

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

MAYARA DOS SANTOS GUARIEIRO

Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel

VITÓRIA – ES

2019

MAYARA DOS SANTOS GUARIEIRO

Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA - ES

2019

[PÁGINA DA FICHA CATALOGRÁFICA]

Utilização da vinhaça no cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* (Kützing) Silva visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel

MAYARA DOS SANTOS GUARIEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 22 de FEVEREIRO de 2019.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes - UFES
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. Stéfano Zorzal de Almeida- UFES
Examinador Interno

Dr^a. Paola Alfonsa Vieira Lo Monaco - IFES
Examinador Externo

A minha avó, Albertina Nogueira (in memoriam),
exemplo de garra e sabedoria, por todo apoio,
generosidade, carinho e incentivo,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e toda a equipe de professores e demais profissionais, pelo aprendizado e oportunidade de desenvolver essa pesquisa;

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria de Oliveira Fernandes, por permitir que eu fizesse parte de sua equipe, pelo carinho, confiança e por todos os ensinamentos, que seguirão comigo ao longo da minha vida pessoal e profissional;

A todos do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), por tudo que me ensinaram, compartilharam, pelas risadas e amizade;

Ao grande amigo “Feederico” Pacheco, por sua competência, solicitude, por tudo que tão generosamente me ensinou, compartilhou, pela companhia “até o trânsito passar”, por me aturar, por prontamente atender aos meus pedidos de socorro, por suas críticas e sugestões, pelo profissional e pessoa incrível que é;

Ao meu companheiro de jornada, amigo de turma e agora de vida, Ronald Tarazona, por ter sido incrível, generoso, companheiro, por me ensinar tanto, por me acalmar, por todas as vezes que acordou cedo só para me ajudar, por não me deixar desanimar diante das dificuldades, por acreditar em mim, por todas as coisas que dividimos e por todos os sorrisos que partilhamos;

Ao meu pai, que mesmo de longe se fez presente, vivenciando e me apoiando em cada uma das etapas desta jornada, por acreditar em mim e nunca permitir que eu desanimasse, por ser o melhor pai do mundo, por tudo;

A minha irmã caçula Carolina, que mesmo de longe sempre me apoiou, escutou, auxiliou e contribuiu para que tudo desse certo. Você é meu “docinho de pavê” e sem você eu não teria conseguido.

A minha família, sem o amor de vocês nada disso teria sentido;

Ao meu grande amigo Fernando Sabino, por acreditar tanto em mim, por comemorar cada uma das minhas vitórias, pelo apoio incondicional, por ter ficado ao meu lado em todos os momentos;

Aos amigos da época da graduação, Daniel e Raquel, pela torcida, incentivo e amizade. Obrigada por se fazerem presentes mesmo de longe;

Ao Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA), representado pela Dr^a. Maria Tereza e toda sua equipe, e ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LABSAN), representado pelo Prof^o Dr. Paulo Wagner e pelo técnico Rodrigo Oss, pela generosidade com a qual nos auxiliaram e por tudo que contribuíram para a realização deste trabalho;

A Deus, pela vida, por cada uma das pessoas que colocou em meu caminho e por me dar forças para persistir na busca por meus sonhos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela concessão da bolsa de mestrado;

Finalmente, agradeço a todos que de alguma forma torceram e contribuíram para a realização desta conquista.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação dos filamentos da microalga *K. flaccidum* Fonte: Autor (2018).....21
- Figura 2: Vinhaça. A.Momento da coleta da vinhaça na usina LASA – Linhares Agroindustrial S/A (Linhares – ES). B. Vinhaça em erlenmeyers de 5 L. Fonte: Autor (2018).23
- Figura 3: Curvas de crescimento de *K. flaccidum* cultivada no meio BBM (controle) e nos meios com diferentes concentrações de vinhaça (10%-50%) obtidas a partir do teste piloto.24
- Figura 4: Disposição dos erlenmeyer em uma das estufas incubadoras utilizadas para o experimento. Fonte: o autor (2018).....25
- Figura 5: A. Biomassa extraída do tratamento com 10% de vinhaça ao final do cultivo. B. Biomassa liofilizada. Fonte: o autor (2018).28
- Figura 6: Curvas de crescimento de *K. flaccidum* cultivada no meio BBM (controle) e nos meios com diferentes concentrações de vinhaça (10%-, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais).34
- Figura 7: Variação temporal da biomassa seca no controle e nos meios com tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: o autor (2018).....36
- Figura 8: Concentrações de clorofila *a* do cultivo de *K. flaccidum* no controle e nos tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).39
- Figura 9: Concentrações de carotenoides do cultivo de *K. flaccidum* no meio controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).39
- Figura 10: Teores de Carboidratos, Proteínas e Lipídeos na biomassa de *K. flaccidum* cultivada em meio controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor ou textura seguidas pela mesma letra não difereem significativamente

pelo teste de Tukey
($p < 0,05$).....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio BBM.	22
Tabela 2: Caracterização física, química e físico-química da vinhaça bruta utilizada no experimento.	31
Tabela 3: Parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento – K, tempo de duplicação - G e rendimento máximo – R _{máx}) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) do meio sintético BBM (controle) e dos meios com diferentes concentrações de vinhaça (10%, 20% e 30%).	35
Tabela 4: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) na biomassa de <i>K. flaccidum</i> cultivada em meio controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30% de efluente, respectivamente).	48
Tabela 5: Percentual de remoção de nutrientes (N – nitrogênio, P – fósforo, NH_4^+ - nitrogênio amoniacal, PO_4^{-3} – ortofosfato e K – potássio) no final dos cultivos nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30% de vinhaça).....	50

RESUMO

As microalgas são capazes de fornecer grande quantidade de biomassa rica em biocompostos de interesse comercial e sua utilização no mercado de biocombustíveis é uma alternativa promissora. Entretanto, é importante considerar o alto custo dos cultivos, sendo necessária a busca por alternativas que visem reduzir os custos do processo, visando à produção em grande escala. A utilização de resíduos industriais é uma estratégia para a redução de custos de produção através do aproveitamento de nutrientes disponíveis nestes efluentes. O presente trabalho teve como objetivo aliar a reutilização de resíduos como fonte de nutrientes para o cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum* como uma alternativa para a cadeia produtiva de biocombustíveis. Para tanto, foi utilizada a vinhaça, água residual resultante do processo de destilação da cana-de-açúcar. Os experimentos foram realizados na sala de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas continentais – LATEAC da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Foram realizadas análises com o intuito de acompanhar o crescimento e o desenvolvimento da cepa cultivada em três diferentes concentrações de vinhaça (10%, 20% e 30%) diluídas em água destilada. Em termos de densidade celular os melhores resultados foram observados nos tratamentos com 20% ($1,3 \times 10^6$ cél.mL⁻¹) e a biomassa obteve resultados significativos em 20 e 30% de diluição. Em relação à caracterização bioquímica da biomassa produzida, o teor de proteínas e lipídeos diminuiu à medida que houve aumento da concentração de vinhaça nos meios. Desse modo, a utilização da biomassa produzida pelo cultivo no efluente avaliado deve ser direcionada a outro aproveitamento que não a produção de biodiesel. Em contrapartida, a biomassa mostrou-se rica em carboidratos, o que sugere a sua aplicação como matéria-prima potencial para a produção de bioetanol. O cultivo de *K. flaccidum* em vinhaça demonstrou ainda eficiência na remoção de nutrientes, tais como nitrogênio amoniacal e ortofosfato, com percentuais de remoção próximos a 97,27% e 40,17% respectivamente, proporcionando redução da carga poluente da vinhaça, minimizando assim possíveis impactos ambientais. Diante dos resultados obtidos, o cultivo da microalga *K. flaccidum* em vinhaça pode ser uma alternativa sustentável e de baixo custo para produção de biomassa aplicada ao mercado de biocombustíveis atrelada ao tratamento de águas residuais.

Palavras-chave: Setor sucroalcooleiro • Vinhaça • microalgas • biocombustíveis • biorremediação

ABSTRACT

The microalgae are able to supply large amounts of biomass rich in biocides of commercial interest and their use in the biofuel market is a promising alternative. However, it's important to have the cost of the crops, requiring a search for alternatives that aim to make the costs of the process, aiming at large-scale production. The use of industrial waste is a strategy to reduce production costs through a use of available resources. The objective of this work was to reuse food as a source of nutrients for microalgae and *flacidium* as an alternative for the production of biofuels. For this purpose, the vineyard, the residual water of the sugarcane distillation process, was used. The experiments were carried out in the room of cultivation of the Laboratory of Taxonomy and Ecology of Continental Algae - Federal University of Espírito Santo (UFES). The analysis was carried out to follow the growth and development of the culture grown in three different types of wine (10%, 20% and 30%) diluted in distilled water. In terms of cell density, the results were observed in the treatments with 20% ($1.3 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$) and a biomass presented results at 20 and 30% dilution. In relation to the biochemical characterization of the biomass produced, the protein and lipid content decreased as the vinasse concentration increased in the media. Thus, the use of the biomass produced by the crop is not intended to optimize another use that is not a biodiesel production. In contrast, a biomass was rich in carbohydrates, which suggests its application as a potential material for the production of bioethanol. The cultivation of *K. flaccidum* in vinasse still demonstrates nutrient efficiency, such as ammoniacal nitrogen and orthophosphate, with removal percentages of 97.27% and 40.17% respectively, thus reducing the pollutant load of the vinasse, thus minimizing environmental impacts. Considering the results obtained, the cultivation of *K. flaccidum* microalgae in vinasse can be an alternative to the sustainable and low cost development for the production of biomass to the market of biofuels linked to the treatment of waste water.

Keywords: Vinass • Microalgae • Biofuels • Bioremediation •

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3. HIPÓTESE.....	20
4. OBJETIVO GERAL.....	20
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
6.1 <i>Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético</i> ...	21
6.2 Coleta e análise do efluente - vinhaça.....	22
6.3 <i>Tratamento físico da vinhaça e Teste piloto</i>	23
6.4 <i>Delineamento experimental</i>	24
6.5 <i>Avaliação do crescimento</i>	26
6.6 <i>Determinação da biomassa seca</i>	27
6.7 <i>Determinação de carboidratos, proteínas e lipídeos totais</i>	27
6.8 <i>Quantificação de pigmentos fotossintetizantes</i>	28
6.9 <i>Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	29
6.9.1 <i>Esterificação das amostras</i>	29
6.9.2 <i>Análises cromatográficas</i>	29
6.9.3 <i>Validação do método</i>	30
6.10 <i>Eficiência do cultivo da microalga na remoção de nutrientes</i>	30
6.11 <i>Tratamento estatístico</i>	31
7. RESULTADOS.....	31
7.1 <i>Caracterização da Vinhaça</i>	31
7.2 <i>Crescimento e biomassa</i>	33
7.3 <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	39
7.4 <i>Teores de proteínas hidrossolúveis</i>	42
7.5 <i>Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)</i>	49
7.6 <i>Remoção de nutrientes</i>	51
8. CONCLUSÕES.....	53
9. REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é empregada como o principal insumo da indústria sucroalcooleira brasileira. A partir do seu processamento originam-se dois importantes produtos de grande valor econômico para o país, o açúcar e o álcool (MORAES; BACCHI, 2014).

O Brasil ocupa posição de destaque na produção de agroenergia, liderando mundialmente a cadeia produtiva da cana-de-açúcar e o expressivo crescimento dessa cultura deve-se às características edafoclimáticas do país, às grandes extensões de terra, aos investimentos do governo com a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) na década de 80 que reconheceu e deu notoriedade ao etanol como uma das principais fontes de energia renovável, vindo a ser uma alternativa à substituição dos combustíveis fósseis, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento sustentável do país (GOES *et al.*, 2008).

A diversidade de variedades da cana-de-açúcar, o melhoramento genético e o elevado estágio de desenvolvimento tecnológico permitem a expansão continua do setor de produção, acarretando no aumento da utilização e do processamento da biomassa da cana-de-açúcar (MATSUOKA *et al.*, 2009). Entretanto, paralelamente ao aumento da produção ocorre o aumento na geração de resíduos, sendo a vinhaça a água residual resultante do processo produtivo do etanol (SILVA *et al.*, 2007).

A vinhaça é um resíduo líquido resultante do processo de destilação do caldo de cana-de-açúcar, sendo gerado em média 10 a 18L por litro de álcool produzido (UNICA, 2011). Dentre todos os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira é o que apresenta maior impacto ambiental (BONINI, 2012), seja pelo grande volume gerado, bem como por seu potencial eutrofizador. Sua composição química pode variar de acordo com a natureza da matéria-prima e do nível de tecnologia da operação (JUNQUEIRA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2007). Possui elevada concentração de matéria orgânica, elevada demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e concentrações consideráveis de macro e micronutrientes, (FUESS; GARCIA, 2012).

Tendo em vista os elevados teores de matéria orgânica e sais inorgânicos, como sulfatos e fosfatos de potássio, além de cálcio, sódio e magnésio em sua

composição, a vinhaça vem sendo comumente utilizada na fertirrigação em detrimento ao lançamento direto deste efluente nos corpos d'água (CORTEZ, 1992). Sobretudo, as dosagens devem ser controladas e mensuradas de acordo com a legislação vigente e sua aplicação no solo deve ser feita de maneira criteriosa (DIAS *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007).

Oliveira (2011) destaca a fertirrigação como uma atividade sólida na indústria sucroalcooleira, porém faz um alerta ao crescimento descomunal no volume deste efluente, o que sugere a criação de alternativas, destacando a utilização da vinhaça produzida na usina como suplementação para o meio de cultura de microalgas, em razão da elevada carga de nutrientes que este resíduo apresenta.

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogêneo de organismos, sendo encontradas em todo o mundo, principalmente em ambientes aquáticos, mas também na superfície de todos os tipos de solos (BICUDO; MENEZES, 2011). A imensa biodiversidade e, conseqüente variabilidade na composição bioquímica destes microrganismos vem permitindo o uso de sua biomassa em diversas aplicações (DERNER *et al.*, 2006). A biomassa de microalgas é composta basicamente por proteínas, lipídeos e carboidratos, incluindo ainda outras substâncias de importância comercial, tais como pigmentos carotenoides e ácidos graxos poliinsaturados (LOURENÇO, 2006).

Microalgas têm sido cultivadas no mundo visando obter biomassa para as mais diversas aplicações de interesse econômico (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011; D'ALESSANDRO *et al.*, 2016; KLEIN *et al.*, 2017). Atualmente, as espécies de microalgas mais cultivadas no mundo são: *Chlorella* sp. e *Spirulina* sp., utilizadas principalmente para a suplementação alimentar; *Dunaliella salina*, fonte de caroteno e *Haematococcus pluvialis*, para produção e processamento de astaxantina (BENEMANN, 2009; AZEREDO, 2012). Outras aplicações relacionadas ao emprego das microalgas incluem a produção de biocombustíveis e o tratamento de águas residuais de inúmeros processos industriais. Todavia, embora já tenha sido demonstrada a viabilidade técnica de se produzir biocombustíveis, como o biodiesel, por meio de microalgas, tais processos ainda não apresentam custos de produção competitivos com derivados da indústria petroquímica (BRASIL *et al.*, 2016), sendo o elevado custo de produção de

biomassa um dos principais gargalos para o estabelecimento de tecnologias de cultivo em grande escala (BHATNAGAR *et al.*, 2011; CAPORGNO *et al.*, 2015).

Desse modo, o uso de efluentes agroindustriais, como vinhaça, no cultivo de microalgas representa uma alternativa sustentável e econômica para o tratamento do efluente (CANDIDO *et al.*, 2018) pois, além de permitir a redução do seu potencial poluidor, reduz os custos de produção de biomassa como matéria-prima para síntese de compostos de interesse comercial, bem como o biodiesel (MITRA *et al.*, 2012, ENGIN *et al.*, 2018), minimizando os gastos com nutrientes sintéticos e água na produção de biomassa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura da cana-de-açúcar está intrinsecamente ligada à história e ao desenvolvimento do Brasil, desempenhando desde a época da colonização grande avanço agrônomo e industrial para o país (GOES *et al.*, 2008). Por apresentar crescimento rápido e fácil adaptação ao solo brasileiro, a planta foi escolhida para fazer parte da agricultura nacional (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Dentre as agroindústrias, a da cana-de-açúcar é um dos principais segmentos desse ramo. O Brasil é atualmente um dos grandes produtores de etanol de cana-de-açúcar no mundo, com safra 2018/2019 de 29,09 bilhões de litros de etanol produzidos (UNICA, 2018). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atualmente o Brasil possui um total de 432 agroindústrias sucroalcooleiras distribuídas nas cinco regiões do país (MAPA, 2011). Dentre os estados da região sudeste, São Paulo lidera o cultivo da lavoura de cana-de-açúcar, devido a grande modernização e elevada produtividade do setor (NOVA CANA, 2016). No Estado do Espírito Santo, o cultivo de cana-de-açúcar destaca-se como um dos produtos da diversificada agricultura do Estado e corresponde a quase 5% do agronegócio estadual (INCAPER, 2015).

Contudo, apesar da riqueza gerada por esta indústria, a produção de combustíveis de primeira geração promove discussões por competir com a produção de alimentos, devido à utilização de terras agricultáveis (RODRIGUES, 2011); além disso, conforme ocorre aumento no processamento de cana para produção de etanol, cresce também a produção de vinhaça, um subproduto

gerado em grande escala e altamente poluidor (ALVARENGA; QUEIROZ, 2009; EMBRAPA, 2011; CHRISTOFOLETTI et al, 2013).

A vinhaça é produzida em muitos países como subproduto do etanol de diferentes matérias-primas: cana-de-açúcar na América do Sul (HAANON; TRENKLE, 1990), beterraba na Europa, e milho na América do Norte (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011). Segundo Silva e colaboradores (2007), este líquido residual também é conhecido como restilo ou vinhoto; configura-se como um resíduo de natureza ácida, turbido, fétido, que atinge altas temperaturas ao sair do destilador (SALOMON; LORA, 2005). É caracterizada por ser um efluente com alto poder poluente, cerca de cem vezes maior que do esgoto doméstico, possui elevada concentração de nutrientes, como nitrogênio, fósforo cálcio, magnésio e potássio, o que lhe confere um significativo potencial fertilizante (FREIRE; CORTEZ, 2000; MEDINA *et al.*, 2005; NICOCHELLI *et al.*, 2012), sendo esta uma forma de reuso do resíduo (CHAVEZ-RODRIGUES, *et al.*, 2013).

No passado, quantidades consideráveis de vinhaça eram descartadas em corpos d'água, causando sérios problemas de poluição. A partir da proibição do seu despejo (Decreto brasileiro 303/1967), a vinhaça passou a ser aplicada na irrigação dos solos das culturas de cana-de-açúcar, em terreno das próprias usinas, aproveitando assim os nutrientes para a fertilização (CORTEZ, 1992). Entretanto, diversos estudos apontam que, devido ao grande volume de produção da vinhaça e sua composição, a fertirrigação tem causado sérios problemas ambientais em virtude da percolação através do solo e contaminação do lençol freático (CAVALETT *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2014; CRUZ; ANDRADE, 2016). Dessa forma, a disposição da vinhaça como fertilizante, não deve ultrapassar, quando aplicada em grandes quantidades, a capacidade de retenção de água do solo e sua aplicação deve ser feita de maneira criteriosa para cada tipo de solo receptor (Silva *et al.*, 2007; RYAN *et al.*, 2009).

Diante da elevada produção no Brasil, a atividade sucroalcooleira tornou-se impactante ao meio ambiente, seja pelo alto consumo de recursos naturais ou pela geração de resíduos (CRUZ; ANDRADE, 2016). Dessa forma, novas alternativas de tratamento e utilização da vinhaça devem ser avaliadas com o intuito de contribuir para a redução dos efeitos deletérios ambientais. Nesse contexto, devido à presença elevada de nutrientes e como medida de solução prática, sustentável e econômica, diversos autores têm proposto a utilização da

vinhaça como meio alternativo de cultivo de microalgas (OLIVEIRA; CÁCERES, 1986; KADIOGLU; ALGUR, 1992; MITRA *et al.*, 2012; BUDIYONO *et al.*, 2014; COCA *et al.*, 2015; SANTANA *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2018).

O cultivo de microalgas tem sido foco de muitos estudos e isso não se deve somente a sua importância ambiental e biológica, mas também a possibilidade de aplicação comercial de sua biomassa em inúmeras áreas. Estes microrganismos se destacam pela sua grande diversidade de características morfológicas, fisiológicas e ecológicas (REVIERS, 2006). Além disso, a eficiência fotossintética, 20% maior em comparação com as plantas terrestres, e o rápido crescimento conferem as microalgas alta capacidade de produção de biomassa (WANG *et al.*, 2016). Ademais, sob certas condições, essa biomassa acumulada pode apresentar concentrações elevadas de compostos de interesse comercial, como proteínas, lipídeos, amido, glicerol e pigmentos naturais (GOMES, 2007).

O aproveitamento da biomassa microalgal tem apresentado diversas vantagens biotecnológicas, por possuir múltiplas aplicações em áreas altamente relevantes, tais como: alimentação humana e animal, farmacêutica, cosmética, medicinal, biofertilizantes de solos, mitigação de gases do efeito estufa pela assimilação do CO₂, tratamento de águas residuais, geração de biocombustíveis (como biodiesel, bioetanol e bio-butanol), entre outras (DERNER *et al.*, 2006; SCHMITZ *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2015), tornando assim a atividade industrial economicamente viável e menos impactante ao meio ambiente.

No que tange a produção de biocombustíveis, Mendes (2012) destaca a maior eficiência na produtividade lipídica das microalgas se comparadas às plantas oleaginosas, uma vez que, algumas espécies podem alcançar até 80% do seu peso seco em óleo. Além disso, esses microrganismos possuem grande taxa de assimilação de CO₂, não necessitam de terra arável para seu cultivo, o que minimiza os danos ambientais causados pela expansão agrícola comumente explorada no Brasil, feita a partir da extração de óleo de cultivares como a soja, canola e a palma (SANTANA *et al.*, 2016); ademais, requerem menos água, sendo possível ainda o seu cultivo em água não potável (MENEZES *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2015). Entretanto, a viabilidade para a produção de biodiesel a partir de microalgas é dependente da redução de seus custos (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Fernandez e colaboradores (2017) enfatizam a importância em considerar o alto custo dos reagentes utilizados em laboratório para preparação dos meios de cultura sintéticos nos quais as microalgas são cultivadas, sendo dessa forma necessária a busca por alternativas que visem reduzir os custos de produção. Estudos que buscam aliar a reutilização de resíduos e geração de energia limpa e de baixo custo tornaram-se indispensáveis, sendo o cultivo de microalgas uma forte alternativa para esta finalidade. Desse modo, a utilização de nutrientes provenientes de resíduos industriais configura-se como uma das alternativas encontradas tanto para diminuir o elevado custo de produção de biomassa microalgal, como também para diminuir o potencial risco poluidor de diversos resíduos (ZHANG *et al.*, 2018).

Em relação aos processos de tratamento de resíduos provenientes de atividades domésticas, agrícolas e industriais, as etapas de tratamento primário e secundário não removem a carga inorgânica do resíduo, e o resultado final é um efluente lançado em corpos d'água causando uma série de danos ao meio ambiente (MOUCHET, 1986; LIM *et al.*, 2010; ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012). O processo terciário, destinado a remover amônia, nitrato e fosfato é cerca de quatro vezes mais caro do que o tratamento primário (ABDEL-RAOUF *et al.*, 2012). Dessa forma, o tratamento terciário biológico parece ter um bom desempenho e menor custo se comparado aos processos químicos (WANG *et al.*, 2016). Portanto, o cultivo de microalgas demonstra ser uma alternativa eficaz de biorremediação, uma vez que fornece um tratamento terciário ao resíduo, juntamente com a produção de biomassa potencialmente valiosa.

Por esse motivo, a comunidade científica tem demonstrado grande interesse em pesquisas que ampliem o conhecimento a respeito do cultivo desses microrganismos utilizando águas residuais. Alguns trabalhos demonstraram que, assim como os resíduos da indústria da cana-de-açúcar, diversos efluentes orgânicos podem ser utilizados como fontes de nutrientes para a produção de microalgas, incluindo, resíduos urbanos (RUIZ-MARIN *et al.*, 2010), resíduos derivados da produção de suínos (GANESHKUMAR *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2016), do processamento industrial de leite (LABBÉ *et al.*, 2017), da fabricação de papel e celulose (POLISHCHUK *et al.*, 2015) e produção do óleo de palma (CHEAH *et al.*, 2018).

A redução de custos com matéria-prima para produção de biocombustíveis e demais bioprodutos derivados de microalgas utilizando efluentes industriais parece ser uma alternativa para o desenvolvimento e sustentabilidade do processo (ZHANG *et al.*, 2018). Porém, a produção de energia a partir da biomassa microalgal só será possível com a eficácia do sistema, sendo assim necessária a identificação de cepas produtoras de reservas lipídicas que possuam rápido crescimento e resiliência ambiental para adaptações ao cultivo, visando à redução dos custos de produção, justificando desta forma a importância deste estudo.

3. HIPÓTESE

A concentração elevada de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) na vinhaça aumentará a biomassa e o teor lipídico da microalga *Klebsormidium flaccidum*, sendo promissora como meio de cultivo alternativo e de baixo custo para produção de biodiesel, minimizando efeitos deletérios ambientais.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da vinhaça como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo da microalga *Klebsormidium flaccidum*, visando à produção de biomassa aplicada ao mercado de biodiesel atrelado ao uso de resíduos industriais.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição física, química e físico-química do efluente utilizado, antes e após o cultivo;
- Adequar o cultivo da cepa *K. flaccidum* em condições controladas de laboratório e avaliar o seu crescimento e desenvolvimento utilizando a vinhaça como meio alternativo de cultivo.
- Comparar os parâmetros biológicos da cepa em teste: análises de crescimento, produtividade de biomassa (proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais e lipídeos totais) nas diferentes concentrações de vinhaça.

- Analisar o perfil dos ácidos graxos de ésteres metílicos como potencial uso na produção de biodiesel.
- Avaliar a assimilação de nutrientes da vinhaça por *K. flaccidum*.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Seleção da microalga e manutenção em meio de cultura sintético

A microalga *Klebsormidium flaccidum* L011A (Fig. 1), selecionada para o presente estudo, foi obtida a partir do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). A seleção da espécie a ser estudada foi realizada com base em resultados anteriores quanto ao seu potencial para produção de ésteres metílicos de ácidos graxos (SANTOS *et al.*, 2016).



Figura 1: Filamentos de *K. flaccidum* (Kützing) Silva, cultivada em meio BBM. Aumento: 1000x. Fonte: Autor (2018).

Klebsormidium flaccidum pertence à Divisão Streptophyta, possui ampla plasticidade ecológica, ocorrendo tanto no meio aquático quanto em superfícies rochosas e solos úmidos. Compreende filamentos longos, cuja células são quadradas a retangulares, parede celular fina e homogênea; cloroplasto parietal, laminar, apresentando um pirenóide por plasto (BICUDO; MENEZES, 2006).

Para a realização deste trabalho, a cepa foi previamente mantida em sala de cultivo, em erlenmeyer com capacidade de 5 litros, contendo meio de cultura sintético Bold's Basal Medium – BBM (Tabela 1), previamente esterilizado em

autoclave a 121 °C por 30 minutos e com pH ajustado para $7,0 \pm 0,05$, iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, com irradiância de 2000 lux, temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro e aeração contínua utilizando compressor Gong yang bang HP- 400 com injeção de ar à vazão de 3,5 L.min.⁻¹.

Tabela 1: Composição das soluções estoque do meio BBM.

	Estoque	Solução estoque	mL/Litro
Solução 1	KH ₂ PO ₄	8.75 g/500 m	10ml
Solução 2	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.25 g/500 ml	10ml
Solução 3	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.75 g/500 ml	10ml
Solução 4	NaNO ₃	12.5 g/500 ml	10ml
Solução 5	K ₂ HPO ₄	3.75 g/500 ml	10ml
Solução 6	NaCl	1.25 g/500 ml	10ml
Solução 7	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	10 g/L	1ml
Solução 8	FeSO ₄ .7H ₂ O	4.98g/L	1ml
Solução 9	H ₂ SO ₄		1ml
	Elementos traços		
	H ₃ BO ₃	2.86 g	
Solução 10	MnCl ₂ .4H ₂ O	1.81 g	1ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.222 g	
	NaMoO ₄ .5H ₂ O	0.390 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.079 g	
Solução 11	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.0494 g	
	H ₃ BO ₃	5.75 g/500 ml	0.7ml

Fonte: STEIN (1973)

6.2 Coleta e análise do efluente – vinhaça

O efluente utilizado neste estudo foi a vinhaça bruta (Fig. 2). O efluente foi doado pela usina Lasa - Linhares Agroindustrial S/A, localizada na cidade de Linhares/ES. Tal seleção foi definida pela localização mais próxima ao local (UFES) onde foram conduzidos os experimentos.

A coleta da vinhaça foi realizada utilizando galões de plásticos previamente lavados com água e detergente neutro, enxaguados e deixados por 24h em HCl 10%, posteriormente enxaguados com água deionizada e secos em temperatura ambiente. Foram coletados 20 L de vinhaça, que foi acondicionada em galões com capacidade de 5L, armazenadas em freezer à temperatura de -6 °C e estocados congelados até a realização dos experimentos.



Figura 2: Vinhaça. A. Momento da coleta do efluente de cana de açúcar - vinhaça – na usina LASA – Linhares Agroindustrial S/A (Linhares – ES). B. Vinhaça acondicionada em Erlenmeyer. Fonte: Autor (2018).

Para a realização da caracterização física, química e físico-química do efluente bruto e do efluente após cultivo da alga, amostras da vinhaça bruta e dos tratamentos (10%, 20% e 30%), no início e ao final do experimento, foram analisadas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LABSAN) para determinação das variáveis: nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, fósforo total, ortofosfato, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) conforme recomendações do Standard Methods, APHA (2012); e ao Laboratório de Espectrometria Atômica LEA), onde foram quantificados os elementos: potássio, magnésio e sódio, a partir da Espectrometria de absorção Atômica com chama (F AAS). Também foram determinados: pH e condutividade com pHmetro VWR SympHony, e a turbidez, com turbidímetro Alfakit Plus V1.25.

6.3 Tratamento físico da vinhaça e Teste piloto

Na primeira etapa do estudo o efluente foi utilizado para a realização de um teste piloto, no qual foi avaliado o crescimento algal em 5 tratamentos com diferentes níveis de diluições (10%,20%,30%,40% e 50%) e o controle com meio sintético BBM. Para o preparo das diluições, o efluente foi previamente filtrado através de malha de 20 μ m de porosidade, e centrifugado (centrífuga refrigerada

Novatecnica) por 5 minutos a 4000rpm, visando reduzir a maior quantidade de material particulado do meio.

O teste piloto foi conduzido em estufas incubadoras Eletrolab, modelo EL202/3, utilizando tubos de ensaio com volumes de 50 mL, e as diluições da vinhaça foram realizadas com água deionizada. O pH inicial das culturas foi ajustado para $7 \pm 0,05$ antes da microalga ser inoculada. A iluminação foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo *daylight*, com irradiância 2000 lux, temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12/12 h de luz/escuro. O teste piloto teve duração de 14 dias, sendo realizadas amostragens a cada dois dias para análise de densidade celular (Fig. 3). Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e o manuseio em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T3.

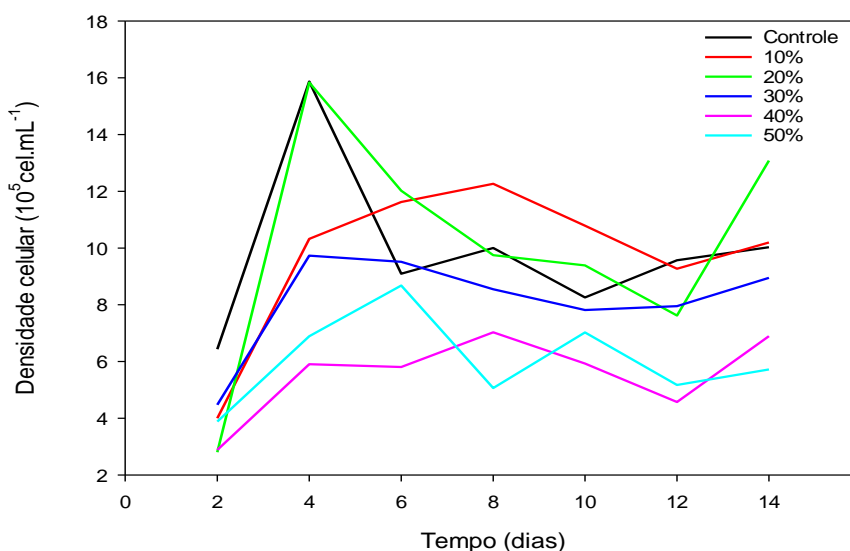


Figura 3: Curvas de crescimento de *K. flaccidum* cultivada no meio BBM (controle) e nos meios com diferentes concentrações de Vinhaça (10%-50%) obtidas a partir do teste piloto.

A partir das curvas de crescimento (Fig.3) obtidas no teste piloto, foram selecionadas as concentrações de 10%, 20% e 30% de vinhaça para realização do experimento, uma vez que foram as diluições que apresentaram os melhores resultados em termos de densidade celular.

6.4 Delineamento experimental

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 3L, constituídos do controle com meio BBM e três tratamentos com concentrações de 10%, 20% e

30% de vinhaça, realizados em triplicata. O experimento foi conduzido em estufas Eletrolab, modelo EL202/3, mantidos sob temperatura controlada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ no LATEAC/UFES (Fig.4).



Figura 4. Disposição dos Erlenmeyer em uma das estufas incubadoras utilizadas para o experimento. Fonte: Autor (2018).

O cultivo foi do tipo estaque ou batelada, sem aspersão de CO_2 e adição de nutrientes após a inoculação. Os cultivos foram realizados em fotoperíodo de 12/12h luz/escuro, irradiância de 2000 lux, utilizando lâmpadas fluorescentes de 40W do tipo daylight. Todo o material utilizado foi previamente autoclavado e o manuseio em câmara de fluxo laminar Pachane PCR T3. As condições de cultivo foram iguais e constantes para todos os tratamentos. Os tratamentos e o controle foram inoculados com concentração celular inicial (dia 0) de $200.000 \text{ cél.mL}^{-1}$. Uma sequência pré-determinada de rodizio dos erlenmeyers nas estufas incubadoras foi estabelecido para garantir a uniformidade das condições de cultivo.

O experimento teve duração de 21 dias, sendo realizadas amostragens com intervalos regulares para as análises de densidade celular, massa seca e pigmentos. Ao final do ensaio, amostras de biomassa liofilizada foram utilizadas na realização de análises de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos

totais, bem como para a caracterização do perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME). As metodologias específicas para cada análise estão descritas nas secções seguintes.

6.5 Avaliação do crescimento

Para a determinação do crescimento e densidade celular das unidades experimentais foram retiradas alíquotas de 2mL a cada 2 dias. A quantificação dos indivíduos foi realizada em hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, utilizando-se microscópio óptico Olympus CX41. Para a contagem, as amostras foram fixadas com solução de lugol acético 5%, seguindo a metodologia descrita por Lourenço (2006).

A partir dos resultados de densidade celular foram elaboradas as curvas de crescimento para cada tratamento e calculados a taxa de crescimento, o tempo de duplicação e o rendimento máximo das cepas segundo FOGG e THAKE, 1987. Para os cálculos das taxas de crescimento populacional foram considerados os valores compreendidos na fase exponencial de crescimento das culturas.

A taxa de crescimento (μ) e tempo médio de duplicação (G) foram calculados segundo as equações descritas abaixo:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1)/(t_2 - t_1)$$

Sendo,

μ = velocidade específica do crescimento;

N_1 e N_2 = número de células nos tempos t_1 e t_2 .

A partir de μ foi possível calcular o tempo médio de duplicação:

$$G = \ln(2)/\mu$$

O rendimento máximo (R) de cada tratamento foi determinado através da equação:

$$R = R_1 - R_0$$

Sendo,

R_1 = número máximo de células/mL;

R_0 = número inicial de células/mL.

6.6 *Determinação da biomassa seca*

Para determinação da biomassa seca, foram filtradas amostras de 20mL dos cultivos a cada 4 dias até o final do experimento utilizando microfiltros de fibra de vidro GF1 com diâmetro de 47mm e poro de 0,7 μm , previamente secos em estufa a 60°C e pesados. Após filtração das amostras, os filtros foram levados à estufa e mantidos a mesma temperatura até atingirem peso constante e, após a etapa de secagem, foram pesados novamente. A biomassa seca foi determinada pela diferença da massa final pela massa inicial do filtro, dividido pelo volume total de amostra filtrado (LOURENÇO, 2006).

A determinação da biomassa seca em g.L^{-1} se deu a partir da seguinte equação:

$$\text{MS} = (\text{Mf} - \text{Mi})/\text{V}$$

Sendo,

MS = Massa seca (g.L^{-1});

Mf = Massa final (g);

Mi: Massa inicial (g);

V = Volume filtrado (L).

A partir dos valores de massa seca foi possível determinar os valores de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) para cada tratamento e controle, referentes a concentração de biomassa microalgal acumulada durante o experimento.

6.7 *Determinação de carboidratos, proteínas e lipídeos totais*

Os teores de carboidratos, proteínas e lipídeos foram quantificados a partir da biomassa final centrifugada e liofilizada (liofilizador SL – 404) obtida em cada um dos tratamentos e controle (Fig. 5A e 5B).



Figura 5. A. Biomassa extraída do tratamento com 10% de vinhaça ao final do cultivo. B. Biomassa liofilizada. Fonte: Autor (2018).

A extração e determinação dos carboidratos totais seguiu método adaptado de Kochert (1978), empregando-se glicose como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Aquamate Plus) em comprimento de onda de 485nm. O teor de proteínas hidrossolúveis foi quantificado empregando-se o método adaptado de Lowry *et al.*, (1978), o qual utiliza albumina bovina como padrão. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em comprimento de onda 750nm. A extração e determinação do conteúdo de lipídeos totais foi realizada por gravimetria, de acordo com a metodologia adaptada de Bligh e Dyer (1959).

6.8 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes

A extração dos pigmentos clorofila *a* e carotenoides foram realizadas utilizando acetona 90% como solvente a frio e as concentrações foram determinadas utilizando espectrofotômetro nos comprimentos de onda 480, 510, 630, 647, 664 e 750 nm, a cada quatro dias de intervalo até o final do experimento (Lourenço 2006).

A determinação das concentrações de clorofila *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi realizada utilizando a fórmula proposta por Jeffrey e Humphrey (1975); e os carotenoides totais foram quantificados segundo Strickland e Parsons (1968).

6.9 Perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)

6.9.1 Esterificação das amostras

O rendimento e a análise do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas amostras foram obtidos segundo método de Hartman e Lago (1973), adaptado para microescala. Inicialmente realizou-se o preparo de uma mistura esterificante, a qual foi utilizada no decorrer do processo de transesterificação. Para isso, adicionaram-se 2,0 g de cloreto de amônio a 60 mL de metanol seguido pela adição de 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura, contida em balão de fundo redondo adaptado a um condensador, foi mantida em refluxo sob agitação por 15 min. O reagente obtido foi então estocado em balão volumétrico de 100 mL com tampa de vidro. Posteriormente, em um tubo de ensaio autoclavável de 20 mL, pesou-se cerca de 200,0 mg da biomassa de microalgas. A seguir, adicionaram-se 3,0 mL de solução 0,5 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio em metanol e aqueceu-se o tubo de ensaio por 10 minutos em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se o tubo de ensaio em banho de gelo e adicionaram-se 9,0 mL da mistura esterificante previamente preparada segundo o procedimento descrito anteriormente. Aqueceu-se novamente o tubo de ensaio por 10 min. em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se o tubo de ensaio em banho de gelo e adicionaram-se 5,0 mL de n-heptano e 2,0 mL de água destilada. Agitou-se o tubo de ensaio algumas vezes e colocou-se o sistema em repouso até a separação de fases. A fase heptânica foi coletada com pipeta tipo Pasteur, posteriormente liofilizada e analisada por cromatografia.

6.9.2 Análises cromatográficas

A análise das amostras foi realizada em um sistema de cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) da série Shimadzu CBM-20A, equipado com degaseificador de solventes DGU-20AS, bomba quaternária de gradiente LC-20AT, injetor automático de amostras SIL-20AHT e detector de arranjo de diodos SPD-M20A. A coluna cromatográfica utilizada neste estudo foi a coluna analítica Kinetex™ C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm, 100 nm). O comprimento de onda de detecção foi de 210 nm. O volume de injeção para as análises foi de 50 µL da amostra e a vazão da fase móvel foi de 0,250 mL/min. Em todas as análises, a coluna permaneceu acondicionada à temperatura constante de 37 °C utilizando

um módulo aquecedor de coluna da Shimadzu. A solução de H₂O:TFA (99,9:0,1 v/v) foi utilizada como fase móvel A, enquanto a fase B foi composta por Acetonitrila 100%. O perfil do gradiente iniciou-se com 70% da fase móvel B. Todas as soluções preparadas para compor as fases móveis foram previamente filtradas e desgaseificadas por 15 minutos em banho de ultrassom (Limpsonic) antes de serem utilizadas.

6.9.3 Validação do método

Os ésteres foram dissolvidos em solução de acetonitrila e a solução padrão de 10 µg/ mL foi estocada a -20 °C. A curva analítica foi obtida pela injeção das seguintes soluções padrões: Dodecanato (C12:0), Linolenato (C18:3), Miristato (C14:0), Linoleato (C18:2), Palmitato (C16:0) e Oleato (C18:1) com concentrações entre 0,2 e 2,0 µg/mL. Os dados foram processados utilizando o software LCSolutions (versão 2.1).

O coeficiente de correlação, a inclinação e o intercepto da curva padrão, bem como a tabela de análise de variância e os respectivos erros padrões foram calculados para verificar a validação do modelo linear da equação utilizada para padronizar o método de quantificação.

6.10 Eficiência do cultivo da microalga na remoção de nutrientes do efluente.

A avaliação da eficiência de remoção dos nutrientes do efluente pela microalga cultivada foi baseada nos resultados obtidos nas análises das variáveis física, química e físico-químicas das amostras do início e do final dos tratamentos. Para o cálculo do percentual de eficiência de remoção dos nutrientes analisados (fósforo total, ortofostato, nitrogênio total, amoniacal, potássio, magnésio e sódio) utilizou-se a equação adaptada de Ferreira e colaboradores (2017).

$$\text{Remoção/Redução (\%)} = (C_i - C_f) / C_i \times 100$$

Em que,

C_i = Concentração inicial do nutriente no meio de cultivo, antes da inoculação;

C_f = Concentração final do nutriente no meio de cultivo, após a remoção da biomassa.

6.11 Tratamento estatístico

Para a obtenção dos valores médios e desvios padrões foram consideradas três réplicas experimentais avaliadas. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa IBM SPSS Statistics 19, com testes paramétricos ANOVA e o teste posteriori de Tukey ($p < 0,05$) para comparação dos valores. Os resultados obtidos foram plotados em gráficos utilizando-se o programa SigmaPlot 14.0.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Caracterização da Vinhaça

Visto a sua composição rica em nutrientes (BETTANI *et al.* 2018), a vinhaça demonstra grande potencial como meio de cultivo alternativo para microalgas, e sua caracterização prévia permite definir em que teor este efluente pode ser utilizado. Após a realização do tratamento físico foram caracterizadas as principais variáveis físicas, químicas e físico-químicas do efluente, as quais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Caracterização física, química e físico-química da vinhaça bruta utilizada no experimento.

Parâmetros	Valor
pH	3.45
Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	2580
DQO (mg/L)	16603
DBO (mg/L)	9464
Nitrogênio Total (mg/L)	498
Nitrogênio Amoniacal (mg/L)	466
Fósforo Total (mg/L)	26
Ortofosfato (mg/L)	20
Potássio (mg/L)	1006
Magnésio (mg/L)	120
Sódio (mg/L)	32
Turbidez (NTU)	4.210

De modo geral, a vinhaça utilizada caracterizou-se como ácida, apresentou valores elevados de turbidez, condutividade elétrica, DBO e DQO, resultados estes semelhantes aos registrados por Santana e colaboradores (2016) e Pugliese e colaboradores (2017), que analisaram o cultivo de diversas espécies

de microalgas em vinhaça e medidas de mitigação deste efluente, respectivamente.

Na vinhaça foi registrada elevada concentração de nitrogênio amoniacal (466 mg/L) sendo esta a principal fração do nitrogênio total (Tabela 2). Tal fato deve favorecer seu uso como meio de cultura, uma vez que, esta é a principal forma assimilável pelas microalgas, requerendo menor custo energético quando comparada a outras fontes de nitrogênio (ESTEVES, 2011). Os valores registrados neste trabalho corroboram com dados da literatura que se referem a efluentes provenientes de indústrias sucrocooleiras, os quais chegam a apresentar valores de nitrogênio total variando de 150 – 700 mg.L⁻¹, em função do tipo de mosto (SCHULTZ, 2009).

Em relação aos teores de fósforo, a vinhaça também apresentou valores elevados, sendo o ortofosfato (20 mg/L) sua principal fração (Tabela 2). Assim como o nitrogênio, o fósforo é essencial para o metabolismo e constituição celular, sendo o ortofosfato a forma principalmente assimilada pelas microalgas (ESTEVES, 2011), evidenciando a potencialidade de uso deste efluente no cultivo de microalgas. É importante ressaltar que, a composição química da vinhaça pode variar em relação a diversos fatores, tais como, características do solo, da variedade de cana-de-açúcar, período da colheita e processo industrial utilizado na produção de etanol (OLGUÍN *et al.*, 2015). Salomon e Lora (2009) registraram dados referentes ao conteúdo de diferentes águas residuais. No que tange a caracterização da vinhaça, os autores apresentaram valores bem mais elevados de fósforo total (100-200 mg.L⁻¹), demonstrando a variação nas características do efluente.

As concentrações de N e P em águas residuais variam independentemente uma da outra, e as microalgas têm a capacidade de ajustar a concentração de N e P da biomassa dependendo do suprimento de nutrientes do meio (BEUCKELS *et al.*, 2015). É importante ressaltar que N e P são usados por microalgas na síntese de diversos compostos bioquímicos, portanto, mudanças nas concentrações desses elementos influenciarão a composição química da biomassa microalgal. Além disso, a deficiência de algum destes elementos pode representar um estresse nutricional durante o desenvolvimento da microalga, podendo inviabilizar o cultivo (LOURENÇO, 2006).

Potássio foi o elemento registrado em maior concentração na vinhaça, semelhante ao que tem sido relatado na literatura (JESUS *et al.*, 2018; CANDIDO *et al.*, 2018; OLIVEIRA, 2011). Este elemento tem papel fundamental na regulação osmótica, manutenção do pH intracelular e na conformação e estabilidade de proteínas (ESTEVES, 2011). O magnésio, cuja importância está associada aos pigmentos fotossintéticos, e o sódio, nutriente essencial na ativação enzimática (LOURENÇO, 2006), foram elementos presentes na composição da vinhaça em concentrações consideráveis.

Para o crescimento bem sucedido da alga os meios de cultivo precisam atender às necessidades nutricionais, proporcionando ótimo crescimento e elevada produtividade em termos de biomassa (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2001). O alto valor de condutividade elétrica permite inferir que há elevada concentração de íons neste efluente (TUNDISI, 2008) muitos destes podendo ser macro ou micronutrientes importantes para o crescimento desses microorganismos. Portanto, a análise da composição física, físico-química e química da vinhaça mostrou a potencialidade deste efluente para o cultivo de microalgas.

7.2 Crescimento e biomassa

O crescimento de *Klebosrmidium flaccidum* foi avaliado pela determinação da densidade celular em função do tempo, conforme mostrado nas diferentes curvas de crescimento para os diferentes tratamentos de vinhaça (10%, 20% e 30%) comparados ao controle (Fig. 6).

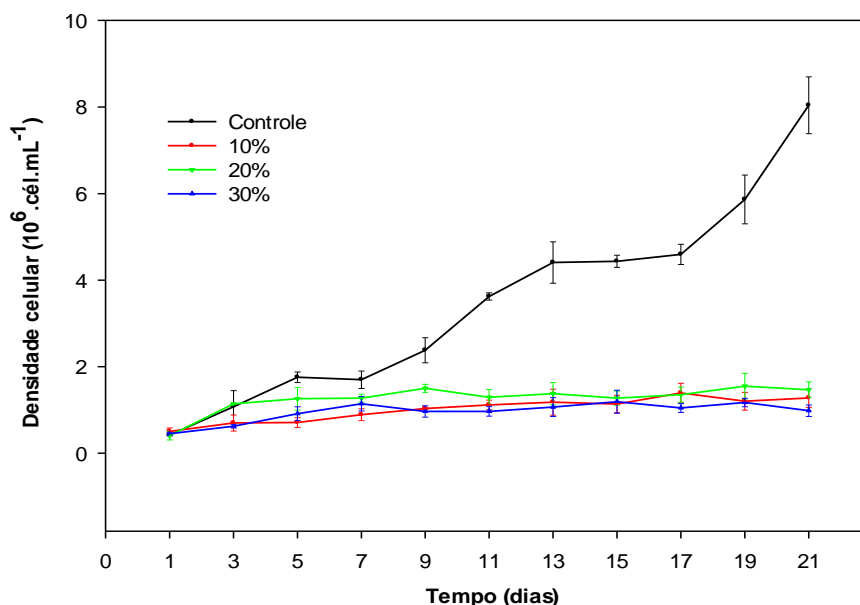


Figura 6. Curvas de crescimento de *K. flaccidum* no controle e nos tratamentos com diferentes concentrações de vinhaça (10%, 20% e 30%).

As curvas de crescimento das culturas demonstram que os tratamentos não apresentaram fase de adaptação, porém, apresentaram crescimento inferior em relação ao controle.

As fases de crescimento dos tratamentos mostraram diferentes dias de duração e foram caracterizadas pelo baixo incremento em termos de densidade celular. Os cultivos em meio controle e em 10% apresentaram fase exponencial com 21 e 17 dias de duração, respectivamente. Já os cultivos com 20% e 30% de efluente tiveram suas fases exponenciais reduzidas, apresentando duração de 9 e 7 dias, respectivamente, a partir dos quais, assim como no tratamento 10%, entraram na fase estacionária do crescimento.

Dentre as concentrações à base de vinhaça, o tratamento com 20% de efluente foi a cultura que proporcionou maior taxa de crescimento (k) de *K. flaccidum*, menor tempo de duplicação da população (G) e o 2º maior valor em termos de rendimento máximo (Tabela 3), cuja densidade celular máxima alcançada foi de $1,5 \times 10^6$ cél. mL⁻¹ no 19º dia de cultivo. Em relação ao controle, porém, tal rendimento foi significativamente inferior ($p > 0,05$), embora as taxas de crescimento de ambas as culturas tenham sido próximas.

Todos os cultivos apresentaram crescimento celular na ordem de 10^6 cel.mL⁻¹, e apesar de não haver diferença significativa nos parâmetros de K e G

dos meios com 20% e 30% de efluente em relação ao controle suas curvas de crescimento apresentaram-se muito abaixo quando comparado com a cultura em meio sintético. Estes resultados indicam que, apesar da presença de vários nutrientes essenciais para o desenvolvimento da cepa, a vinhaça apresentou um ou mais fatores que estariam limitando o desenvolvimento da microalga.

O crescimento das microalgas é afetado por uma série de fatores, e devido sua natureza fotossintética a quantidade e a qualidade de luz disponível afeta diretamente a taxa de crescimento e composição da biomassa (CHEAH *et al.*, 2018). O baixo crescimento da cepa registrado nos tratamentos pode ter relação com a coloração marrom escura apresentada pela vinhaça, atribuída principalmente à presença de um pigmento castanho escuro denominado melanoidina (SILVA *et al.*, 2014), que minimiza a penetração de luz, interferindo em processos biológicos de importância para o crescimento e manutenção da cultura.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos de crescimento (taxa de crescimento – K, tempo de duplicação - G e rendimento máximo – R_{máx}) e dias de duração da fase de crescimento exponencial (Log) do meio sintético BBM (controle) e dos meios com diferentes concentrações de vinhaça.

	K (d⁻¹)	G (dias)	R_{máx.} (cél.mL⁻¹)	Duração da Fase Log (dias)
Controle	0.15 ^a	4.7 ^a	7 841 250 ^a	1-21
10%	0.06 ^b	12.6 ^b	1 190 883 ^b	1-17
20%	0.17 ^a	4.3 ^a	1 350 417 ^b	1-9
30%	0.15 ^a	4.6 ^a	989 304 ^b	1-7

Valores de K, G e R_{máx} expressos em média +- erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

Muitos estudos que utilizam vinhaça para o cultivo de microalgas o fazem com vinhaça altamente diluída em meio de cultura sintético ou com outro resíduo rico em nutrientes, o que difere do proposto nesta pesquisa, tendo em vista que os tratamentos constaram de vinhaça diluída em água deionizada, sem adição de nutrientes, visando a produção de biomassa com máxima redução de custos.

Budiyono e colaboradores (2014) ao utilizarem vinhaça biodigerida (8%) no cultivo de *Spirulina platensis* (Gomont) registraram taxa de crescimento semelhante ao registrado neste estudo (0,15 d⁻¹). Marques e colaboradores (2013), por sua vez, utilizaram vinhaça biodigerida e diluída (2%) com efluentes

secundários de tratamento de esgoto para o crescimento de *Chlorella vulgaris* (Beyerinck), e obtiveram taxa de crescimento superior ($0,76 \text{ dia}^{-1}$). Santos e colaboradores (2016) relataram que, culturas heterotróficas de *S. platensis* apresentaram taxa de crescimento de $0,54$ e $1,02 \text{ d}^{-1}$ na presença de vinhaça a $0,1\% \text{ v/v}$ e $1,0\% \text{ v/v}$, respectivamente, enquanto uma taxa de $0,97 \text{ d}^{-1}$ foi observada na cultura autotrófica. Valores mais baixos foram exibidos por culturas mixotróficas, com taxa de crescimento específico de $0,28 \text{ d}^{-1}$ e $0,14 \text{ d}^{-1}$ em meio suplementado com vinhaça a $0,1\% \text{ v/v}$ e $1,0\% \text{ v/v}$, respectivamente.

Esses autores obtiveram resultados interessantes utilizando o mesmo efluente, no entanto, é importante salientar que, diferenças quanto às metodologias empregadas, espécies utilizadas e condições físico-químicas dos efluentes exercem diferentes influências nas taxas de crescimento de microalgas (WILSON *et al.*, 2003), refletindo diretamente nos resultados.

Em relação à massa seca, as análises estatísticas (ANOVA e Tukey) demonstraram haver diferenças significativas ($p < 0,05$) no incremento em biomassa entre as diferentes concentrações de vinhaça (Fig. 7).

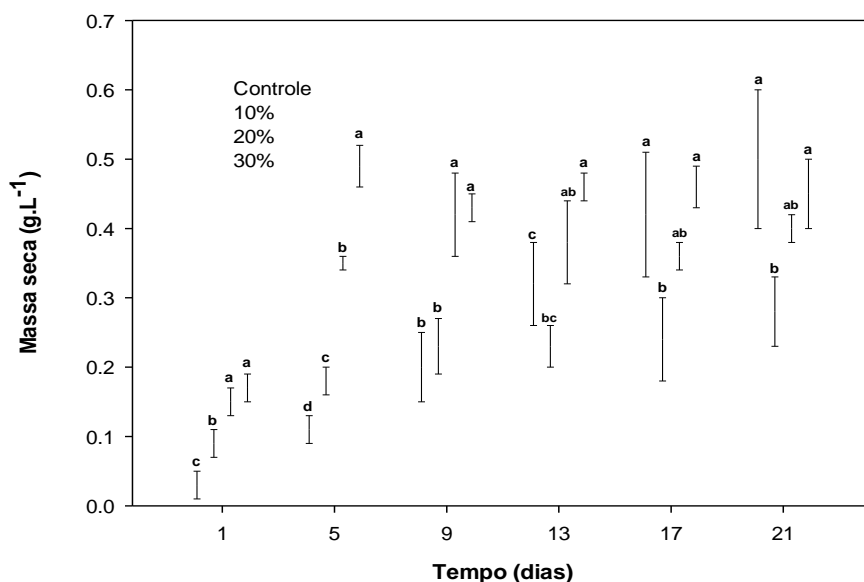


Figura 7: Variação temporal da biomassa seca no controle e nos meios com tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o tratamento 10% o aumento na concentração de biomassa demonstrou um padrão de crescimento contínuo, observando-se o incremento de biomassa de $0,09\text{g.L}^{-1}$ para $0,275\text{g.L}^{-1}$ no 21º dia de cultivo. Este padrão foi seguido pelo tratamento 20%, que apresentou incremento de biomassa ($0,401\text{g.L}^{-1}$) semelhante ao valor obtido para o controle ($0,495\text{g.L}^{-1}$) no mesmo período. Das três condições testadas neste estudo, o tratamento 30% apresentou maior concentração em biomassa ($0,486\text{g.L}^{-1}$) no 5º dia de cultivo, sendo estatisticamente superior ao controle e demais tratamentos.

Em um dos raros trabalhos encontrados na literatura envolvendo o cultivo de cepas do gênero *Klebsormidium*, Liu e colaboradores (2016) investigaram o cultivo de algas filamentosas em efluentes orgânicos e hortícolas; dentre os resultados obtidos, a menor produção de biomassa foi atribuída aos cultivos com a cepa de *klebsormidium sp.* ($13,5\text{mg.L}^{-1}$), valores inferiores aos registrados no presente trabalho. Ramirez e colaboradores (2014), ao avaliarem o crescimento de *Scenedesmus sp.* em meio de cultura sintético suplementado com concentrações de vinhaça variando de 0 a 40%, encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, tendo registrado a maior concentração de biomassa ($0,45\text{g.L}^{-1}$) no cultivo com 37,5% de efluente.

O custo dos nutrientes para a preparação dos meios de cultivos representa um dos fatores relevantes na produção de microalgas; a redução da quantidade de meio utilizado, por biomassa algácea produzida, poderá diminuir de forma significativa os custos de produção (BERTOLDI 2008, SCHMITZ *et al.*, 2012). Nesta pesquisa, a biomassa da microalga cultivada nos diferentes tratamentos à base de vinhaça demonstrou padrão crescente de incremento. No final do experimento, a maior concentração de biomassa ($0,45\text{g.L}^{-1}$) foi obtida no tratamento 30%, enquanto que a menor concentração ($0,28\text{g.L}^{-1}$) foi obtida no 10%. Estes resultados podem indicar que o aumento na concentração de 10% para 30% de vinhaça teve efeito positivo no incremento em biomassa, provavelmente devido a maior disponibilidade de nutrientes disponíveis no meio.

Diferente dos resultados obtidos neste estudo, diversos trabalhos encontrados na literatura têm relatado a diminuição de biomassa seca de diferentes espécies de microalgas à medida que aumenta as concentrações de vinhaça. Kadioglu e Algur (1992), precursores nos estudos envolvendo a utilização deste efluente, avaliaram o crescimento da microalga *Chlamydomonas*

reinhardii (Daneard) e relataram o aumento tanto no número de células, quanto no conteúdo de biomassa dessa espécie nas concentrações de 1- 5% do efluente, ocorrendo diminuição significativa desses parâmetros em concentrações acima de 10%. Engen e colaboradores (2018) ao compararem os cultivos mixotróficos e heterotróficos da microalga *Micractinium* sp. (Fresenius) observaram que, sob diferentes concentrações de vinhaça (2%, 5%, 10% e 20%) os cultivos obtiveram a maior concentração de biomassa ($1,2 \text{ g.L}^{-1}$) em condições mixotróficas com 5% do efluente, relatando redução da biomassa e na concentração celular em cultivos com concentrações superiores.

Visando a otimização dos cultivos com vinhaça, objetivando melhores resultados em termos de densidade celular e produtividade de biomassa, Ramirez e colaboradores (2014) sugeriram que, a intensidade luminosa deva ser proporcionalmente maior à medida que se aumenta a concentração do efluente, o que possibilitaria o uso de concentrações mais elevadas de vinhaça, maior redução dos custos de cultivo e conseqüentemente, uma destinação mais adequada ao efluente. Portanto, o cultivo de microalgas em vinhaça é dependente das diversas características inerentes ao efluente e das condições empregadas.

7.3 Pigmentos fotossintéticos

As concentrações dos pigmentos fotossintéticos em *K. flaccidum* nos diferentes tratamentos durante o experimento estão representadas na Figura 8 (clorofila *a*) e Figura 9 (carotenoides). O incremento de pigmentos no controle foi estatisticamente superior aos tratamentos com vinhaça em todos os dias, com maiores concentrações de clorofila *a* e carotenoides no 13^o e 17^o dias de cultivo.

Em relação aos tratamentos com vinhaça, as maiores concentrações de clorofila *a* ocorreram no 9^o dia de cultivo, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) para as três condições testadas, com valores de clorofila *a* variando de ($1,61$ a $1,71 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$).

Quanto às concentrações de carotenoides nos tratamentos, assim como ocorreu nos resultados encontrados para a clorofila *a*, o maior valor ocorreu no 9^o dia de cultivo. Comparando os tratamentos com vinhaça, ao final do experimento constataram-se concentrações significativamente maiores ($p < 0,05$) no tratamento com 30% de efluente, o qual apresentou $0,69 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de carotenoides. Todavia, os resultados são significativamente inferiores aos registrados no

controle ($2,72 \mu\text{g.L}^{-1}$) para o mesmo período. Os tratamentos 10% e 20% apresentaram redução das concentrações deste pigmento ao longo dos cultivos e não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$).

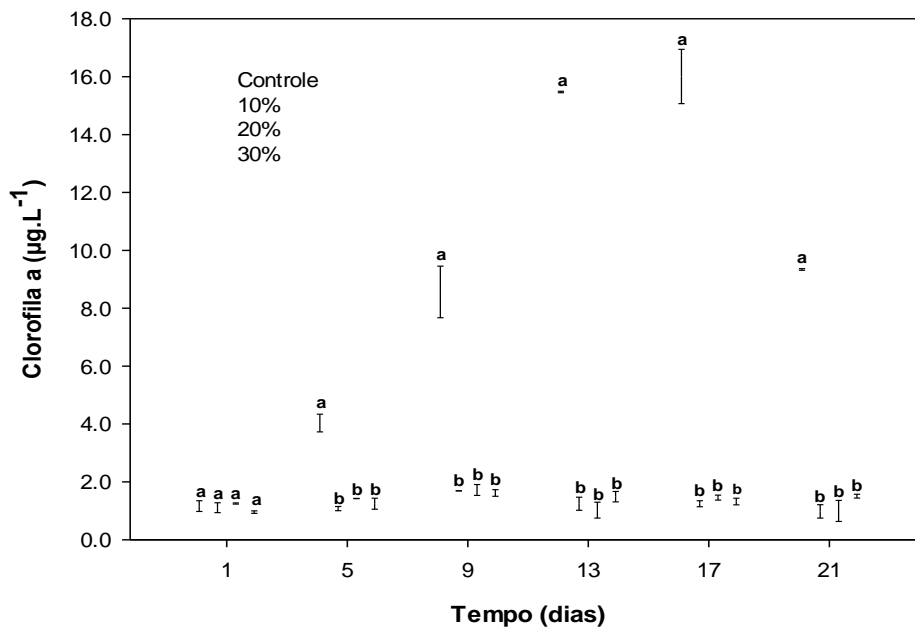


Figura 8: Concentrações de clorofila *a* do cultivo de *K. flaccidum* no controle e nos tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

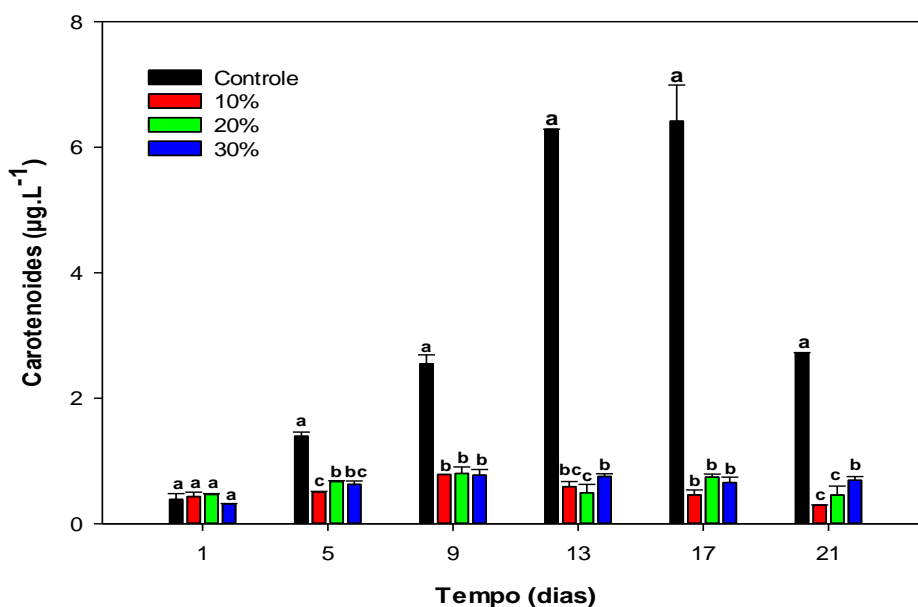


Figura 9: Concentrações de carotenoides do cultivo de *K. flaccidum* no meio controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras

verticais). Colunas com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A clorofila 'a' é o principal pigmento atuante nos sistemas de absorção de luz (LOURENÇO, 2006); sua abundância está associada à saúde fisiológica das células, à capacidade fotossintética e à fixação de carbono por esses organismos (BORGES *et al.*, 2007). Os baixos teores de clorofila a ($1,61$ a $1,71 \mu\text{g.L}^{-1}$) nos tratamentos com vinhaça obtidos nesta pesquisa demonstram que a capacidade fotossintética da microalga *K. flaccidum* foi afetada, provavelmente devido à dificuldade de penetração de luz, o que também resultou em baixa densidade celular, ambos atributos de biomassa de algas.

Candido e colaboradores (2018) registraram concentrações mais elevadas de clorofila 'a' ($4,0 - 5,0 \text{ mg.L}^{-1}$) para a microalga *C. vulgaris* cultivada em vinhaça biodigerida (80%) e convencional (60%), respectivamente. Esses resultados demonstraram que as células de *C. vulgaris* apresentaram melhor adaptação ao efluente, o que possibilitou a síntese deste pigmento.

Dos vários metabólitos importantes de microalgas, os carotenoides têm ganhado grande atenção devido às suas propriedades antioxidantes (RAJESH *et al.*, 2017). Além disso, são comercialmente importantes para aplicações industriais, particularmente nos mercados de corantes, alimentos e na indústria de cosméticos (RICHMOND, 2008). É conhecido que a síntese de carotenoides em microalgas é influenciada principalmente por fatores como intensidade de luz, temperatura, salinidade e limitação de nutrientes (BEN-AMOTZ, 1983; BECKER, 2004; YE *et al.*, 2008). Algumas microalgas verdes como a *Haematococcus pluvialis* (Flotow) têm grande potencial de acumulação de astaxantina sob condições de estresse (LEMOINE; SCHOEFS, 2010) e sua aplicação vem sendo amplamente investigada devido ao aumento na demanda por pigmentos naturais e o seu alto valor de mercado (AMBATI *et al.*, 2014; PANIAGUA-MICHEL, 2015).

Embora neste estudo as concentrações de carotenoides não tenham alcançado valores expressivos, outros estudos apontam a utilização de resíduos agroindústrias na produção de biomassa rica em pigmentos naturais, como na pesquisa de Rodrigues e colaboradores (2014) que, ao cultivarem a cianobactéria *Phormidium autumnale* (Gomont) em água residual, caracterizaram vinte tipos de carotenoides. Essa investigação apontou ainda o balanço de biomassa e

produção desse pigmento, onde os resultados indicaram que é possível obter 107 902,5kg/ano de carotenoides totais em escala industrial, a partir do cultivo dessa microalga utilizando uma fonte de produção alternativa e de baixo custo.

Embora a vinhaça se apresente como um meio alternativo rico em nutrientes e promissor para o cultivo de microalgas, assumimos que para a espécie *K. flaccidum* o cultivo não obteve resultados satisfatórios para a produção de pigmentos.

7.4 Teores de proteínas hidrossolúveis, carboidratos e lipídeos.

Os resultados da determinação das biomoléculas, proteínas, carboidratos e lipídeos totais nos cultivos controle (BBM) e nos tratamentos com vinhaça (10%, 20% e 30%) são mostrados na figura 9. O teste de variância seguido do teste de Tukey demonstrou haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, indicando que a composição bioquímica das células de *K. flaccidum* era dependente do meio de cultura utilizado e da disponibilidade de nutrientes.

Neste estudo, as células cultivadas em 10%, 20% e 30% de vinhaça apresentaram teores de proteínas solúveis, 3,6%, 8,6% e 8,8%, respectivamente, valores estatisticamente inferiores ao apresentado no cultivo com meio de cultura sintético (BBM), cuja composição celular apresentou um teor de 24% desta biomolécula.

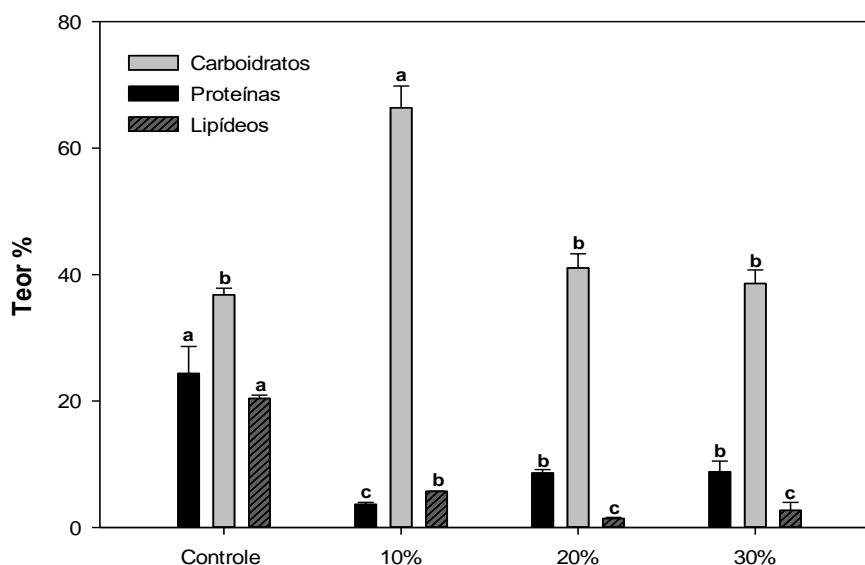


Figura 10: Teores de Carboidratos, Proteínas e Lipídeos na biomassa de *K. flaccidum* cultivada no controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30%). Valores expressos em média \pm erro padrão (barras verticais). Colunas da mesma cor seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observa-se que, nos tratamentos a base de vinhaça, apesar dos baixos valores registrados, à medida que a concentração de nutrientes aumentou, ocorreu o aumento no teor de proteínas da biomassa de *K. flaccidum*. Os tratamentos com 20 e 30% de vinhaça apresentaram teores de proteínas estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao tratamento com 10% do efluente. Esses resultados indicam que o incremento no teor de proteínas pode ter sido em consequência da maior disponibilidade de nutrientes no meio, a exemplo, a maior concentração de nitrogênio.

A disponibilidade de nutrientes exerce influência na composição bioquímica das microalgas e o nitrogênio apresenta importância acentuada por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário de algas (LOURENÇO, 2006). A abundância deste elemento no meio tende a aumentar a síntese de ácidos nucléicos, pigmentos fotossintetizantes e proteínas nas células (LI *et al.*, 2011), possibilitando a obtenção de um produto com alto valor nutricional, que pode ser utilizado como suplemento alimentar, na aquicultura e em outras áreas biotecnológicas (MORIOKA *et al.*, 2014). Alterações na composição bioquímica da biomassa de microalgas em resposta às variações na

composição das águas residuais podem ter consequências importantes para a valorização e utilização da biomassa final dos cultivos.

Zhuang e colaboradores (2018), ao analisarem a influência de várias concentrações de nitrogênio e fósforo total (concentrações variando em uma faixa correspondente às águas residuais domésticas e agroindustriais) sobre o crescimento e composição de biomassa da microalga *Scenedesmus sp.* concluíram que, o conteúdo proteico das células manteve níveis mais altos quando a microalga foi cultivada em meio com maior conteúdo de nitrogênio (150 mg/L). Da mesma forma, Syaichurrozi e Jayanudin (2017) ao estudarem o efeito da água residual oriunda da produção de Tofu (TW) no crescimento e teor de biomoléculas de *S. platensis*, relataram aumento no teor de proteínas de 36,73 para 66,62% na adição de TW de 2 para 6% v/v. Os autores sugerem que esse fenômeno foi causado pelo aumento na concentração de nitrogênio de 26,59 para 33,78 mg/L, confirmando a influência positiva da oferta deste nutriente no incremento do teor de proteínas.

Em relação ao teor de carboidratos quantificados na biomassa final dos cultivos, observou-se efeito inverso, uma vez que, os tratamentos com vinhaça apresentaram maior teor de carboidratos quando comparados ao cultivo em meio sintético BBM (controle) A maior concentração de carboidratos da biomassa de *K. flaccidum* foi verificada no tratamento com 10% de vinhaça (66,39% \pm 3,49), cultivo este realizado com maior taxa de diluição e, conseqüentemente, menor disponibilidade de nutrientes. Este resultado é duas vezes maior que o teor encontrado na biomassa do controle e estatisticamente superior aos resultados observados nos tratamentos com 20% (41,06% \pm 2,24) e 30% (38,59% \pm 2,14) de diluições do efluente.

Em cultivos realizados em condições com elevada disponibilidade de nutrientes as microalgas tendem a sintetizar proteínas. Contrariamente, quando há restrição de alguns nutrientes (a exemplo, baixo suprimento de nitrogênio), o fluxo de carbono proveniente da fotossíntese é desviado para as vias metabólicas associadas á síntese de compostos ricos em energia, e a concentração de polissacarídeos pode aumentar muito em relação ao total de proteínas da célula (HU *et al.*, 2004; LOURENÇO *et al.*, 2004). Calixto e colaboradores (2016) avaliaram o uso de resíduos frutíferos / hortícolas (HB), resíduos de cana-de-açúcar (VB), esterco de frango cru (MCR), excrementos de frango (BCE) e esgoto

doméstico municipais (MDS) no cultivo e nas composições bioquímicas e perfil de ácidos graxos de *Chlorella* sp., *Chlaydomonas* sp., *Lagerheimia longiseta* e *Pediastrum tetras*, os teores de carboidratos variaram de 25 a 45% quando os cultivos foram realizados em VB. Contudo, as espécies *Chlorella* sp. e *Lagerheimia longiseta* demonstraram os maiores níveis de produção de carboidratos (superiores a 50%) em meio com efluente de MDS, onde a disponibilidade de nutrientes era inferior.

Além da disponibilidade de nutrientes, outros fatores também podem influenciar a composição bioquímica da biomassa das microalgas, tais como, suplementação de CO₂, tipo de cultivo, temperatura, pH e intensidade de luz (CHEN *et al.*, 2013). Estudos relacionados ao cultivo mixotrófico da microalga *Chlorella vulgaris* em águas residuais relatam baixo acúmulo de carboidratos quando a microalga foi cultivada em vinhaça de etanol de milho e em efluente de soro de soja, 6,64% e 15,48%, respectivamente, (MITRA *et al.*, 2012); em contrapartida, o cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* em água residual doméstica suplementada com glicose (5g/L) apresentou 41,4% de carboidratos em sua composição (GRUTA *et al.*, 2016). Os autores sugerem que a glicose suplementada à água residual foi prontamente consumida pelas células de *C. vulgaris*, influenciando o incremento da biomassa e na utilização dos nutrientes disponíveis para metabolizar biomoléculas. Wang e colaboradores (2017), com o intuito de obter melhor crescimento celular e maior produtividade de carboidratos, cultivaram a microalga *Neochloris aquatica* em água residuária de suinocultura em condições mixotróficas, intensidade luminosa (até 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), temperatura e relação N/P otimizadas. Os resultados demonstraram significância estatística dos parâmetros de cultivo afetando a remoção de DQO/nutrientes, a alta produtividade de biomassa (6,10gL⁻¹) e expressivo acúmulo de carboidratos (50,46 %).

Com base nesses estudos, o cultivo mixotrófico de microalgas em efluentes com elevada turbidez, tal como a vinhaça, parece ser o tipo de cultivo mais eficiente para maior produção de biomassa e acúmulo de reservas de armazenamento (HO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015), uma vez que a limitação da penetração de luz pode ser superada aproveitando a capacidade destes organismos em degradar fontes de carbono orgânico em condições de baixa exigência de luz (PAGNANELLI *et al.* 2014) e produção de metabólitos

fotossintéticos, que é impraticável em caso de cultivo heterotrófico (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Os resultados confirmam como a composição e o metabolismo dos carboidratos em microalgas pode diferir significativamente de espécie para espécie, das condições de cultivo empregadas e também do meio de cultura utilizado (RISMANI-YAZDI *et al.*, 2011).

Em relação ao teor de lipídeos totais, os resultados obtidos nos tratamentos com a utilização do efluente não foram tão expressivas. O maior teor de lipídeos foi registrado para o cultivo com 10% de vinhaça (5,74%), sendo significativamente inferior ao teor lipídico registrado no controle (20,4%). Os meios com 20% e 30% de efluente apresentaram valores médios de 1,4% e 2,67%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$).

No que tange a produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas, um dos principais objetivos é o alto rendimento lipídico, visto a influencia direta da elevada produtividade desta biomolécula nos custos finais de produção (RUDOLFI *et al.*, 2009). Em geral, sob condições desfavoráveis ao crescimento (a exemplo, estresse nutricional) ocorrem alterações no metabolismo celular das microalgas e o carbono fixado pode ser redirecionado para a síntese de outros compostos de reserva, tais como, carboidratos e lipídeos (HUO *et al.*, 2011). Segundo Radakovits e colaboradores (2010), uma maneira de favorecer a síntese e aumentar o conteúdo de ácidos graxos na biomassa de microalgas é bloquear as vias metabólicas envolvidas na produção de compostos energéticos, como o amido. Desse modo, os baixos valores registrados em termos de teor lipídico neste estudo podem ser consequência da competição existente entre a síntese de lipídeos e carboidratos, visto que, as vias metabólicas associadas à síntese e degradação de compostos ricos em energia estão intimamente ligadas (SIAUT *et al.*, 2011; HO *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo a utilização da vinhaça como meio de cultivo alternativo para outras espécies de microalgas demonstraram resultados satisfatórios em relação à biossíntese de lipídeos. Ferreira e colaboradores (2018), ao avaliarem o consumo de nutrientes, conteúdo lipídico e o crescimento de *Desmodesmus sp.* em vinhaça bruta obtiveram maior teor de lipídios (aproximadamente 24%) e maior produtividade de biomassa em condições heterotróficas. Os autores observaram que o incremento no teor lipídico na biomassa da microalga foi devido a menor disponibilidade de nitrogênio do meio,

confirmando a relação direta entre o baixo consumo de nitrogênio e o acúmulo de substâncias de reserva. Calixto e colaboradores (2016), ao avaliarem o teor lipídico de 4 cepas cultivadas em diferentes tipos de efluentes indicaram que o conteúdo lipídico das microalgas respondeu às diferenças nas concentrações de nitrogênio e outros nutrientes disponíveis no meio. Neste mesmo estudo, os teores lipídicos de *Chlorella sp.*, *Chlaydomonas sp.*, *Lagerheimia longiseta* e *Pediastrum tetras* cultivados em vinhaça foram de aproximadamente 8%, 20%, 15% e 13%, respectivamente. Os resultados sugerem que cepas diferentes de microalgas possuem características metabólicas inerentes e podem diferir em termos fisiológicos mesmo em condições de cultivo idênticas.

Para a produção economicamente viável de biodiesel a partir da biomassa de microalgas, além do alto teor lipídico é necessário que a cepa possua habilidades de adaptação de cultivo, mantendo elevado rendimento em termos de biomassa e conseqüentemente, elevada produtividade lipídica. Alguns autores realizaram estudos em que a adição de nutrientes e o pré-tratamento dos efluentes se mostraram alternativas viáveis para otimização do processo. Olguín e colaboradores (2015), utilizaram 2% de vinhaça anaerobicamente digerida (AEV) + NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) no cultivo de *Neochloris oleoabundans*; os autores constataram incremento significativo na densidade celular e valores significativamente maiores (38,5%) nos teores lipídicos em comparação ao tratamento sem a adição de NaHCO₃ (30,2%). Por sua vez, Cheah e colaboradores (2018), investigaram os efeitos do pré-tratamento ácido (H₂SO₄) e a concentração ideal do efluente oriundo da produção de óleo de palma (POME) no incremento de biomassa e teor lipídico das cepas *Chlorella sp.* e *Chlorella sorokiniana*. Das duas cepas cultivadas, o conteúdo lipídico de *Chlorella sorokiniana* obtido a partir do cultivo em POME pré-tratado foi de 11,21% com 2,12 g L⁻¹ de concentração de biomassa quando cultivado com 30% (v / v), o que proporcionou um rendimento relativamente maior do que os valores reportados em POME não tratado. Os autores consideram o pré-tratamento eficaz para melhorar as produções de biomassa, uma vez que converte a lignina do POME em açúcares para servir como suplemento para as microalgas.

É importante ressaltar que, se a adição de nutrientes for incentivada, a formulação de meios de cultivo baseados na utilização de resíduos visando à

diminuição dos custos de produção poderia ser desnecessária. Em contrapartida, estudos relacionados aos efeitos do pré-tratamento de efluentes nos cultivos são necessários, com o intuito de potencializar o reaproveitamento, visando a maior eficiência no uso e a otimização do cultivo de microalgas acoplado ao tratamento terciário de resíduos (CHEAH *et al.*, 2018).

Embora o foco principal desse estudo tenha sido investigar o acúmulo de óleo na composição da biomassa de *K. flaccidum* cultivada em vinhaça para produção de biodiesel, ficou evidente que a cepa acumulou teores elevados de carboidratos. É necessário salientar que, a biomassa microalgal pode conter várias biomoléculas que podem ser utilizadas em outros processos tecnológicos (HEMPEL *et al.*, 2012). Assim, a biomassa rica em carboidratos pode ser matéria prima apropriada para a produção e comercialização de outros biocombustíveis, tais como, bioetanol e biogás (CHEN *et al.*, 2013; MARKOU *et al.*, 2012; KHANRA *et al.*, 2018). Até onde sabemos, não existem estudos específicos na literatura sobre o cultivo da microalga *Klebosrmidium flaccidum* utilizando vinhaça. Dessa forma, os resultados aqui apresentados, ou seja, o alto teor de carboidratos (66,39 %) na biomassa de *K. flaccidum* resultantes do cultivo em meio de cultura alternativo com 10% de vinhaça como única fonte de nutrientes é altamente encorajador.

7.5 Perfis dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME).

A composição dos FAME extraídos da biomassa obtida de *K. flaccidum* cultivadas em diferentes concentrações de vinhaça são apresentados na tabela 4. Os ácidos graxos foram classificados como ácidos graxos saturados (SFA) e insaturados (UFA). Os SFA analisados foram o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0). Os UFA foram divididos em monoinsaturados, como o ácido oleico (C18:1), di-insaturados, ácido linoleico (C18:2) e tri-insaturados, como o ácido linolênico (C18:3).

Tabela 4: Perfil de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos ($\mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) na biomassa de *K. flaccidum* cultivada em meio controle e nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30% de efluente, respectivamente).

FAME	Controle	10%	20%	30%
Laurico (C:12)	14.3 ^b	42.2 ^a	4.9 ^c	8.3 ^{bc}
Mirístico (C14:0)	131.3 ^{ab}	51.9 ^b	64.9 ^{ab}	164.4 ^a
Palmítico (C16:0)	59.9 ^b	62.8 ^b	176.4 ^a	40.4 ^b
Oleico (C18:1)	80.5 ^{ab}	45.9 ^c	65.9 ^{bc}	98.9 ^a
Linoleico (C18:2)	20.8 ^a	4.9 ^c	11.4 ^b	8.4 ^{bc}
Linolênico (C18:3)	1.8 ^a	1.5 ^a	2.7 ^a	2.7 ^a
SFA	205.5 ^{ab}	156.9 ^b	246.2 ^a	213.10 ^{ab}
UFA	103.10 ^a	52.3 ^b	80.0 ^{ab}	110.0 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0.05$). SFA - ácidos graxos saturados. UFA - ácidos graxos insaturados.

Observou-se que dentre as concentrações de vinhaça testadas, o ácido graxo predominante foi o ácido palmítico (C16:0), cujo maior teor foi observado no tratamento com 20% de efluente ($176.4 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$), concentração significativamente superior ao observado no controle ($59.9 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$). O ácido mirístico (C14:0), apresentou maior valor ($164.4 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$) no tratamento com 30% de vinhaça.

Em termos de UFA, dentre os ácidos graxos analisados, o ácido oleico (C18:2) apresentou elevada concentração em todas as unidades experimentais. O meio com 30% de efluente apresentou valor médio de $98.9 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$ deste ácido graxo, demonstrando diferença significativa entre os demais tratamentos ($p > 0,05$); Por outro lado, a maior concentração do ácido linoleico (C18:2) foi obtida no cultivo com meio sintético BBM (controle) $20.8 \mu\text{g.g}^{-1}\text{ms}$. O conteúdo do ácido linolênico (C18:3) não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e o controle ($p < 0.05$), e os valores obtidos foram mais baixos.

Tais variações no perfil de FAME são comparáveis com os estudos realizados por Engen e colaboradores (2018), que avaliaram o cultivo da microalga *Micractinium* sp. em diferentes concentrações de vinhaça. Neste estudo o ácido graxo predominante foi o ácido linoleico, responsável por 45% do total dos ácidos graxos no tratamento com 20% de efluente. Perfil de FAME semelhante foi relatado no estudo de Mitra e colaboradores (2012), que avaliaram o efeito da vinhaça e do soro de soja como fonte de nutrientes para o cultivo heterotrófico e

mixotrófico de *Chlorella prothecoides*. O perfil do FAME das células de *C. prothecoides* cultivadas em vinhaça foi composto principalmente por ácido linoleico (C18: 2), ácido oléico (C18: 1) e ácido palmítico (C16: 0), cujos percentuais foram de $52,2 \pm 0,4\%$, $21,4 \pm 0,2\%$ e $13,9 \pm 0,2\%$, respectivamente.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos oriundos de óleo vegetal e gordura animal submetidos às reações de transesterificação são os ingredientes químicos do biodiesel e sua composição influencia diretamente na qualidade do biocombustível (LI *et al.*, 2011). Além disso, outros fatores são essenciais para atender ao padrão de qualidade do biodiesel, tais como, qualidade da matéria-prima, número de cetano, viscosidade, ponto de entupimento, estabilidade oxidativa e outros processos posteriores à produção (KNOTHE; GERPEN 2006; BOAMAR, 2010). Segundo Chisti (2007), o biodiesel produzido a partir de óleos provenientes da biomassa de microalgas é, provavelmente, a única fonte renovável capaz de substituir o diesel derivado do petróleo e garantir a qualidade final do biodiesel produzido.

Os resultados deste estudo demonstram que, o perfil de FAME de *K. flaccidum* cultivada nas diferentes concentrações de vinhaça apresentou conteúdo superior de SFA, comparado ao conteúdo de UFA. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Zheng e colaboradores (2016), que relataram aumento de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e declínio de ácidos graxos poliinsaturados em culturas de *Chlorella sp.*, *Chlorella sorokinana* e *Phaeodactylum tricornutum* cultivadas em diferentes concentrações de extratos de resíduos de algas marinhas (6-8%). Segundo Knothe (2006), quanto maior o número de insaturações, menos estável será o biodiesel em termos oxidativos; em contra partida, o aumento do comprimento da cadeia hidrocarbônica em ésteres metílicos saturados (SFA) aumenta o número de cetano (NC), parâmetro indicativo de qualidade da queima do biodiesel e velocidade de ignição. Além disso, o NC pode influenciar na redução das emissões de partículas de óxidos de nitrogênio (NO_x) e na qualidade da combustão (KLOPFENSTEIN, 1985).

Diante do exposto e sabendo que a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados tem grande impacto na qualidade do biodiesel, o alto teor de STA, tais como o ácido mirístico (C14:0) e o ácido palmítico (C16:0) obtidos em nosso estudo poderiam tornar os óleos derivados da biomassa de *K. flaccidum* cultivada

em vinhaça aplicáveis à produção de biodiesel. Portanto, é de grande importância conhecer os perfis dos FAME's das microalgas que crescem no meio de águas residuais, pelo seu potencial como matéria-prima para o biodiesel, bem como para a utilização de sua biomassa como matéria-prima para a produção de outros produtos de alto valor.

7.6 Remoção de nutrientes

No final do experimento, no 21º dia, após a retirada da biomassa microalgal, a composição residual dos meios de cultivo foi avaliada em relação aos teores de nitrogênio total (N), fósforo total (P), nitrogênio amoniacal (NH_4^+), ortofosfato (PO_4^{-3}), potássio (K), DBO e DQO para avaliação do efeito biorremediador da microalga nos tratamentos com 10%, 20% e 30% de vinhaça. Os dados da Tabela 5 mostram que houve decréscimo na concentração dos nutrientes, provavelmente devido ao consumo pela microalga presente nos cultivos.

Tabela 5. Percentual de remoção de nutrientes (N – nitrogênio, P – fósforo, NH_4^+ - nitrogênio amoniacal, PO_4^{-3} – ortofosfato e K – potássio) no final dos cultivos nos diferentes tratamentos (10%, 20% e 30% de vinhaça).

	% remoção N - total	% Remoção P-total	% Remoção NH_4^+	% Remoção PO_4^{-3}	% Remoção K
10%	78,42 ^b	9,67 ^b	91,70 ^a	14,51 ^b	42,51 ^b
20%	90,07 ^a	29,08 ^a	97,27 ^a	31,68 ^a	67,21 ^a
30%	91,58 ^a	34,02 ^a	96,94 ^a	40,17 ^a	51,18 ^a

Valores expressos em média \pm erro padrão. Valores seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukeyi ($p < 0.05$).

Em termos de remoção de nitrogênio e fósforo, o cultivo de *K. flaccidum* em vinhaça apresentou maior eficiência de remoção de nitrogênio (> 90%) se comparado ao valor obtido para o P (> 34,02%). Os percentuais de remoção de P foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos tratamentos 20% e 30% quando comparados ao tratamento 10%, onde os suprimentos de N eram menores. Em relação às formas iônicas de P (P-PO_4^{-3}) e N (N-NH_4^+) prontamente disponíveis para assimilação da microalga, os resultados demonstraram remoção acentuada de N-NH_4^+ para todos os tratamentos, cujos percentuais foram superiores a 91%.

O tratamento com 30% de vinhaça apresentou redução média de $P-PO_4^{-3}$ de 40%, sendo o tratamento que mais se destacou em termos de remoção deste nutriente.

As microalgas requerem grandes quantidades de nitrogênio e fósforo para seu crescimento (RENUKA *et al.*, 2013) o que significa que esses microrganismos podem assimilar efetivamente o nitrogênio e o fósforo das águas residuais. É sabido que, a assimilação de nutrientes em algas ocorre através do transporte ativo de íons através da membrana celular; logo, são necessárias proteínas de transporte que dependem da disponibilidade de nitrogênio no meio de crescimento (PERINI E BRACKEN, 2014). Dessa forma, a remoção de P está associada à remoção de N através de seus respectivos papéis no metabolismo celular (LOLADZE; ELSER, 2011). Isso implica que, uma alta concentração de N nas águas residuais é um pré-requisito para a remoção efetiva de P (BEUCKELS, 2015). Portanto, as menores reduções de P- total (9,67%) e PO_4^{-3} (14,51%) no tratamento 10% podem ser resultado da menor disponibilidade de nitrogênio no meio.

Em geral, águas residuais municipais apresentam níveis elevados de nitrogênio e fósforo em sua composição e o descarte contínuo e sem tratamento adequado pode causar sérios problemas de poluição. Devido a isso, a remoção de nutrientes de águas residuais urbanas a partir do cultivo de microalgas tem sido amplamente relatada na literatura. Znad e colaboradores (2018) investigaram a remoção de nutrientes em três diferentes águas residuais municipais por *Chlorella vulgares* e obtiveram remoção de N e P de 80% e 100% respectivamente. Resultados semelhantes foram descritos por Singh e colaboradores (2017) para quatro espécies de microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella sp.*, *Parachlorella kessleri-I* e *Nannochloropsis gaditana*), as quais foram avaliadas quanto à fitorremediação de água residual municipal e uso potencial para a produção de biodiesel. Entre as quatro linhagens testadas, *P. kessleri-I* removeu eficientemente todos os nutrientes com uma taxa de remoção de até 98% para fosfato após 10 dias de crescimento em 100% de efluente. Caporgno *et al.*, (2015) reportaram a possibilidade de crescimento de *Chlorella kessleri* e *Chlorella vulgares* em águas residuárias urbanas, atingindo redução de nitrogênio em torno de 96% e 95%, e redução da concentração de fósforo em torno de 99% e 98%, respectivamente.

Dentre as pesquisas com vinhaça, destaca-se a de Marques e colaboradores (2013) que testaram o potencial da vinhaça tratada anaerobicamente como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo da microalga *C. vulgaris*. A remoção total de NH_4 e PO_4 foi registrada no cultivo com 100% do efluente. No estudo de Valderrama e colaboradores (2002), os autores investigaram o crescimento de *C. vulgares* em vinhaça combinada com outros dois efluentes. A microalga demonstrou ser eficaz na remoção de NH_4 (60 a 78%) e a remoção de fosfato (média 28%) se assemelha com os resultados obtidos em nosso estudo. Resultados satisfatórios foram obtidos para *S. obliquus* cultivada em águas residuárias agroindustriais altamente contaminadas da indústria avícola; os autores obtiveram resultados semelhantes aos desta pesquisa, cuja remoção de nitrogênio amoniacal foi superior a 97% (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

A remoção de nitrogênio e fósforo em águas residuais ocorre principalmente na fase de tratamento terciário (GONÇALVES *et al.*, 2018). Os métodos mais comumente utilizados incluem processos biológicos, como digestão anaeróbica seguida de nitrificação e desnitrificação (QUEIROZ *et al.*, 2007). O uso de microalgas é vantajoso porque gera menos poluentes do que os processos químicos conhecidos, permitindo ainda redução dos custos de operação (GORDON; SECKBAC, 2012). A redução significativa de nutrientes também foi observada por outros autores (RUIZ-MARIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016; PENA *et al.*, 2017; LABBÉ *et al.*, 2017; CHEAH *et al.*, 2018) corroborando a ideia de utilizar o cultivo de microalgas como um processo terciário de tratamento de efluentes.

Nesta pesquisa, a remoção de potássio, elemento encontrado em elevada concentração no efluente, foi mais eficiente no tratamento com 20% de vinhaça, no qual o percentual de remoção deste elemento chegou a 67%. Esse resultado é particularmente interessante, uma vez que essa redução pode vir a minimizar os problemas com a fertirrigação. Segundo Mariano e colaboradores (2009) a prática prolongada da fertirrigação aumenta a concentração de cálcio, magnésio, matéria orgânica e potássio, elevando a condutividade elétrica e a salinização do solo, podendo ainda promover a contaminação do lençol freático (Silva *et al.*, 2007).

A eficiência de remoção deste elemento também foi avaliada no trabalho realizado por Candido e colaboradores (2016), os quais destacaram o uso da

vinhaça no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em consórcio com organismos heterotróficos, o que resultou na diminuição de compostos orgânicos e de elementos minerais no resíduo. Além disso, os autores chamaram a atenção para a redução do potássio em até 25% em relação aos meios antes dos cultivos. Esse comportamento também foi observado por Bonini (2012), que demonstrou a possibilidade de utilização da vinhaça como meio de cultivo para a cianobactéria *Aphanothece microscópica* e *Chlorella vulgaris*. Neste estudo verificaram-se remoções de 13% de potássio para a cianobactéria, e 13,8% para a *C. vulgaris*.

Em relação ao cálcio e magnésio, ao contrário dos demais nutrientes, os resultados da caracterização dos meios após a retirada da biomassa apresentou aumento desses elementos. De modo semelhante, Candido e colaboradores (2016) e Selesu (2015) reportaram o aumento de alguns nutrientes em suas culturas microalgais e atribuíram essa variação à morte celular e à secreção de metabólitos secundários pelas microalgas, o que pode ser estendido aos dados aqui apresentados.

O cultivo de microalgas combinado com a utilização de vinhaça oferece um passo interessante para o tratamento de águas residuais provenientes de indústrias sucroalcooleiras. Desse modo, o processo tornasse-a economicamente mais viável, possibilitando a produção de biomassa destinada a diversas aplicações, possibilitando ainda a biorremediação desse efluente e a mitigação dos impactos ambientais.

8. CONCLUSÕES

Este estudo buscou fornecer estratégia eficaz do uso da vinhaça como meio de cultivo alternativo para a microalga *Klebsormidium flaccidum* objetivando a produção de biomassa, alto rendimento lipídico e reuso do efluente. Por meio dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O uso da vinhaça como meio alternativo de cultivo não se mostrou tão interessante em relação ao crescimento microalgal quando comparado ao cultivo com meio de cultura sintético, cuja densidade celular ($7,8 \times 10^6 \text{cél.mL}^{-1}$) foi superior em relação a todos os tratamentos. Todavia, ainda que a microalga tenha apresentado crescimento reduzido, os cultivos com 10%, 20% e 30% de vinhaça apresentaram densidade celular na ordem de 10^6cél.mL^{-1} .

- O tratamento com 20% de vinhaça foi à cultura que proporcionou maior taxa de crescimento (0.17 d^{-1}), menor tempo de duplicação (4.3 d) da população e o 2º maior valor em termos de rendimento máximo ($1,3 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$).
- O tratamento 30% foi à condição otimizada que gerou maior teor de biomassa no 5º dia de cultivo ($0,486 \text{ g.L}^{-1}$), valor superior ao registrado pelo controle no mesmo período.
- Em relação às concentrações de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e carotenoides), os tratamentos com vinhaça não alcançaram valores expressivos (maiores valores registrados no tratamento 20%, $1,71 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,80 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente) em termos de conteúdo para fins comerciais.
- Com relação ao perfil de FAME, a biomassa dos cultivos apresentou alto teor de ácidos graxos saturados, como o ácido mirístico e o ácido palmítico, o que poderia tornar os óleos derivados da biomassa de *K. flaccidum* cultivada em vinhaça aplicáveis à produção de biodiesel. Entretanto, para a produção economicamente viável é necessário alto rendimento lipídico, o que difere dos resultados obtidos nesta pesquisa.
- No que diz respeito à composição bioquímica da biomassa produzida, o teor de proteínas e lipídeos diminuiu à medida que houve aumento da concentração de vinhaça nos meios. Desse modo, a utilização da biomassa produzida pelo cultivo no efluente avaliado deve ser direcionada a outro aproveitamento que não a produção de biodiesel. Em contrapartida, a biomassa apresentou-se rica em carboidratos, o que sugere a sua aplicação como matéria-prima potencial para a produção de bioetanol. Esse resultado é promissor, pois demonstra a capacidade da microalga *K. flaccidum* em se desenvolver em um meio de cultivo turvo, ácido e alternativo como a vinhaça, que além de proporcionar incremento de biomassa favorável, considerando uma produção em escala industrial, iria baratear os custos de produção.
- O cultivo de *K. flaccidum* em vinhaça demonstrou eficiência na remoção de nutrientes, tais como nitrogênio amoniacal e ortofosfato, com percentuais de remoção próximos a 97,27% e 40,17% respectivamente, proporcionando redução da carga poluente da vinhaça, minimizando assim possíveis impactos ambientais. Além disso, a elevada capacidade de remoção do potássio (67%,

no tratamento 20%) mostrou-se interessante, uma vez que essa redução pode vir a minimizar os problemas com a fertirrigação.

- Este estudo mostrou o potencial de *K. flaccidum* cultivada em vinhaça para a produção de biomassa rica em carboidratos e remoção simultânea de nutrientes (principalmente NH_4^+ , PO_4^{3-} , e k), ligando o processo de tratamento de águas residuais com a produção de biocombustíveis. Portanto, espera-se que as informações geradas nesta pesquisa possam agregar conhecimento ao desenvolvimento de tecnologias para produção sustentável e de baixo custo de biocombustíveis de terceira geração e biorremediação de efluentes industriais.

9. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I.B.M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.19, n.3, 257-275, 2012.

ALMEIDA, L.T.; SANTOS, Z.N.E. Etanol: impactos socioambientais de uma commodity em ascensão. In: VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica, 2007, Fortaleza/CE. **Anais eletrônicos do VII Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 2007. Disponível em: <<http://www.ecoeco.org.br>> Acesso em: out. 2018.

ALVARENGA, R.P.; QUEIROZ, T.R. Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. São Paulo. 2º International Workshop Advances Cleaner Production. **Key Elements for a sustainable world: energy, water and climate change**, 2009. Disponível em<<http://www.advancesincleanerproduction>>Acesso em: jun. 2018.

AMBATI, R.R ; PHANG, S.M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R.G. .Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications. **Mar Drugs**, v. 1, n. 12, p. 128-152. 2014.

BENEMANN, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. *Energies*. V.6, p. 5886-5886, 2013.

BEN-AMOTZ, A.; J. PHYCOL. Effect of low temperature on the stereoisomer composition of b carotene in the halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* (Chlorophyta). **Journal of phycology**, v. 32, n.2, p. 272, 275. 1996.

BEN-AMOTZ, A. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. **Annual Review of Microbiology**, n. 37, p. 95-119. 1983.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Review: microalgae biotechnology, Curitiba: **Digital library of journals**, v. 26, n. 1, p. 9-20. 2008.

BETTANI, S.R.; DE OLIVEIRA, R. G.; SANTOS, N. L.; KIECKBUSCH, T. G.; BASTOS, R.G.; SOARES, M.R.; DA SILVA, M.A. Sugarne Vinasse and Microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate Polymers**. v. 203, p. 322-330, 2018.

BEUCKELS, A.; SMOLDERS, E.; MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. **Water Research**, v. 77, p. 98-106, 2015.

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

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil**: chave para Identificação e Descrições. São Carlos: Rima. 580p. 2006.

BICUDO, C.E.M.; PEREIRA, F.C. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 16: Chlorophyceae (Ulotrichales). **Hoehnea**, v. 30, p. 31-37, 2003.

BRASIL, B.S.A.F.; SILVA, F.C.P.; SIQUEIRA, F.G. Microalgae biorefineries scenario in perspective. *New Biotechnology*. **New Biotechnology**, 2016.

BOAMAR, P.F.A. Combustíveis Automotivos – Especificações Técnicas, Tributos e Legislação. Florianópolis. **Insular**, 832p. 2010.

BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscópica* Nägele e *Chorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça. **Dissertação de mestrado do Programa de Biotecnologia** da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Araras / SP, p. 96 . 2012.

BORGES, L. V.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. O. V. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um mecanismo de Desenvolvimento limpo. **Revista Atlântica**, Rio Grande, v. 29, p. 35 – 46, 2007.

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

CALIXTO, C.D.; DA SILVA SANTANA, J.K.; DE LIRA, E. B.; SASSI, P. G.P.; ROSENHAIM, R.; DA COSTA SASS, C.F.; DA CONCNEIÇÃO, M.M. SASSI, R. Biochemical compositions and fatty acid profiles infour species of microalgae

cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438–446, 2016.

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

CAPORGNO, M. P.; TALEB, A.; OLKIEWICZ, M.; FONT, J.; PRUVOST, J.; LEGRAND, J.; BENGGOA, C. Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. **Algal Research**, v. 10, p. 232–239, 2015.

CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T.L.; DIAS, M.O.S.; JESUS, C.D.F.; MANTELATTO, P.E.; CUNHA, M.P.; FRANCO,H.C.J.; CARDOSO, T.F.; MACIEL—ILHO, R.; ROSSELL, C.E.V.; BONOMI, A. Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 14, p. 399-410, 2012.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CETESB. Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 2006.

CHAVEZ-RODRIGUES, M.F.; MOSQUEIRA-SALAZAR, K.J.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A. Water reuse and recycling according to stream qualities in sugar–ethanol plants. **Energy Sustain. Dev.** 17 (5), 546–554, 2013.

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

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIRA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI, C.S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, 2752-2761, 2013.

CHEN, C. Y.; ZHAO, X. Q.; YEN, H.W.; HO, S. H.; CHENG, C.L.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

CHEAH, W. Y.; LING, T. CH; SHOW, P. L.; JUAN, J. CH.; CHANG, J. S. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. **Applied Energy**, v. 179, p. 609-625, 2018.

COCA, M.; BARROCAL, VM.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, MT. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Histórico da Safra de cana-de-açúcar** 2018/2019. SUREG: Espírito Santo, 2018.

CORTEZ, L.; MAGALHÃES, P.; HAPP, J. Principais subprodutos da agroindústria canavieira e sua valorização. **Revista Brasileira de Energia**, v. 2, p. 111-146, 1992.

CRUZ, I.; ANDRADE. Gestão ambiental ISO 14001 nas indústrias sucroalcooleiras em Sergipe. **Interfaces Científicas - Exatas e Tecnológicas**. Aracaju, v.2, N.2, p. 71 – 82. Out. 2016.

DE AZEREDO, V. B. S. Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil. 2012. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

DE LA NOUE, J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. **Biotechnol Adv**, v. 6, p. 725–770, 1988.

DEAN, AP.; ESTRADA B. ; NICHOLSON, JM.; SIGEE, D. C. Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to differing concentrations of phosphorus: a combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. **Phycol. Res.** v. 56, p. 193–201, 2008.

D’ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, 832–841, 2016.

DERNER, R. B.; OSHE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DIAS, M.O.S.; FILHO, R.M.; MANTELATTO, P.E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C.E.V.; BONOMI, A.; LEAL, M.R.L.V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Management**, v.15, p. 35-51, 2015.

DISMUKES, G.C. ; CARRIERI, D.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, n.19, p. 235-240, 2008.

ELLIS, J.; HENGGE, N. R.; SIMS, C. Acetone, butanol, and ethanol production from wastewater algae, *Bioresour. Technol.* v. 111, p. 491–495. 2012.

ENGIN, I.K.; CEKMECELIOGLU, D.; YUCEL, A.M.; OKTEM, H.A. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 251, 128–134, 2018.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONATO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE,G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasse: characterization and treatments. *Waste Manage.* 29, 1235–1250, 2011.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 3. Ed. Rio de janeiro: Interciência. 2011.

FERNANDEZ-LINARES, L.C.; BARAJAS, C.G.; PÁRAMO, E.D.; CORONA, A.B. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium, **Bioresource Technology**. v.244, p.400-406, 2017.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B.; NICOHELLI. Vinhaça de cana-de-açúcar. **Série Engenharia Agrícola**, v. 1. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203p.

FOGG, G. E.; THAKE, B. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. 1965.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Bioenergy from stillage anaerobic digestion to enhance the energy balance ratio of ethanol production. **Environmental Management**, v. 162, p. 102-114. 2015.

GARCÍA, A. O; ROJAS, C. A. C. Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 3-13, 2006.

GIANCHINI, C. F.; FERRAZ, M. V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar. Revisão de Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, 15. 2009.

GOES, T.; MARRA, R.; SILVA, G. **Setor sucroalcooleiro no Brasil: situação atual e perspectivas**. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, n. 2, p. 39-51, 2008.

GUPTA, P. L.; CHOI, H.J.; PAWAR, R. R.; JUNG, S. P.; LEE, S.M. Enhanced biomass production through optimization of carbon source and utilization of wastewater as a nutrient source. **Journal of Environmental Management**, v. 184, p. 585–595, 2016.

HANNON, K.; TRENKLE, A. Evaluation of condensed molasses fermentation solubles as a nonprotein nitrogen source for ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2634–2641, 1990.

HO, S. H.; CHEN, C.Y.; CHANG, J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresour. Technol**, v. 113, p. 244–252, 2012.

HUO, Y.X.; CHO, K.M.; RIVERA, J.G.L. MONTE, C.R.; SHEN, Y.J.; YAN, J.C. Conversion of proteins into biofuels by engineering nitrogen flux, **Nat. Biotechnol**, v. 29, P. 346–351, 2011.

INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural. Disponível em: <http://incaper.es.gov.br/>. Acesso em: 22 de set. de 2016.

JIANG, Y.; WANG, H.; ZHAO, C.; HUANG, F.; DENG, L.; WANG, W. Establishment of stable microalgal-bacterial consortium in liquid digestate for nutrient removal and biomass accumulation, **Bioresource Technology**. v. 268, p. 300-307, 2018

JUNQUEIRA, C.A.R.; JUNIOR, V.E.M.; LOSSARDO, L.F.; FELICIO. B.C.; JUNIOR, O.M.; FOSCHINI, R.C.; MENDES, R.M.; LORANDI, R. Identificação do potencial de contaminação de aquíferos livres por vinhaça na bacia do Ribeirão do Pântano, Descalvado (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**. São Paulo, v. 39 (3), 2009.

KADIOGLU, A.; ALGUR, O.F. The effects of vinasse on the growth, biomass, and primary productivity in pea (*Pisum sativum*) and sunflower (*Helianthus annuus*). **Agr Ecosyst Environ.** V. 39, p.139-144, 1992.

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

KLOPFENSTEIN, W.E. J. **American Oil Chemists' Society**, v. 62, p. 1029- 1031, 1985.

LAURENS, L. M. L.; CHEN-GLASSER, M.; MCMILIAN, J.D. A perspective on renewable bioenergy from photosynthetic algae as feedstock for biofuels and bioproducts. **Algal Research** 2017, 24, 261.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. **Photosynth Res.**, v. 106, p. 155-177, 2010.

LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 5138–5144, 2011.

LIM, S., CHU, W., PHANG, S. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **J. Bioresour. Technol.** v. 101, p. 7314–7322, 2010.

LIMA, D.J.D. Elementos tecnológicos para aproveitamento da vinhaça. **Tecnologia em biocombustíveis.** Araçatuba, SP Brasil: Faculdade de Tecnologia de Araçatuba 2012.

LOPES, T. S. A.; SILVA, A. A.; SILVA, A. F. DANTAS, G. D.; FERREIRA, W.B. Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella* sp. **Revista Ciência e tecnologia**, v. 8, n. 33, p. 25-33, 2015. 2012.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e aplicações.** ed. 1, São Carlos: RiMa, 2006.

MATSUOKA, S; FERRO,J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular and Development Biology Plant, Raleigh**, v. 45, n. 3, p. 372-381, 2009.

MEDINA, G. B. Usos alternativos de las vinazas de acuerdo con su composición química. **Tecnicaña**, n. 17, v.9, p. 15-19, 2005.

MICHELLON, E.; SANTOS, A.L; RODRIGUES, A.L; RODRIGUES, J.R.A. Breve descrição do proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. **XLVI Congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**. Rio Branco, Acre, **SOBER**, 2015.

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J.; LAMSAL, B. 13. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, v. 1, p. 40-48, 2012.

MORAIS, B.S.; JUNQUEIRA, T.S.;PAVANELLO, L.G.; CAVALETT, O.; MATELATTO, P.E.; BONOMI , A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense. **Applied Energy**. v. 113, p. 825–835, 2014.

MORAES, M.L.; BACCHI, M.R.P. Etanol do início às fases atuais de produção. **Revista Política Agrícola**. Ano XXIII. v. 23, n.4, p. 1-18, 2014.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, A. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E.S. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44-49, 2014.

MOUCHET, P. Algal reactions to mineral and organic micropollutants, ecological consequences and possibilities for industrial scale application; a review. **Water Res**. v. 20, p. 399–412, 1986.

NICOHELLI, L.M.; NASCENTES, R.; LIMA, E.B.N.R.; SOARES, F.S.C. Sorção de potássio em amostras de solo submetidas à aplicação de vinhaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 16, n. 7, p. 754-760, 2012.

OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.1, p. 601-610, 1986.

OLIVEIRA, M. Production waste from ethanol may be used to produce biodiesel. **Pesquisa FAPES: energia**. Ed. 186. 2011.

OLIVEIRA, O.; GIANESELLA, S.; SILVA, V.; MATA, T.; CAETANO, N. Lipid and carbohydrate profile of a microalga isolated from wastewater. **Energy Procedia**, v. 136, p. 468–473, 2017.

PANIAGUA-MICHEL, J. Microalgal Nutraceuticals. **Handbook of Marine Microalgae**. p. 255–267, 2015.

PAGNANELLI F; ALTIMARI, P; TRABUCCO F; TORO L. **Mixotrophic growth of Chlorella vulgaris and Nannochloropsis oculata**: interaction between glucose and nitrate. **J Chem Technol Biotechnol**. n.89, p, 652–661, 2014.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Res**. n. 45, p, 11- 36, 2011.

POLISHCHUK, A.; VALEV, D.; TARVAINEN, M.; MISHRA, S.; KINNUEN, V.; ANTAL, T., YANG, B.; RINTALA, J.; TYYSTJARVI, E. Cultivation of Nannochloropsis for eicosapentaenoic acid production in wastewaters of pulp and paper industry. **Bioresour Technol**, 193, 469-476. 2015.

QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.Q; BASTOS R.G.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, **Bioresour Technol**. n. 98, p. 2163–2169, 2007.

RENUKA, N.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; PRASANNA, R. Nutrient sequestration, biomass production by microalgae and phytoremediation of sewage water. **International Journal of Phytoremediation**, v. 15, p. 789-800, 2013.

REVIERS, B. Biologia e Filogenia das Algas. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed, Porto Alegre, 280p. 2006.
RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, John Wiley & Sons, 2008.

RISMANI-YAZDI, H.; HAZNEDAROGLU, B. Z.; BIBBY, K.; PECCIA, J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalga *Dunaliella tertiolecta*:

Pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. 2011.

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

RODRIGUES, J.A.R. Do engenho à biorrefinaria. A usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p.1242-1254, 2011.

ROSSETTO, A. J. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: Paranhos, S.B. (ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas, **Fundação Cargill**, v.2, p.435-504, 1987.

RUIZ-MARIN, A.; ESPINOSA-MENDOZA, L.G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology.*, n. 101, p. 58-64, 2010.

SALOMON, K. R; LORA, E. E. S. Estimativa do potencial de geração de energia elétrica para diferentes fontes de biogás no Brasil. **Biomassa e Energia**, v.2, p.57-67, 2005.

SANTANA, H.; CEREIJO, C.R.; TELES, V.C.; NASCIMENTO, R.C.. FERNANDES, M.S.; BRUNALE, P.; CAMPANHA, R.C.; SOARES, I.P.; SILVA, F.CP.; SABAINI, P.S.; SIQUEIRA, F.G.; BRASIL, B.S.A.F. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2016.

SANTOS, F.S.; MILITÃO, F.P.; FERNANDES, V.O. Cultivo de microalgas: uma amostragem do banco de algas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais, UFES. In: 67º Encontro regional de botânica, 2016, Vitória, ES. ANAIS.

SELESU, N. F. H. Desenvolvimento do processo de produção de microalgas em fotobiorreator industrial usando efluente suíno biodigerido. **Dissertação do**

Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba / PR, p, 96. 2015.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC–UPF**, v. 4, p. 48-60, 2012.

SCHULTZ, N. Efeito residual da adubação em cana planta e adubação nitrogenada em cana de primeira soca com aplicação da vinhaça. 59f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo)** – Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SIAUT, M.S.; CUINE, C.; CAGNON, B.; FESSLER, M. NGUYEN,P.; CARRIER, A.; BEYLY, F.; BEISSON, C.; TRIANTAPHYLIDES, Y.; LI-BEISSON, G.; Peltier, Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves, **BMC Biotechnol**, v. 11, p.2 ,2011.

SILVA, A.S.; GRIEBELER, N.P.; BORGES, L.C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p. 108-114, 2007.

SINGH, A. K.; SHARMA, N.; FAROOQI, H.;ABDIN, M. Z.;MOCK, T.; KUMAR, S. . Phycoremediation of municipal wastewater by microalgae to produce biofuel. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, p. 805-812, 2017.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep. p. 72, 1995.

STEIN. J. Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. **Cambridge University Press**, p. 448, 1973.

WANG, Y.; GUO, W.; YEN, H.W.; HO, S.H.; LO, Y.C.; CHENG, C.L.; REN, N. CHANG, J.S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. **Bioresour Technol**, v.198. p, 619-625, 2015.

WANG, Y.; HO, S.H.; CHENG, C.L., GUO, W.Q.; NAGARAJAN,D.; LEE,D.J.; CHANG,J.S. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. **BioresourTechnology**. v. 222, p. 485-497, 2016.

WANG, Y. HO, S.H.; CHENG, C.L. NAGARAJAN, D. GUO, W.Q.; LIN, C.; LI, S.; REN, N.; CHANG, J.S. Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production, **Bioresource Technology**, v. 242, p. 7-14, 2017.

YE, Z.W.; JIANG, J.G.; G.H. WU, Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: **progresses and prospects**, **Biotechnol**, v. 26. p. 352, 360, 2008.

ZHANG, L.; CHENG J.; PEI, H.; PAN J.; JIANG, L.; HOU, Q.; HAN, F. Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 115, p. 276-287, 2018.

ZHENG,S.; HE, M.; JIANG, J.;ZOU, S.; YANG, W.;ZHANG, Y.;WANG,C. Effect of kelp waste extracts on the growth and lipid accumulation of microalgae. **Bioresource Technology**, n. 201. P. 80–88, 2016.

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

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química Nova*, v.33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.