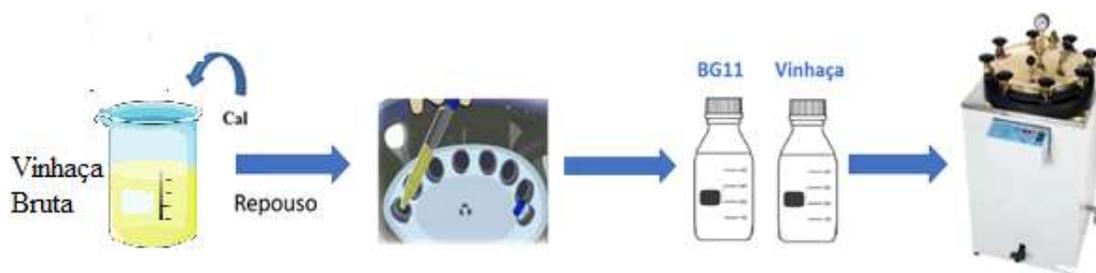
Para utilizar a vinhaça como meio de cultura, foi preciso fazer um tratamento prévio a fim de atenuar a sua acidez, presença de sólidos e cor. Assim, a vinhaça bruta foi transferida para um béquer de 200 mL previamente higienizado para verificação do pH. O processo de clarificação e decantação de sólidos foi realizado segundo a metodologia aplicada por Teles (2016).

Foi adicionado hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ (Synth) à vinhaça bruta na proporção de 3 g L⁻¹. Essa solução foi mantida em repouso por 40 minutos. Após esse período, o material foi

centrifugado (*High-Speed Refrigerated Centrifuge CR-22N Hitachi®*) a 10.000 rpm por 5 minutos, à temperatura de 20°C, sendo o material precipitado descartado.

O ajuste do pH por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) foi executado até se atingir valores 7,2 - 7,5. O equipamento utilizado foi um medidor de pH micro processado da Tecnal®, com exatidão e incerteza $\text{pH} \pm 0,01$. A solução obtida foi transferida para frascos de vidro com tampa e anel antigota, autoclavada por 20 minutos a 121 °C. A Figura 7 ilustra o procedimento.

Figura 7:Esquema de clarificação da vinhaça e preparo do meio



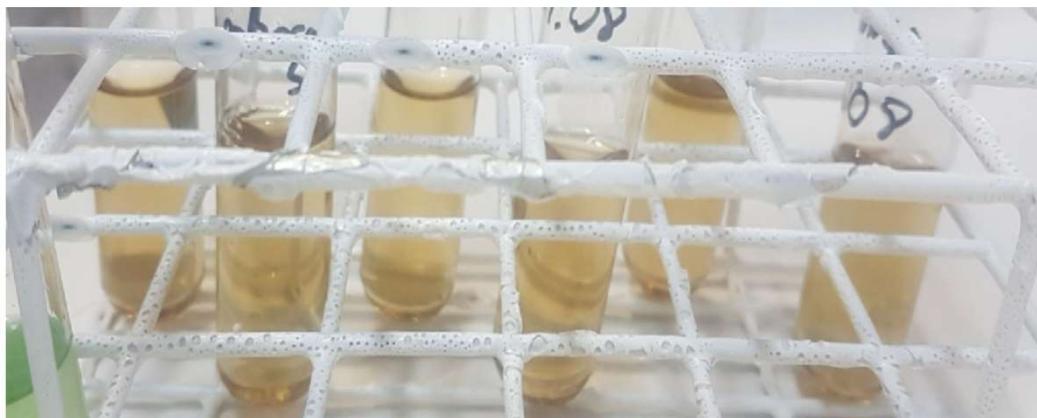
Fonte: Autora (2022)

4.2 Adaptação das cepas de microalgas em diferentes concentrações de vinhaça.

As cepas utilizadas fazem parte das linhagens obtidas pelo laboratório Bio4Tec e foram previamente coletadas e isoladas pelos pesquisadores Bruna Bacaro Borrego e Bruno Karolski. As microalgas são oriundas da região metropolitana da Baixada Santista, de três diferentes localidades, em áreas de manguezal na cidade de Cubatão. Esse manguezal possui uma forte ação antrópica, com contaminação de diferentes tipos, tanto industrial quanto doméstica. Por isso essa área foi escolhida para isolamento, para tentar isolar microalgas que tolerassem condições extremas (GRACIOSO et al. 2021). As cepas isoladas e o consórcio foram mantidos em meio líquido BG-11 à temperatura de 26,1°C.

Realizaram-se três experimentos preliminares com seis cepas diferentes, das quais 5 eram microalgas isoladas identificadas no presente trabalho como A3, A5, A20, B7, B12 e um consórcio denominado MSC4P. O primeiro experimento foi realizado em tubos de ensaio estéreis, preenchidos com volume total de 15 mL de meio de cultura contendo 10% de vinhaça pré-tratada (v/v) e 750 µL de inóculo, fechados com rodilhão e dispostos em estante com intensidade luminosa (LED branca fria) de 9800 lux, conforme ilustra a Figura 8.

Figura 8: Experimento preliminar para seleção de cepas



Fonte: Autora (2022)

No segundo experimento, foram utilizados 50 mL de volume total com 10% (v/v) de vinhaça e 90% BG-11. Inoculou-se 1 mL das cepas A3, A5 e MSC4P em frascos do tipo Erlenmeyer (250 mL) que foram fechados com rodilhão, o que permitiu a troca gasosa entre o meio e a atmosfera exterior. Este procedimento foi analisado com e sem agitação constante usando uma mesa agitadora (Ethik Technology®) de movimento orbital a 80 rpm.

No terceiro experimento, que teve como objetivo avaliar o efeito das diferentes concentrações de vinhaça no crescimento das culturas, ampliou-se a concentração de vinhaça no meio para 20% (v/v) a fim de adaptar as cepas para maiores concentrações. O procedimento foi igual ao conduzido nos dois primeiros experimentos. O inóculo utilizado nos testes com maiores concentrações de vinhaça foi obtido a partir dos testes com concentrações inferiores. Isto foi feito com o objetivo de adaptar os micro-organismos ao meio de cultura de forma gradual e, com isto, possibilitar um desempenho melhor do crescimento no meio de cultivo.

4.3 Seleção e identificação da cepa A3

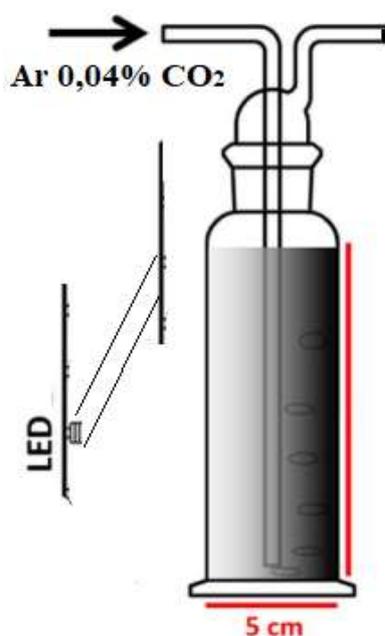
A partir dos experimentos de seleção realizados com as diferentes cepas, a cepa A3 apresentou a melhor velocidade de crescimento nas condições testadas. Deste modo, foi escolhida para dar prosseguimento aos experimentos subsequentes.

A identificação da cepa foi feita pela doutoranda Bruna Bacaro Borrego, por meio da extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento do gene DNAr-ITS. Por fim, as sequências obtidas foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados BLAST *database* para verificar seu percentual de similaridade com os gêneros e espécies de microalgas.

4.4 Condições de cultivo cepa A3 - *Coelastrella* sp.

Os cultivos da cepa *Coelastrella* sp. para avaliação de crescimento foram realizados em meio contendo BG-11 e vinhaça nas concentrações de 10%, 20% e 30% (v/v). As células foram inoculadas em meio líquido em frascos Drechsler estéreis de 5 cm de diâmetro e volume de trabalho de 250 mL, com adição de ar a 0,04% de CO₂ e taxa de iluminação de 9800 lux (*Light Meter*). O procedimento está representado na Figura 9.

Figura 9: Sistema de cultivo.

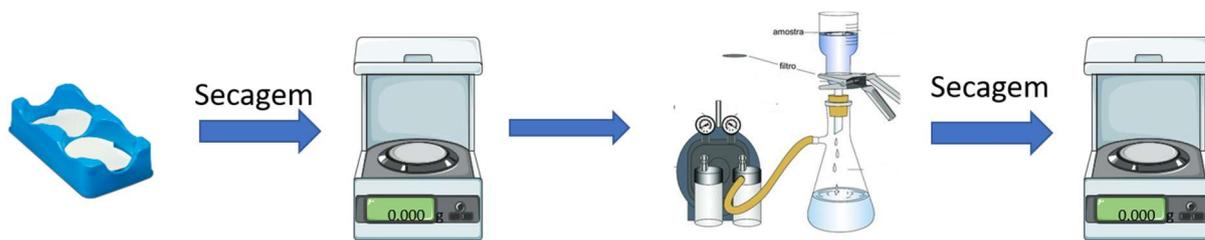


Fonte: Autora (2022)

4.5 Quantificação da biomassa

A biomassa seca foi determinada por métodos gravimétricos a partir de amostras de 10 mL do cultivo, como representado na Figura 10. Neste procedimento, membranas de polietersulfona com poro de 0,22 μm e 0,47 mm de diâmetro, da *Sartorius Stedim Biotech*®, foram secas em micro-ondas por 5 minutos em potência máxima. Após isto, as membranas foram pesadas (P_0) e submetidas à aplicação de vácuo para filtrar o cultivo. Seguido à filtração, novamente a membrana foi seca em micro-ondas, sob as mesmas condições anteriores, e então foi verificado o peso final (P_f).

Figura 10: Método para determinação de biomassa seca



Fonte: Autora (2022)

4.6 Análise da produção de lipídeos.

A análise qualitativa da produção de lipídeos neutros foi realizada pelo método de fluorescência. O procedimento foi realizado com vermelho de Nilo (9-dietilamino-5H-benzo(α) fenolxazin-5-ona), que é um marcador com forte fluorescência em ambientes não polares, motivo pelo qual vem sendo utilizado nas análises *in situ* de produção de lipídeos.

Para realização da análise, foi retirado 1 mL do cultivo, o qual foi centrifugado a 8000 rpm por 2 minutos, sendo o cultivo suspenso em BG-11 para leitura da densidade optica (D.O). Na análise utilizou-se uma D.O. com absorbância de aproximadamente 0,7. O preparo da solução contendo um volume de 2 mL de cultivo, seguindo uma metodologia adaptada de Perin *et al.* (2017). A solução preparada foi mantida a 60°C por aproximadamente 3 horas. A fluorescência foi medida usando um espectro fluorímetro sob a excitação de 488 nm e emissão de 500 a 650 nm, a fim de verificar a presença de lipídeos durante o cultivo. A partir daí, o período de cultivo necessário para produção de lipídeos pôde ser estimado.

4.7 Determinação dos lipídeos totais.

4.7.1 Extração de lipídeos pelo método *National Renewable Energy Laboratory*

Para realizar a análise quantitativa de lipídeos, utilizou-se o método *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Para extração dos lipídeos totais, foram utilizados 5 – 10 mg de células em peso seco após 72h de cultivos em triplicata. Foram adicionados à amostra 200 μ L (2:1) clorofórmio/metanol (*Synth e Vetec Química Fina*, respectivamente), e 300 μ L de solução 0,6 M ácido clorídrico/metanol. Os tubos fechados foram colocados em bloco de aquecimento e mantidos por 1h a temperatura de 85°C. Foram retirados do bloco para resfriamento e, após 15 minutos foi adicionado 1 mL de hexano e submetidos a agitação em vórtex. Após agitação, os tubos foram mantidos abertos em capela à temperatura ambiente para evaporação dos solventes.

4.7.2 Cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector de ionização de chama (CG-FID)

Os ácidos graxos foram determinados por cromatografia em fase gasosa (CG) acoplado ao detector de ionização de chama (FID) em um cromatógrafo Modelo Agilent Technologies 7890A utilizando: coluna HP-Innowax (19091N-1331 – 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), hélio como gás de arraste; detector FID à temperatura de 300°C; gás He (30 mL min^{-1}), H₂ fluxo 40 mL min^{-1} , fluxo de ar 400 mL min^{-1} , rampa de aquecimento para análise: temperatura inicial de 100°C, mantida por 1 min; rampa de 25°C/min até atingir 200°C, mantida por 1 min; rampa de 5°C/min até atingir 250°C, mantida por 7 min. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram quantificados a partir de curva de calibração com *FAME Standard Mixture of 25 Fatty Acid Methyl Esters* conhecidos, comparando as áreas dos picos obtidos aos padrões conhecidos.

4.8 Análise de nitrogênio amoniacal (NH₃-H).

Para análise de nitrogênio amoniacal foi adotado o método colorimétrico 4500- NH₃ F - Método Indofenol – *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater-APHA*. Para isso, foram utilizadas as seguintes soluções: a) solução alcóolica de fenol 1,26 mol L⁻¹, b) solução de nitroprussiato de sódio 0,017 mol.L⁻¹, c) solução de citrato alcalino: 0,25 mol L⁻¹ d) solução oxidante, contendo 10 mL de citrato alcalino e 2,5 mL de hipoclorito de sódio (2,5%).

4.8.1 Curva de calibração

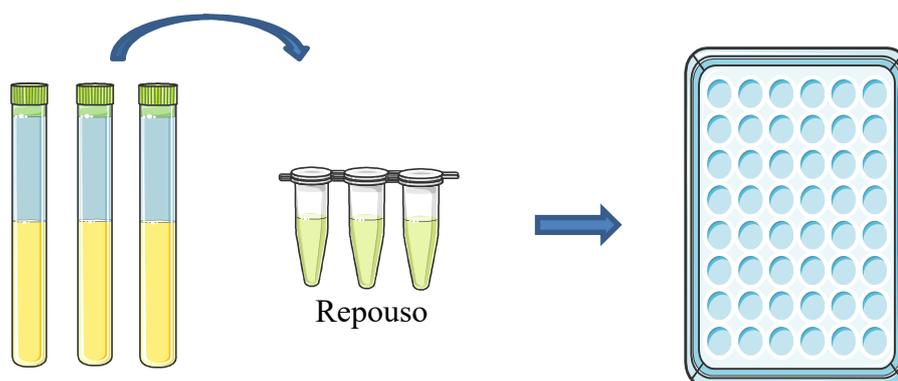
A curva de calibração foi obtida pela análise de regressão linear, traçando-se um gráfico entre a concentração da solução padrão (cloreto de amônia) e a absorbância. A solução de cloreto de amônia foi preparada diluindo-se 10 mg do padrão em 100 mL de água usando um balão volumétrico. Em seguida, foi armazenada em frasco do tipo Schott de 100 mL. Soluções diluídas foram preparadas a partir da solução de 100 mg L⁻¹. As concentrações preparadas para construção da curva de calibração foram: 50; 40; 30; 20; 10; 5; 2,5; 1; 0 mg L⁻¹.

4.8.2 Análises dos cultivos

Para analisar a concentração de nitrogênio inicial e final dos cultivos foi usado 500 μL do sobrenadante após centrifugação. Adicionaram-se 20 μL da solução (a), 20 μL da solução (b) e 50 μL da solução (d), agitando em seguida. Após a adição da solução oxidante, manteve-se as amostras em repouso por 1h, sob baixa luminosidade. Posteriormente, amostras de 200

μL (em triplicata) foram transferidas para uma placa de 96 poços, a qual foi inserida no leitor de microplacas *multimode-reader* da marca Biotek, em comprimento de onda de 640 nm, conforme ilustrado na Figura 11.

Figura 11: Método colorimétrico para análise de nitrogênio amoniacal



Fonte: Autora (2022)

4.9 Determinação de fósforo

Para a determinação do fósforo, foi utilizado o método colorimétrico do *kit Phosphat-test Merck* (Figura 12).

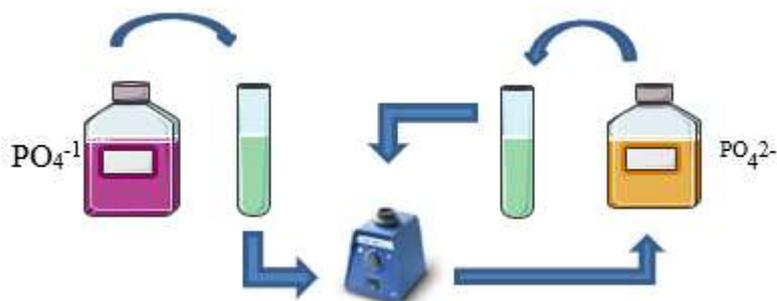
4.9.1 Curva de calibração

A curva de calibração foi obtida pela análise de regressão linear, traçando-se um gráfico entre a concentração da solução padrão (fosfato de potássio) e a absorbância. A solução de fosfato de potássio foi preparada diluindo-se a partir de 5 mg do padrão em 100 mL de água usando um balão volumétrico. Em seguida, foi armazenada em frasco do tipo *Schott* de 100 mL. Soluções diluídas foram preparadas a partir da solução de 100 mg L⁻¹. As concentrações preparadas para construção da curva de calibração foram: 10; 7,5; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,25; 0 mg L⁻¹.

4.9.2 Quantificação do cultivo

Foram utilizados 5 mL de amostra dos cultivos, na qual foram adicionadas 5 gotas do reagente PO₄⁻¹ (fosfato), agitação em vórtex e 1 espátula do reagente PO₄⁻², agitando novamente até a completa dissolução. A amostra foi mantida em repouso por 5 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

Figura 12: Procedimento de utilização do kit Phospat-test.



Fonte: Autora (2022).

4.10 Análise de DQO.

Os testes de determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram realizados conforme orientações do fabricante Merck, com o kit Spectroquant® NOVA 60A, utilizando-se uma curva padrão, construída a partir da solução estoque de biftalato de potássio, nas concentrações de: 150; 100; 75; 50; 25; 10; 0. Para cada concentração, foram transferidos 3 mL para um tubo de ensaio, onde acrescentou-se 0,3 mL da solução A e 2,85 mL da solução B, conforme sugestão para faixa analítica de 10-150 mg L⁻¹. Para as amostras, foi seguido o mesmo procedimento da construção da curva, sendo as análises realizadas em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Correção do pH e diminuição da turbidez da vinhaça

O estabelecimento de condições favoráveis no meio de cultivo é determinante para propiciar o aumento da taxa de crescimento das microalgas. Estudos anteriores mostraram que valores de pH entre 6 e 9 beneficiou o crescimento de diferentes espécies de microalgas. Trata-se de uma faixa de acidez para a qual não há variação significativa na taxa de crescimento (PEREZ, 2008). O ajuste do meio BG-11 e da vinhaça foi realizado de forma a mantê-los com o pH entre 7,0 e 7,5.

Segundo Lóio (2013), a cal é empregada com sucesso como agente coagulante no tratamento de águas para abastecimento e efluentes, inclusive na vinhaça. Dada a sua melhor disponibilidade em relação ao hidróxido de sódio (NaOH), optou-se então por utilizar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para clareamento e remoção dos sólidos em suspensão e uma solução de NaOH para correção do pH. Os resultados são apresentados na Figura 13.

Figura 13: Variação na coloração com adição de $(\text{CaOH})_2$ em vinhaça bruta antes e depois da correção do pH.



Fonte: Autora (2022).

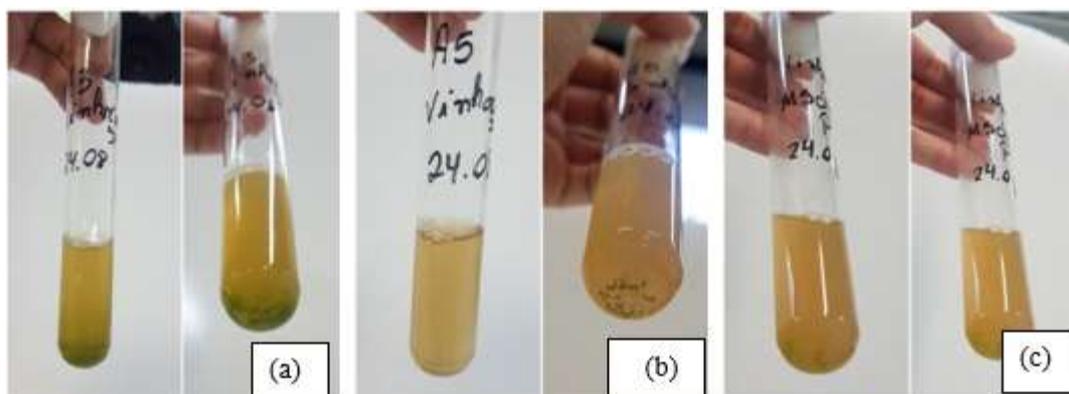
A partir das medições, pôde-se concluir que o pH da vinhaça bruta de $\approx 3,4$ foi alterado para $\approx 7,68$ após a adição de 3 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e ajuste com NaOH. A vinhaça apresenta-se geralmente ácida e com coloração parda. A adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a torna castanho-escuro, conforme observado na Figura 13. Esse escurecimento pode estar associado à ação de

melanoidinas, mais solúveis em pH alcalino (CHANDRA *et al.*, 2008 *apud* LÓIO, 2013). Apesar da coloração castanho escuro, é perceptível que a vinhaça se tornou mais translúcida, o que facilita a passagem de luz em comparação a uma solução turva ou opaca.

5.2 Seleção de cepas

Os resultados dos experimentos preliminares foram observados a partir da formação de aglomerados verdes no fundo dos tubos, o que significa o crescimento das microalgas. Estes resultados foram utilizados para seleção das cepas que eram capazes de crescer na presença da vinhaça. Posteriormente, estas cepas foram selecionadas e seu desempenho de crescimento foi acompanhado por meio da leitura da densidade óptica e quantificação da biomassa. Na Figura 14 são mostradas as cepas que apresentaram crescimento aparente através da coloração esverdeada no ensaio I (10% v/v), sendo elas A3, A5 e MSC4P, respectivamente.

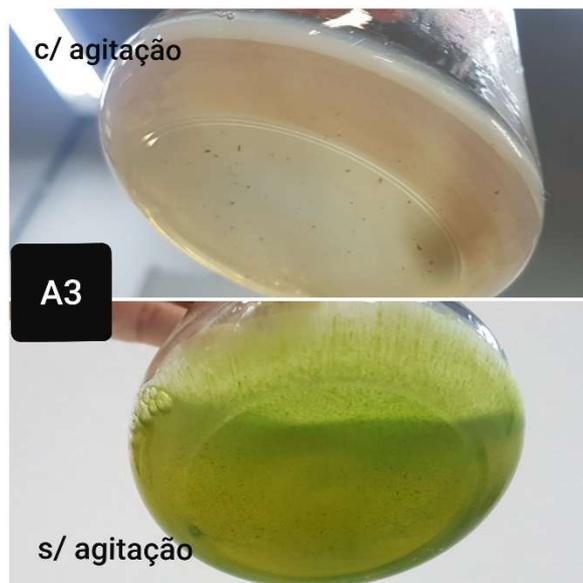
Figura 14: Imagem para verificação do crescimento das cepas em meio 10% respectivamente: (a) A3; (b) A5; (c) MSC4P.



Fonte: Autora (2022)

O experimento II, descrito no tópico 4.3, mostrou que mantendo as condições de concentração do meio, temperatura ambiente e pH para sistemas sem agitação, o crescimento aparente das microalgas ocorreu em maior quantidade, ou seja, para as espécies analisadas a agitação não é um fator favorável. A Figura 15 ilustra o crescimento da microalga A3 após o período de 5 dias.

Figura 15: Cultivo da cepa A3 com e sem agitação.



Fonte: Autora (2022).

Após dobrar a concentração de vinhaça no meio, atingindo 20% (v/v), a cepa A3 apresentou considerável crescimento aparente. A partir disto, esta foi selecionada para as etapas posteriores que incluíam o acompanhamento do crescimento através da leitura da densidade óptica e quantificação da biomassa seca. A Figura 16 ilustra a cepa A3 após 7 dias de inóculo.

Figura 16: Cepa A3 cultivada em concentração 20% (v/v) de vinhaça

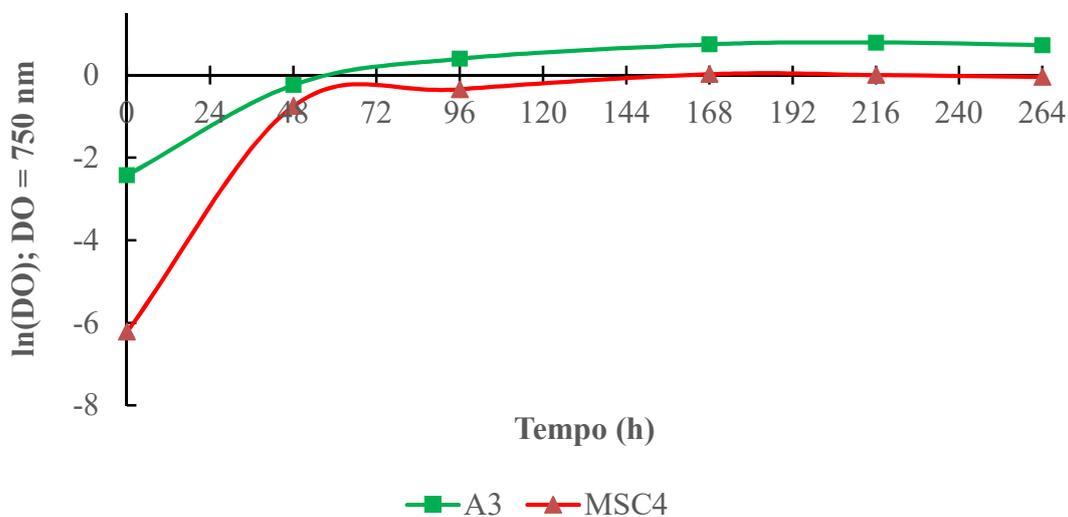


Fonte: Autora (2022)

5.3 Experimento de crescimento das microalgas

Os experimentos de crescimento foram feitos para a cepa A3 e o consórcio MSC4P. Foi adotado sistema de cultivo sem agitação, com luz constante, durante 15 dias, com análises de densidade óptica em intervalos de 48 h. As medidas de DO foram feitas a 750 nm, cujos resultados são apresentados na Figura 17.

Figura 17: Curva de crescimento (DO) das cepas selecionadas a 750 nm



Fonte: Autora (2021).

Como se pode observar, o crescimento para ambas as cepas de microalgas foi acentuado até as primeiras 48 h. É importante destacar que embora a amplitude de $\ln(\text{DO})$ seja maior para a cepa A3, a taxa de crescimento para MSC4 é muito mais expressiva, o que pode ser notado pela inclinação do gráfico neste período inicial.

Em conformidade com esta observação, os resultados apontaram que as velocidades máximas de duplicação das cepas foram de $0,0293 \text{ h}^{-1}$ para a A3, e de $0,0612 \text{ h}^{-1}$ para MSC4. Consequentemente, o tempo de duplicação calculado foi de, aproximadamente 23,6 h para a cepa A3, e de 11,3 h para MSC4.

Entre algumas das hipóteses que podem ser levantadas para explicar este comportamento das cepas, a principal é o estresse ao qual estas são submetidas. Uma vez que tempo de duplicação de MSC4 é maior que para A3, nota-se um rápido crescimento da concentração de microalgas e, com isso, há uma relação entre quantidade de micro-organismos e nutrientes insuficiente para manutenção do crescimento da cultura após o fim da fase exponencial. Isto poderia explicar o porquê, apesar de ter uma taxa de crescimento maior, há uma ligeira redução de $\ln(\text{DO})$ para esta cepa em 96h.

Mediante a análise, foi escolhida a cepa A3 para dar andamento ao trabalho proposto, ao apresentar crescimento em meio 10% e 20% e ser entre as espécies testadas a única que apresentou a olho nu aglomerados em um tempo inferior a 5 dias, por estar isolada que promove

melhor controle da cultura, visto que culturas em consórcio apresentam problemas em que a cada período uma das cepas podem estar se beneficiando no meio.

5.4 Identificação da cepa A3

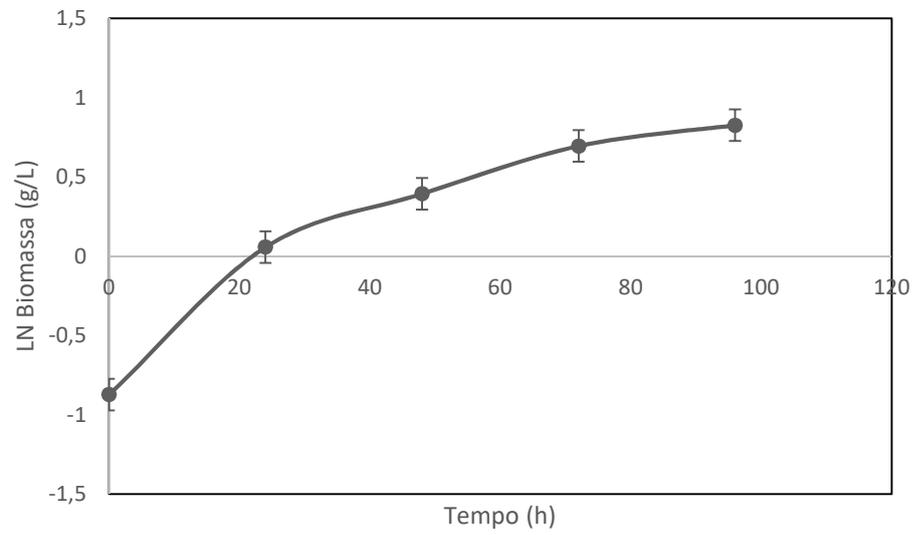
A identificação de microalgas são cruciais para um cultivo eficaz, pois nos auxilia a entender o metabolismo, quais os diversos ambientes que já foram estudados com o gênero identificado e possíveis bioprodutos que já foram relatados. Ou seja, identificar o microrganismo de estudo nos dá um norte para desenvolver a pesquisa.

Extraíu-se o DNA genômico da cepa A3 para posterior amplificação do gene DNAr-ITS e sequenciamento. A análise do sequenciamento e o comparativo da sequência obtida em relação às sequências do NCBI permitiu que a cepa fosse identificada, resultando em uma similaridade de 99,4% ao gênero *Coelastrella* (GenBank accession number ON921055). Além disso, o parâmetro *E-value* foi igual a zero, indicando que o alinhamento entre a sequência obtida e a sequência do gênero *Coelastrella* sp. foi significativo.

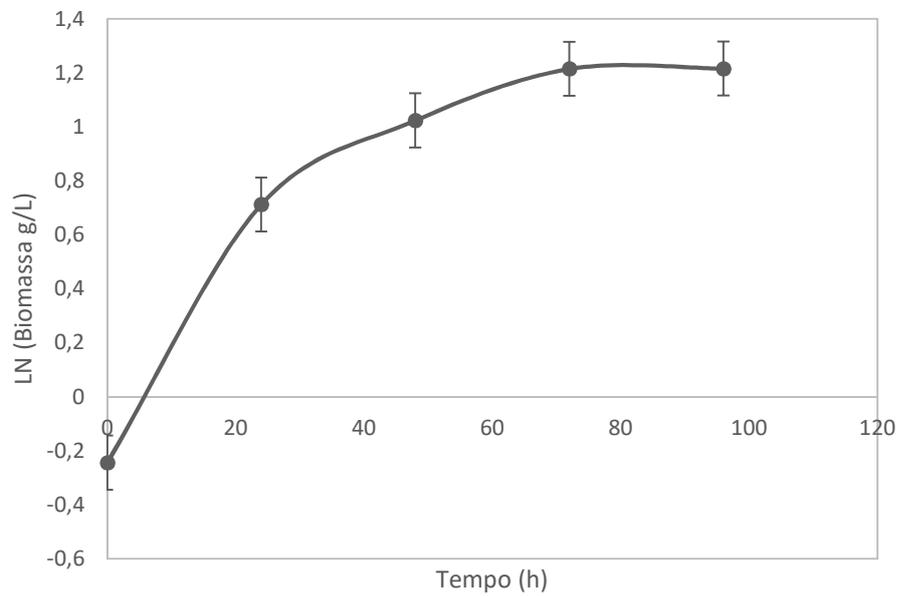
O gênero *Coelastrella* é um dos sete gêneros que compõe a família Coelastroideae, e é conhecido a aproximadamente 100 anos. As microalgas desse gênero possuem morfologia cocóide, elíptica e citríforme. Além disso, são unicelulares e podem formar pequenos agregados celulares. Desde 2007 há estudo relatando o potencial biotecnológico deste gênero. Abe et al. (2007) estudou o potencial antioxidante dos carotenoides da cepa *Coelastrella striolata*. Já um estudo desenvolvido por Hu et al (2013), com uma cepa termotolerante deste gênero, mostrou a produção de pigmentos em condições extremas. Goecke *et al.* (2020) relatou a produção de lipídeos e pigmentos de uma cepa isolada que até então ainda não havia sido relatada na Noruega. Como esse gênero vem demonstrando ser uma microalga com robustez, Luo et al. (2016) utilizou uma cepa *Coelastrella* sp para uso em biorremediação, removendo nutrientes de águas residuais provenientes da criação de suínos e também a produção de lipídeos.

5.5 Crescimento quantificação biomassa

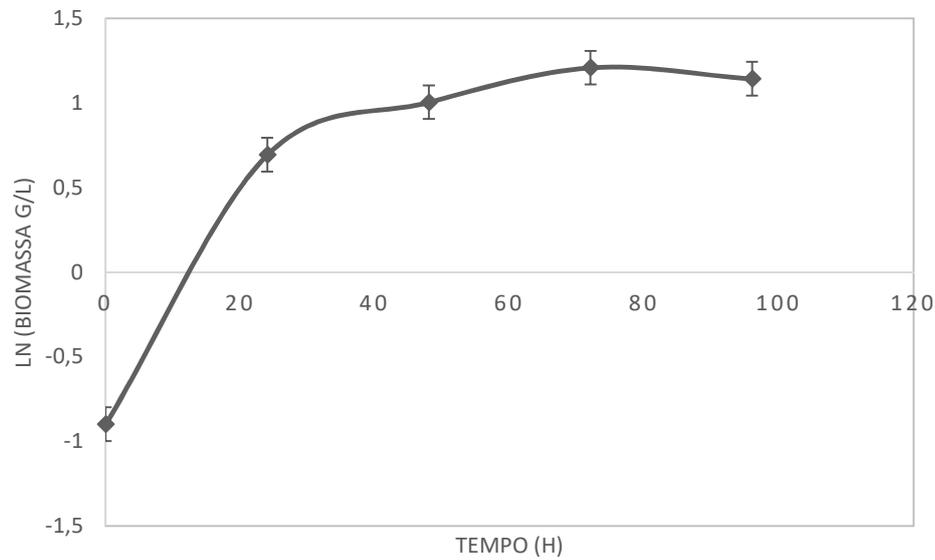
Para construção das curvas de crescimento utilizou-se a média dos pontos encontrados em triplicata, das medidas realizadas a cada 24 h. Os valores encontrados de biomassa a partir da gravimetria realizada em ensaios preliminares para adaptação da cepa estão representados nas Figuras 18, 19 e 20. A figura 21 apresenta dados de crescimento em 20 e 30% com maior número de pontos para melhor análise e precisão da taxa de crescimento.

Figura 18: Curva de crescimento em meio 10% vinhaça/BG-11.

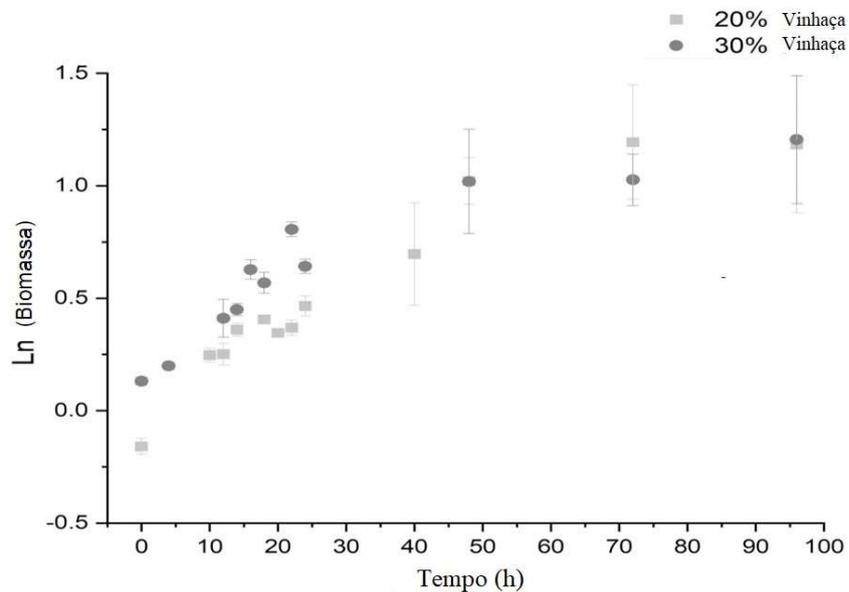
Fonte: Autora (2022).

Figura 19: Curva de crescimento em meio 20% vinhaça/BG-11.

Fonte: Autora (2022).

Figura 20: Curva de crescimento em meio 30% vinhaça/BG-11.

Fonte: Autora (2022).

Figura 21: Perfil de crescimento celular em meio com 20% e 30% (v/v Vinhaça/BG11)

Para determinação da velocidade máxima de crescimento, foi feita uma análise a partir dos dados experimentais durante a fase exponencial, onde observa-se que para ambas as concentrações de vinhaça ocorre em aproximadamente 24 h. O valor obtido foi de $0,043\text{h}^{-1}$ e o tempo de duplicação celular então de 16,05 h ($R^2 = 0,98$) para o cultivo em 20%, $0,0338\text{h}^{-1}$ e 20,50 h ($R^2 = 0,97$) em meio 30%. Com esses resultados pode-se observar que sob a

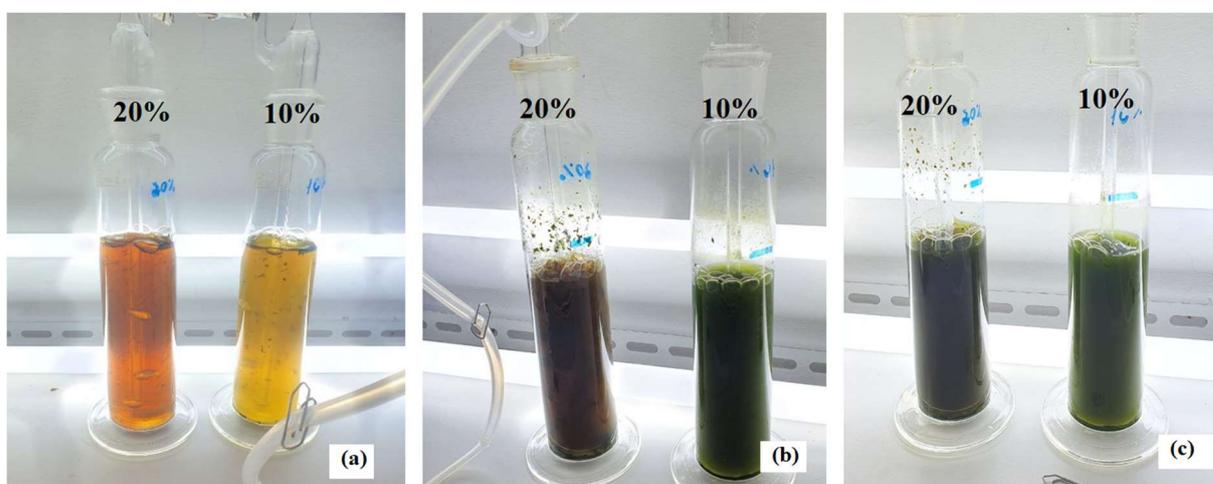
concentração de 30%, a deformação foi mais significativamente estressada, pois seus dados cinéticos foram diretamente afetados.

Ramirez (2013) avaliou o crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio suplementado com teores de 0 a 50% de vinhaça e observou que o ponto máximo da fase exponencial se atinge entre 180h e 240h. A partir do 8º dia, o cultivo levou à produção de 0,42 g/L de biomassa para concentrações 12,5 – 37,5% e uma quantidade inferior a 0,5 g/L de microalgas em 10 dias.

Em estudo realizado por Candido (2022), foi observado que diferentes microalgas conseguem crescer em cultivos na presença de vinhaça tratada apresentando, porém, desempenhos diversos se comparado a meios de cultivos sintéticos sem a presença de efluentes. Outros pesquisadores avaliaram o cultivo das microalgas em diferentes concentrações de vinhaça com o objetivo de investigar as melhores faixas de efluente que estas conseguem adaptar-se, avaliando a velocidade de crescimento, o tempo de duplicação e a produção de lipídeos (RAMIREZ 2013). Como pode ser observado na Figura 22, em relação aos testes preliminares realizados em Erlenmeyer (figura 15) para cepa *Coelastrella* sp., pode-se notar um aumento aparente na formação de aglomerados para os experimentos desenvolvidos em frascos Drechsler, o que provavelmente está relacionado a sua geometria que propicia melhor distribuição de luz, assim como a adição de ar ao sistema.

Observou-se a formação de sistema heterogêneo, particularmente no cultivo a 20% de vinhaça. Isto é, sob maior concentração de vinhaça os particulados sólidos presentes dificultaram a homogeneização, o que acarretou problemas para análises de densidade óptica em consequência da falta de homogeneidade das alíquotas retiradas para análise.

Figura 22: Perfil de crescimento celular em meio com 20% e 30% (v/v Vinhaça/BG11)



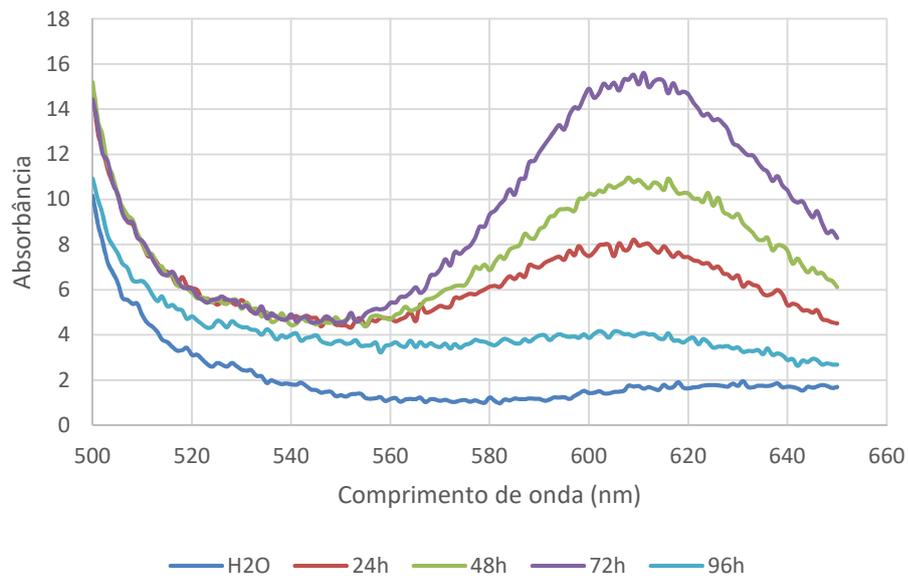
Fonte: Autora (2022)

a) Inicial; (b) cultivo após 3 dias; (c) cultivo após 5 dias

5.6 Análise da produção de lipídeos

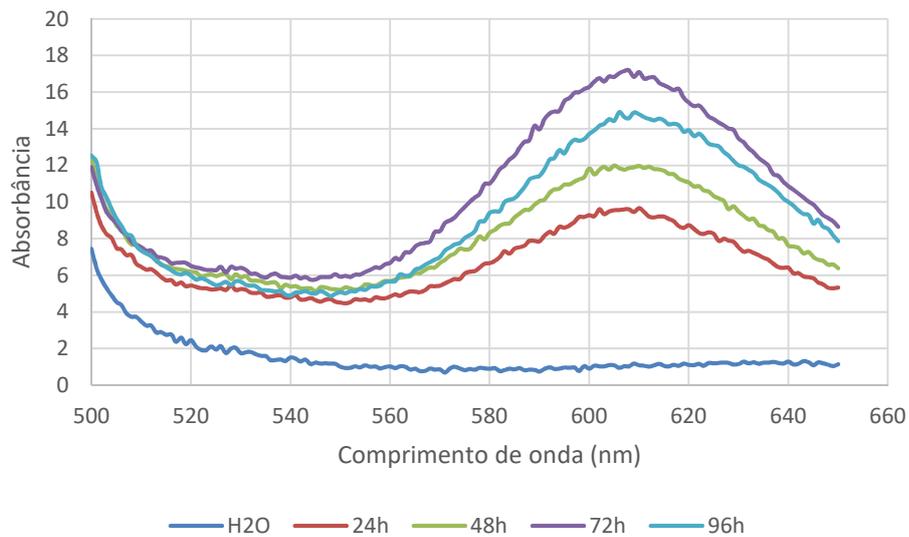
A indicação da presença de lipídeos, bem como a quantidade produzida, foi avaliada nas mesmas culturas utilizadas para quantificação da biomassa, também em triplicata, nos períodos de 24, 48, 72 e 96h. Os resultados são apresentados nas Figuras 23 e 24.

Figura 23: Curva utilizada para a análise de lipídeos em meio 20% (v/v).



Fonte: Autora (2022)

Figura 24: Curva utilizada para a análise de lipídeos em meio 30% (v/v).



Fonte: Autora (2022)

Ao observar as curvas, nota-se que cepa *Coelastrella* sp. em ambos os meios contendo 20% e 30% de vinhaça apresentou teor de lipídeos com absorvância acima de 4,0 que, de acordo com a metodologia aplicada, é o valor mínimo necessário para indicar a presença de moléculas lipídicas a partir de 24h, apontando a velocidade da produção de lipídeos por esta cepa.

A produção máxima ocorreu em 72h, sendo este então considerado o melhor momento para extração destas macromoléculas. Uma queda na absorvância é observada na curva referente a 96h, o que sugere que em meios contendo 20% e 30% o comportamento da microalga se apresenta de forma que esta passa a consumir os lipídeos a partir do 4º dia.

5.7 Determinação dos lipídeos totais

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos nas extrações da microalga *Coelastrella* sp. para os ensaios em duplicata com 20% e 30% de vinhaça/BG11, a partir do método gravimétrico NREL.

Tabela - 3: Percentual de lipídeos totais na microalga *Coelastrella* sp.

<i>Coelastrella</i> sp.	20% Vinhaça/BG11	30% Vinhaça/BG11
% de Lipídeos	≈ 20,13%	≈ 51,6%

Fonte: Autora (2022).

Estudos anteriores desenvolvidos com a *Coelastrella* sp., por (LEE et al., 2021) indicam que, de fato, uma proporção maior de BG-11 tende a inibir o acúmulo de lipídeos, dada a alta concentração de nitrato que este meio apresenta. Esta microalga, quando submetida a uma condição de estresse em limitação de amônia, embora tenda a armazenar energia na forma de lipídeos e carboidratos, teve seu crescimento inibido.

Por outro lado, quando foi submetida a uma concentração maior de vinhaça (30%), notou-se um aumento considerável no teor de lipídeos armazenados. Estes resultados vão de encontro a pesquisas anteriores em que se observou que esta espécie apresenta considerável potencial para geração de lipídeos em culturas contendo águas residuárias, como efluentes da suinocultura (LEE et al., 2021).

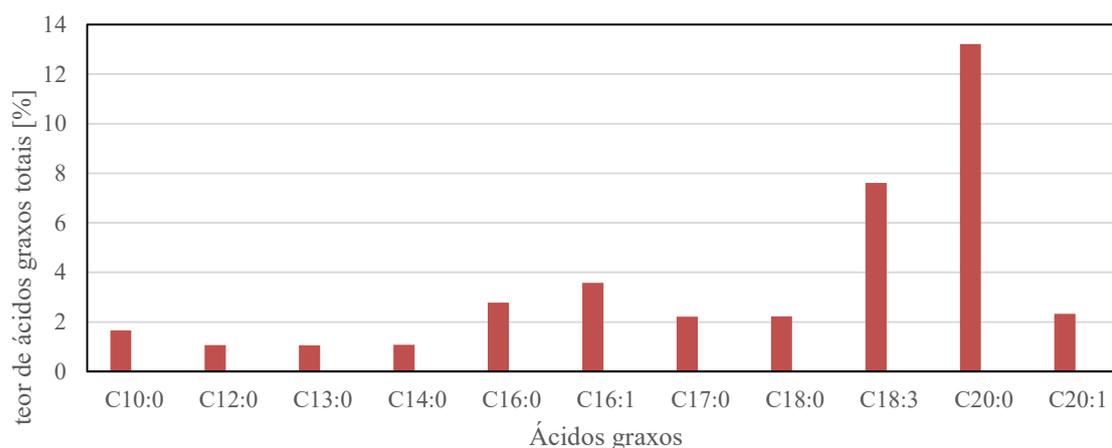
Cabe ressaltar que no estudo citado, assim como no presente, a *Coelastrella* sp. apresentou, não apenas potencial para utilização em processos de biorremediação de águas residuárias, mas também potencial para geração de outros bioprodutos derivados deste processo, como bioetanol e biometano que vai de encontro com os resultados obtidos por RAWAT et al. (2011).

Oliveira (2013), em estudos contendo efluente de bovinocultura, obteve 15% de lipídeos totais no 10º dia de cultivo em relação a biomassa microalgal de *Scenedesmus* sp. cultivada em meio contendo 10% de efluente. Viêgas (2010), avaliando diferentes formas de extração avaliou que clorofórmio:metanol 2:1 (v/v) apresenta melhor resultado e atingindo valores de aproximadamente 20% de lipídeos totais para *Chlorella pyrenoidosa*. Em comparação aos diferentes gêneros, a *Coelastrella* sp. apresenta excelente capacidade de adaptação ao meio trabalhado e produção lipídica.

5.7.1 Perfil de ácidos graxos

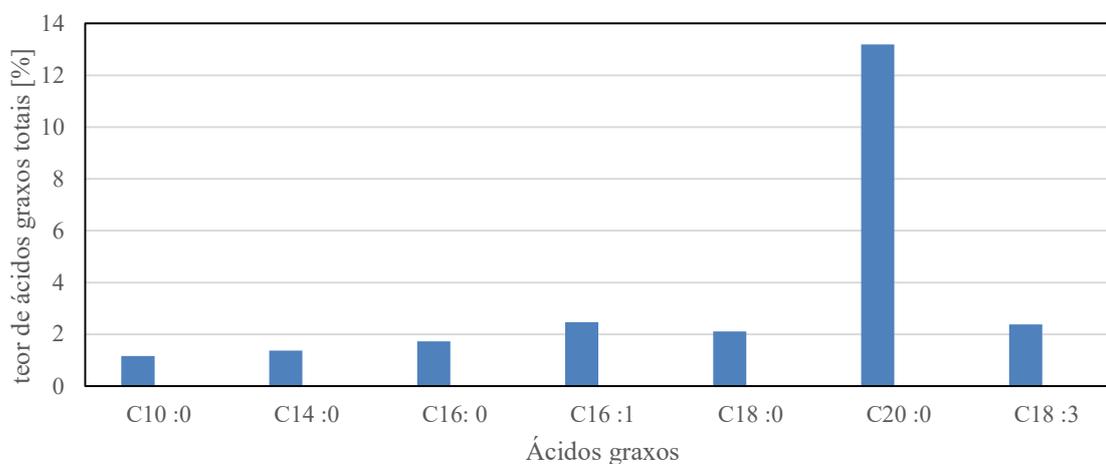
A composição de ácidos graxos de lipídeos extraídos da espécie *Coelastrella* sp. em meio com 20% e 30% vinhaça/BG11 é apresentada nas Figuras 25 e 26.

Figura 25: Perfil de lipídeos em meio contendo 20% vinhaça/BG-11.



Fonte: Autora (2022)

Figura 26: Perfil de lipídeos em meio contendo 30% vinhaça/BG-11.



Fonte: Autora (2022)

O perfil de ácidos graxos presentes na microalga apresentou cadeias que variaram de 10 a 22 carbonos, majoritariamente saturadas. Os perfis lipídicos apontaram predominância na formação de ácido araquídico (C20:0) seguido do α -linolênico (C18:3). Pelos perfis, nota-se que grande parte dos ácidos graxos que compõem os lipídeos são ácidos graxos saturados, matéria-prima com potencial para geração de biodiesel dadas as seguintes propriedades que conferem ao combustível: alta estabilidade oxidativa, baixo retardo de ignição e menor potencial de emissão de NO_x, poluente intensamente agressivo para a camada de ozônio (LEE *et al.*, 2021).

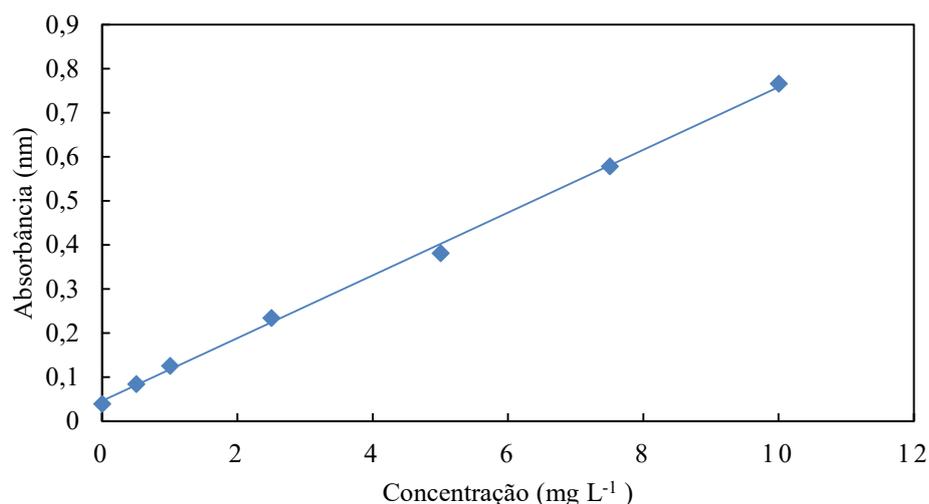
A qualidade do óleo influencia diretamente as propriedades do biodiesel. Pode ser determinada especialmente pela composição de ácidos graxos acumulada na biomassa microalgal através da proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados. Tais composições são diretamente influenciadas por fatores como condições climáticas e meio de cultivo (CHISTI, 2007 *apud* OLIVEIRA, 2013).

Viêgas (2010) encontrou maior quantidade de ácido linolênico (C 18:3) variando entre 29,04 a 42,47% no perfil de ácidos graxos de *Chlorella pyrenoidosa* sob diferentes condições de cultivo. Esse percentual elevado pode propiciar instabilidade em relação ao oxigênio. Observando os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a *Coelastrella* sp. apresenta maior estabilidade para a produção de biodiesel em relação ao perfil de ácidos graxos.

4.9 Nitrogênio Amoniacal

Para determinar a concentração de nitrogênio amoniacal presente no meio de cultura no início e no fim do cultivo, foi utilizada uma curva de calibração de cloreto de amônia como padrão (Figura 27).

Figura 27: Curva de calibração do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) – 640 nm.



Fonte: Autora (2022)

Esta curva de calibração é representada pela equação da reta: $y = 0,0712x + 0,0467$ com $R^2 = 0,9984$. Por meio desta, foi determinada a concentração inicial de nitrogênio amoniacal de $11,65 \text{ mg L}^{-1}$ e $14,93 \text{ mg L}^{-1}$ para os cultivos de 20 e 30% contendo vinhaça, respectivamente. Após quatro dias de cultivo, não foi detectada presença de N-NH₃ em qualquer ensaio, o que indica que durante a fase de crescimento, as microalgas consumiram 100% da amônia disponível.

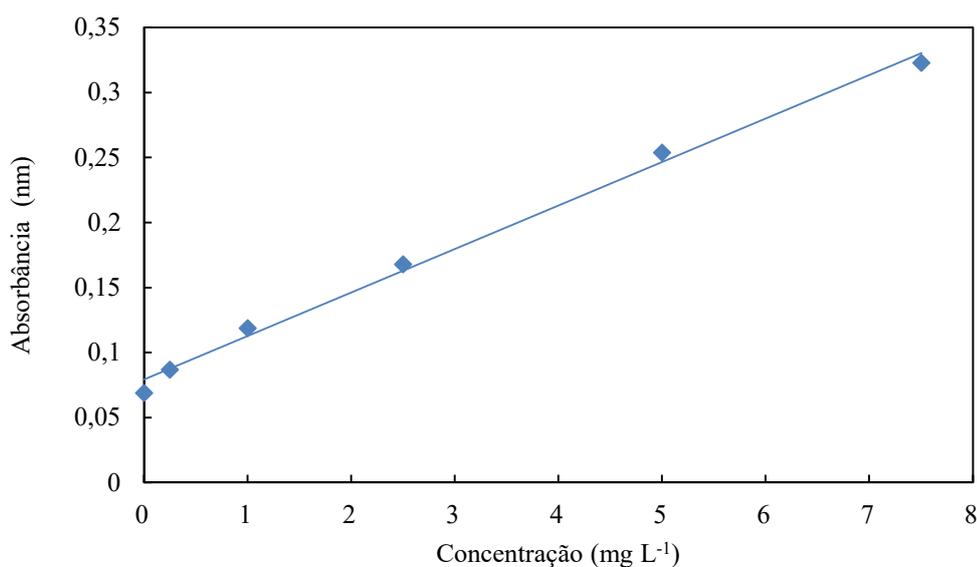
Segundo o estudo de RAMIREZ (2013), no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em meio contendo 31,9% de vinhaça, apresentou 96% de remoção de nitrogênio amoniacal após o fim da fase exponencial, de 10 dias. Mattos & Bastos (2016) avaliaram o desempenho de *Desmodesmus* sp. no tratamento de vinhaça e observaram, com o cultivo da microalga, redução de em torno de 50% do teor de nitrogênio do meio. Os resultados deste trabalho, em consonância com estes estudos anteriores, corroboram a hipótese de que o cultivo de microalgas em meio composto por vinhaça apresenta excelente potencial como processo de tratamento deste efluente.

Cabe destacar que, entre outras vantagens, a eliminação de nitrogênio amoniacal da vinhaça evita que os processos de percolação e lixiviação contaminem águas subterrâneas e superficiais. Entre algumas das pesquisas mais recentes da utilização de microalgas para tratamento de efluentes, os resultados obtidos por Lee *et al.* (2021) também apontam este potencial, à medida que o cultivo de *Coelastrella* sp. em águas residuárias de suinocultura removeu até 99% da amônia.

4.10 Fósforo

Para determinar a concentração de fósforo total no meio de cultura no início e no fim do cultivo, foi utilizada uma curva de calibração de fosfato como padrão (Figura 28).

Figura 28: Curva de calibração fósforo



Fonte: Autora (2022)

Desta maneira, e a partir da equação da reta $y = 0,0335x + 0,0794$ com $R^2 = 0,9945$ a redução no conteúdo de fósforo foi de 63,12% em meio com 20% de vinhaça e 95,8% em meio com 30%. Desta forma, concomitantemente ao aumento na disponibilidade de fósforo no meio, também ocorreu aumento no consumo do nutriente, o que indica que a elevação no teor de vinhaça no cultivo é um fator positivo para o crescimento da cultura de microalgas.

Outros trabalhos também indicam o potencial do cultivo de microalgas para remoção de fósforo de águas residuárias. O estudo conduzido por Oliveira (2013), por exemplo, mostrou

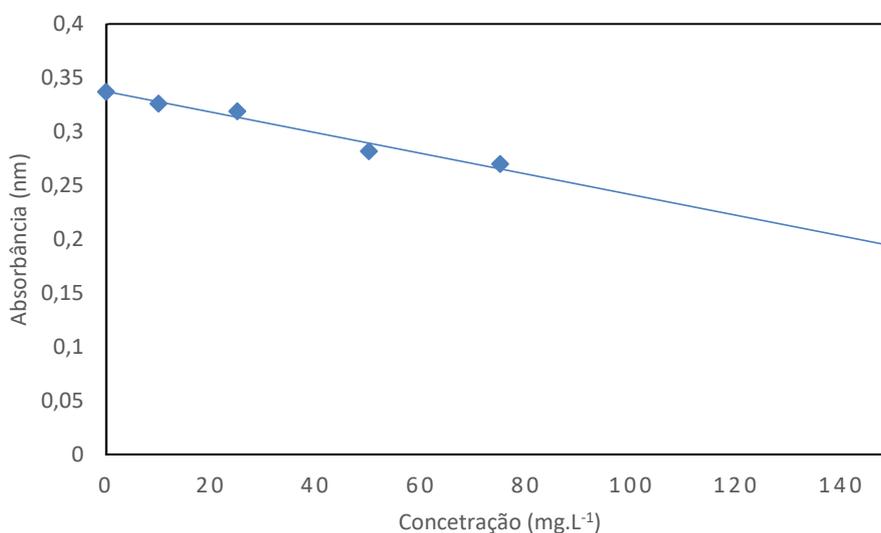
que por meio do cultivo de *Scenedesmus* sp. ocorre a remoção de 52% da quantidade de fósforo em meio contendo concentração de 30% de efluente bovino biodigerido.

Outro estudo correlato, desenvolvido por Ramirez (2013), apontou que ensaios de cultivo em meio contendo 31,9% de vinhaça, utilizando também *Scenedesmus* sp. apresentaram eficiência de 98,4% na remoção de fósforo. Além destes, destaque-se aqui também o trabalho desenvolvido por Santos (2013), em que se observou remoção de 98,5% a 99,8% do teor de fósforo de um meio de cultivo de *Chlorella* sp. em um período de 9 e 15 dias de crescimento, respectivamente.

5.8 DQO

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) é um parâmetro que mede a quantidade de matéria orgânica, entretanto não determina a concentração de substâncias específicas e individuais, mas sim o consumo de oxigênio através de reações químicas de oxidação. Foram analisadas as amostras do meio de cultivo contendo 20% e 30% de vinhaça. Para tanto, foi construída uma curva de calibração a partir de biftalato de potássio (Figura 29).

Figura 29: Curva de calibração para determinação de DQO



Fonte: Autora (2022)

Esta curva de calibração é representada pela equação da reta $y = 0,001x + 0,3373$, sendo coeficiente de correlação $R^2 = 0,9922$.

Os resultados obtidos foram de teor de DQO inicial para os cultivos com 20% e 30% de vinhaça de 73,30 mg.L⁻¹ e 84,30 mg.L⁻¹, respectivamente. Os teores finais obtidos para os ensaios com 20% e 30% de vinhaça foram de 34,30 e 42,30 mg.L⁻¹ respectivamente. Desta maneira, a redução da DQO foi de 53,20% em meio 20% e 49,82% em meio com 30% de vinhaça.

Estes resultados vão de encontro ao que pesquisas anteriores já apontaram com respeito ao potencial do cultivo de microalgas para redução da demanda química de oxigênio. Mattos & Bastos (2016) verificaram a redução de 35% na DQO utilizando *Desmodesmus* sp., Santos (2013) também obteve resultado positivo em relação a este parâmetro por meio do cultivo de *Chlorella* sp. em vinhaça, onde se alcançou redução de 11,5%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, levando em consideração os objetivos propostos e analisando os resultados obtidos, observamos que os mesmos foram alcançados. Na primeira fase, durante o processo de seleção e adaptação das microalgas foi possível selecionar entre 6 diferentes cepas, uma com potencial para crescimento em meio de cultivo alternativo contendo efluente da produção de etanol. A cepa tolerante foi identificada e faz parte do gênero *Coelastrella*, mostrando-se um microrganismo com potencial de crescimento em efluente industrial por apresentar características de crescimento de acordo com dados da literatura.

Os meios apresentando diferentes concentrações de vinhaça (10%, 20% e 30%) e sem agitação apresentaram o ponto máximo da fase exponencial no mesmo tempo que ocorre em aproximadamente 24h, que é um tempo inferior aos dados apontados pelos estudos contendo diferentes gêneros de microalgas (*Scenedesmus* sp. – *Chlorella* sp.) em meio contendo vinhaça.

Do ponto de vista biotecnológico houve um potencial do uso da biomassa produzida para produção de biodiesel, já que o acúmulo de lipídeos foi bastante satisfatório. Isto porque essa cepa apresenta em sua biomassa um percentual de 20,13% e 51,6% em meios contendo 20% e 30% de vinhaça, respectivamente. O perfil de ácidos graxos não apresentou variações significativas entre as duas condições e para ambas obteve-se uma elevada produção de ácidos saturados, e isso, conseqüentemente, aumenta a estabilidade oxidativa do óleo.

Como alternativa em procedimentos de tratamento de efluentes, a partir dos parâmetros físico-químicos analisados, o uso de nutrientes pela microalga promoveu reduções majoritárias de nitrogênio amoniacal (redução de 100%), até 95,8% de fósforo e 49,82% na DQO, melhorando a gestão dos efluentes sob o ponto de vista ambiental.

Assim, os resultados obtidos a partir dos experimentos com adição de vinhaça no meio de cultivo, conclui-se que a microalga do gênero *Coelastrella* sp., além de boa adaptação, apresenta benefícios ao meio ambiente diante do fato de proporcionar um destino à vinhaça, e da biorremediação, já que a vinhaça pode ser uma fonte de nutrientes de baixo custo, além de viabilizar economicamente a produção de biodiesel a partir de microalgas.

Recomendações para trabalhos futuros

Através da avaliação dos resultados do cultivo da microalga em vinhaça da produção de etanol para sistemas em escala laboratoriais, como trabalhos futuros pode-se apontar:

- Aumentar o volume de cultivos para verificar se o comportamento se mantém e avaliar a produção de biomassa em escala piloto;
- Aumentar a porcentagem de vinhaça no meio entre 40% e 50%;
- Realizar análises dos parâmetros físico-químicos que envolvem o meio de cultivo por tempo de crescimento;
- Fazer o estudo da produção de carboidratos presentes na biomassa e avaliar a sua performance como biomassa para produção de bioetanol de terceira geração. De tal maneira que ao comparar os resultados seja possível avaliar o potencial da biomassa para produção de outros bioprodutos, diferentes do biodiesel.

REFERÊNCIAS

- ALBARELLI, J. Q. **Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica.** 2013. 216 f. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Engenharia Química)–Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- ANDRADE, L. M. D. **Produção de microalgas e caracterização de sua composição protéica e lipídica via espectrometria de massas.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. D. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 603-608, 2016.
- BASTOS, V. D. Biorrefinarias, biocombustíveis e química renovável: revolução tecnológica e financiamento. Disponível em: <[https://web. bndes. gov. br/bib/jspui/handle/1408/914](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/914), 2012.> Acesso em: 11 de novembro 2021.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.
- BIAŁAS, W.; SZYMANOWSKA, D.; GRAJEK, W. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. **Bioresource technology**, v. 101, n. 9, p. 3126-3131, 2010.
- BORDONAL, Ricardo de Oliveira et al. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 2, p. 1-23, 2018.
- CANDIDO, C. et al. Fisiologia de microalgas em vinhaça tratada e a temática dos resíduos na educação ambiental. 2019.
- CANDIDO, Camila; CARDOSO, Lucas Guimarães; LOMBARDI, Ana Teresa. Bioprospecting and selection of tolerant strains and productive analyses of microalgae grown in vinasse. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-11, 2022.
- CAPSSA. Evaporadores de concentração de vinhaça. 2019. Disponível em: <<https://www.capssa.com.br/evaporador-de-concentracao-de-vinhaca/>>. Acesso em 3 de dezembro de 2019.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, Norma Técnica P 4, 2015. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/>> Acesso em: 2 mar de 2020.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Boletim da Safra de Cana-de-Açúcar, Brasília, v. 6, n. 4, abr. 2020. Quarto levantamento, Safra 2019/20. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>. Acesso em: 25 nov. 2020

CORREIA, J. E. Histórico da aplicação de vinhaça em canaviais: bioensaios de toxicidade terrestre e aquática. 2019.

DA SILVA, Mellissa AS; GRIEBELER, Nori P.; BORGES, Lino C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108-114, 2007.

DA SILVA CARDOSO, A.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542, 2011.

DASKALOPOULOS, E.; BADR, O.; PROBERT, S. D. Economic and environmental evaluations of waste treatment and disposal technologies for municipal solid waste. **Applied Energy**, v. 58, n. 4, p. 209-255, 1997.

DE AQUINO LIMA, F. et al. Revisão sobre a toxicidade e impactos ambientais relacionados à vinhaça, efluente da indústria sucroalcooleira. **Cadernos UniFOA**, v. 11, n. 32, p. 27-34, 2016.

DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465-9473, 2016.

DE SOUZA, M. P. et al. As Microalgas Como Uma Alternativa Para a Produção De Biocombustíveis Parte I: Bioetanol. **Tecno-Lógica**, v. 16, n. 2, p. 108-116, 2012.

DÖLL, M. M. R.; FORESTI, E. Efeito do bicarbonato de sódio no tratamento de vinhaça em AnSBBR operado a 55 e 35°C. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 15, p. 275-282, 2010.

DOS SANTOS, A. P. F. AVALIAÇÃO DE NÍVEIS DE PIGMENTOS E CRESCIMENTO DA MICROALGA *Haematococcus pluvialis* (Flotow 1844) CULTIVADA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA. 2016.

ENAMALA, M. K. et al. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, n. May 2017, p. 49–68, 2018.

ENGEL, G. D.; DA SILVA PORTO, P. S.; FREITAS, R. R. Estudo das tecnologias para produção de biodiesel a partir de microalgas do gênero *nannochloropsis*. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 12, p. e5712482-e5712482, 2018. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 3409, p. 1–28, 2014.

EUCLIDES, Thais Moraes de. Seleção e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

FERNÁNDEZ-LINARES, L. C. et al. **Producción de biocombustibles** a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, v. 8, n. 3, p. 101-115, 2012.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L. D; COSTA, J. A. V.. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

GOECKE, F. et al. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 36, n. 10, p. 1-17, 2020.

GRACIOSO, Louise Hase et al. Light excess stimulates Poly-beta-hydroxybutyrate yield in a mangrove-isolated strain of *Synechocystis* sp. *Bioresource Technology*, v. 320, p. 124379, 2021.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. ***Biotechnology Advances***, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

HARUN, Razif et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, 2010.

HOARAU, J., CARO, Y., GRODIN, I., PETIT, T. Sugarcane vinasse processing: toward a status shift from waste to valuable resource. A review. *Journal of Water Processing Engineering*. 24 (2018) 11-25.

LEE, S. A. et al. Two-step microalgal (*Coelastrella* sp.) treatment of raw piggery wastewater resulting in higher lipid and triacylglycerol levels for possible production of higher-quality biodiesel. ***Bioresource Technology***, v. 332, n. February, 2021.

LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O etanol combustível no Brasil. *Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas*, Ministério das Relações Exteriores, 2008.

LEITE, Wanderli Rogério Moreira et al. Digestão anaeróbia em temperaturas mesofílica e termofílica de lodo de ete usando reatores de estágio único e dois estágios. 2015.

LÓIO, D. A. Tratamento físico-químico de vinhaça por coagulação, floculação e sedimentação e seu aproveitamento no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* visando a produção de biocombustível. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MIRANDA, J. R. P. D. C. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia.

MORAES, Marcelo Lopes de; BACCHI, Mirian Rumenos Piedade. Etanol: do início às fases atuais de produção. ***Revista de Política Agrícola***, v. 23, n. 4, p. 5-22, 2015.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas**. 2013. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais – Faculdade de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013).

ORTENZIO, Y T. et al. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. ***Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)***, v. 5, n. 1, 2015.

PARSONS, T. **A manual of chemical & biological methods for seawater analysis**. Elsevier, 2013.

POVEDA, M. M. R. **Análise econômica e ambiental do processamento da vinhaça com aproveitamento energético**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel: Raw materials, production technologies and fuel properties. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.

ROCHA, M. H. et al. Resíduos da produção de biocombustíveis: vinhaça e glicerina, vol. 2. **Rio de Janeiro: Interciência**, p. 691-809, 2012.

SANTOS, P. V. D. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SENNA, P. P.; DE MATTOS ANSANELLI, S. L. ETANOL DE PRIMEIRA OU DE SEGUNDA GERAÇÃO? UMA COMPARAÇÃO ENTRE OS CICLOS PRODUTIVOS. **Blucher Engineering Proceedings**, v. 3, n. 4, p. 1497-1510, 2016.

SILVA, M. Aparecida

Moraes. Produção de alimentos e agrocombustíveis no contexto da nova divisão mundial do trabalho. **PEGADA-A Revista da Geografia do Trabalho**, v. 9, n. 1, 2008.

SILVA, G. A. D. **Avaliação das tecnologias de disposição de vinhaça de cana-de-açúcar quanto ao aspecto de desenvolvimento ambiental e econômico**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411–3424, 2011.

RICHMOND, Amos (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. John Wiley & Sons, 2008.

SZYMANSKI, M. S. E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono—estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 901-911, 2010.

TELES, VALÉRYA CARNEIRO. Caracterização da biomassa das microalgas *Micractinium* sp. e *Chlamydomonas* biconvexa cultivadas em vinhaça e CO₂ para aplicações biotecnológicas. **Embrapa Agroenergia-Tese/dissertação (ALICE)**, 2016.

TOMASELLI, Luisa. The microalgal cell. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, v. 1, p. 3-19, 2004.

TRINDADE, Emmely Oliveira et al. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PROCESSOS DE COAGULAÇÃO-FLOCULAÇÃO E ADSORÇÃO NO TRATAMENTO DO EFLUENTE DA PRODUÇÃO DO ETANOL. LOPES, Cláudio Hartkopf; GABRIEL, Afra Vital Matos Dias;

BORGES, Maria Teresa Mendes Ribeiro. Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol. 2017.

VIEIRA, Yago Araujo et al. DEGRADAÇÃO DA VINHAÇA POR TRATAMENTO COMBINADO COM *Pleurotus sajor-caju* E OXIDAÇÃO ELETROQUÍMICA. **Semana de Pesquisa e Extensão da Universidade Tiradentes-SEMPESq-SEMEX**, n. 19, 2017.

EM, P. D. E. P.; VEGETAL, B.; MARTINS, G. B. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. 2014.

ENAMALA, M. K. et al. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, n. May 2017, p. 49–68, 2018.

ENGEL. GALINA, Daiana; DA SILVA PORTO, Paulo Sérgio; FREITAS, Rodrigo Randow. Estudo das tecnologias para produção de biodiesel a partir de microalgas do gênero *nannochloropsis*. *Research, Society and Development*, v. 7, n. 12, p. e5712482-e5712482, 2018. **Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents**, v. 3409, p. 1–28, 2014.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

LEE, S. A. et al. Two-step microalgal (*Coelastrella* sp.) treatment of raw piggyery wastewater resulting in higher lipid and triacylglycerol levels for possible production of higher-quality biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 332, n. February, 2021.

OLIVEIRA, A. C. Universidade federal do paran a amanda cristina de oliveira produ o de biomassa de microalgas. 2013.

PESSOA, Valdemberg M. do N.; SOUZA, Francisco das Chagas Silva; REBOUÇAS, Igor Guedes. O biodiesel como elemento de desenvolvimento sustent vel no semi- rido potiguar. **Holos**, v. 3, p. 113-125, 2007.

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

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411–3424, 2011.

VI GAS, C. V. EXTRA O E CARACTERIZA O DOS LIP DEOS DA MICROALGA *Chlorella pyrenoidosa* VISANDO   PRODU O DE  STERES GRAXOS. **Disserta o de Mestrado**, p. 73, 2010.