UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RAQUEL REZENDE DOS SANTOS

CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS:
uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal

RIO DE JANEIRO

2017

RAQUEL REZENDE DOS SANTOS

CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS:

uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: José Luiz de Medeiros

Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo

Ricardo Moreira Chaloub

Rio de Janeiro

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Raquel Rezende.
Cultivo Cíclico em Duas Etapas: uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal /Raquel Rezende dos Santos. – 2017.
148 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Rio de Janeiro, 2017.

Orientadores: José Luiz de Medeiros, Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo e Ricardo Moreira Chaloub

1. Microalga 2. Vinhaça de cana-de-açúcar 3. Carbono inorgânico dissolvido 4. Cultivo Cíclico em Duas Etapas.

I. Medeiros, José Luiz de (Orientador). II. Araújo, Ofélia de Queiroz Fernandes (Orientadora). III. Chaloub, Ricardo Moreira (Orientador). IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. V. Cultivo Cíclico em Duas Etapas: uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal.

RAQUEL REZENDE DOS SANTOS

CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS:

uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado por

(Márcia M. Machado Gonçalves, D.Sc., Instituto de Química, UERJ)

(Cristina A. Gomes Nassar, D.Sc., Instituto de Biologia, UFRJ)

(Sandra M. F. de Oliveira e Azevedo, D.Sc., Instituto de Biofísica, UFRJ)

(Magali Christe Cammarota, D.Sc., Escola de Química, UFRJ)

(Melissa L. Estrada Gutarra, D.Sc., Escola de Química, UFRJ)

"Por isso mesmo, empenhem-se para acrescentar à sua fé a virtude; à virtude o conhecimento."

2 Pedro 1:5

"Adquire sabedoria, adquire inteligência, e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca."

Provérbios 4:5

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Ele, autor e consumador da minha fé. Obrigada meu Deus por direcionar minha vida, pelo seu cuidado e sustento do início ao fim deste trabalho, por fazer infinitamente mais do que eu poderia imaginar. Ebenézer, até aqui me ajudou o Senhor!

Ao meu marido Leonardo Santos. Sou grata por absolutamente tudo que você faz por mim. Obrigada pelo seu amor e cuidado, por enxugar as minhas lágrimas, por crescer e sonhar comigo, pela companhia no laboratório aos finais de semana e feriados, pela ajuda no programa MATLAB.

Aos meus pais, Denise e Salvador Rezende, e ao meu irmão Daniel Rezende. Obrigada por me amarem incondicionalmente, por todo investimento que fizeram em mim, por acreditarem em mim, por me sustentarem em oração. Vocês são os meus maiores exemplos. Jamais conseguirei agradecê-los da maneira que merecem.

Às minhas amigas de todas as horas. Obrigada Joice Gonçalves pelas palavras de ânimo e pelos imensuráveis *happy hour* no shopping para relaxar. Obrigada Ingrid Medeiros pelas palavras de encorajamento ao ouviu os meus lamentos. Obrigada Juliana Leite por ser mais que uma companheira de trabalho no H2CIN, por dividir comigo tantas reflexões científicas e religiosas, por compartilhar momentos pessoais.

Aos meus orientadores Ofélia Araújo, José Luiz e Ricardo Chaloub. Obrigada pela orientação sempre presente ao longo desses quatro anos, pela prontidão em me ajudar, pela confiança depositada em mim e pelos conselhos fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos companheiros de trabalho no H2CIN. Obrigada Luiz Carlos pela disposição em ir ao município de Campos dos Goytacazes coletar vinhaça. Obrigada Rui Castro pela ajuda nas análises de proteína e cromatografia de íons.

À equipe administrativa e técnica do laboratório H2CIN. Obrigada Carla Meneguci e Antônio Avanide por serem solícitos aos meus inúmeros pedidos, por agilizarem minhas solicitações de compra e pagamento e pelos momentos de descontração na rotina do laboratório. Obrigada Wagner Costa e Thiago Alves pelo auxílio na construção da estante de cultivo e nas instalações elétricas.

Às alunas de iniciação científica Bruna Beck e Gabriela Bouça pela assistência nos incalculáveis experimentos. Ao professor Armando Vieira (USFcar) pela gentileza na doação das cepas de microalgas. À usina Coagro (Campos dos Goytacazes/RJ) pela presteza no

fornecimento da vinhaça. À equipe do laboratório de Tecnologia Ambiental (EQ/UFRJ) pela colaboração nas análises de DBO, DQO e nitrogênio amoniacal.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela contribuição direta e indireta no trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

RESUMO

Santos, Raquel Rezende. **Cultivo Cíclico em Duas Etapas:** uma estratégia visando a utilização de vinhaça e CO_2 para obtenção de biomassa microalgal. Rio de Janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2017.

Com a perspectiva de aumento substancial da produção de vinhaça e CO_2, e tendo em vista o controle sobre a disposição desses resíduos, faz-se necessária a busca por tecnologias que visam redirecionar os mesmos para outros processos industriais de modo a agregar valor econômico. Nesse sentido, o uso de vinhaça como substrato no cultivo microalgal tem se mostrado uma alternativa promissora, uma vez que possibilita a biofixação de CO_2 durante o processo de fotossíntese proporcionando a obtenção de biomassa rica em biomoléculas de interesse comercial. Assim, o presente trabalho teve como objetivo averiguar a possibilidade de produzir biomassa microalgal na presença de vinhaça de cana-de-açúcar. Inicialmente, foi acompanhado o crescimento celular de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina maxima* sob condições heterotrófica, mixotrófica e autotrófica em meio de cultura suplementado com vinhaça. Sendo *S. maxima* mais propícia ao tratamento de vinhaça, o Cultivo Cíclico em Duas Etapas empregando condição autotrófica durante a fase clara do fotoperíodo (12 h) e condição heterotrófica durante a fase escura (12 h) foi definido como a estratégia mais promissora visando o tratamento de vinhaça, o consumo de CO_2 e a produção de biomassa. Sob condição heterotrófica, a injeção fracionada de vinhaça minimiza a inibição por substrato. Já na fase autotrófica, a assimilação de CO_2 foi determinada pelos níveis de carbono inorgânico dissolvido, pela concentração celular e pela taxa de crescimento. Por fim, a otimização das concentrações de carbono demonstrou máxima taxa específica de crescimento em cultivo utilizando entre 3-4,5% v/v de vinhaça e 6,81 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$. Sob essas condições foram obtidas taxas de crescimento entre 1,18-1,62 d^{-1} e 151,9 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ de máxima produtividade em biomassa com 72,2% de teor proteico. O consumo da matéria orgânica presente na vinhaça foi observado pela redução de 67% da demanda química de oxigênio.

Palavras-chave: Microalga, Vinhaça de cana-de-açúcar, Carbono inorgânico dissolvido, Cultivo Cíclico em Duas Etapas.

ABSTRACT

Santos, Raquel Rezende. **Cyclic Two-Stage Cultivation:** a strategy aiming the use of vinasse and CO_2 to obtain microalgal biomass**.** Rio de Janeiro, 2017. Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2017.

Given the substantial increase of the vinasse and CO_2 production, and in view of the increased control over disposal of these residues, it is necessary to search for technologies that aim to redirect them to other industrial processes aiming at adding economic value. In this sense, use of vinasse as substrate in microalgae cultivation has been shown to be a promising alternative, as it enables CO_2 biofixation during photosynthesis process providing biomass rich in biomolecules of commercial interest. Therefore, the present work investigated the possibility to produce microalgae biomass in the presence of sugarcane vinasse. Initially, the cellular growth of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* under heterotrophic, mixotrophic and autotrophic conditions at culture media supplemented with vinasse was monitored, being *S. maxima* more propitious to vinasse treatment and used thereafter. Cyclic Two-Stage Cultivation with autotrophic condition during light phase of the photoperiod (12 h) and heterotrophic condition during dark phase (12 h) was defined as promising strategy for vinasse treatment, CO_2 consumption and biomass production. Under heterotrophic condition, fractional injection of vinasse minimized inhibition by substrate. In the autotrophic phase, CO_2 assimilation was determined by dissolved inorganic carbon levels, cellular concentration and growth rate. Lastly, optimization of carbon concentration demonstrated maximum specific growth rate using between 3-4.5% v/v vinasse and 6.81 $g.L^{-1}$ $NaHCO_3$. These conditions resulted in growth rate between 1.18-1.62 d^{-1} and maximum biomass productivity of 151.9 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ with 72.2% of protein content. Organic matter consumption into the vinasse was observed by 67% reduction in Chemical Oxygen Demand.

Keywords: Microalgae, Sugarcane vinasse, Dissolved inorganic carbon, Cyclic Two-stage cultivation.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 ---------- *1*
1.1 INTRODUÇÃO ---------- **1**
1.2 OBJETIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO ---------- **3**
CAPÍTULO 2 ---------- *4*
2.1 MICROALGAS ---------- **4**
2.1.1 FOTOSSÍNTESE ---------- 5
2.1.2 CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA ---------- 9
2.1.2.1 FONTE DE CARBONO ---------- 10
2.1.2.2 FATORES AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NO CULTIVO ---------- 11
2.1.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO ---------- 12
2.1.3.1 INDÚSTRIA NUTRACÊUTICA ---------- 14
2.1.3.2 INDÚSTRIA COSMECÊUTICA ---------- 15
2.1.3.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES ---------- 16
2.1.3.4 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS ---------- 17
2.1.4 ESPÉCIES DE INTERESSE COMERCIAL ---------- 20
2.1.4.1 GÊNERO CHLORELLA ---------- 21
2.1.4.2 GÊNERO SPIRULINA ---------- 22
2.2 RESÍDUOS PROVENIENTES DA INDÚSTRIA DE BIOETANOL ---------- **23**
2.2.1 DIÓXIDO DE CARBONO ---------- 24
2.2.1.1 TRATAMENTO E DESTINAÇÃO ---------- 25
2.2.2 VINHAÇA ---------- 26
2.2.2.1 TRATAMENTO E DESTINAÇÃO ---------- 27
2.3 JUSTIFICATIVA ---------- **29**
CAPÍTULO 3 ---------- *31*
3.1 MICROALGAS E MEIOS DE CULTURA ---------- **32**
3.2 VINHAÇA E CARACTERIZAÇÃO ---------- **33**
3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO ---------- **35**
3.3.1 ESCOLHA DA MICROALGA E DA ESTRATÉGIA DE CULTIVO MAIS PROMISSORA --- 35
3.3.1.1 CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS ---------- 36
3.3.2 FORNECIMENTO DE CARBONO ORGÂNICO E NÍVEL DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO ---------- 37
3.3.2.1 INJEÇÃO DE VINHAÇA ---------- 38
3.3.2.2 INJEÇÃO DE CO_2 ---------- 38
3.3.2.3 CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^- ---------- 38
3.3.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA ---------- 39
3.3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO ---------- 40
3.3.3.1 MODELO, ANÁLISE ESTATÍSTICA E VALIDAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA ---------- 41
3.3.3.2 CONSUMO DA MATÉRIA ORGÂNICA PRESENTE NA VINHAÇA ---------- 42

3.3.4 PARÂMETROS DO CULTIVO ----------43
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA PRODUZIDA----------44
3.4.1 CARBOIDRATOS TOTAIS ----------44
3.4.2 PROTEÍNAS TOTAIS ----------44
3.4.3 LIPÍDIOS TOTAIS ----------44
3.4.4 CINZAS----------45
3.5 CULTIVOS UTILIZANDO LUZ SOLAR----------45
3.6 SEPARAÇÃO DE BIOMASSA POR MEIO DA FLOCULAÇÃO ----------46
CAPÍTULO 4 ----------48
4.1 ESCOLHA DA MICROALGA E DA ESTRATÉGIA DE CULTIVO MAIS PROMISSORA 48
4.1.1 CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS ----------52
4.2 FORNECIMENTO DE CARBONO ORGÂNICO E NÍVEL DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO ----------56
4.2.1 INJEÇÃO DE VINHAÇA ----------57
4.2.2 INJEÇÃO DE CO_2 ----------59
4.2.3 CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^- ----------63
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO----------66
4.3.1 CONSUMO DA MATÉRIA ORGÂNICA PRESENTE NA VINHAÇA ----------74
4.4 CULTIVOS UTILIZANDO LUZ SOLAR----------75
4.5 SEPARAÇÃO DE BIOMASSA POR MEIO DA FLOCULAÇÃO ----------78
CONCLUSÕES & RECOMENDAÇÕES ----------83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ----------85
APÊNDICE ---------- 107
LEGISLAÇÃO SOBRE A VINHAÇA ---------- 107
FIGURAS & TABELAS COMPLEMENTARES ---------- 113
PUBLICAÇÕES NO TEMA ---------- 126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade microalgal 5

Figura 2. Estrutura do fotossistema II em cianobactérias e microalgas eucarióticas. Heterodímeros *D1*/*D2* cercados por outras subunidades citocromos 7

Figura 3. Transferência de elétrons e constituintes redox dos fotossistemas II e I em cianobactérias 8

Figura 4. Biorrefinaria de microalgas. 18

Figura 5. Microscopia de *Chlorella vulgaris* 22

Figura 6. Microscopia de *Spirulina maxima* 23

Figura 7. Fluxograma das principais etapas realizadas no presente trabalho. 31

Figura 8. Coleta da vinhaça na Usina Coagro 33

Figura 9. Cultivo microalgal em garrafas do tipo pet cristal. 36

Figura 10. Cultivo microalgal iluminado por luz solar em período matutino às 16 h 46

Figura 11. Crescimento de *Chlorella vulgaris* sob diferentes regimes 48

Figura 12. Crescimento de *Spirulina maxima* sob diferentes regimes 50

Figura 13. Composição bioquímica da biomassa de *Spirulina maxima* obtida após 25 dias de cultivo sob diferentes regimes 50

Figura 14. Meios de cultura de *Spirulina maxima* sob diferentes momentos e regimes 51

Figura 15. Crescimento de *Spirulina maxima* em cultivo semicontínuo 52

Figura 16. Crescimento de *Spirulina maxima* em cultivo semicontínuo com intervalos autotróficos 53

Figura 17. Valores de pH no meio de cultura durante os Ciclos e intervalos de CCDE 54

Figura 18. Luminosidade estimada na superfície externa das garrafas de cultura durante os Ciclos e intervalos de CCDE 54

Figura 19. Composição bioquímica da biomassa de *Spirulina maxima* obtida no 7º dia (Ciclo I), 19º dia (Ciclo II) e 29º dia de cultivo (Ciclo III) 55

Figura 20. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH nos meios durante o CCDE com diferentes fornecimentos de vinhaça a 3% v/v durante a fase heterotrófica 57

Figura 21. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH em cultivos autotróficos aerados com ar comprimido enriquecido de CO_2 a 10% v/v em diferentes influxos 61

Figura 22. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH em cultivo autotrófico aerado com ar comprimido enriquecido de CO_2 a 10% v/v e inóculo de 0,45 $g.L^{-1}$ 62

Figura 23. Efeito da redução de HCO_3^- sobre (a) crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH no meio 64

Figura 24. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH no meio sob efeito da redução de HCO_3^- em CCDE com injeção fracionada de 3% v/v de vinhaça e influxo contínuo de CO_2 a 10% v/v. 65

Figura 25. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* durante os ensaios da metodologia de SR e (b) três repetições do ponto central 68

Figura 26. Histograma de distribuição de resíduos para respostas observadas e preditas 70

Figura 27. Matriz Variância-covariância para parâmetros do modelo e dados experimentais. 71

Figura 28. SR mostrando efeito interativo de vinhaça (X_1) e $NaHCO_3$ (X_2) sobre a máxima taxa específica de crescimento de *Spirulina maxima* durante CCDE 72

Figura 29. Remoção de matéria orgânica e íons no meio de cultura durante ensaios de validação da SR 75

Figura 30. Crescimento de *Spirulina maxima* sob luz solar 76

Figura 31. Valores da densidade de fluxo de fótons registrados ao longo do dia em (a) local iluminado com luz solar em período matutino e (b) local iluminado com luz solar em período matutino e vespertino. 77

Figura 32. Separação sólido-líquido de biomassa de *Spirulina maxima* na fase estacionária de crescimento 79

Figura 33. Separação sólido-líquido de biomassa de *Spirulina maxima* na fase exponencial de crescimento 81

Figura 34. Processo de flotação de *Spirulina maxima* na fase exponencial de crescimento mediada pela adição de NaOH 5 M durante 150 min 81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de microalgas cultivadas sob condições heterotróficas 10

Tabela 2. Potencial Biotecnológico de algumas biomoléculas obtidas de microalgas. 13

Tabela 3. Espécies de microalgas cultivadas comercialmente 21

Tabela 4. Composição química da vinhaça obtida de diferentes matérias-primas 27

Tabela 5. Parâmetros caracterizados na vinhaça bruta 34

Tabela 6. Configuração experimental e níveis das variáveis *input* da Metodologia SR 41

Tabela 7. Comparação dos resultados decorrentes da adição de carbono orgânico e inorgânico ao cultivo de *Spirulina maxima* 66

Tabela 8. Máxima taxa específica de crescimento analisada pela metodologia de SR: respostas observadas e preditas, limites de confiança e desvio padrão da resposta observada..... 67

Tabela 9. Demais variáveis *input* observadas: produtividade em biomassa, conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas 67

Tabela 10. Análise de variância do modelo. 69

Tabela 11. Teste de significância dos parâmetros do modelo. β_0 é um termo constante..... 69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS, UNIDADES E COMPOSTOS QUÍMICOS

Abreviatura/Sigla	**Descrição**
AA	*Arachidonic Acid* (ácido araquidônico)
APG	Ácido 3-fosfoglicérico
ALA	*γ-Linolenic Acid* (ácido γ-linolênico)
AO	Aiba & Ogawa
ATP	Adenosina Trifosfato
CCDE	Cultivo Cíclico em Duas Etapas
Chl	Clorofila
CHN	Carbono/Hidrogênio/Nitrogênio
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DHA	*Docosahexaenoic Acid* (ácido docosahexaenóico)
DHGLA	*Di-homo-σ-Linolenic Acid* (ácido di-homo-σ-linolênico)
DO	Densidade Óptica
DPA	*Docosapentaenoic Acid* (ácido docosapentaenóico)
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPA	*Eicosapentaenoic Acid* (ácido eicosapentaenóico)
ETA	*Eicosatetraenoic Acid* (ácido eicosatetraenóico)
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
GLA	*σ-Linolenic Acid* (ácido σ-linolênico)
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
GN	Gás Natural
GNV	Gás Natural Veicular
iNDC	*Intended Nationally Determined Contribution*
LA	*Linoleic Acid* (ácido linoléico)
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio- Fosfato
$NADP^+$	NADPH em sua forma oxidada
pH	Potencial Hidrogeniônico
FS I	Fotossistema I
FS II	Fotossistema II

PUFA	*Polyunsaturated Fatty Acid* (ácido graxo poli-insaturado)
RuBP	Ribulose-1,5-bifosfato
Ru-5P	Ribulose 5-fosfato
SDA	*Stearidonic Acid* (ácido estearidônico)
SR	Superfície de Resposta
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar
UTEX	*University of Texas at Austin*
UV	Radiação Ultravioleta
UV-B	Radiação Ultravioleta B
WC	*Water Culture*

Símbolo	**Descrição**
ºC	Graus Celsius
%	Percentual
v/v	Volume/volume
ω	Ômega
US$	Dólar americano

Unidade	**Descrição**
Atm	Atmosfera
mPa	Milipascal
ha	Hectare
m	Metro
m^2	Metro quadrado
m^3	Metro cúbico
dm^3	Decímetro cúbico
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
cm^3	Centímetro cúbico
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
nm	Nanômetro
L	Litro

mL	Mililitro
µL	Microlitro
kg	Quilograma
kgf	Quilograma força
g	Grama
mg	Miligrama
µg	Micrograma
M	Molar
mM	Milimolar
µmol	Micromol
cmolc	Centimolc
N	Normal
t	Tempo
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
d	Dia
g	Gravidade
kHz	Quilohertz
W	Watt
mW	Miliwatt
kWh	Quilowatt hora
kcal	Quilocaloria
Lx	Lux
mEq	Miliequivalente
µE	Microeinstein
mS	Milisiemens
ppm	Parte por milhão
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade formadora de colônia
tCO_2e	Tonelada de CO_2 equivalente
$GtCO_2e$	Gigatonelada de CO_2 equivalente

Composto Químico	**Descrição**
$AlCl_3$	Cloreto de alumínio
$Al_2(SO_4)_3$	Sulfato de alumínio
C	Carbono
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
$CaCl_2.2H_2O$	Cloreto de cálcio dihidratado
CH_4	Gás metano
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	Nitrato de cobalto hexahidratado
CO	Monóxido de carbono
CO_2	Dióxido de carbono
$CoCl_2.6H_2O$	Cloreto de cobalto hexahidratado
$CuSO_4.5H_2O$	Sulfato de cobre pentahidratado
Fe_3O_4	Óxido de ferro
$FeCl_3.6H_2O$	Cloreto férrico hexahidratado
$FeSO_4.7H_2O$	Sulfato férrico heptahidratado
H	Hidrogênio
H_2	Gás hidrogênio
H_2S	Ácido sulfídrico
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorídrico
HCO_3^-	Bicarbonato
HNO_3	Ácido nítrico
K_2HPO_4	Fosfato de potássio dibásico
K_2O	Óxido de potássio
K_2SO_4	Sulfato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de magnésio heptahidratado
$MnCl_2.4H_2O$	Cloreto de manganês tetrahidratado
N	Nitrogênio
N_2	Gás nitrogênio

N_2O	Óxido nitroso
Na_2EDTA	Etilenodiamino-tetra-acetato de sódio
$Na_2EDTA.2H_2O$	Etilenodiamino-tetra-acetato de sódio dihidratado
$Na_2MoO_4.2H_2O$	Molibdato de sódio dibásico dihidratado
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2CO_3	Carbonato de Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
$NaMoO_4.2H_2O$	Molibdato de sódio dihidratado
$NaNO_3$	Nitrato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_4OH	Hidróxido de amônio
NH_3	Amônia
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
O	Oxigênio
O_2	Gás oxigênio
Tris	Hidroximetil-aminometano
$ZnSO_4.7H_2O$	Sulfato de zinco heptahidratado

CAPÍTULO 1

Introdução & Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

Microalgas são seres fotossintetizantes que envolvem uma enorme diversidade de formas e funções ecológicas. Esse grupo inclui organismos unicelulares, multicelulares, procarióticos e eucarióticos com uma variedade de classes definidas pelo ciclo de vida, tipo de pigmento e estrutura celular (BRENNAN & OWENDE, 2010). Entre algumas características relevantes das microalgas é possível citar a capacidade de biofixar CO_2 reduzindo emissões (CHISTI, 2007), a possibilidade de tratar diversos tipos de efluentes (PIRES *et al*., 2013) e a produção de diferentes biomoléculas de interesse comercial (BOROWITZKA *et al*., 2013).

De modo geral, o aumento da demanda de produtos obtidos a partir das microalgas deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem em sua composição ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos essenciais, corantes naturais e compostos imunologicamente ativos, entre outros. Empresas de produção de compostos de microalgas vêm desenvolvendo novos sistemas de produção de biomassa e utilização desses biocompostos em produtos diferenciados. Diversas espécies têm sido aplicadas mundialmente na alimentação humana e animal, assim como na obtenção de aditivos empregados nas indústrias farmacêutica e cosmecêutica (PULZ & GROSS, 2004).

No Brasil, a obtenção do bioetanol de primeira geração ocorre principalmente a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar. De acordo com o último relatório publicado pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), a produção de cana-de-açúcar no Brasil acumulada de 1º de abril até 16 de dezembro de 2016 totalizou 588,85 milhões de toneladas. Do total colhido, foram produzidos 24,74 bilhões de litros de bioetanol. O país tem se destacado como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo também o segundo produtor mundial de bioetanol (UNICA, 2016). Entre os resíduos gerados na produção de bioetanol está o CO_2, proveniente do processo de fermentação, e a vinhaça, produto da destilação para recuperação do álcool (BONASSA *et al*., 2015).

A produção de 1 L de bioetanol gera cerca de 0,75 kg de CO_2 de alta pureza, saturado em água (XU *et al*., 2010). Esse CO_2 capturado nas dornas de fermentação pode ser direcionado para diversas aplicações industriais, tais como a produção de bebidas carbonatadas e o congelamento durante processamento, acondicionamento, transporte e armazenamento de alimentos; síntese de produtos químicos, biocombustíveis e polímeros (ELMEKAWY *et al*.,

2016); e a biofixação através do processo de fotossíntese em cultivo microalgal (CHISTI, 2007).

A vinhaça, por sua vez, é caracterizada como efluente de destilaria e pode apresentar alto poder poluente decorrente da sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH e elevada corrosividade. O descarte apropriado da vinhaça tem sido um desafio para a indústria alcooleira. Quando lançado em ambientes aquáticos, a vinhaça é capaz de destruir a fauna e flora aquáticas, além de inviabilizar o uso desses possíveis mananciais no abastecimento de água potável (LAIME *et al*., 2011). A fertirrigação pode acarretar a salinização do solo, bem como a lixiviação de metais e nutrientes para águas superficiais e subterrâneas (CHRISTOFOLETTI *et al*., 2013). Embora a fertirrigação seja um cenário sólido na indústria alcooleira, o volume de vinhaça tem sido crescente (1 L de bioetanol gera entre 9-14 L de vinhaça) limitando o seu uso indiscriminado em canaviais (NITAYAVARDHANA & KHANAL, 2010).

Uma via alternativa à destinação da vinhaça é o seu uso como substrato em processos microbianos, como em fermentação via fungos filamentosos. A ação microbiana resulta na diminuição de demanda bioquímica de oxigênio e, por conseguinte, na redução do poder poluidor do resíduo. A célula fúngica utilizada no processo é selecionada e cultivada para diversos fins industriais como a obtenção de proteínas (NITAYAVARDHANA & KHANAL, 2010). Embora a vinhaça também tenha potencial como substrato no cultivo de microrganismos fotossintetizantes, poucos são os relatos do seu uso para cultivo microalgal.

Apesar do alto teor energético, na prática, a vinhaça ainda tem um valor econômico negativo assim como o CO_2 tem um impacto adverso sobre o meio ambiente. Nesse sentido, torna-se importante a aplicação do conceito de biorrefinaria, no qual ocorre a integração de diversos processos de conversão de biomassa. Dessa forma, os resíduos da indústria de bioetanol podem ser redirecionados na implementação de novas tecnologias com valor agregado, como no caso do cultivo microalgal.

1.2 OBJETIVOS E ESTRUTURA DO TRABALHO

A pesquisa teve por objetivo avaliar a possibilidade de produzir biomassa microalgal na presença de vinhaça de cana-de-açúcar e suprimento de CO_2, visando o tratamento desses resíduos e a obtenção de biomoléculas de interesse comercial.
Os objetivos específicos foram:

(i) escolher a microalga mixotrófica mais propícia ao consumo da matéria orgânica e, consequentemente, ao tratamento de vinhaça;

(ii) definir a estratégia de cultivo mais promissora visando o crescimento celular, o uso de vinhaça e o consumo de CO_2;

(iii) otimizar as condições de cultivo visando a produção de biomassa.

O trabalho está estruturado em quatro capítulos, conclusões e recomendações, referências bibliográficas e três apêndices. No capítulo 2, a pesquisa é contextualizada dentro do atual estado da arte. O capítulo 3 apresenta a metodologia utilizada no desenvolvimento da pesquisa e o capítulo 4 reúne os resultados obtidos com suas respectivas discussões. O apêndice apresenta a (i) legislação que trata da destinação da vinhaça; (ii) figuras e tabelas complementares aos resultados; (iii) artigos completos publicados em periódicos.

CAPÍTULO 2

Contextualização & Estado da arte

2.1 MICROALGAS

Microalgas são organismos fotossintetizantes que crescem rapidamente e em diferentes condições ambientais devido a sua simples estrutura celular. Conhecidas como uma das formas de vida mais antigas do planeta, esses microrganismos envolvem uma enorme diversidade de formas e funções ecológicas (MATA *et al.*, 2010). A definição de microalgas inclui organismos unicelulares, multicelulares, procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos com uma variedade de classes definidas pelo ciclo de vida, tipo de pigmento e estrutura celular (**figura 1**) (BRENNAN & OWENDE, 2010).

Enquanto as cianobactérias são haploides e apresentam reprodução assexuada por meio da fissão binária ou fragmentação do filamento, as microalgas eucarióticas podem ser haploides ou diploides com duas ou até três fases durante o ciclo de vida. São descritos como habitat natural das microalgas os oceanos abertos, as costas rochosas e o meio aquático de água doce como rios, lagos, valas e lagoas. Podem viver de forma livre ou em simbiose mutualista em habitat com uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade (RAVEN & GIORDANO, 2014).

As microalgas eucarióticas são dotadas de cloroplastos constituídos de camadas de membranas internas, os tilacóides, onde ocorrem as principais reações bioquímicas da fotossíntese e de uma matriz amorfa, o estroma. Semelhante às mitocôndrias, os cloroplastos possuem dupla membrana, sendo a membrana externa pouco seletiva à passagem de solutos e a membrana interna bastante seletiva. Sem cloroplasto, as cianobactérias possuem uma série de membranas tilacoidais no citoplasma oriundas de protrusões da membrana citoplasmática. Uma grande variedade de pigmentos fotossintetizantes pode ser encontrada nas microalgas. Além do pigmento primário, chl *a*, é possível encontrar pigmentos acessórios como chl *b*, chl *c*, carotenos, xantofilas e ficobiliproteínas (LEA-SMITH *et al*., 2016). Outras moléculas como chl *d* e chl *f* também já foram descritas em cianobactérias atuando como pigmento primário e acessório, respectivamente (ALLAKHVERDIEV *et al*., 2016).

Embora o crescimento fotoautotrófico, utilizando luz como fonte de energia química e CO_2 como fonte inorgânica de carbono, seja dominante, algumas espécies de microalgas podem adotar o metabolismo heterotrófico, utilizando um composto orgânico como única fonte de energia, ou mixotrófico, utilizando luz como fonte de energia química além de compostos orgânicos como fonte de carbono. Muitas espécies são capazes de alterar o metabolismo de

acordo com as condições ambientais. A disponibilidade de carbono e luz são fatores limitantes para definir o tipo de metabolismo (RYM *et al*., 2010).

Entre algumas características relevantes das microalgas é possível citar: (i) capacidade de utilizar CO_2 contribuindo para mitigação do efeito estufa (CHISTI, 2007; ARAÚJO *et al*., 2015); (ii) eficiente remoção de compostos orgânicos, nutrientes inorgânicos, metais pesados e coloração em águas residuais possibilitando o tratamento de diversos tipos de efluentes (PIRES *et al*., 2013); (iii) elevadas taxas fotossintéticas acarretando alta produtividade em biomassa (COUTINHO & BOMTEMPO, 2011; FRANCO *et al*., 2012); (iv) produção de diferentes biomoléculas de interesse comercial (SPOLAORE *et al*., 2006; BOROWITZKA, 2013); (v) processamento complementar da biomassa residual para a obtenção de energia (PITTMAN *et al*., 2011) ou outros produtos como biofertilizante (GUPTA *et al*., 2013).

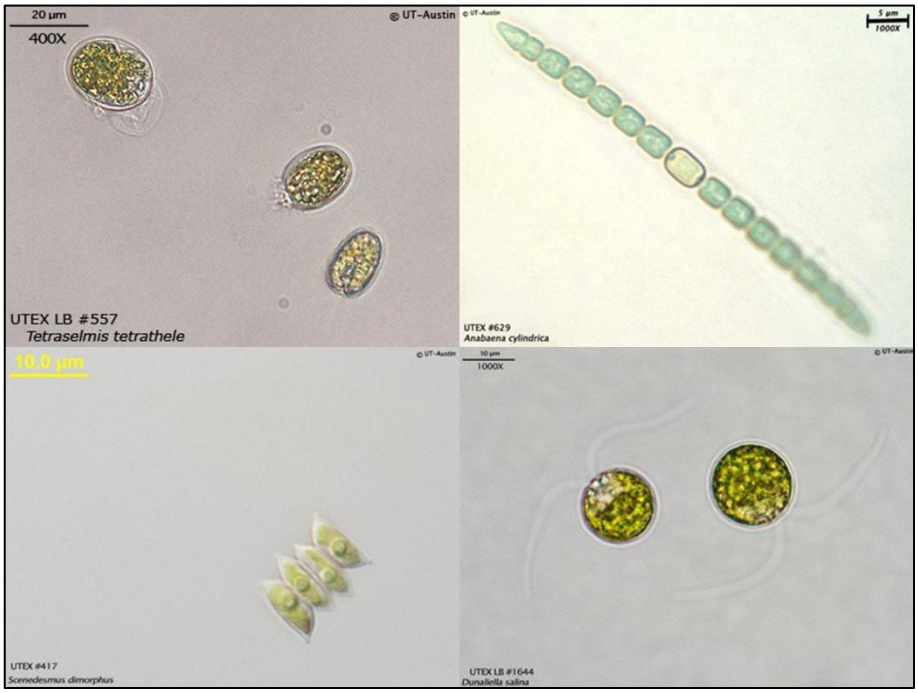


Figura 1. Diversidade microalgal. Fonte: UTEX *The Cultura Colletion of Algae*, 2015.

2.1.1 FOTOSSÍNTESE

O conjunto de reações resultando na conversão de luz solar em compostos ricos em energia é denominado fotossíntese. Existem complexos de múltiplas subunidades e uma variedade de enzimas localizados nos tilacóides de microalgas para realizarem o processo de

fotossíntese. O primeiro evento necessário é a absorção de fótons pelos pigmentos, no complexo antena dos tilacóides. A antena distal, contendo pigmentos acessórios como carotenoides, ficoeritrina, ficocianina, chl *a*, chl *b* e chl *c*, absorve a energia luminosa em menor comprimento de onda e a transfere para a antena proximal, que contém chl *a* (GABDULKHAKOV & DONTSOVA, 2013).

Na antena proximal, a energia é transferida na forma de éxcitons até o centro de reação do fotossistema II (FS II) resultando na excitação da molécula de clorofila e ejeção de elétrons para aceptores primários, iniciando o transporte de elétrons através da cadeia de componentes redox. Ainda que a energia seja absorvida e transferida com alta eficiência pelas antenas, sempre ocorrem pequenas perdas, seja através de eventos radiativos (e.g., fluorescência, fosforescência) ou não radiativos (e.g., calor). A dissipação de energia tem relação inversa com a taxa fotossintética e pode ser usada como diagnóstico da integridade e acoplamento do processo de fotossíntese (RUBIO *et al*., 2003).

O cerne do FS II é constituído por duas grandes subunidades de proteínas homólogas, *D1* e *D2*, as quais apresentam principalmente a configuração α-hélice. Associadas à proteína *D1* encontram-se moléculas de clorofila (*chl* a_{D1}), de feofitina ($Pheo_{D1}$) e a plastoquinona *A* (Q_A); enquanto a proteína *D2* mantém sua estrutura ligada aos homólogos *chl* a_{D2}, $Pheo_{D2}$ e Q_B. Cada uma dessas moléculas, incluindo as proteínas *D1* e *D2*, também interage com moléculas de carotenoides (GABDULKHAKOV & DONTSOVA, 2013).

O complexo central do FS II é cercado por outras subunidades proteicas (e.g., CP47, CP43), lipídios e íons. Durante o funcionamento do FS II, mecanismos de defesa são desenvolvidos para impedir que a foto-oxidação induzida pelo excesso de energia luminosa afete diretamente a proteína *D1* na cadeia transportadora de elétrons (NICKELSEN & RENGSTL, 2013). A **figura 2** ilustra as principais diferenças do complexo central do FS II em cianobactérias e microalgas eucarióticas.

Ainda no FS II, a plastoquinona reduzida (Q_BH_2) difunde-se até o complexo citocromo (*cit*) b_6/f, onde é oxidada e desprotonada, e os elétrons são transferidos até a plastocianina (*PC*) ou *cit* c_{553} via *cit* b_6/f. Assim, duas Q_BH_2 são oxidadas liberando duas Q_B, dois elétrons da *PC* ou do *cit* c_{553} e quatro prótons no lúmen do tilacóide. No FS I, os elétrons são transferidos através de aglomerados ferro-enxofre para a ferrodoxina seguindo para *ferrodoxina-NADP*$^+$ *redutase* que reduz $NADP^+$ a NADPH. Dois elétrons são necessários para produzir uma molécula NADPH e o gradiente de prótons é utilizado para produzir ATP via *ATPase* (ALLAKHVERDIEV *et al*., 2016).

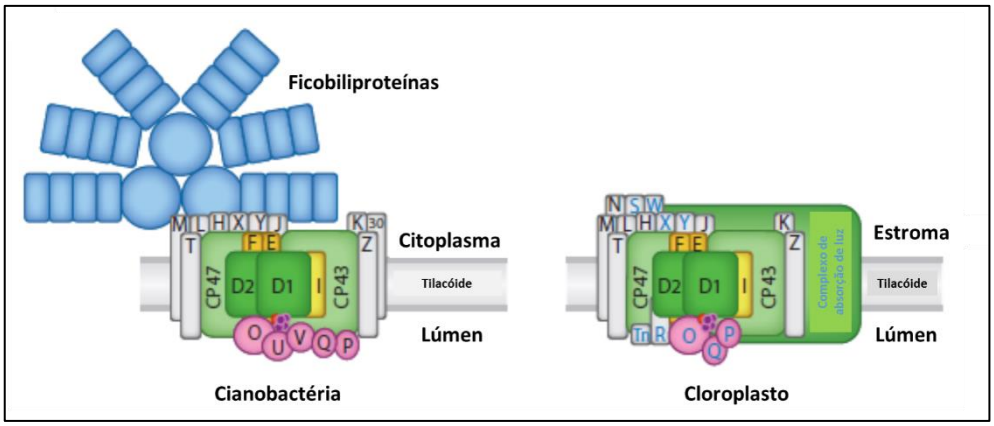


Figura 2. Estrutura do fotossistema II em cianobactérias e microalgas eucarióticas. Heterodímeros *D1*/*D2* cercados por outras subunidades citocromos. Fonte: NICKELSEN & RENGSTL, 2013.

O transporte de elétrons que ocorre entre os FS II e FS I levando à síntese de ATP é conhecido como fotofosforilação não-cíclica. Alternativamente, os elétrons oriundos do FS I podem fluir através da ferrodoxina para o *cit* b_6/f e deste novamente para o FS I. Esse processo conhecido como fotofosforilação cíclica também resulta na formação de um gradiente de prótons e produção de ATP, contudo, não reduz $NADP^+$. Diferentes rotas de transporte cíclico já foram propostas para cianobactérias e a razão de prótons para síntese de uma molécula de ATP pode variar entre as espécies (ALLAKHVERDIEV *et al*., 2016).

A energia luminosa absorvida e armazenada na fase fotofísica é utilizada para realização de inúmeras reações bioquímicas na fase fotoquímica. Na fotossíntese oxigênica, a foto-oxidação da água é o maior doador de elétrons durante a fase fotoquímica. Nesse caso, os elétrons são transferidos até o complexo central do FS II via resíduos de tirosina. Assim, duas moléculas de água são oxidadas liberando uma molécula de O_2 e uma molécula de água foto-oxidada é capaz de reduzir uma molécula de NADPH (ALLAKHVERDIEV *et al*., 2016). A **figura 3** ilustra a transferência de elétrons na membrana tilacóide de cianobactérias.

Tanto NADPH como ATP são utilizados durante a fase fotoquímica para fixação de CO_2 através do ciclo de Calvin. Na primeira etapa do ciclo de Calvin, a *ribulose*-1,5-*bifosfato carboxilase/oxigenase* (*RubisCO*) catalisa a carboxilação de ribulose-1,5-bifosfato (*RuBP*), via adição de CO_2, levando à formação de duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (*APG*). Em seguida, o *APG* é fosforilado e reduzido a um intermediário-chave da glicólise, o gliceraldeído 3-fosfato (*G3P*) que via reversão das etapas iniciais da glicólise pode ser convertido em carboidrato e utilizado na biossíntese celular (RAE *et al*., 2013).

Parte da molécula *G3P* segue o ciclo dos ácidos tricarboxílicos sendo convertida na molécula de piruvato, o qual na presença da coenzima *A* é transformado em acetil-Co*A*. Durante

esse processo ocorre a síntese de aminoácidos usados como precursores de inúmeras proteínas. A formação de Malonil-Co*A* a partir da molécula de acetil-Co*A* permite o alongamento da cadeia de ácido graxo que em ciclo contínuo permite a síntese de lipídios. A síntese de biomoléculas está envolvida com uma série de reações bioquímicas originando a formação de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, pigmentos, compostos fenólicos, solutos compatíveis e antimicrobianos, entre outros (LV *et al*., 2010).

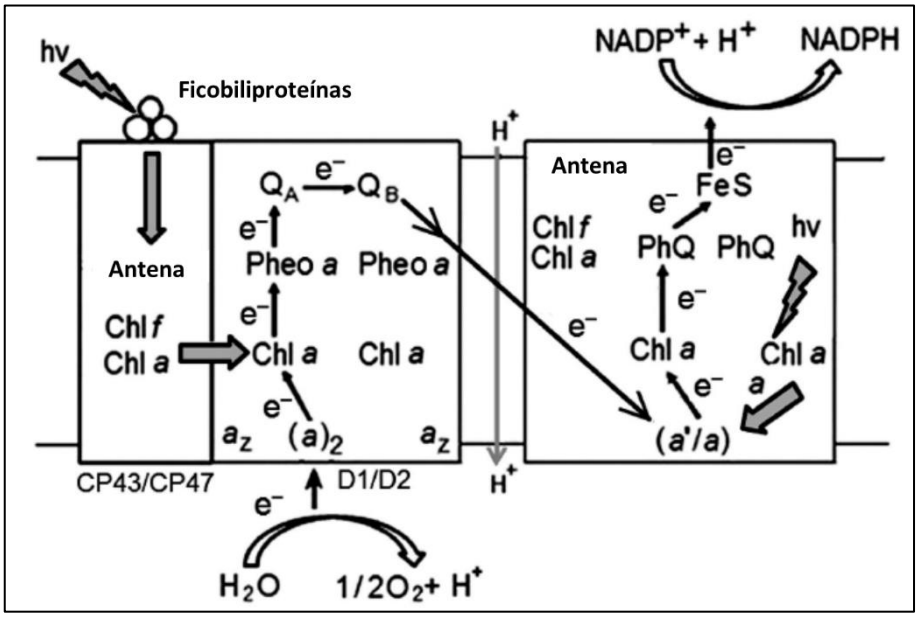


Figura 3. Transferência de elétrons e constituintes redox dos fotossistemas II e I em cianobactérias. Fonte: ALLAKHVERDIEV *et al*., 2016.

Para que a *RubisCO* promova a incorporação de seis moléculas de CO_2, por exemplo, há a necessidade de seis moléculas de *RuBP* que atuam como aceptoras. Essa reação leva à formação de doze moléculas de *APG*, as quais atuam como esqueleto de carbono na formação de seis novas moléculas de *RuBP* e de uma molécula de hexose, utilizada na biossíntese celular. Uma série complexa de rearranjos origina as seis moléculas de ribulose 5-fosfato (*Ru-5P*), a partir das quais as seis *RuBP* serão geradas. A última etapa dessa regeneração corresponde à fosforilação da *Ru-5P* catalisada pela enzima *fosforibuloquinase.* Assim como a *RubisCO*, essa enzima também é exclusiva do ciclo de Calvin (RAE *et al*., 2013).

A *RubisCO* exerce função tanto de carboxilação na fotossíntese como de oxigenação na fotorrespiração. Sob condição aeróbia, O_2 e CO_2 competem pelo mesmo sítio ativo o que faz com que o excesso de O_2 promova inibição da fotossíntese e aumento da fotorrespiração.

Localizada no pirenoide, região no estroma do cloroplasto, essa enzima é ativa apenas em meio alcalino associado a elevadas concentrações de íon magnésio. Em cianobactérias, a *RubisCO* é encapsulada em microcompartimentos proteicos, os carboxissomas (MORONEY *et al*., 2013).

2.1.2 CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

A escolha do método de cultivo e produção de biomassa microalgal é de suma importância para a viabilidade da cadeia produtiva de microalgas, sendo necessária a busca por um ponto ótimo entre o custo de implantação/operação, produtividade em biomassa e o rendimento de biomoléculas específicas. De modo geral, o cultivo microalgal pode ser desenvolvido em sistemas abertos ou fechados, seguindo regime de batelada simples ou alimentada em processo contínuo ou semicontínuo. Além da configuração do sistema e do regime de batelada, o desempenho do cultivo está relacionado com a disponibilidade de nutrientes, luz, temperatura, pH e aeração, entre outros.

Embora lagoas tipo *raceway* tenham baixo custo de implantação e fácil operação, o sistema aberto é mais suscetível à contaminação com microrganismos indesejáveis, às oscilações ambientais de luminosidade e temperatura, à evaporação da água, à baixa taxa de agitação e transferência de massa entre as fases líquida e gasosa, à menor difusão de CO_2 e menor produtividade em biomassa. Outra característica é a necessidade de extensa área de cultivo (APEL & WEUSTER-BOTZ, 2015).

Os fotobiorreatores podem apresentar diferentes configurações, tais como reatores em painéis, em colunas e tubulares. O sistema fechado pode ser iluminado artificialmente ou por luz solar, possui maior custo e complexidade, apresenta maior aquecimento, concentração de O_2, dificuldade de higienização e rompimento celular por cisalhamento. Por outro lado, possui menor risco de contaminação, maior controle sobre os fatores envolvidos no cultivo, alta transferência de massa e maior produtividade em biomassa (GUPTA *et al*., 2015).

No regime em batelada simples, a cultura é inoculada e coletada em certa fase de crescimento. O regime é descontínuo, apresenta um único inóculo celular e não contem adição de nutrientes após o início do processo. Na batelada alimentada (regime descontínuo com único inóculo celular), nutrientes são adicionados ao cultivo de forma contínua ou intermitente. No regime contínuo, os nutrientes são adicionados ao cultivo a uma vazão constante, sendo o volume de cultivo também mantido constante através da coleta contínua da cultura. Já no

regime semicontínuo, a cultura é inoculada, sendo parte coletada em certa fase de crescimento e substituída por volume igual de nutrientes (HO *et al*., 2014).

2.1.2.1 FONTE DE CARBONO

Em geral, as microalgas são fotoautotróficas, sendo a energia utilizada em seus processos biológicos originada da fotossíntese (i.e., a luz é utilizada como fonte de energia química e o CO_2 como fonte inorgânica de carbono). Contudo, na ausência de luz, outras fontes de carbono podem ser assimiladas e transformadas em intermediários de carbono por certas espécies de microalgas (**tabela 1**). Nesse caso, o uso de fontes de carbono orgânico requer diferentes sistemas enzimáticos para transporte, ativação através de fosforilação, metabolismo anabólico intermediário e catabólico, geração de energia através do nível de substrato e/ou respiração (MORALES-SÁNCHEZ *et al*., 2015).

Tabela 1. Espécies de microalgas cultivadas sob condições heterotróficas.

Microalga	Fonte de carbono assimilada	Referência
Chlorella vulgaris	Acetato e glicerol	Liang *et al*., 2009
Chlorella pyrenoidosa	Hidrolisado de resíduo alimentício	Pleissner *et al*., 2013
Chlorella protothecoides	Hidrolisado de amido de mandioca	Wei *et al*., 2009
Scenedesmus obliquus	Hidrolisado de farelo de trigo	El-Sheekh *et al*., 2012
Haematococcus pluvialis	Acetato	Kobayashi *et al*., 1997
Cryptecodinium cohnii	Glicose, etanol e ácido acético	Swaaf *et al*., 2003 Mendes *et al*., 2007

No uso de carboidratos como fonte de carbono orgânico, a ativação do processo geralmente ocorre através de reações catalisadas por *hexoquinases* como as encontradas em *Chlorella* sp. e *Euglena* sp. Várias cianobactérias usam *glicose-desidrogenase* dependente de

piridina no metabolismo inicial de glicose livre. O glicerol é convertido em gliceraldeído 3-fosfato e este convertido na molécula de piruvato. No uso de ácidos orgânicos, por exemplo, o lactato também é convertido em piruvato. Já o acetato leva à formação da molécula de acetil-Co*A*, a qual através do ciclo do glioxilato também produz intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (PEREZ-GARCIA *et al*., 2011).

Os carboidratos são metabolizados através da via oxidativa pentose fosfato. Uma vez que a maioria das enzimas presentes nessa via também participam do ciclo de Calvin, o metabolismo de carbono citoplasmático e a biofixação de CO_2 são integrados e regulados pela disponibilidade de carbono orgânico e luz. Curiosamente, os cloroplastos continuam ativos no crescimento heterotrófico e a via oxidativa pentose fosfato apresenta taxa metabólica maior que as outras vias. Quando comparado ao crescimento fotoautotrófico, o metabolismo heterotrófico pode apresentar maior taxa de crescimento proporcionando maiores produtividades. O regime em batelada alimentada também pode ser aplicado para aumentar a densidade celular (MORALES-SÁNCHEZ *et al*., 2015).

Além do metabolismo fotoautotrófico e heterotrófico, certas espécies de microalgas podem apresentar crescimento mixotrófico utilizando CO_2 e compostos orgânicos como fontes de carbono. Nesse caso, os processos fotoautotrófico (i.e., fotossíntese) e heterotrófico (i.e., respiração celular) afetam mutuamente o cultivo mixotrófico contribuindo para efeitos sinérgicos sobre a taxa de crescimento, densidade celular e produtividade. Em relação ao crescimento heterotrófico, o metabolismo mixotrófico permite menor emissão de CO_2 por unidade de biomassa associado à respiração celular, sendo essa emissão de CO_2 compensada pela biofixação durante a fotossíntese (WANG *et al*., 2014).

2.1.2.2 FATORES AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NO CULTIVO

Desempenhando papel fundamental no processo de fotossíntese, a luz tem forte influência sobre o crescimento, a taxa de biofixação de CO_2 e a composição celular da biomassa. Antes do ponto de saturação luminosa, o aumento da iluminação em cultivos fotoautotróficos e mixotróficos favorece a taxa de crescimento celular. A partir do ponto de saturação, o aumento da luminosidade resulta em fotoinibição e, consequentemente, redução da capacidade fotossintética (HO *et al*., 2014). A intensidade luminosa pode resultar em mudanças no pH e nas concentrações de íon magnésio e NADPH no estroma do cloroplasto que, por sua vez, podem regular e influenciar o acúmulo de biomoléculas (LV *et al*., 2010).

Embora a luz solar seja mais rentável, o comportamento celular pode variar em face das oscilações ambientais, condições climáticas e estações do ano. Alternativamente, a iluminação artificial pode ser produzida a partir de diversas fontes. Os sistemas de cultivo são projetados para obter maior área iluminada possível, todavia áreas de sombreamento podem ser formadas. Nesse caso, a taxa de agitação é fundamental para melhorar a distribuição das células e, por conseguinte, a distribuição de luz em todo o cultivo (ABU-GHOSH *et al*., 2015).

Valores ótimos de temperatura e pH desempenham um papel significativo sobre enzimas participantes do metabolismo celular. Esses fatores ambientais também afetam diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos interferindo nos níveis de carbono inorgânico dissolvido (CID) e no balanço fotossíntese:respiração. Mudanças nos valores de pH são utilizadas como ajustes primários para prevenir contaminações por outros microrganismos. Temperaturas elevadas normalmente resultam em declínio na síntese de proteínas e acúmulo de carboidratos e lipídios (MORAIS *et al*., 2015).

A agitação é importante não só para facilitar a transferência de massa entre as fases líquida e gasosa, mas também para distribuir uniformemente as células no cultivo. A agitação é projetada para reduzir o estresse mecânico, assim colunas de bolhas e sistemas *airlift* são capazes de aerar e agitar o sistema com baixo estresse por cisalhamento. A aeração mantém o influxo de CO_2 e a exaustão de O_2, impedindo o acúmulo deste no cultivo (GUPTA *et al*., 2015).

As microalgas apresentam uma série de mecanismos adaptativos em resposta às alterações na salinidade. Essas respostas dependem de características física e química da parede e membrana celular, da regulação do fluxo de água, de mecanismos para equilibrar o nível iônico intracelular e da síntese e degradação de solutos orgânicos de baixa massa molecular. Alto nível de salinidade é capaz de estimular a geração de espécies reativas de oxigênio que, por sua vez, desencadeiam a regulação positiva de genes carotogênicos distintos aumentando o acúmulo de carotenoides antioxidantes (GUIHÉNEUF *et al*., 2016).

A presença de bactérias, protozoários, fungos, vírus, parasitas, predadores ou até mesmo outras espécies de microalgas no cultivo resulta em contaminação, a qual pode competir e limitar a obtenção da biomassa de interesse afetando ainda a quantidade e qualidade de biomoléculas sintetizadas. A presença de alguns contaminantes pode ainda alterar o pH do cultivo interferindo no crescimento microalgal (MENDES & VERMELHO, 2015).

2.1.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Numerosas aplicações industriais têm sido propostas, tendo em vista o grande potencial biotecnológico das microalgas (**tabela 2**). A cadeia produtiva de biocompostos de microalgas envolve etapas como escolha da espécie e fonte de carbono, definição das condições de cultivo e do modo de operação, coleta da biomassa, extração e purificação das biomoléculas de interesse, processamento complementar da biomassa residual para obtenção de combustíveis ou outros produtos. Diversas espécies têm sido aplicadas mundialmente na alimentação humana e animal, assim como na obtenção de aditivos empregados nas indústrias farmacêutica e cosmecêutica.

A alta escala de produção de CO_2 e vinhaça demanda como destinação produtos de grande volume de produção, requisito atendido por combustíveis, enquanto que biomoléculas (de alto valor agregado) encontram-se em escalas de menor volume (HALLENBECK, 2012). Embora o número de publicações na área seja crescente, este tema ainda compreende inúmeros desafios em função da variedade de espécies de microalgas e substratos possíveis, cultivos celulares, biomoléculas produzidas e seus potenciais biotecnológicos.

Tabela 2. Potencial Biotecnológico de algumas biomoléculas obtidas de microalgas.

Microalga	Biomoléculas	Atividade biológica	Referência
Chlorella sp.	Polissacarídeos Proteínas Ácidos graxos	Efeitos imunomodulatório e antitumoral	Morimoto *et al*., 1995 Cheng *et al*., 2004 Sheng *et al*., 2007
Scenedesmus sp.	Extrato	Potencial terapêutico na doença de *Alzheimer*	Hielscher-Michael *et al*., 2016
Isochrysis galbana	Carotenoides	Corante alimentar e efeito antioxidante	Ahmed *et al*., 2014
Spirulina sp.	Proteínas Ficocianina	Suplemento alimentar, efeitos anti-inflamatório e antioxidante	Lupatini *et al*., 2014 Liu *et al*., 2016 Wu *et al*., 2016
Botryococcus braunii	Proteínas	Balanço hídrico celular e biossíntese de colágeno	Buono *et al*., 2012
Nannochloris sp.	Extrato	Efeito clareador	Pereira *et al*., 2015
Dunaliella salina	Extrato	Atividade antimicrobiana	Pane *et al*., 2015

2.1.3.1 INDÚSTRIA NUTRACÊUTICA

Os polissacarídeos de microalgas são importantes na indústria alimentícia por apresentarem alta digestibilidade e ausência de limitação ao uso do pó de microalgas em alimentos (RICHMOND, 2004). Esses polissacarídeos também são biomoléculas de importância farmacológica. Resultados de programas de *screening* para testar efeitos imunologicamente relevantes dessas macromoléculas *in vitro* mostraram que certos polissacarídeos altamente sulfatados podem desencadear a resposta humoral do sistema imune humano (NAMIKOSHI, 1996).

O elevado teor proteico de várias espécies de microalgas é uma das razões para considerar essa biomassa como uma fonte não convencional de proteínas (RICHMOND, 2004). Não apenas o teor proteico é importante, mas também o fato das microalgas serem capazes de sintetizar todos os aminoácidos possibilitando o fornecimento de aminoácidos essenciais para alimentação de seres humanos e animais (GUIL-GUERRERO *et al*., 2004). Entre os aminoácidos essenciais encontrados em microalgas destacam-se isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina e valina. Além de propriedade antioxidante e efeito imunomodulatório, o uso dessas macromoléculas como suplemento alimentar pode auxiliar no controle da obesidade. A elevação do nível de aminoácidos plasmáticos estimula a liberação de hormônios que atuam sobre a saciedade resultando na redução de apetite (AMBROSI *et al*., 2008).

Peixes e óleos de peixe são usualmente empregados na obtenção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), no entanto, os produtos extraídos dessas fontes têm levantado discussões no que diz respeito à segurança alimentar devido ao acúmulo de toxinas por peixes. Além disso, a utilização dessas fontes como aditivo alimentar é limitada em função de problemas associados ao forte odor, sabor desagradável e baixa estabilidade oxidativa. Para certas aplicações, o óleo de peixe é inapropriado devido ainda à presença de ácidos graxos mistos (triacilglicerídeos com dois ou mais ácidos graxos diferentes). Sendo os PUFA originários de peixes que consomem microalgas em ambientes oceânicos, é lógico considerar as microalgas como potenciais fontes de PUFA (SPOLAORE *et al*., 2006).

Na indústria nutracêutica, verifica-se uma tendência em agrupar os ácidos graxos insaturados em famílias conhecidas como ω (ômega). Entre os ácidos graxos de microalgas, as famílias do ω3 e ω6 são de particular interesse por prevenir doenças cardiovasculares e inflamações, além de melhorar a função cerebral. Os principais ácidos graxos da família ω3

encontrados em microalgas são ácido γ-linolênico (ALA), ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosapentaenóico (DPA). Já os ácidos graxos da família ω6 incluem ácido linoléico (LA) e ácido araquidônico (AA). Alguns produtos intermediários como ácido di-homo-σ-linolênico (DHGLA), ácido σ-linolênico (GLA), ácido estearidônico (SDA) e ácido eicosatetraenóico (ETA) são produzidos durante a síntese de PUFA (SANGHVI & LO, 2010).

As microalgas também representam uma valiosa fonte de quase todas as vitaminas essenciais (A, B_1, B_2, B_3, B_6, B_{12}, C, E, ácido fólico, ácido pantotênico, inositol, biotina e nicotinato) (GUIL-GUERRERO *et al*., 2004). Outros importantes constituintes são os pigmentos como clorofila, carotenoides, ficocianina e ficoeritrina. Essas biomoléculas têm uma ampla aplicação na indústria nutracêutica, desde a utilização como corante natural até a utilização como moléculas antioxidante e anti-inflamatória (SPOLAORE *et al*., 2006).

2.1.3.2 INDÚSTRIA COSMECÊUTICA

Atualmente, o Brasil ocupa o quarto lugar no mercado consumidor mundial de produtos de beleza, atrás apenas dos Estados Unidos, da China e do Japão (ABIHPEC, 2016). A crescente busca pela beleza, aliada ao aumento do poder aquisitivo dos últimos anos, tem contribuído para manter o patamar de desenvolvimento do setor. A adoção de tecnologias sustentáveis requer um esforço na busca de ingredientes naturais, diferenciados e competitivos. Nesse sentido, a biomassa microalgal tem um valor significativo no mercado cosmecêutico. Diversas espécies têm sido cultivadas para o desenvolvimento de produtos direcionados aos cuidados do rosto, corpo e cabelo (RAJA *et al*., 2008).

O envelhecimento da pele é um processo lento causado por inúmeros fatores intrínsecos (e.g., idade, estado hormonal, estresse oxidativo) e extrínsecos (e.g., radiação UV, poluição, estresse, álcool, cigarro, alimentação) que prejudicam a renovação celular resultando em perda de elasticidade, desidratação, poros dilatados, linhas de expressão e rugas. Extratos de microalgas ricos em proteínas têm sido capazes de estimular a síntese de colágeno e o crescimento de fibroblasto reduzindo linhas de expressão e rugas (BUONO *et al*., 2012). Extratos de *Chlorella vulgaris* (Dermochlorella®), *Nannochloropsis oculata* (Pepha-Tight®) e *Dunaliella salina* (Pepha-Ctive®) têm sido utilizados em cremes que visam proporcionar firmeza à pele com efeitos a curto e longo prazo estimulando a proliferação celular e influenciando o metabolismo energético envolvido na síntese da pele.

Bastante comuns em xampus e máscaras de hidratação, os ácidos graxos essenciais são usados principalmente nos cosméticos de uso tópico. Por terem efeito antiqueratinizante, são muito usados para tratar peles e cabelos secos, além de auxiliar na fotoproteção minimizando os danos da radiação UV. Outras ações dos ácidos graxos em cremes incluem ação emoliente, emulsificante, espessante e estabilizante (STOLZ & OBERMAYER, 2005).

Exposição repetitiva à radiação UV é capaz de causar não só o envelhecimento prematuro, como também manchas e eritema na pele. Compostos fenólicos (e.g., catecol, florotaninos, isoflavonas) obtidos em microalgas apresentam efeitos fotoprotetor e antioxidante semelhantes a extratos obtidos em plantas superiores. Na célula, esses compostos atuam dissipando a radiação e impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio (JEFFREY *et al*., 1999).

Recentemente, as microalgas também têm atraído atenção pela capacidade de sintetizar agentes naturais inibidores de *tirosinase* (e.g., cloroglucinol, fucoxantina). Uma vez que essa enzima catalisa etapa importante no processo de pigmentação da pele, esses inibidores são relevantes para reduzir a síntese de melanina criando um efeito clareador gradual na pele (PEREIRA *et al*., 2015).

Outra importância em formulações cosmetológicas é a atividade antibacteriana e antifúngica em diversos compostos extraídos de microalgas (e.g., exopolissacarídeos, proteínas, ácidos graxos, ficobiliproteínas, clorofila, compostos fenólicos). Entre alguns agentes etiológicos combatidos destacam-se *Bacillus subtilis, B. cereus, Staphylococcus aureus, S. epidermidi, Streptococcus pyogenes, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhi, Klebsiella pneumoniae, Vibrio cholerae, Proteus vulgaris, Candida albicans, Aspergillus fumigatus, A. niger, Blastomyces dermatitidis, Emmonsia parva, Sporothrix schenckii, Epidermophyton floccosum, Microsporum audouini, M. canis, M. ferrugineum, M. gypseum, M. nanum, M. persicolor* (FALAISE *et al*., 2016).

2.1.3.3 TRATAMENTO DE EFLUENTES

O tratamento convencional de águas residuais contendo matéria orgânica biodegradável baseia-se em processos biológicos aeróbios e anaeróbios que convertem matéria orgânica em compostos inertes permitindo a eliminação segura destes e/ou reuso da água. Esses processos convencionais fornecem satisfatória remoção de carbono, nitrogênio e fósforo, mas à custa de alto gasto energético e perda de nutrientes. Além de serem muitas vezes complexos, esses

processos também podem impactar o meio ambiente com a emissão de gases causadores do efeito estufa (e.g., CO_2, CH_4, N_2O). Por essas razões, o uso de microalgas no tratamento de águas residuais, reduzindo o custo energético do processo, reciclando nutrientes e produzindo biomassa, combina múltiplos benefícios ambientais (ACIÉN *et al*., 2016).

Os principais contaminantes em águas residuais incluem compostos orgânicos, compostos inorgânicos e metais pesados, e sua composição pode variar em função da localização e das atividades predominantes (e.g., agricultura, indústria alimentícia e têxtil, água residual). A performance das microalgas no tratamento pode ser significativamente impactada pela razão carbono:nitrogênio:fósforo, pela concentração de metais pesados, pela presença de xenobióticos, pelo teor de sólidos suspensos e pela coloração do efluente (ABDEL-RAOUF *et al*., 2012).

O uso direto das microalgas no tratamento de águas residuais pode ser estabelecido quando não for necessário modificar características do efluente (e.g., diluição). De forma geral, as microalgas podem atuar no tratamento secundário ou terciário de águas residuais. Embora o tratamento de efluentes seja mais uma aplicação biotecnológica bastante promissora para as microalgas, há pouco desenvolvimento industrial dessa tecnologia. Para ser competitivo com os processos convencionais de lodo ativado, os processos com microalgas devem ser tolerantes à alta carga orgânica e reduzir o tempo de retenção hidráulica (MUÑOZ & GUIEYSSE, 2006).

Diversos estudos têm avaliado diferentes efluentes como substratos em cultivos de microalgas de modo a complementar o sistema de tratamento já existente e auxiliar a produção de biomassa. Diferentes espécies de microalgas têm sido capazes de crescer em efluente de suinocultura (DEPRAETERE *et al*., 2013), de lacticínio (UMMALYMA & SUKUMARAN, 2014), de têxtil (LIM *et al*., 2010) e de celulose (TARLAN *et al*., 2002). Outros substratos utilizados para cultivo microalgal foram urina humana (DAO-LUN & ZU-CHENG, 2006), esgoto doméstico (INOUE & UCHIDA, 2013) e águas municipais (MAHAPATRA *et al*., 2014).

2.1.3.4 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

O processamento da biomassa residual (ou íntegra), após extração de biomoléculas de interesse comercial, inclui rotas bioquímicas ou termoquímicas. A conversão bioquímica, que emprega enzimas e microrganismos, inclui digestão anaeróbia e fermentação para produção de biogás e bioetanol, respectivamente. Já a conversão termoquímica engloba a gaseificação para

produção de gás de síntese (*syngas*), pirólise para produção de bio-óleo, refino hidrotérmico e combustão (PITTMAN *et al*., 2011). A **figura 4** apresenta as alternativas mais promissoras para obtenção de cada produto em uma biorrefinaria de microalgas.

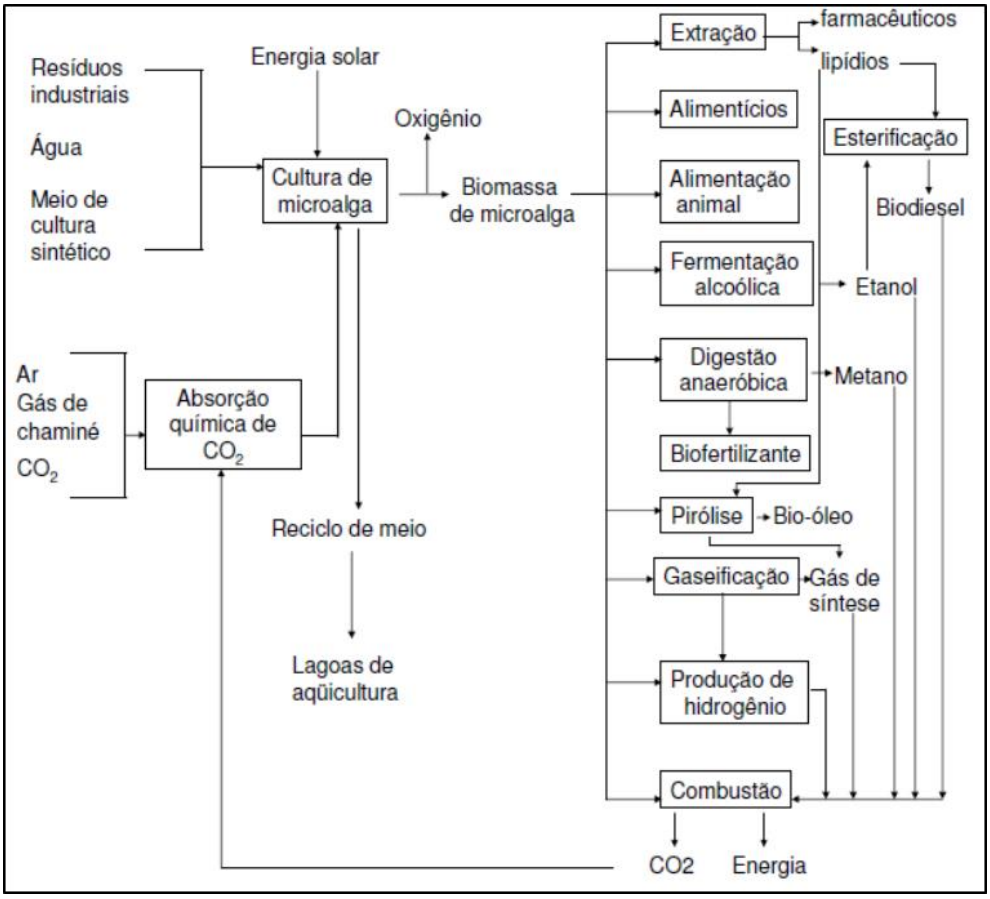


Figura 4. Biorrefinaria de microalgas. Fonte: COSTA & MORAIS, 2011.

No processo de digestão anaeróbia, a biomassa é degradada por diferentes grupos de bactérias e arquéias. Como produto final é obtido o biogás e um sobrenadante que pode ser usado como fertilizante. O sobrenadante gerado em uma digestão anaeróbia bem-sucedida pode apresentar características superiores a fertilizantes de ótima qualidade devido à menor demanda química de oxigênio (DQO), baixa concentração de metais pesados e maior biodisponibilidade de macronutrientes (WARD *et al*., 2014).

O processo anaeróbio é tradicionalmente utilizado para o tratamento de resíduos agroindustriais e municipais com a finalidade de adequá-los às exigências ambientais, no entanto, esse bioprocesso já vem sendo utilizado para a produção de biocombustíveis (CHISTI,

2013). Diferentes resíduos orgânicos também podem ser utilizados como matéria-prima caracterizando um processo de codigestão (MATA-ALVAREZ *et al*., 2000). Entre as vantagens de produzir esse biocombustível por meio da digestão anaeróbia é possível citar a dispensa de secagem, o processamento biológico de toda a fração orgânica da matéria-prima, a tolerância à alta carga orgânica, o menor gasto energético e a menor geração de resíduos (WARD *et al*., 2014).

Com um conteúdo energético semelhante ao do Gás Natural (GN), o biogás é constituído majoritariamente por CH_4 (50 a 80%) e CO_2 (20 a 40%), além de outros constituintes em menores quantidades (e.g., N_2, H_2, NH_3, H_2S). A proporção dos constituintes e o poder calorífico inferior podem variar em função de fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo. Altas concentrações de CH_4 estão relacionadas a um maior poder calorífico e baixas concentrações de impurezas (e.g., vapor d'água, H_2S) permitindo uma destinação mais nobre ao biogás (FAVRE *et al*., 2009).

O biogás pode ser usado de forma direta ou em cogeração para obtenção de energias elétrica, térmica e mecânica, sendo a sua principal intenção substituir os gases de origem mineral como o Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) usado como gás de cozinha, GN usado em equipamentos domésticos e Gás Natural Veicular (GNV) usado em motores de combustão interna de automóveis. Para queima do biogás em caldeiras e fogões são necessários menos tratamentos, geralmente mais simples e baratos, enquanto o uso como GNV e GN exige um biogás de maior pureza e tratamentos mais caros (COLDEBELLA *et al*., 2016).

Os açúcares presentes na biomassa podem ser convertidos em bioetanol através do processo de fermentação. O elevado teor de celulose e amido na parede celular e no citoplasma, respectivamente, faz com que a biomassa microalgal seja uma matéria-prima adequada ao processo de fermentação. Assim como outras matérias-primas, são necessárias etapas de pré-tratamento e hidrólise antes da fermentação; e diferentes fontes de carboidrato podem ser utilizadas na cofermentação. Quando comparada às matérias-primas sacarínea, amilácea ou lignocelulósica, a fermentação de biomassa microalgal destaca-se pelo menor consumo de água, pelo menor custo de produção (visto que não necessita de herbicida e pesticida, podendo ser cultivada em água salobra) e pela rápida colheita (não segue regime de safra) (HARUN *et al*., 2014).

O processo de gaseificação consiste na combustão parcial de carbono contido na biomassa, na presença de um oxidante (e.g., ar, oxigênio puro, vapor d' água), levando à formação de gás de síntese composto por H_2, CO, CO_2 e CH_4. A proporção dos constituintes pode variar em função da matéria-prima, do gaseificador, do modo operacional e do oxidante.

O *syngas*, por sua vez, pode ser convertido a combustível líquido (metanol) via síntese de *Fischer-Tropsch* ou a olefina via síntese direta ou a partir de intermediários. Durante a gaseificação, ocorrem inúmeras reações como as da pirólise, da combustão e do craqueamento térmico (HEIDENREICH & FOSCOLO, 2015).

A pirólise é o processo de degradação termoquímica da biomassa na ausência de oxidante de forma a permitir a transformação da biomassa em três frações: sólida, gasosa e líquida. A fração sólida consiste, principalmente, em cinzas e carbono que pode ser utilizado como combustível ou na fabricação de carvão ativado por meio da sua posterior ativação com CO_2 e/ou vapor d' água. A fração gasosa é composta por *syngas* e outros hidrocarbonetos. Já a fração líquida é chamada de bio-óleo, sendo uma mistura complexa de componentes aromáticos e alifáticos oxigenados (HEIDENREICH & FOSCOLO, 2015).

2.1.4 ESPÉCIES DE INTERESSE COMERCIAL

Tendo em mente a diversidade microalgal e o grande potencial biotecnológico dessa biomassa, a etapa de escolha da espécie na cadeia produtiva de microalgas é de fundamental importância para viabilidade do bioprocesso. A escolha da espécie deve levar em consideração parâmetros como taxa de crescimento celular, produtividade em biomassa e biomoléculas específicas, condições ambientais e nutricionais requeridas para o crescimento ótimo, tipo de metabolismo celular adotado e escolha do substrato, engenharia do fotobiorreator e modos operacionais, resistência à contaminação e coleta da biomassa, entre outros.

O rendimento do cultivo pode ser melhorado via manipulação de alguns parâmetros listados acima, sendo a resposta espécie-específica. As principais microalgas cultivadas comercialmente são *Chlorella* sp. e *Spirulina* sp. para a adição em alimentos naturais, *Dunaliella salina* para a obtenção de β-caroteno e *Haematococcus pluvialis* para a obtenção de astaxantina em países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (DERNER *et al*., 2006). A **tabela 3** lista algumas espécies de microalgas cultivadas comercialmente por diferentes empresas.

Tabela 3. Espécies de microalgas cultivadas comercialmente. Fonte: DERNER *et al*., 2006.

Microalga	Bioproduto	Atividade biológica	Empresa
Crypthecodinium sp.	DHA	Desenvolvimento cerebral	Martek/Omegatech (Estados Unidos)
Haematococcus sp.	Astaxantina	Tratamento da síndrome do túnel do carpo	Cyanotech (Estados Unidos)
Haematococcus sp.	Astaxantina	Anti-inflamatório e tratamento de lesões musculares	MERA (Estados Unidos)
Chlorella sp.	Extrato de carboidrato	Melhora da resposta imunológica	OceanNutrition (Canadá)
Odontella sp.	EPA	Anti-inflamatório	InnovalG (França)
Spirulina sp.	Vitamina B_{12}	Melhora da resposta imunológica	Panmol/Madaus (Áustria)
Ulkenia sp.	DHA	Tratamento de doenças cerebrais e cardíacas	Nutrinova/Celanese (Alemanha)

2.1.4.1 GÊNERO CHLORELLA

Chlorella sp. é uma microalga eucariótica verde inserida no filo *Chlorophyta*, classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae.* As espécies do gênero *Chlorella* são unicelulares não móveis, esféricas ou elipsoidais, com diâmetro variando entre 2-15 µm (**figura 5**). Podem habitar ambientes dulcícola ou marinho, na forma livre ou em simbiose com fungos ou protozoários. A parede celular, constituída principalmente de celulose, pode variar muito entre as espécies. O amido é a principal fonte de reserva podendo acumular corpos lipídicos sob certas condições de limitação nutricional (LIU & CHEN, 2016).

As células de *Chlorella* sp. possuem chl *a* e *b*, além de *β*-caroteno e várias xantofilas como luteína, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, neoxantina, astaxantina e cantaxantina. Quanto ao metabolismo, são capazes de crescer sob condições fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica utilizando açúcares ou ácidos aminados como fonte orgânica de carbono. A composição bioquímica pode variar em função da espécie e das condições de cultivo. As principais espécies estudadas são *C. ellipsoidea, C. emersonii*, *C. kessleri*, *C. minutíssima*, *C.*

protothecoides, *C. pyrenoidosa*, *C. saccharophila*, *C. sorokinianna*, *C. vulgaris* e *C. zofingiensis* (LIU & CHEN, 2016).

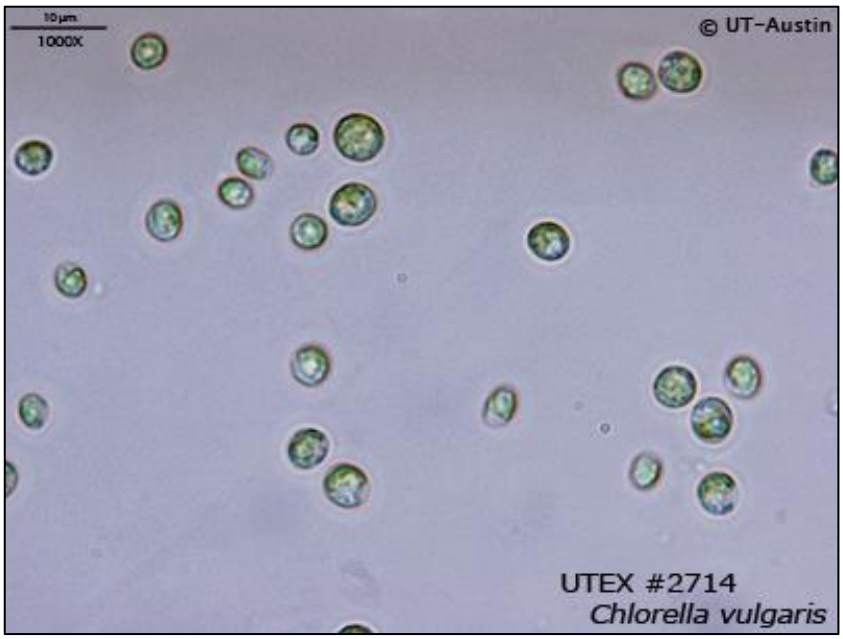


Figura 5. Microscopia de *Chlorella vulgaris*. Fonte: UTEX *The Cultura Colletion of Algae*, 2015.

2.1.4.2 GÊNERO SPIRULINA

Spirulina sp. é uma cianobactéria inserida no filo *Cyanophyta*, classe *Cyanophyceae*, ordem *Oscillatoriales* e família *Spirulinaceae*. As espécies do gênero *Spirulina* são multicelulares e filamentosas, com filamentos na forma helicoidal conhecidos como tricoma (**figura 6**). Os tricomas podem apresentar largura e comprimento variando entre 3-4 µm e 50-500 µm, respectivamente. As células de *Spirulina* sp. movimentam-se na coluna d'água orientadas por vacúolos gasosos. Podem habitar ambientes dulcícola, marinho, salobro e termal (com temperatura entre 35-40 ºC), além de suportarem baixas temperaturas noturnas (~15 ºC). Apresentam crescimento ótimo em meio salino (> 30 $g.L^{-1}$) e alcalino (pH entre 8,5-11). A parede celular, semelhante à de bactérias Gram-negativas, é formada por peptideoglicano e lipopolissacarídeos (HABIB *et al*., 2008).

Figura 6. Microscopia de *Spirulina maxima.* Fonte: UTEX *The Cultura Colletion of Algae*, 2015.

O produto de reserva de *Spirulina* sp. é um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α-1,4. Essa molécula, semelhante ao glicogênio, difere do amido por apresentar ramificações mais abundantes em relação à cadeia principal de polissacarídeo. O pigmento fotossintetizante predominante em *Spirulina* sp. é a ficocianina, sendo encontrados também chl *a*, β-caroteno e xantofilas. Assim como o gênero *Chlorella*, essas células são capazes de crescer sob condições fotoautotrófica, heterotrófica e mixotrófica. Em média, a composição bioquímica da biomassa comercial é dividida em 20% de carboidratos, 60% de proteínas, 5% de lipídios e 7% de minerais; podendo essa proporção variar em função da espécie e das condições de cultivo. As principais espécies estudadas são *S. fusiformis*, *S. major*, *S. maxima*, *S. platensis* e *S. weissii* (HABIB *et al*., 2008).

2.2 RESÍDUOS PROVENIENTES DA INDÚSTRIA DE BIOETANOL

O bioetanol é um álcool produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais, tais como cereais, beterraba e cana-de-açúcar. Embora também seja obtido por síntese, ainda hoje, boa parte do etanol industrial é obtido por meio da fermentação de biomassa vegetal. Atualmente, outras biomassas têm sido exploradas como matéria-prima para o processo de fermentação como no caso de resíduos lignocelulósicos

e microalgas, o que caracteriza o bioetanol de segunda e terceira geração, respectivamente. Além de ser usado como fonte de energia renovável (é o biocombustível líquido mais utilizado), o bioetanol também é empregado para a fabricação de cosméticos, produtos químicos, farmacêuticos e alimentícios (DEMIRBAS, 2007).

A obtenção do bioetanol de primeira geração, a partir de matéria-prima sacarínea ou amilácea, ocorre principalmente a partir da sacarose do caldo de cana-de-açúcar ou glicose da hidrólise de amido. De acordo com o último relatório publicado pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), a produção de cana-de-açúcar no Brasil acumulada de 1º de abril até 16 de dezembro de 2016 totalizou 588,85 milhões de toneladas. Do total colhido foram produzidos 35,06 milhões de toneladas de açúcar e 24,74 bilhões de litros de bioetanol. O país tem se destacado como maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo também o primeiro produtor mundial de açúcar e o segundo produtor mundial de bioetanol atrás apenas dos Estados Unidos (UNICA, 2016).

Os principais resíduos gerados na usina sucroalcooleira são palha (proveniente dos ponteiros da cana-de-açúcar), água de lavagem (usada excessivamente para retirar terra e processar industrialmente a cana-de-açúcar), bagaço (obtido após extração do caldo de cana), torta de filtro (proveniente da filtração do caldo extraído), CO_2 e vinhaça (provenientes do processo de fermentação e destilação para recuperação do álcool, respectivamente) (BONASSA *et al.*, 2015).

2.2.1 DIÓXIDO DE CARBONO

A fermentação do mosto, no processo de produção do bioetanol, é realizada nas chamadas dornas de fermentação, as quais podem atingir uma capacidade de milhares de litros. Algumas empresas utilizam dornas abertas, embora na maioria sejam fechadas. Na fermentação do mosto, as leveduras convertem açúcares em bioetanol e CO_2. No processo com dornas abertas, ocorre a perda de 1-2% de bioetanol pelo arraste do CO_2 liberado na atmosfera. Já as dornas fechadas são dotadas de um sistema coletor de CO_2 que encaminha o gás e o bioetanol para uma torre de recuperação. Nessa torre realiza-se a lavagem do CO_2 em contracorrente com água visando a recuperação do bioetanol (MAGALHÃES, 2012).

Independentemente do tipo de dorna utilizada, o CO_2 produzido é liberado na atmosfera. A geração de 1 L de bioetanol utilizando milho como matéria-prima, por exemplo, gera cerca de 0,75 kg de CO_2. Esse gás é saturado com baixa pressão. As poucas impurezas estão sob a

forma de compostos como etanol, metanol, enxofre e H_2S (XU *et al*., 2010). O CO_2 capturado nas dornas de fermentação pode ser utilizado em diversas aplicações industriais. Uma usina alcooleira de médio porte, por exemplo, pode recuperar e comercializar cerca de 3.000 $kg.h^{-1}$ de CO_2 (JORNAL DA CANA, 2008).

2.2.1.1 TRATAMENTO E DESTINAÇÃO

Comparado a outras correntes industriais contendo CO_2 (e.g., gás natural, gases exaustos), das quais o CO_2 deve ser separado por processos intensivos em custos de capital e operacionais (e.g., absorção química, aminas, membranas) (MEDEIROS *et al*., 2013; ANDREONI & PIETRUCCI, 2016; ARAÚJO *et al*., 2016; GIORDANO *et al*., 2016), o sistema de captura de CO_2 oriundo da indústria de bioetanol é relativamente simples. Devido à elevada pureza do CO_2 proveniente das dornas de fermentação, os únicos processos necessários são: (i) lavagem do gás para remoção de impurezas solúveis em água (e.g., álcoois, cetonas); (ii) desidratação, notadamente por absorção em trietileno glicol (KWAK *et al*., 2014) para prevenir a formação de hidratos e a corrosão da tubulação; (iii) compressão para a pressão de transporte ou uso. Destaca-se que a compressão com resfriamento entre estágios promove condensação de água, reduzindo o seu teor no gás, podendo, de acordo com a aplicação, dispensar o uso de etapa de desidratação. Ainda em função do destino dado ao CO_2, a desidratação torna-se desnecessária, como no caso de biofixação de CO_2, visto que o gás é borbulhado em meio de cultura aquoso.

São possíveis inúmeras aplicações industriais para o CO_2 recuperado na planta de bioetanol. Na indústria alimentícia, pode ser direcionado à produção de bebidas carbonatadas (na proporção de até 6% v/v) (e.g., refrigerante, cerveja, vinho) e congelamento durante processamento, acondicionamento, transporte e armazenamento de alimentos. O fluido supercrítico de CO_2 (exibe propriedades entre gás e líquido) também é uma excelente alternativa para extração de ingredientes alimentares. Na indústria química, o CO_2 pode ser utilizado como fonte de carbono para síntese de produtos químicos, biocombustíveis e polímeros (ELMEKAWY *et al*., 2016).

A biofixação do CO_2 recuperado em cultivo microalgal através do processo de fotossíntese é mais uma possibilidade tecnológica. Sob condição fotoautotrófica, o ar atmosférico enriquecido de CO_2 até 15% v/v favorece o crescimento celular (PATIL & KALIWAL, 2016). Para obtenção de 1 kg de biomassa microalgal seca são necessários cerca

de 1,83 kg de CO_2 variando de acordo com a espécie e as condições de cultivo adotadas. Do ponto de vista da engenharia de processos, a utilização de CO_2 deve ser integrada ao destino da biomassa obtida, em concepção de biorrefinaria de cana-de-açúcar com integração de diversos processos. O arranjo industrial deve ser orientado por decisões econômicas, ambientais e sociais.

A emissão de CO_2 também apresenta impactos econômicos e sociais sobre a tributação de carbono. Nessa, recomenda-se a aplicação de um imposto sobre as emissões da queima de combustíveis fósseis. Espera-se um efeito positivo sobre o mercado, pois o imposto induz empresas a adotarem práticas inovadoras, limpas e mais eficientes, tendendo a excluir a parcela das empresas ineficientes e relativamente mais poluidoras. É importante que a criação de um imposto sobre as emissões esteja associada a políticas que compensem os possíveis efeitos adversos sobre a competitividade, tais como a desoneração de exportações e uma taxação sobre o conteúdo de emissões embutido nas importações (INSTITUTO ESCOLHAS, 2015).

Dentro desse contexto, o governo brasileiro assumiu uma Pretendida Contribuição, Nacionalmente Determinada (iNDC) que estabeleceu uma meta absoluta de emissão de 1,3 $GtCO_2e$, em 2025, e uma contribuição indicativa subsequente de 1,2 $GtCO_2e$ em 2030. Quando comparadas às emissões reportadas em 2005, estas metas representam uma redução de 37% e 43%, respectivamente (BRASIL, 2015). A tonelada equivalente de CO_2 (tCO_2e) é o total de gases emitidos que causam o efeito estufa multiplicado pelo seu potencial de aquecimento global. O valor de US$ 10,00/tCO_2e é a referência usada pela maioria dos países que aplicam algum tipo de imposto sobre emissões (INSTITUTO ESCOLHAS, 2015).

2.2.2 VINHAÇA

Também conhecido como vinhoto, restilo ou calda da destilaria, a vinhaça é o produto de calda da destilação do vinho que, por sua vez, é resultado da fermentação do caldo de cana-de-açúcar ou melaço (subproduto da indústria de açúcar também utilizado na produção de bioetanol) (SILVA *et al*., 2007). A produção de 1 L de bioetanol gera entre 9-14 L de vinhaça, o qual pode variar suas características em função do tipo de matéria-prima utilizada no mosto de fermentação (ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011).

Em geral, a vinhaça apresenta coloração marrom escuro, é constituído em maior parte de água (cerca de 93%), contém elevada acidez, alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e DQO. O teor de sólidos corresponde à matéria orgânica, basicamente sob a forma de ácidos

orgânicos como oxálico, lático, acético e málico. Também é possível encontrar minerais como potássio, cálcio e magnésio, além de fenóis (ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011; CHRISTOFOLETTI *et al*., 2013).

Um dos principais desafios na biorrefinaria de vinhaça é a sua coloração, decorrente da presença de compostos como ácido tânico, ácido húmico, melanoidina da Reação de *Maillard* entre carboidratos e o grupamento amina de proteínas, açúcar caramelizado do superaquecimento e furfurais da hidrólise ácida (WILKIE *et al*., 2000). A **tabela 4** lista alguns parâmetros que definem a composição química da vinhaça obtida a partir de diferentes matérias-primas.

Tabela 4. Composição química da vinhaça obtida de diferentes matérias-primas. (na) representa dados não encontrados. *Unidade em $mg.kg^{-1}$. Fonte: ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011.

Parâmetro\Matéria-prima	Caldo de cana	Melaço de cana	Melaço de beterraba
DBO ($g.L^{-1}$)	16,7	39,5	27,5-44,9
DQO ($g.L^{-1}$)	30,4	84,9-95	55,5-91,1
Nitrogênio ($mg.L^{-1}$)	102-628	153-1230	1800-4750
Fósforo ($mg.L^{-1}$)	71-130	1-190	160-163
Enxofre ($mg.L^{-1}$)	1356	1500-3480	3500-3720
Potássio ($mg.L^{-1}$)	1733-1952	4893-11000	10000-10030
Cobre ($mg.L^{-1}$)	4	0,27-1,71	2,1-5*
Cádmio ($mg.L^{-1}$)	(na)	0,04-1,36	<1*
Chumbo ($mg.L^{-1}$)	(na)	0,02-0,48	<5*
Ferro ($mg.L^{-1}$)	16	12,8-157,5	203-226*
pH	4,04-4,6	4,46-4,8	4,3-5,35
Fenóis ($mg.L^{-1}$)	(na)	34	450

2.2.2.1 TRATAMENTO E DESTINAÇÃO

A vinhaça é caracterizada como efluente de destilarias com alto poder poluente (cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico). Sua riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, altos índices de DBO e DQO são considerados altamente nocivos à fauna

e flora de ambientes dulcícola e marinho. A liberação de vinhaça em ambientes aquáticos torna o balanço de oxigênio negativo, isso porque esse balanço se dá pela diferença entre a quantidade de oxigênio que encontra-se disponível nas águas e a quantidade de oxigênio que a água necessita para oxidar a matéria orgânica (DBO). Outra causa para a redução do balanço de oxigênio é a proliferação de microrganismos consumidores da carga orgânica presente no efluente. Como consequência, ocorrem grandes prejuízos para a fauna e flora aquáticas, além de dificultar o aproveitamento de mananciais contaminados como fonte de abastecimento de água potável (LAIME *et al*., 2011).

A fertirrigação (GIANCHINI & FERRAZ, 2009), a digestão anaeróbia (MOTA *et al*., 2015) e o tratamento aeróbio (PANT & ADHOLEYA, 2007) têm sido apresentados como destinação alternativa e tecnologias para reduzir o poder poluente da vinhaça. Outros processos de pré-tratamento e refinamento após redução da coloração e do conteúdo orgânico também têm sido citados como no caso da adsorção, da coagulação-floculação, da ozonização, da oxidação eletroquímica e da eletrocoagulação (SATYAWALI & BALAKRISHNAN, 2008; ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011).

Como método de destinação da vinhaça, a fertirrigação (adubação e irrigação) tem sido amplamente utilizada, pois reduz a necessidade de fertilizantes e melhora a capacidade de absorção da água. No entanto, esse método pode acarretar na salinização do solo, lixiviação de metais e nutrientes para águas superficiais e subterrâneas e fitotoxicidade; além da elevada concentração de potássio (acima da permitida pela Norma Técnica CETESB P 4.231/2005, apêndice) limitar o uso indiscriminado da vinhaça em canaviais (NITAYAVARDHANA & KHANAL, 2010).

A elevada carga orgânica presente na vinhaça torna o tratamento anaeróbio mais atraente em comparação aos tratamentos aeróbios, isso porque os processos anaeróbios tendem a menor formação de lodo e requerem uma menor quantidade de nutrientes em comparação aos processos aeróbios. O processo de digestão anaeróbia tem sido estudado e apresentado eficiência de 90% na redução da DQO com recuperação de 85 a 95% de energia na forma de biogás (WILKIE *et al*., 2000).

O sobrenandante gerado na digestão aneróbia da vinhaça ainda pode conter matéria orgânica e alguns contaminantes, sendo necessário um tratamento adicional antes da sua disposição final. Nesse sentido, tem sido estudado o tratamento aeróbio com fungos (*Penicillium decumbens*, *Aspergillus niger*, *Flavadon flavus*), leveduras (*Citeromyces* sp.), bactérias (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp.) e microalgas (*Spirulina* sp.) (JIRANUNTIPON *et al*., 2008).

Na adsorção, o carvão ativado é utilizado como eficiente adsorvente dos poluentes orgânicos através de reações químicas e eletrostáticas (SEIXAS *et al*., 2016). A coagulação-floculação envolve a adição de sais de alumínio ou de ferro como coagulante facilitando a separação dos materiais suspensos no efluente (GUERREIRO *et al*., 2016). No processo de ozonização, o ozônio é solubilizado no efluente e o H_2O_2 aumenta a produção de radicais oxidantes como o radical hidroxila (HADAVIFAR *et al*., 2016). A oxidação eletroquímica envolve os elétrons como principais reagentes para remoção da cor do efluente (DASKALAKI *et al*., 2013). E a eletrocoagulação é um complexo interdependente de processos, no qual a geração de coagulantes por oxidação é realizada *in situ* através da dissociação de um anodo (ESPAÑA-GAMBOA *et al*., 2011).

2.3 JUSTIFICATIVA

Com a perspectiva de aumento substancial da produção de vinhaça e CO_2, e tendo em vista o controle sobre a disposição desses resíduos, faz-se necessária a busca por tecnologias que visam redirecionar os mesmos para outros processos industriais de modo a agregar valor econômico. Embora a vinhaça possa ser potencialmente utilizada como uma fonte de nutrientes e já tenha sido descrito como substrato na obtenção de biomassa fúngica e bacteriana, poucos são os relatos da utilização desse resíduo industrial na produção de biomassa microalgal. Nesse caso, além de reduzir a toxicidade da vinhaça, as microalgas são capazes de biofixar CO_2 contribuindo para a mitigação do efeito estufa.

Em 2010, Barrocal e colaboradores avaliaram o crescimento de *Spirulina maxima* em meio de cultura suplementado com vinhaça de beterraba. Na ocasião a vinhaça foi inserida no meio de cultura para reduzir o custo de produção da biomassa. Em 2015, esse mesmo grupo científico (COCA *et al*., 2015) descreveu o crescimento e o teor proteico de *Spirulina platensis* novamente em meio suplementado com vinhaça de beterraba.

No Brasil, já foram descritos o cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis* utilizando melaço como substrato orgânico (ANDRADE & COSTA, 2007), o uso de vinhaça de cana-de-açúcar após digestão anaeróbia diluído em efluente doméstico para cultivo de *Chlorella vulgaris* (MARQUES *et al*., 2013), o crescimento de *Scenedesmus* sp. em meio de cultura suplementado com vinhaça de cana-de-açúcar (RAMIREZ *et al*., 2014) e a codigestão anaeróbia de *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. com vinhaça de cana-de-açúcar (FORMAGINI *et al*., 2014).

Mais recentemente, Calixto e colaboradores (2016) avaliaram o crescimento, a composição bioquímica e o perfil de ácidos graxos de *Chlorella* sp., *Chlamydomonas* sp., *Lagerheimia longiseta* e *Pediastrum tetras* em meio de cultura alternativo a partir de cana-de-açúcar e vinhaça. Já Santana e colaboradores (2016), selecionaram 40 cepas de microalgas e avaliaram o crescimento e a composição bioquímica dessas em vinhaça de cana-de-açúcar sob diferentes concentrações.

Iniciado em 2013, o presente trabalho levou em consideração a quantidade de relatos sobre a utilização de vinhaça bruta no cultivo de microrganismos fotossintetizantes, sendo justificável a busca por outras possíveis espécies promissoras no tratamento de vinhaça, bem como a avaliação da utilização de vinhaça oriunda do bagaço de cana-de-açúcar (principal matéria-prima para a produção de bioetanol no Brasil). Em adição às justificativas acima, a existência de grandes quantidades de carboidratos, proteínas e lipídios, entre outras biomoléculas, em células de microalgas tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas que exploram o potencial biotecnológico dessa biomassa.

CAPÍTULO 3

Materiais & Métodos

As principais etapas realizadas no presente trabalho são apresentadas na figura abaixo.

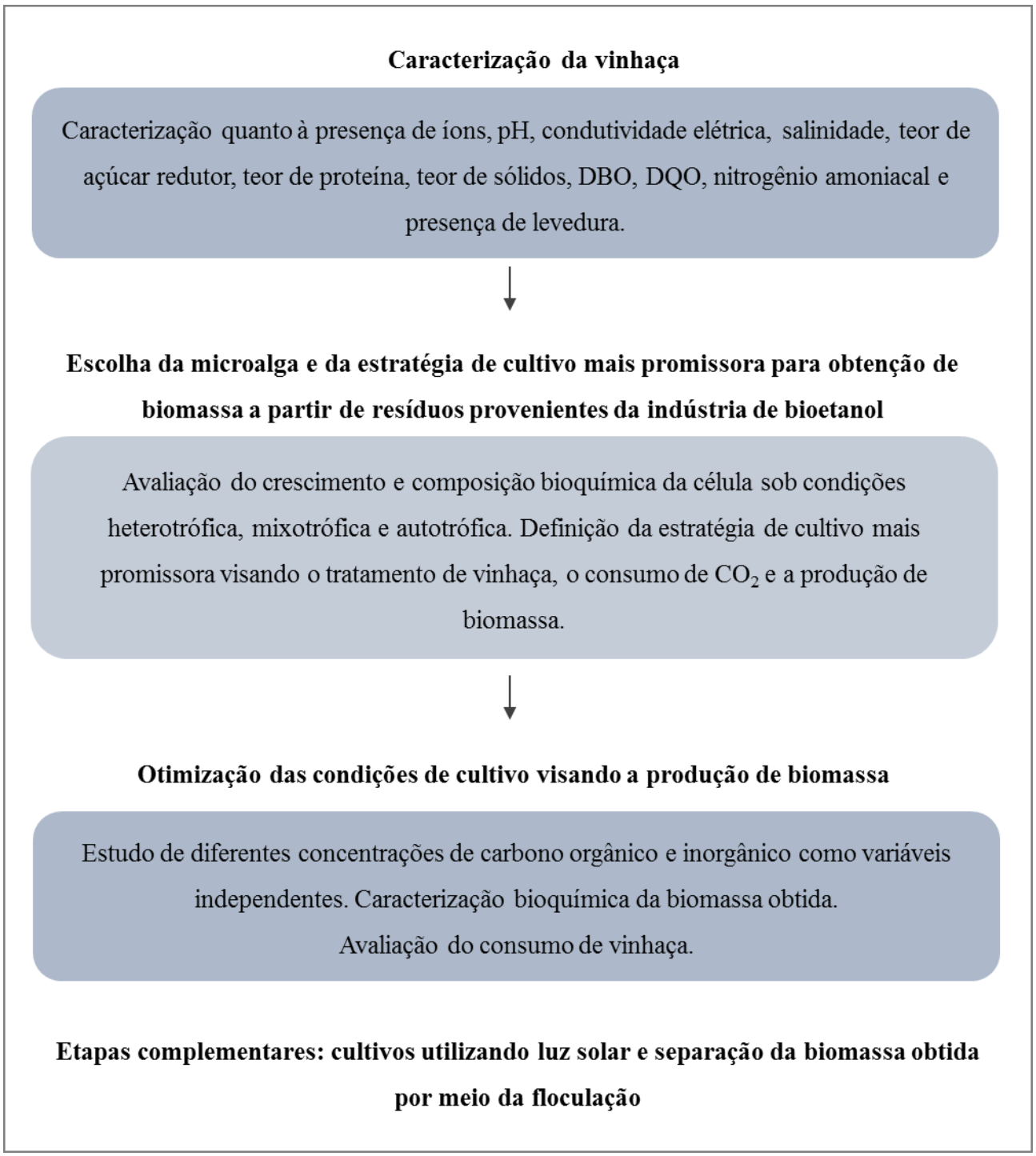


Figura 7. Fluxograma das principais etapas realizadas no presente trabalho. Fonte: autor, 2016.

3.1 MICROALGAS E MEIOS DE CULTURA

As microalgas *Chlorella vulgaris* e *Spirulina maxima* foram doadas pelo prof. Armando A. H. Vieira da Universidade Federal de São Carlos (USFcar/SP). As cepas foram mantidas em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio esterilizado por autoclavação a 121 ºC e 1 atm durante 20 min, exceto a solução de vitaminas que foi filtrada em membrana de acetato de poro 0,22 µm (SARTORIUS®). Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 110 rpm em movimento orbital de 25 mm (ETHIK TECHNOLOGY modelo 109-01), intensidade luminosa de 20 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} provida por lâmpadas fluorescentes em fotoperíodo 12:12 h (claro:escuro) e temperatura de 25±2 °C. As células foram repicadas a cada 20 dias. A densidade de fluxo de fótons foi mensurada através de um sensor quântico LI-190SA (Li-Cor Inc., EUA) acoplado a um integrador radiométrico LI-250A (Li-Cor Inc., EUA). O sensor foi localizado na superfície externa dos frascos *Erlenmeyer*.

A cepa *C. vulgaris* foi mantida em meio WC (GUILLARD & LORENZEN, 1972) modificado composto por tampão TRIS (0,5 g.L^{-1}), $NaNO_3$ (0,085 g.L^{-1}), $NaHCO_3$ (0,0126 g.L^{-1}), $CaCl_2.2H_2O$ (0,03676 g.L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,03697 g.L^{-1}), K_2HPO_4 (0,00871 g.L^{-1}), H_3BO_3 1% (0,1 mL.L^{-1}), solução de metais traços (1 mL.L^{-1}) e solução de vitaminas (1 mL.L^{-1}). A solução de metais traços foi composta de $CuSO_4.5H_2O$ (0,0098 g.L^{-1}), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,022 g.L^{-1}), $CoCl_2.6H_2O$ (0,01 g.L^{-1}), $MnCl_2.4H_2O$ (0,18 g.L^{-1}), $NaMoO_4.2H_2O$ (0,0063 g.L^{-1}), Na_2EDTA (4,36 g.L^{-1}) e $FeCl_3.6H_2O$ (3,5 g.L^{-1}). A solução de vitaminas foi constituída de tiamina (0,1 g.L^{-1}), cianocobalamina (0,0005 g.L^{-1}) e biotina (0,0005 g.L^{-1}). O pH inicial do meio foi ajustado para 8,5 com HCl 1 M.

A cepa *S. maxima* foi mantida em meio AO (AIBA & OGAWA, 1977) modificado composto de Na_2CO_3 (4,03 g.L^{-1}), $NaHCO_3$ (13,61 g.L^{-1}), K_2HPO_4 (0,5 g.L^{-1}), $NaNO_3$ (2,5 g.L^{-1}), K_2SO_4 (1,0 g.L^{-1}), NaCl (1,0 g.L^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,2 g.L^{-1}), $CaCl_2.2H_2O$ (0,04 g.L^{-1}), $FeSO_4.7H_2O$ (0,01 g.L^{-1}), $Na_2EDTA.2H_2O$ (0,08 g.L^{-1}) e solução de metais traços (1 mL.L^{-1}). A solução de metais traços foi constituída de $ZnSO_4.7H_2O$ (0,22 g.L^{-1}), $MnCl_2.4H_2O$ (1,81 g.L^{-1}), H_3BO_3 (2,86 g.L^{-1}), $Co(NO_3)_2.6H_2O$ (0,049 g.L^{-1}), $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0,039 g.L^{-1}) e $CuSO_4.5H_2O$ (0,079 g.L^{-1}). O pH inicial do meio foi ajustado para 9,5 com NaOH 1 M.

3.2 VINHAÇA E CARACTERIZAÇÃO

A vinhaça de cana-de-açúcar foi obtida na Cooperativa Agroindustrial do Estado do Rio de Janeiro (Usina Coagro) localizada no município de Campos dos Goytacazes/RJ. A vinhaça coletada diretamente de colunas de destilação (~95 ºC), foi acondicionado em garrafas de polietileno de 5 L (**figura 8**), imediatamente transportado e armazenado a -4 ºC até o momento de utilização.

Figura 8. Coleta da vinhaça na Usina Coagro. Fonte: autor, 2013.

A presença de íons foi determinada por cromatografia de troca iônica (METROHM modelo 930 COMPACT IC FLEX). A detecção de cátions foi realizada em uma coluna METROSEP C4 250/4.0 com solução aquosa de HNO_3 (1,7 mM) e ácido dipicolínico (0,07 mM) como eluente. As condições analíticas foram 0,9 $mL.min^{-1}$, 40 ºC, 11,04 MPa e 20 µL de volume de amostra. Para a detecção de ânions, foi utilizada a coluna METROSEP ASupp 5 150/4.0 com solução aquosa de $NaHCO_3$ (1,0 mM) e Na_2CO_3 (3,2 mM) como eluente. As condições analíticas foram 0,7 $mL.min^{-1}$, 25 ºC, 13,52 MPa e 20 µL de volume de amostra. A curva de calibração foi construída usando padrões da marca Fluka.

Os valores de pH, condutividade elétrica e salinidade foram mensurados através da leitura em potenciômetro (ANALYSER COMÉRCIO E INDÚSTRIA LTDA modelo 300), medidor de condutividade elétrica (SEVEN COMPACT modelo S230) e refratômetro (INSTRUTHERM modelo RTS-101ATC), respectivamente. Os teores de carboidratos e

proteínas totais foram quantificados através dos métodos colorimétricos fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1956) e Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando curvas de calibração (**figuras A1** e **A2**, apêndice) construídas a partir de D-glicose e albumina de soro bovino, respectivamente. Demais características físico-químicas e microbiológica foram avaliadas de acordo com as metodologias analíticas descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1976). Todo a vinhaça utilizada foi previamente filtrada em filtro de poro 1,2 µm e autoclavada, portanto alguns parâmetros também foram caracterizados após autoclavação. A **tabela 5** lista as características obtidas na amostra de vinhaça coletada, sendo essa mesma amostra utilizada em todos os ensaios.

Tabela 5. Parâmetros caracterizados na vinhaça bruta. *Após autoclavação: fração de levedura e proteínas foram zeradas, carboidratos passaram para 2.119 $mg.L^{-1}$, DBO passou para 2.649 $mg.L^{-1}$ e DQO passou para 21.784 $mg.L^{-1}$.

Cálcio	900 ppm
Cloro	1.930 ppm
Enxofre	453 ppm
Potássio	2.210 ppm
Sódio	570 ppm
pH	3,11
Condutividade elétrica	6,7 $mS.cm^{-1}$
Salinidade	20 ppm
Carboidratos totais	3.909 $mg.L^{-1*}$
Proteínas totais	139 $mg.L^{-1*}$
Sólidos totais	22.803 $mg.L^{-1}$
Sólidos dissolvidos[1]	16.758 $mg.L^{-1}$
Sólidos suspensos[2]	3.244 $mg.L^{-1}$
Sólidos voláteis	13.821 $mg.L^{-1}$
DBO	9.060 $mg.L^{-1*}$
DQO	21.698 $mg.L^{-1*}$
Nitrogênio amoniacal	3,4 $mg.L^{-1}$
Levedura	>10 $UFC.mL^{-1*}$

[1] Porção do sólido total que transpassa por filtro de poro 1,2 µm.
[2] Porção do sólido total retida no filtro de poro 1,2 µm.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para obtenção do inóculo, as microalgas foram cultivadas em garrafas do tipo pet cristal de 6 L contendo 5 L de meio de manutenção estéril. As garrafas foram mantidas sob agitação pneumática, aeradas com ar filtrado proveniente de compressores de aquário com vazão de 800 $cm^3.min^{-1}$, luminosidade de 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ em fotoperíodo 12:12 h e temperatura de 30±3 °C. As células foram aclimatadas às condições experimentais por três gerações e o inóculo utilizado na fase exponencial de crescimento.

Para escolher a microalga mais promissora no tratamento de vinhaça, estabelecer o tipo de metabolismo mais eficiente para os fins e verificar a influência dessa decisão na composição bioquímica da célula, foi avaliado o crescimento de ambas as espécies sob condições heterotrófica, mixotrófica e autotrófica (seção 3.3.1). Diferentes modos de fornecimento de carbono orgânico e inorgânico também foram testados a fim de aprimorar a estratégia de cultivo estabelecida (seção 3.3.2). Na sequência, concentrações de carbono orgânico e inorgânico foram otimizadas por meio da metodologia de Superfície de Resposta (seção 3.3.3).

3.3.1 ESCOLHA DA MICROALGA E DA ESTRATÉGIA DE CULTIVO MAIS PROMISSORA

O inóculo obtido foi transferido para garrafas de 6 L contendo 5 L de meio, de modo que a concentração inicial de *C. vulgaris* e *S. maxima* foi 0,05 e 0,02 $g.L^{-1}$, respectivamente. Sob condição heterotrófica, os cultivos ocorreram na ausência de luminosidade e em meios suplementados com vinhaça nas concentrações 0,1% v/v e 1% v/v. Em condição mixotrófica, os cultivos foram mantidos sob luminosidade de 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ em fotoperíodo 12:12 h e os meios novamente suplementados com vinhaça nas concentrações 0,1% v/v e 1% v/v. Para controle, foram conduzidos ensaios sob condição autotrófica com luminosidade de 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ em fotoperíodo 12:12 h e ausência de vinhaça.

Todos os cultivos, conduzidos em batelada simples, foram mantidos sob aeração com ar filtrado proveniente de compressores de aquário com vazão de 800 $cm^3.min^{-1}$ e temperatura de 30±3 °C. O pH inicial dos cultivos de *C. vugaris* e *S. maxima*, após acréscimo de vinhaça, foi ajustado para 8,5 e 9,5, respectivamente. O crescimento celular foi avaliado através de registros diários (seção 3.3.4). A **figura 9** retrata os cultivos mantidos sob condições heterotrófica e autotrófica.

A biomassa produzida foi coletada por centrifugação (CIENTEC modelo CT6000R) a 3.500 rpm (ou 2607 *g*) e 20 °C durante 10 min. Após centrifugação, a biomassa de *S. maxima* foi lavada com NH_4HCO_3 0,5 M para remoção do excesso de sal (ZHU & LEE, 1997). As biomassas foram liofilizadas (TERRONI modelo LT600) e estocadas a 4 °C até o momento da análise bioquímica (seção 3.4).

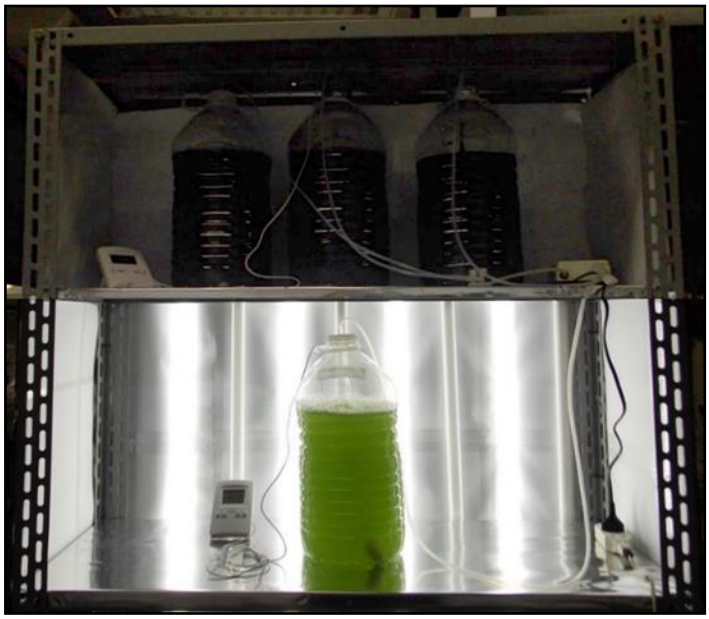


Figura 9. Cultivo microalgal em garrafas do tipo pet cristal. Primeira prateleira com cultivo heterotrófico (ausência de luminosidade e meio de cultura suplementado com vinhaça) e segunda prateleira com cultivo autotrófico (presença de luminosidade e ausência de vinhaça). Para o cultivo mixotrófico utilizou-se a segunda prateleira (presença de luminosidade e meio de cultura suplementado com vinhaça). Fonte: autor, 2014.

3.3.1.1 CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS

O inóculo de *S. maxima* foi transferido para garrafas de 6 L contendo 2,5 L de meio AO, de modo que a concentração inicial de células foi 0,05 $g.L^{-1}$. O Cultivo Cíclico em Duas Etapas (CCDE) corresponde ao crescimento sob condições autotrófica durante a fase clara do fotoperíodo (12 h) e heterotrófica durante a fase escura (12 h). Na fase autotrófica, as células foram iluminadas com 70, 100, 150 e 200 µmol de $fótons.m^{-2}.s^{-1}$ a depender da coloração do meio decorrente da adição de vinhaça. Já na fase heterotrófica, o cultivo foi mantido sob ausência de luminosidade, sendo as células alimentadas com vinhaça. No início de cada fase escura, as células foram alimentadas com vinhaça via substituição de 75 mL de suspensão

celular por 75 mL de vinhaça, de modo que o volume da garrafa fosse constante (2,5 L) e o meio suplementado (batelada alimentada) com vinhaça a 3% v/v durante 7 dias.

Após 7 dias de CCDE, parte da suspensão celular foi coletada (75%) enquanto parte (25%) foi utilizada como inóculo de novo cultivo, sendo esse processo em "corte" chamado de regime semicontínuo. Dois principais esquemas de cultivo semicontínuo foram testados: (i) Ciclo I de CCDE durante 7 dias + Ciclo II de CCDE durante 3 dias; (ii) Ciclo I de CCDE durante 7 dias + cultivo autotrófico de 5 dias (intervalo para restabelecer o crescimento celular) + Ciclo II de CCDE durante 7 dias + intervalo autotrófico de 3 dias + Ciclo III de CCDE durante 7 dias.

Os cultivos foram mantidos sob aeração com ar filtrado e temperatura de 30±3 °C. O pH inicial de 9,5 foi periodicamente ajustado com NaOH 1 M na fase heterotrófica após batelada alimentada de vinhaça. O crescimento celular foi avaliado diariamente, sendo a biomassa produzida nos Ciclos I, II e III de CCDE centrifugada (3.500 rpm e 20 °C durante 10 min), lavada (NH_4HCO_3 0,5 M), liofilizada e estocada (a 4 ºC) até o momento da análise bioquímica.

3.3.2 FORNECIMENTO DE CARBONO ORGÂNICO E NÍVEL DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO

O inóculo de *S. maxima* foi transferido para garrafas de 4 L contendo 2 L de meio AO e concentração inicial de células igual a 0,05 $g.L^{-1}$. A fim de aprimorar o cultivo estabelecido (CCDE), foram avaliadas diferentes estratégias de fornecimento de vinhaça durante a fase heterotrófica. Alterações no nível de CID foram observadas através de modificações no influxo de CO_2 no cultivo e na concentração de HCO_3^- no meio de cultura. Na fase autotrófica, as células foram iluminadas com 70 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ durante os 3 dias iniciais e 150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ durante os 4 dias finais. Para cada estratégia investigada, um cultivo controle autotrófico foi conduzido sob as mesmas condições experimentais, inclusive iluminação (70-150 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$). Todos os cultivos foram mantidos por 7 dias sob aeração com ar filtrado e temperatura de 30±3 °C. O pH inicial de 9,5 foi periodicamente ajustado com NaOH 1 M na fase heterotrófica após o fornecimento de vinhaça e o crescimento celular avaliado diariamente.

3.3.2.1 INJEÇÃO DE VINHAÇA

O fornecimento de vinhaça, no início de cada fase heterotrófica, ocorreu via substituição de 60 mL de suspensão celular por 60 mL de vinhaça resultando em meio suplementado com vinhaça a 3% v/v. Dois modos de fornecimento de vinhaça foram testados: (i) injeção fracionada de substrato, provido em três instantes de tempo, com adição de 20 mL de vinhaça a cada 4 h da fase escura do fotoperíodo; (ii) injeção única de substrato com adição de 60 mL de vinhaça no início da fase escura. Além do cultivo controle, a injeção fracionada de substrato foi conduzida em CCDE com meio AO substituído por água destilada estéril e tampão Na_2CO_3 (4,03 $g.L^{-1}$).

3.3.2.2 INJEÇÃO DE CO_2

Inicialmente, a influência do influxo de CO_2 no crescimento celular foi analisada sob condições autotróficas. Os cultivos foram aerados com ar comprimido filtrado na vazão de 80 $mL.min^{-1}$ enriquecido de CO_2 a 10% v/v. As taxas de ar comprimido e CO_2 foram mensuradas por meio de rotâmetros de gás (APPLITECH®) com leitura na faixa 1-2,4 $L.min^{-1}$ e 0,5-1,3 $L.min^{-1}$, respectivamente. Dois modos de operação foram testados: (i) injeção de CO_2 durante a fase clara do fotoperíodo (12 h); (ii) injeção contínua de CO_2 (24 h). Na sequência, foi observada a influência da densidade celular em cultivo enriquecido de CO_2. A injeção contínua de CO_2 foi analisada em cultivo autotrófico com concentração inicial de células igual a 0,45 $g.L^{-1}$. Nessa situação, o cultivo controle foi conduzido com a mesma concentração celular.

3.3.2.3 CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^-

Inicialmente, a interferência da concentração de HCO_3^- no meio de cultura sobre o crescimento celular foi investigada sob condição autotrófica sem enriquecimento de CO_2. As células foram cultivadas em meio AO reduzido em 50% de $NaHCO_3$ (i.e., redução de 13,61 para 6,81 $g.L^{-1}$). Em seguida, o efeito da redução de HCO_3^- foi observado em CCDE com injeção fracionada de vinhaça. Por fim, foi observado o efeito simultâneo da redução de HCO_3^- em CCDE com injeção fracionada de vinhaça e influxo contínuo de CO_2 .

3.3.2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos nas seções 3.3.1 e 3.3.2 foi conduzida segundo Himmelblau (1970). A análise empregou estimadores de Média (Y), de Variância (S_Y^2) e de Desvio Padrão da Amostra (S_Y), calculados via Eqs. (1), (2) e (3), respectivamente.

$$Y = \left(\frac{\sum_{k=1}^{n} X_k}{n}\right) \tag{1}$$

$$S_Y^2 = \frac{\left(\sum_{k=1}^{n}(X_k - Y)^2\right)}{(n-1)} \tag{2}$$

$$S_Y = \sqrt{S_Y^2} \tag{3}$$

onde n é número de réplicas e X_k é a resposta observada do ensaio k. As curvas de crescimento e análise bioquímica foram observadas em triplicata ($n=3$) e duplicata ($n=2$) independentes, respectivamente. A população de respostas obtidas $\{X_k\}$ segue uma Distribuição Normal N com média θ_x e variância θ_x^2 e distribuição X^2 com n-1 Graus de Liberdade como demonstrados na Eq. (4).

$$Y \rightarrow N\left(\theta_x, \frac{\theta_x^2}{n}\right), \qquad \frac{(n-1)S_Y^2}{\theta_x^2} \rightarrow X_{n-1}^2, \qquad COV(Y, S_Y^2) = 0 \tag{4}$$

onde COV é variância-covariância. O objetivo da análise estatística é inferir os valores corretos de θ_x e θ_x^2 para abordar incertezas e/ou erros associados aos dados obtidos. A partir da Eq. (4) e do teorema t, forma-se a Eq. (5) obedecendo o *t-Student* com n-1 Graus de Liberdade.

$$\frac{Y - \theta_x}{\sqrt{\frac{S_Y^2}{n}}}, \qquad t_{n-1} \tag{5}$$

O valor de α permite $t_{1-\alpha/2}$ ser a abcissa na distribuição t_{n-1} tal que o intervalo $\left[-t_{1-\alpha/2}, t_{1-\alpha/2}\right]$ tem probabilidade 1-α, ou seja, $\left(-t_{1-\alpha/2} \leq t \leq t_{1-\alpha/2}\right)$ = (1-α). Assim, o valor correto de θ_x pode ser localizado dentro de um intervalo de confiança centralizado em Y com probabilidade (1-α)*100% como demonstra a Eq. (6).

$$Y - t_{1-\alpha/2}\sqrt{S_Y^2/n} \leq \theta_x \leq Y + t_{1-\alpha/2}\sqrt{S_Y^2/n} \tag{6}$$

Toda a análise foi baseada no limite de confiança de 95% (α = 0,05). Os gráficos são plotados com valores de Y e as barras verticais representam S_Y ($Y \pm S_Y$). As **tabelas A1-A11** (apêndice) apresentam a análise estatística dos dados obtidos.

3.3.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

O inóculo de *S. maxima* foi transferido para garrafas de 4 L contendo 2 L de meio AO e concentração inicial de células igual a 0,06 $g.L^{-1}$. As concentrações de carbono fornecidas durante o CCDE foram otimizadas aplicando a metodologia de Superfície de Resposta (SR). Um planejamento fatorial completo 3^2 foi utilizado como *design* experimental para otimizar a concentração de vinhaça (1,5-4,5% v/v, X_1) fornecida durante a fase heterotrófica e a concentração de HCO_3^- (2,72-10,9 $g.L^{-1}$, X_2) presente no meio AO. A **tabela 6** indica a configuração experimental e os níveis das variáveis independentes (*input*) da SR.

A vinhaça, injetado de forma fracionada, foi provido em três instantes de tempo (i.e., para 1,5% v/v ou 30 mL, foram adicionados 10 mL de vinhaça a cada 4 h da fase escura do fotoperíodo. Para 3% v/v ou 60 mL, foram adicionados 20 mL de vinhaça a cada 4 h. Para 4,5% v/v ou 90 mL, foram adicionados 30 mL de vinhaça a cada 4 h). O volume da garrafa manteve-se constante (2 L) via substituição do volume de suspensão celular pelo volume de vinhaça. Na fase autotrófica, as células foram iluminadas com 70 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} durante os 2 dias iniciais e 150 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} durante os 3 dias finais.

Foram realizados um total de 9 ensaios com 3 repetições no ponto central. Todos os cultivos foram mantidos por 5 dias sob aeração com ar filtrado e temperatura de 30±3 °C. O pH inicial de 9,5 foi periodicamente ajustado com NaOH 1 M na fase heterotrófica após batelada alimentada de vinhaça. O crescimento celular foi avaliado diariamente e a biomassa obtida processada para posterior análise. Como variáveis dependentes (*output*), foi verificada a máxima taxa específica de crescimento, a produtividade em biomassa e a composição bioquímica celular.

Tabela 6. Configuração experimental e níveis das variáveis *input* da Metodologia SR.

Ensaio	X_1		X_2		Réplicas
	Vinhaça (% v/v)	Nível	$NaHCO_3$ (g.L^{-1})	Nível	
1	4,5	1	6,81	0	1
2	4,5	1	10,9	1	1
3	3,0	0	10,9	1	1
4	1,5	-1	10,9	1	1
5	1,5	-1	6,81	0	1
6	1,5	-1	2,72	-1	1
7	3,0	0	2,72	-1	1
8	4,5	1	2,72	-1	1
9	3,0	0	6,81	0	3

3.3.3.1 MODELO, ANÁLISE ESTATÍSTICA E VALIDAÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Um modelo empírico com estrutura polinomial quadrática (Eq. 7) foi obtido através da SR para prever a máxima taxa específica de crescimento a partir das variáveis *input* X_1 e X_2.

$$Y = \beta_0. + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_3.X_1.X_2 + \beta_4.X_1^2 + \beta_5.X_2^2 \quad (7)$$

onde β_1 e β_2 são coeficientes de regressão linear; β_3 é coeficiente de regressão interativo; β_4 e β_5 são coeficientes de regressão quadrática e β_0 é um termo constante.

A análise empregou estimadores da variância fundamental (σ_ϵ^2) - S_R^2, S_L^2 e S_Y^2 - usados como indicadores da qualidade dos dados obtidos. A Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Médias (S_R^2), a Soma de Quadrados de Resíduos Réplicas-Médias (S_L^2) e a Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Réplicas (S_Y^2) foram calculadas segundo Himmelblau (1970) via Eqs. (8), (9) e (10), respectivamente.

$$S_R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_E} P_i\left(\bar{Y}_i^E - \hat{Y}_i\right)^2}{DFR}, \qquad DFR = N_E - (q+1), \qquad \bar{Y}_i^E = \frac{\sum_{j=1}^{P_i} Y_{ji}^E}{P_i} \quad (8)$$

$$S_L^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_E}\sum_{j=1}^{P_i}(Y_{ij}^E - \bar{Y}_i^E)^2}{DFL}, \qquad DFL = \sum_{i=1}^{N_E} P_i - N_E \tag{9}$$

$$S_Y^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N_E}\sum_{j=1}^{P_i}(Y_{ij}^E - \hat{Y}_i)^2}{DFY}, \qquad DFY = \sum_{i=1}^{N_E} P_i - (q+1) \tag{10}$$

onde *i* e *j* são índices de ensaios e réplicas, respectivamente; N_E e P_i são números de ensaios e réplicas, respectivamente; $\bar{Y}_i^E$ e $\hat{Y}_i$ são as respostas observada e predita do ensaio *i*, respectivamente; Y_{ij}^E é a resposta observada da réplica *j* no ensaio *i*; *DFR*, *DFL* e *DFY* são números de Graus de Liberdade associados às variâncias S_R^2 , S_L^2 e S_Y^2, respectivamente e *q + 1* é o número de parâmetros do modelo.

O teste Fisher (*F-test*) para mensurar a significância de parâmetros do modelo de regressão, os limites de confiança do parâmetro (CL^P) e os limites de confiança dos dados observados (CL^E) foram calculados (HIMMELBLAU, 1970) via Eqs. (11), (12) e (13), respectivamente.

$$F - test = \frac{S_R^2}{S_L^2} \tag{11}$$

$$CL^P = t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{S_Y^2} \tag{12}$$

$$CL^E = t_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{S_Y^2} \tag{13}$$

onde $t_{1-\alpha/2}$ é a abscissa *t-Student* com apropriados Graus de Liberdade e probabilidade $\left(-t_{1-\alpha/2} \leq t \leq t_{1-\alpha/2}\right)$ = (1-α)*100%. Toda a análise foi baseada no nível de confiança de 95% (α = 0,05), sendo $p \leq 0{,}05$ considerado estatisticamente significante. A validação do modelo de SR foi conduzida em triplicata, em ensaios utilizando os níveis ótimos de variáveis *input*. O modelo e os gráficos da SR foram gerados através do programa MATLAB (The Mathworks Inc.).

3.3.3.2 CONSUMO DA MATÉRIA ORGÂNICA PRESENTE NA VINHAÇA

A remoção de matéria orgânica da vinhaça foi observada sob condições ótimas de cultivo (ensaios de validação do modelo de SR) através da DBO e DQO, ambas avaliadas conforme procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and*

Wastewater (1976). A remoção de íons foi avaliada através da leitura em medidor de condutividade elétrica.

3.3.4 PARÂMETROS DO CULTIVO

O crescimento celular foi monitorado pela leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (SHIMADZU modelo U-1800 EGN 120V) a 730 nm (DO_{730nm}), sendo a DO_{730nm} corrigida em função da concentração de vinhaça adicionada. A curva de crescimento foi construída a partir dos valores de peso seco ($g.L^{-1}$) em escala logarítmica. A DO_{730nm} de *C. vulgaris* e *S. maxima* foi correlacionada (**figura A3**, apêndice) com o peso seco *X* via Eqs. (14) e (15), respectivamente.

$$X = \frac{(DO_{730nm})}{3{,}7464}, \qquad R^2 = 0{,}987 \tag{14}$$

$$X = \frac{(DO_{730nm})}{1{,}8158}, \qquad R^2 = 0{,}995 \tag{15}$$

O peso seco foi determinado por meio da filtração a vácuo da suspensão celular em membranas de fibra de vidro de poro 0,45 µm (SARTORIUS®) previamente pesadas. As membranas contendo biomassa de *S. maxima* foram ainda lavadas com NH_4HCO_3 0,5 M. Após filtração e lavagem, as membranas foram secas em estufa (ICAMO modelo 3) a 100 ºC até peso constante. As membranas secas foram resfriadas em dessecador e pesadas novamente. O peso seco foi calculado a partir da diferença entre o peso final e o peso inicial da membrana.

A máxima taxa específica de crescimento (µ, d^{-1}) foi determinada na fase exponencial via Eq. (16).

$$\mu = \left(\frac{1}{t}\right) ln\left(\frac{X_f}{X_i}\right) \tag{16}$$

onde *t* é o tempo total de crescimento exponencial (d); X_f e X_i são concentrações final e inicial da cultura ($g.L^{-1}$) em *t*, respectivamente. A produtividade em biomassa no final do cultivo ($mg.L^{-1}.d^{-1}$) foi o quociente da concentração de biomassa produzida ($mg.L^{-1}$) pelo tempo total de cultivo (d).

3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA PRODUZIDA

3.4.1 CARBOIDRATOS TOTAIS

Os carboidratos totais foram extraídos de acordo com o método descrito por Myklestad & Haug (1972). Para o preparo do extrato, foi utilizado 0,03 g de biomassa seca para cada 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi incubada em banho a 4 ºC por 20 h. O extrato foi diluído pela adição de 6 mL de água destilada e filtrado a vácuo em membrana de fibra de vidro de poro 0,45 µm (SARTORIUS®). O teor de carboidratos totais foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al*., 1956). Uma alíquota de 1 mL do extrato diluído foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 0,5 mL de fenol 3% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A amostra repousou por 10 min, sendo agitada e novamente repousada em banho a 25 ºC por mais 10 min. A absorvância foi obtida a 490 nm (SHIMADZU modelo U-1800 EGN 120V). A curva de calibração (**figura A4**, apêndice) foi construída usando D-glicose como padrão.

3.4.2 PROTEÍNAS TOTAIS

O conteúdo de proteínas totais foi obtido pela multiplicação do conteúdo de nitrogênio total (%) pelo fator de conversão específico 4,22 (LOURENÇO *et al*., 2004). O nitrogênio total foi quantificado por análise elementar CHN (%), utilizando 1,7 mg de biomassa seca para combustão a 1075 ºC em analisador elementar (Perkin-Elmer CHN analyzer modelo 2400). O conteúdo de nitrogênio presente na biomassa foi convertido em gás e quantificado por célula de condutividade térmica. Acetanilida foi usada para calibração.

3.4.3 LIPÍDIOS TOTAIS

A extração de lipídios foi realizada pela mistura clorofórmio:metanol (2:1) assistido por ultrassom (SANTOS *et al*., 2015). Foi utilizado 0,5 g de biomassa seca para cada 36 mL da mistura de solventes. A mistura foi submetida ao banho ultrassônico (UNIQUE modelo USC-1400A) sob 40 kHz por 20 min a temperatura ambiente. Após filtração a vácuo em membrana de fibra de vidro de poro 0,45 µm (SARTORIUS®), a fase orgânica foi coletada e transferida

para outro tubo onde foram adicionados 9 mL de KCl 0,88%. Após remoção da fase superior com o auxílio de uma pipeta, a fase inferior foi lavada pela adição de 4,5 mL da mistura clorofórmio:metanol:água (3:48:47). A lavagem foi repetida duas vezes, sendo a fase superior coletada e seca em estufa a 40 ºC até peso constante. O conteúdo de lipídios totais foi determinado por gravimetria.

3.4.4 CINZAS

O teor de cinzas foi estimado por calcinação da biomassa seca em forno mufla (HELRICH, 1990). As cinzas foram obtidas a partir da filtração a vácuo da suspensão celular em membranas de fibra de vidro de poro 0,45 µm (SARTORIUS®), previamente pesadas, e tratamento em forno mufla (QUIMIS modelo Q318M21) a 450 ºC por 1 h. Após resfriamento em dessecador, as membranas foram pesadas novamente. O teor de cinzas foi calculado a partir da diferença entre o peso inicial e o peso final da membrana.

3.5 CULTIVOS UTILIZANDO LUZ SOLAR

Os cultivos utilizando luz solar foram realizados visando observar o comportamento celular em face das oscilações ambientais de luminosidade e temperatura e, supostamente, projetar o CCDE em fotobiorreator com captação solar. A média e variância ($n=2$) (**tabela A12**, apêndice) foram conduzidas conforme descrito na seção 3.3.2.4.

O inóculo de *S. maxima* foi transferido para garrafas de vidro transparente de 10 L contendo 8 L de meio AO estéril e concentração inicial de células igual a 0,05 $g.L^{-1}$. Sob condição autotrófica, os cultivos foram conduzidos em batelada simples, aerados com ar filtrado proveniente de compressores de aquário com vazão 800 $cm^3.min^{-1}$ e iluminados por luz solar de dois modos: (i) iluminação em período matutino (i.e., 9 h às 12 h); (ii) iluminação em período matutino e vespertino (i.e., 9 h às 15 h). Para controle foi utilizado o cultivo autotrófico iluminado por luz artificial (i.e., 6 h às 18 h). O pH inicial dos cultivos foi ajustado para 9,5 com NaOH 1 M. As oscilações na luminosidade e temperatura decorrentes das variações ambientais foram acompanhadas durante todo o dia e o crescimento celular avaliado diariamente. A **figura 10** retrata o cultivo mantido sob iluminação solar.

Figura 10. Cultivo microalgal iluminado por luz solar em período matutino às 16 h. Fonte: autor, 2016.

3.6 SEPARAÇÃO DE BIOMASSA POR MEIO DA FLOCULAÇÃO

Os ensaios de floculação visaram explorar a ação de vacúolos gasosos presentes em *S. maxima* para processos *dowstream* de separação de biomassa. A média e variância (*n=2*) (**tabelas A13-A14**, apêndice) foram conduzidas conforme descrito na seção 3.3.2.4.

Foi verificada a separação sólido-líquido da biomassa produzida durante cultivos autotróficos ao longo do presente trabalho. A separação química ocorreu em provetas contendo 50 mL de suspensão celular onde foi adicionado 1 mL de NaOH nas concentrações 1 M, 2 M, 3 M, 4 M e 5 M. As suspensões foram homogeneizadas três vezes e incubadas a 25 ºC durante 90, 120 e 150 min. Para avaliar a interferência da composição bioquímica sobre o mecanismo de floculação, a separação sólido-líquido mediada por NaOH também foi realizada com biomassa na fase exponencial de crescimento.

Após o tempo de incubação, foi retirada uma alíquota na porção inferior da coluna de suspensão celular. A eficiência do processo de separação foi verificada pela redução da densidade óptica (DO_{730nm}), a qual foi calculada a partir da diferença entre a DO_{730nm} obtida antes da adição de NaOH e a DO_{730nm} obtida após incubação. Variações no pH também foram

avaliadas após incubação e a integridade celular foi observada por microscopia óptica (BIOVAL modelo L1000B).

CAPÍTULO 4

Resultados & Discussão

4.1 ESCOLHA DA MICROALGA E DA ESTRATÉGIA DE CULTIVO MAIS PROMISSORA

O crescimento das microalgas em meio de cultura suplementado ou não com vinhaça foi acompanhado sob condições heterotrófica, mixotrófica e autotrófica. A **figura 11** apresenta o crescimento de *C. vulgaris* mantido por 10 dias sob diferentes regimes. A máxima densidade celular registrada sob condições heterotrófica (meio contendo 0,1% v/v de vinhaça), mixotrófica (meio contendo 1% v/v de vinhaça) e autotrófica foi 0,109 $g.L^{-1}$, 0,160 $g.L^{-1}$ e 0,143 $g.L^{-1}$, respectivamente. Nessas condições, as máximas taxas específicas de crescimento variaram entre 0,21-0,36 d^{-1}.

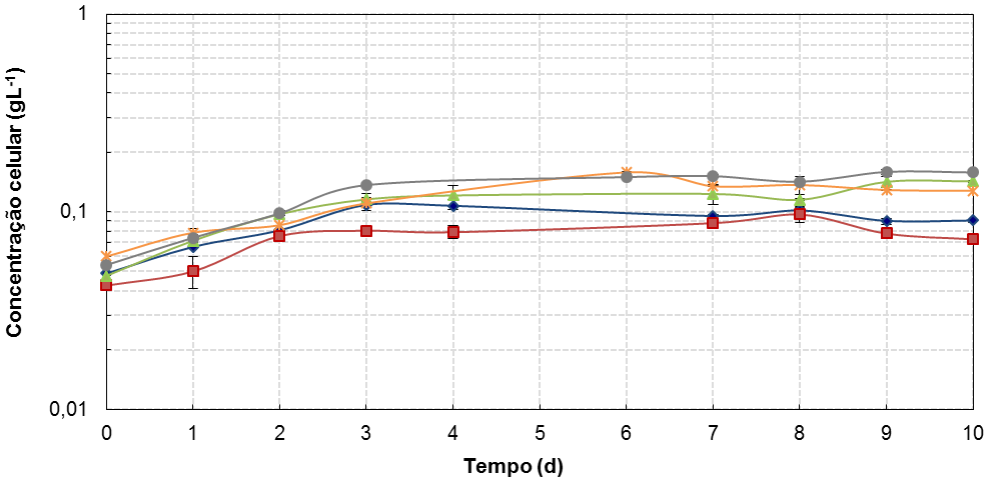


Figura 11. Crescimento de *Chlorella vulgaris* sob diferentes regimes. (--♦--) Cultivo heterotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça. (--■--) Cultivo heterotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça. (--x--) Cultivo mixotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça. (--●--) Cultivo mixotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça. (--▲--) Cultivo autotrófico.

No caso de *S. maxima*, o cultivo heterotrófico alcançou a fase estacionária entre 2-4 dias de crescimento (**figura 12**) apresentando máxima concentração celular (em meio contendo 1% v/v de vinhaça) de 0,198 $g.L^{-1}$. Já os cultivos mixotrófico e autotrófico mantiveram-se em fase exponencial por mais tempo. Após 25 dias, foi produzido 0,716 $g.L^{-1}$ de biomassa sob condição mixotrófica (meio contendo 1% v/v de vinhaça). O cultivo autotrófico apontou uma produção de biomassa cerca de 20% menor do que os cultivos mixotróficos. O crescimento de *S. maxima*

sob diferentes regimes influenciou as máximas taxas específicas de crescimento. Os cultivos heterotróficos contendo meio suplementado com 0,1% e 1% v/v de vinhaça indicaram máxima taxa específica de crescimento de 0,54 d^{-1} e 1,47 d^{-1}, respectivamente. No cultivo autotrófico a taxa de crescimento foi 0,97 d^{-1}, enquanto os cultivos mixotróficos obtiveram valores entre 0,84-1,34 d^{-1}.

Embora a espécie de *C. vulgaris* esteja entre as mais estudadas, apresentando inúmeros dados na literatura, a cepa de *C. vulgaris* empregada no presente trabalho não demonstrou ser propícia ao consumo de carbono orgânico devido a características como baixa densidade celular e fácil contaminação na presença de vinhaça (dados não apresentados). Enquanto a presença de carbono orgânico no cultivo heterotrófico de *S. maxima* pode aumentar a taxa específica de crescimento na fase exponencial, a associação entre a intensidade luminosa e a vinhaça no cultivo mixotrófico pode aumentar a biomassa produzida na fase estacionária.

Esses resultados sugerem que existe uma sinergia entre iluminação e vinhaça durante o cultivo de *S. maxima*, a qual pode ser explorada por meio da estratégia de Cultivo Cíclico em Duas Etapas (CCDE) empregando condições autotrófica durante a fase clara do fotoperíodo (12 h) seguida de condição heterotrófica durante a fase escura (12 h). O fornecimento de vinhaça como fonte de carbono orgânico pode proporcionar o crescimento noturno e reduzir substancial perda respiratória, de modo a impactar significativamente a produtividade em biomassa e o rendimento de biomoléculas específicas.

Sabe-se que ciclos claro:escuro durante o fotoperíodo têm impacto direto no balanço fotossíntese:respiração. Como alternativa para aumentar a taxa fotossintética e reduzir a perda de biomassa durante a respiração, alguns estudos têm descrito o cultivo intermitente em ciclo claro (KIM *et al*., 2011; LI *et al*., 2015a), a inserção de painel LED gerando fotoperíodo altamente controlado (CHOI *et al*., 2013; WAGNER *et al*., 2016), além de mudanças na temperatura de cultivo durante o ciclo escuro (OGBONNA & TANAKA, 1996; WANA *et al*., 2014). Nesse sentido, o CCDE aplicado no início de cada fotoperíodo é uma estratégia, ambientalmente correta, para manter a célula em crescimento contínuo sem perdas de biomassa (OGBONNA & TANAKA, 1998).

As vantagens de escolher *Spirulina* sp. para o tratamento de vinhaça incluem: (i) ocorrência natural em meio alcalino, sendo uma condição natural que reduz a presença de contaminantes biológicos; (ii) crescimento ótimo em temperatura acima de 25 ºC de maneira que a alta densidade de fluxo de fótons pode provocar o aumento da temperatura sem comprometer o crescimento celular; (iii) alta taxa de crescimento e robustez (características de cianobactéria) (HABIB *et al*., 2008).

Uma vez escolhida, apenas a biomassa da *S. maxima* foi avaliada (**figura 13**) quanto à composição bioquímica. Sob condições autotrófica e mixotrófica, a composição bioquímica da biomassa não foi significativamente diferente. O conteúdo em peso seco de carboidratos, proteínas e lipídios variou entre 4,5-6,4%, 73,9-76,5% e 9,9-11,5%, respectivamente. O teor de cinzas, aproximadamente constante, foi 5,2%. A **figura 14** retrata os meios de cultura de *S. maxima* sob diferentes momentos e regimes.

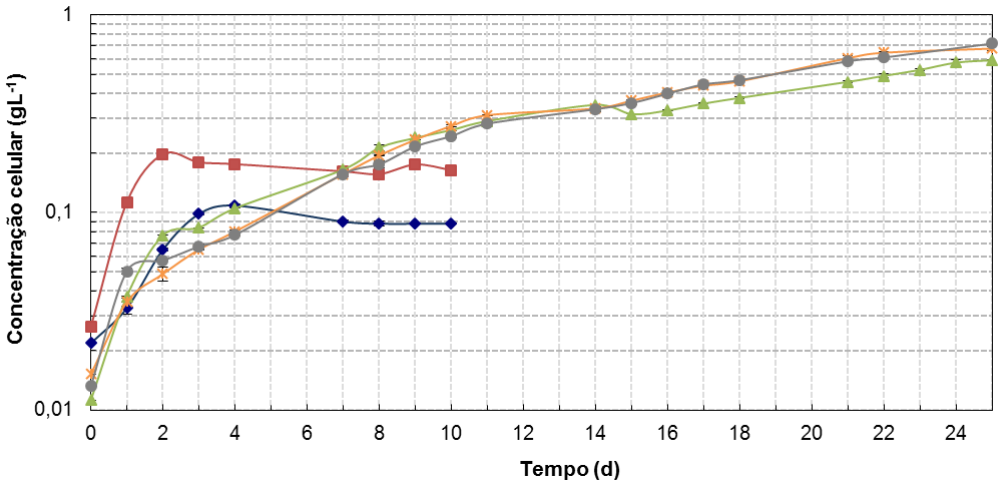


Figura 12. Crescimento de *Spirulina maxima* sob diferentes regimes. (--♦--) Cultivo heterotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça. (--■--) Cultivo heterotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça. (--x--) Cultivo mixotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça. (--●--) Cultivo mixotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça. (--▲--) Cultivo autotrófico.

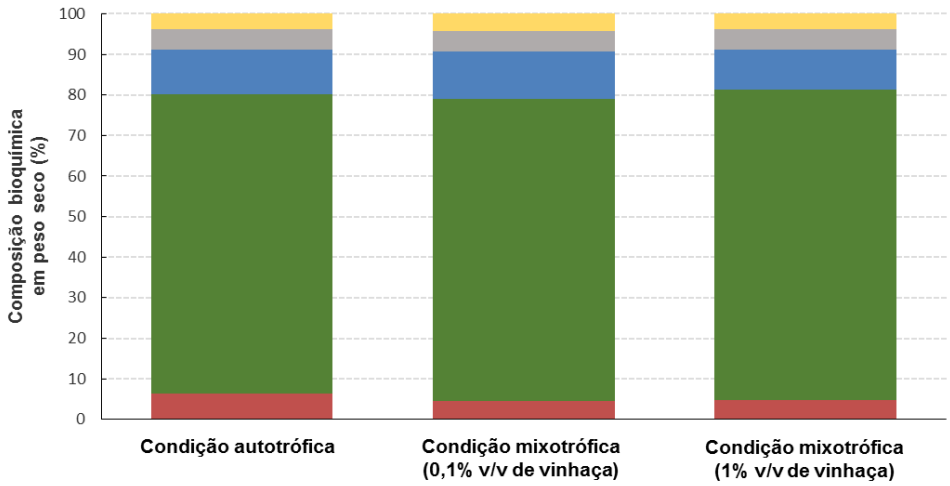


Figura 13. Composição bioquímica da biomassa de *Spirulina maxima* obtida após 25 dias de cultivo sob diferentes regimes. (■) Carboidratos. (■) Proteínas. (■) Lipídios. (■) Cinzas. (■) Outros.

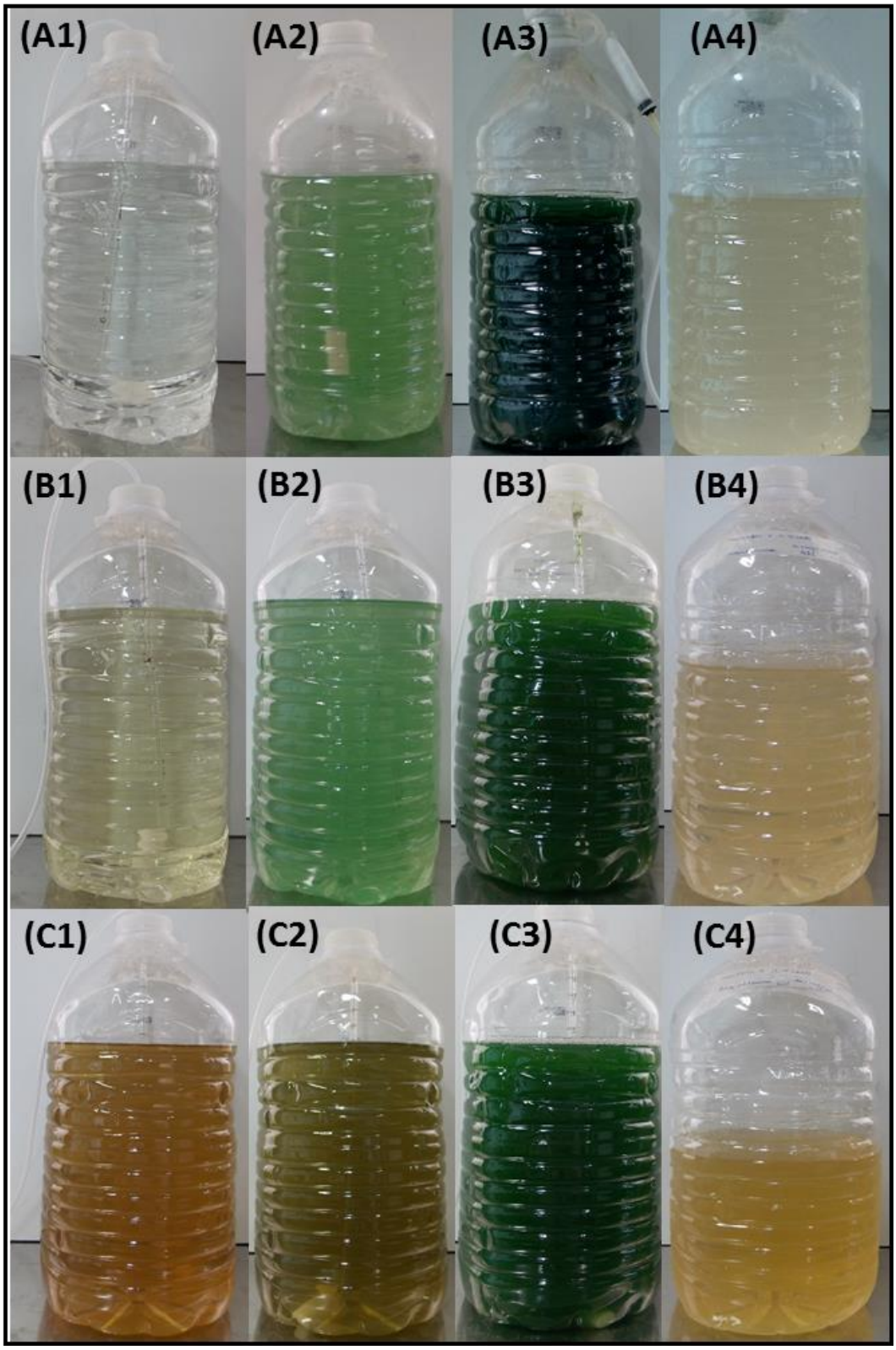


Figura 14. Meios de cultura de *Spirulina maxima* sob diferentes momentos e regimes. Colunas 1, 2, 3 e 4 representam meios de cultura antes do inóculo de células, imediatamente após o inóculo de células, após 25 dias de cultivo e após a separação celular por centrifugação, respectivamente. Linhas A, B e C representam os cultivos autotrófico, mixotrófico com meio contendo 0,1% v/v de vinhaça e mixotrófico com meio contendo 1% v/v de vinhaça, respectivamente.

4.1.1 CULTIVO CÍCLICO EM DUAS ETAPAS

No CCDE de *S. maxima*, as células foram iluminadas durante a fase autotrófica (12 h) e alimentadas com vinhaça a 3% v/v durante a fase heterotrófica (12 h). As **figuras 15** e **16** apontam os dois principais esquemas de cultivo semicontínuo testados. Após 7 dias de CCDE, foi produzido 0,495 $g.L^{-1}$ de biomassa com máxima taxa específica de crescimento de 1,13 d^{-1} (Ciclo I). No 7º dia de cultivo, 75% da suspensão celular foi coletada e substituída por volume igual de meio de cultura suplementado com vinhaça a 3% v/v (Ciclo II de CCDE). O encadeamento de CCDE demostra baixo crescimento celular no Ciclo II em relação ao Ciclo I (**figura 15**).

Uma possível razão para a ineficiência do Ciclo II, em subsequência, é a ausência de um intervalo autotrófico de poucos dias para clarificar a suspensão e restabelecer o crescimento celular. Isso porque a batelada alimentada de vinhaça durante a fase escura do fotoperíodo altera a coloração do meio de cultura impedindo a penetração de luz durante a fase clara. Ensaios preliminares em meios suplementados com vinhaça em concentrações superiores a 10% v/v não induziram crescimento celular (dados não apresentados).

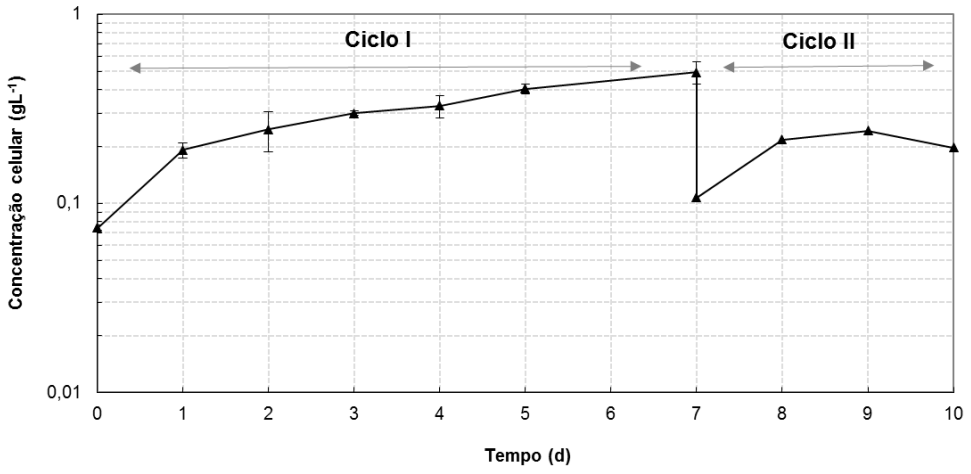


Figura 15. Crescimento de *Spirulina maxima* em cultivo semicontínuo. Ciclo I representa o CCDE com corte de 75% da suspensão celular no 7º dia e substituição por volume igual de meio de cultura suplementado com vinhaça a 3% v/v iniciando o Ciclo II de CCDE.

Como alternativa para restabelecer o crescimento celular, foram testados Ciclos de CCDE com intervalos autotróficos de 5 e de 3 dias (**figura 16**). Assim, no 7º dia de cultivo, 75% da suspensão celular foi coletada e substituída por volume igual de meio de cultura sem vinhaça. Ao 12º dia, 86% da suspensão celular (a fim de que a concentração inicial de células fosse constante em todos os Ciclos) foi substituída por meio de cultura contendo 3% v/v de vinhaça (Ciclo II de CCDE). Ao término do Ciclo II, foi obtido 0,609 $g.L^{-1}$ de biomassa, sendo 75% da suspensão celular novamente substituída por meio de cultura sem vinhaça. Ao 22º dia, 75% da suspensão celular foi substituída por meio de cultura com vinhaça dando início ao Ciclo III de CCDE com a produção final de 0,585 $g.L^{-1}$ de biomassa. As máximas taxas específicas de crescimento nos Ciclos II e III foram 1,09 d^{-1} e 0,52 d^{-1}, respectivamente.

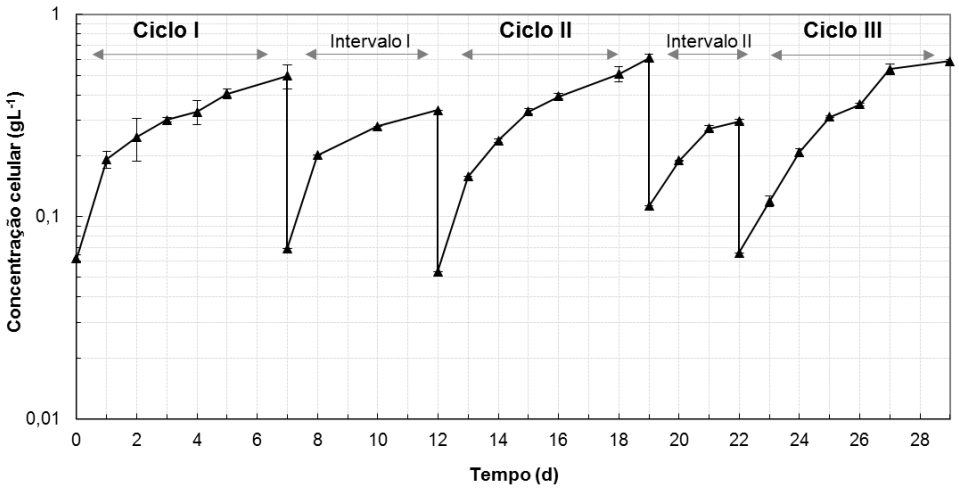


Figura 16. Crescimento de *Spirulina maxima* em cultivo semicontínuo com intervalos autotróficos. Ciclos I, II e III representam o CCDE intercalados por intervalos de 5 e de 3 dias sob condições autotróficas, respectivamente.

Em comparação ao cultivo autotrófico de *S. maxima* (**figura 12**), densidades celulares similares (0,495-0,609 $g.L^{-1}$) foram obtidas entre 22-25 dias decorridos de cultivo, portanto a estratégia de CCDE permite manter a célula em crescimento contínuo sem substancial perda respiratória. Como consequência, o tempo de cultivo pode ser reduzido (7 dias) sem comprometer a produtividade em biomassa.

Sob condição autotrófica, o pH do cultivo aumenta gradualmente durante a fotossíntese devido à conversão de HCO_3^- a CO_2 consumindo prótons ($HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$) (SWARNALATHA *et al.*, 2015). Sendo a vinhaça predominantemente ácida, a batelada

alimentada durante a fase heterotrófica reduz o pH do meio de cultura tal que o pH durante o CCDE pode alcançar valores fora da faixa ótima de crescimento (dados não apresentados). Para prevenir variações de pH com efeito negativo sobre o crescimento de *S. maxima*, o pH inicial foi periodicamente ajustado mantendo as características básicas do meio de cultura. A **figura 17** exibe os valores de pH (9,4-9,8) no meio de cultura durante os Ciclos e intervalos de CCDE. A variação na densidade de fluxo de fótons (70-200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, **figura 18**) também é consequência da batelada alimentada de vinhaça, visto que a coloração do meio é alterada impedindo a penetração de luz durante a fase clara.

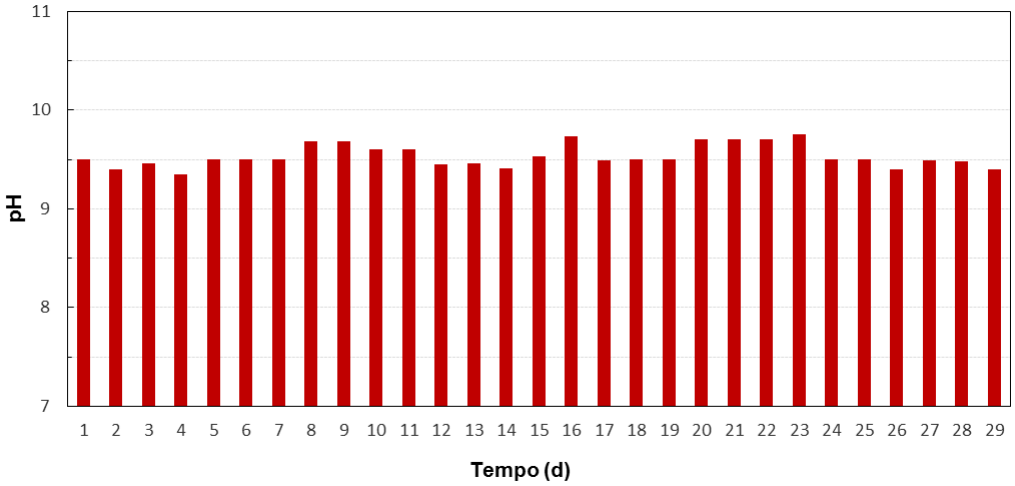


Figura 17. Valores de pH no meio de cultura durante os Ciclos e intervalos de CCDE.

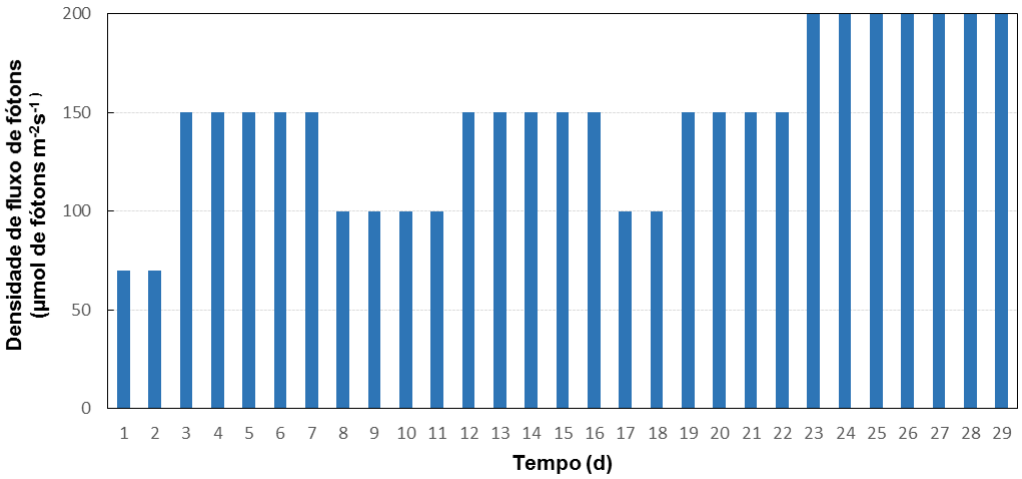


Figura 18. Luminosidade estimada na superfície externa das garrafas de cultura durante os Ciclos e intervalos de CCDE.

A análise bioquímica da biomassa produzida nos Ciclos de CCDE não foi significativamente diferente (**figura 19**). O teor em peso seco de carboidratos, proteínas e lipídios variou entre 7,2-8,7%, 74,3-77,3% e 6,1-7,6%, respectivamente. O conteúdo de cinzas foi constante (5,2%). Assim, a estratégia de CCDE é vantajosa por impactar significativamente a produtividade em biomassa sem comprometer o elevado conteúdo proteico característico de *Spirulina* sp.

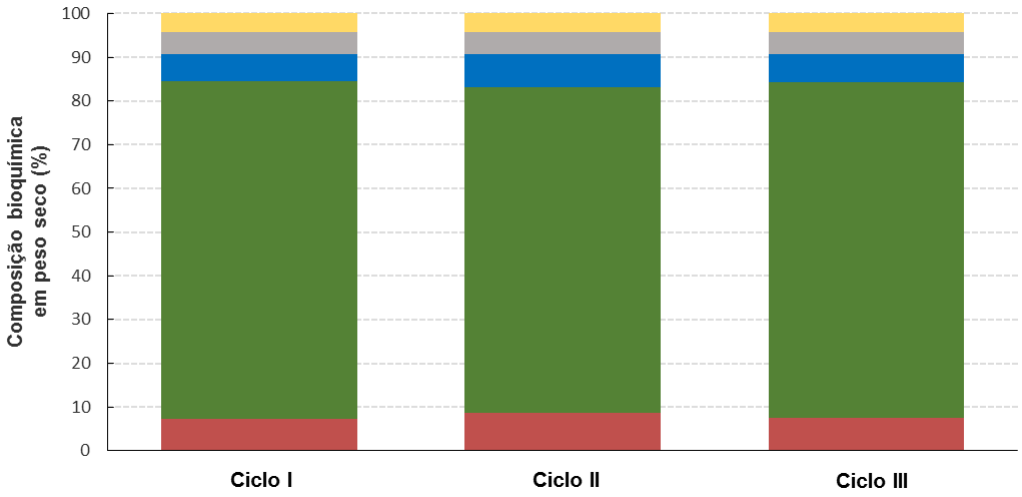


Figura 19. Composição bioquímica da biomassa de *Spirulina maxima* obtida no 7º dia (Ciclo I), 19º dia (Ciclo II) e 29º dia de cultivo (Ciclo III). (■) Carboidratos. (■) Proteínas. (■) Lipídios. (■) Cinzas. (■) Outros.

Em 2010, Barrocal e colaboradores avaliaram o crescimento de *S. maxima* em meio Schlösser suplementado com 1, 2, 5 e 7 $g.L^{-1}$ de vinhaça de beterraba. O cultivo mixotrófico ocorreu em fotobiorreator *airlift* tubular (injeção de 1 $L.min^{-1}$ de ar) de 3,55 L a 25-30 ºC e iluminação constante de 3.000 Lx (~41 µmol de $fótons.m^{-2}.s^{-1}$). Com inóculo inicial de 0,25 $g.L^{-1}$, o fotobiorreator operou em regime contínuo com vazão constante de meio de cultura. A máxima densidade celular (4,8 $g.L^{-1}$) foi observada no cultivo suplementado com vinhaça bruta a concentração de 1 $g.L^{-1}$ em menos de 20 dias. Os cultivos com 2 e 5 $g.L^{-1}$ de vinhaça apresentaram concentração de biomassa de 4,3 e 4,8 $g.L^{-1}$, respectivamente, em maior tempo. A composição do meio não influenciou a taxa específica de crescimento (0,1 d^{-1}).

Esse mesmo grupo científico descreveu o crescimento de *S. platensis* cultivada em meio Schlösser contendo vinhaça de beterraba (COCA *et al.*, 2015). Inicialmente, o cultivo mixotrófico ocorreu em frascos *Erlenmeyer* contendo 100 mL de meio com inóculo inicial de 0,2 $g.L^{-1}$ a 30 ºC, fotoperíodo 16:8 h e agitação orbital de 150 rpm. Foram avaliadas a influência

de quatro fatores: intensidade luminosa (24, 48, 72 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}); tempo de cultivo (15, 20, 25 dias); concentração de vinhaça no meio de cultura (sem vinhaça, 2, 5 g.L^{-1}) e diluição do meio (sem diluição, diluição 75% meio + 25% água destilada, diluição 50% meio + 50% água destilada). A máxima concentração celular (3,3 g.L^{-1}) foi observada em 72 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, 25 dias de cultivo, 2 g.L^{-1} de vinhaça e meio sem diluição.

Sabe-se que o peso seco de microalgas é afetado pela quantidade de sais presentes na água intracelular e absorvidos na superfície celular. Nesse caso, a lavagem da biomassa é uma técnica que deve ser adotada para evitar valores não reais de peso seco (ZHU & LEE, 1997). Curvas iniciais de correlação entre valores de DO_{730nm} e peso seco (g.L^{-1}) sem a etapa de lavagem da biomassa com NH_4HCO_3 superestimaram valores de peso seco em até quatro vezes (dados não apresentados). Em muitos trabalhos é comum a ausência de descrição da etapa de lavagem, o que pode justificar valores aparentemente elevados de concentração celular.

Ogbonna & Tanaka (1996) introduziram a estratégia de cultivo cíclico utilizando ciclos claro:escuro para investigar a perda de biomassa e mudanças na composição bioquímica de *Chlorella pyrenoidosa*. O fornecimento de glicose como fonte de carbono orgânico durante a fase escura do fotoperíodo permitiu o crescimento celular contínuo sem perdas e efeito adverso sobre a composição bioquímica da biomassa. Esses autores também observaram o cultivo cíclico de *Euglena gracilis* utilizando glicose, etanol e acetato como fonte de carbono orgânico (OGBONNA & TANAKA, 1998). Em 2000, Yang e colaboradores avaliaram o fluxo metabólico em cultivo cíclico de *C. pyrenoidosa* por meio do fornecimento de glicose como fonte de carbono orgânico.

4.2 FORNECIMENTO DE CARBONO ORGÂNICO E NÍVEL DE CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO

A fim de aprimorar o cultivo estabelecido (CCDE), foram avaliados diferentes modos de fornecimento de vinhaça durante a fase heterotrófica. Alterações no nível de CID foram observadas através de modificações no influxo de CO_2 no cultivo e na concentração de HCO_3^- no meio de cultura.

4.2.1 INJEÇÃO DE VINHAÇA

Embora a máxima taxa específica de crescimento nos dois modos de injeção testados seja a mesma (1,13 d^{-1}), a produtividade em biomassa no cultivo com injeção fracionada de vinhaça foi 35,4% maior (83,8 $mg.L^{-1}.d^{-1}$) em relação ao modo de injeção única (61,9 $mg.L^{-1}.d^{-1}$). Em adição, a injeção fracionada de vinhaça foi conduzida em CCDE com meio de cultura substituído por água destilada. Assim, ensaios de CCDE em água destilada (tendo vinhaça como a única fonte de nutriente) obtiveram 42 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ de produtividade em biomassa e taxa de crescimento de 1,10 d^{-1} enquanto o cultivo controle autotrófico resultou em 37,8 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ e 0,55 d^{-1}, respectivamente (**figura 20a**). A **figura 20b** exibe os valores de pH (9,3-9,7) nos cultivos observados.

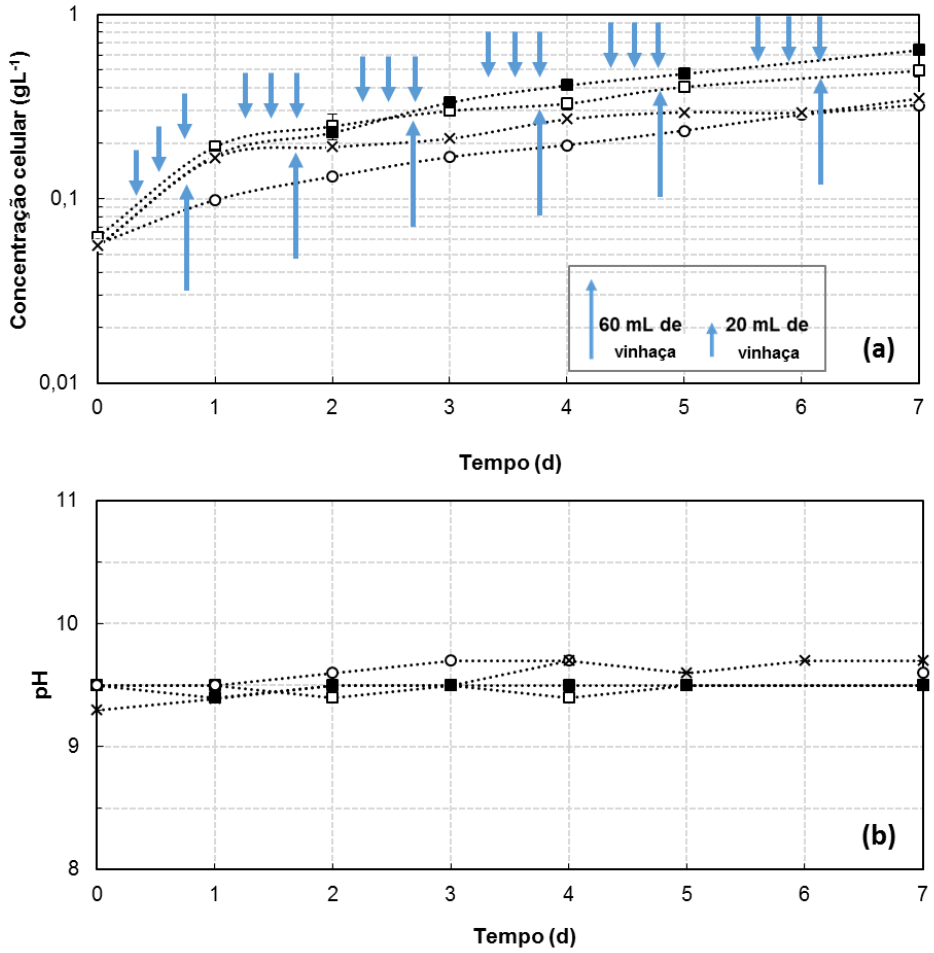


Figura 20. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH nos meios durante o CCDE com diferentes fornecimentos de vinhaça a 3% v/v durante a fase heterotrófica. (....■....) CCDE com injeção fracionada de vinhaça. (....□....) CCDE com injeção única de vinhaça. (....x....) CCDE em água destilada com injeção fracionada de vinhaça. (....○....) Cultivo autotrófico sem injeção de vinhaça. Setas azuis indicam injeção de vinhaça.

O modelo de cinética Monod estabelece uma associação entre a concentração de substrato (*S*) limitante no meio e a taxa específica de crescimento (μ_X) através da máxima taxa específica de crescimento (μ_M) e da constante de saturação do substrato (K_S) (LEE *et al*., 2015a). No início do cultivo, quando *S* é alta (em relação ao inóculo obtido na ausência de vinhaça), a célula deve apresentar μ_X próximo de μ_M em ambos os modos de injeção. Entretanto, no CCDE com injeção fracionada de vinhaça ocorre uma suposta redução da K_S mantendo o platô da fase exponencial por um tempo maior (até o 4º dia). Em situação sem inibição por substrato, maior duração na fase exponencial resulta em maior produtividade em biomassa.

Um modelo (expresso via Eqs. 17-21) explicando o efeito do fornecimento de vinhaça e do nível de CID sobre a cinética de crescimento celular pode ser desenvolvido a partir dos resultados experimentais aqui apresentados e da cinética Monod. A perda de biomassa e o balanço fotossíntese:respiração são dependentes do CID (HCO_3^- induz respiração e, consequentemente, perda respiratória) e da luminosidade (durante a fotossíntese essa perda é menor). Simultaneamente, a injeção fracionada de vinhaça impacta positivamente o crescimento heterotrófico (LUONG, 1987; KEYMER *et al*., 2014).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X - f_L \tag{17}$$

$$f_L = \frac{S_I}{K_I+S_I}\frac{IR}{K_{IR}+IR} \tag{18}$$

$$\mu_X = \mu_{X,H} + \mu_{X,A} \tag{19}$$

$$\mu_{X,A} = \mu_{M,A}\frac{S_I}{K_I+S_I}\frac{IR}{K_{IR}+IR} \tag{20}$$

$$\mu_{X,H} = \mu_{M,H}\frac{S_O}{K_O+S_O}[1-\frac{S_O}{S_{O,MAX}}]^n \tag{21}$$

onde *dX* é a diferença entre concentração final e inicial da células; *dt* é a variação de tempo final e inicial de crescimento; μ_X, f_L e *IR* são taxa específica de crescimento, perda de biomassa e luminosidade, respectivamente; $\mu_{X,A}$ e $\mu_{X,H}$ são taxas específicas para crescimento autotrófico e heterotrófico, respectivamente; $\mu_{M,A}$ e $\mu_{M,H}$ são máximas taxas específicas de crescimento autotrófico e heterotrófico, respectivamente; S_I e S_O são concentrações de carbono inorgânico e carbono orgânico, respectivamente; K_I, K_O e K_{IR} são constantes de saturação para S_I, S_O e *IR*, respectivamente; S_O, MAX é a concentração de S_O que inibe a regulação intensificada pelo exponente *n* (LUONG, 1987).

Conforme Eq. (21), o fornecimento de vinhaça na fase escura do fotoperíodo desencadeia o crescimento heterotrófico proporcionando aumento da densidade celular em relação ao cultivo exclusivamente sob condição autotrófica. Já a injeção fracionada de vinhaça minimiza a inibição por substrato justificando melhor desempenho quando comparado à injeção única. Como expresso em Eq. (20), a iluminação artificial é capaz de manter o crescimento noturno, mas com notório aumento de custos. Nesse caso, o CCDE com injeção fracionada de vinhaça pode proporcionar benefícios econômicos em larga escala industrial. Sabe-se que a geração de energia heterotrófica em cianobactérias ocorre por meio da via oxidativa pentose fosfato, via glicolítica e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (SUBASHCHANDRABOSE *et al*., 2013); e que sob nutrição heterotrófica, moléculas orgânicas fornecem energia primária proporcionado maiores produtividades (ZHEN *et al*., 2012; ZHOU *et al*., 2012).

Ainda que a vinhaça possa ser utilizada como fonte de carbono orgânico na obtenção de biomassa microalgal e a estratégia de cultivos cíclicos utilizando ciclos claro (autotrófico):escuro (heterotrófico) seja potencialmente vantajosa para aumentar a produtividade em biomassa microalgal, poucos são os relatos explorando CCDE e inexistente é o emprego de vinhaça para crescimento heterotrófico durante os ciclos escuros. Em 2014, Ramirez e colaboradores otimizaram temperatura, concentração de vinhaça de cana-de-açúcar e intensidade luminosa durante cultivo de *Scenedesmus* sp. As condições ótimas indicadas no planejamento fatorial foram 20-30 ºC, meio WC suplementado com 40% v/v de vinhaça e 10.000 Lx (~137 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) em fotoperíodo 12:12 h. Sob condições ótimas, o cultivo mixotrófico em fotobiorreator *airlift* de 3 L após 10 dias alcançou 80 mg.L^{-1}.d^{-1} de produtividade em biomassa (no presente trabalho, o CCDE com injeção fracionada de vinhaça a 3% v/v durante 7 dias apresentou 83,3 mg.L^{-1}.d^{-1} de produtividade em biomassa).

4.2.2 INJEÇÃO DE CO_2

A **figura 21a** mostra o crescimento de *S. maxima* sob condição autotrófica com dois modos de injeção de CO_2 a 10% v/v. O cultivo com injeção de CO_2 durante a fase clara do fotoperíodo (12 h) apresentou comportamento similar (sem diferença significativa) ao cultivo controle aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2. Nessas situações, a produtividade em biomassa e a máxima taxa específica de crescimento variaram entre 38,8-39,7 mg.L^{-1}.d^{-1} e 0,57-0,60 d^{-1}, respectivamente. Ao comparar com o cultivo aerado

continuamente (24 h) com ar comprimido enriquecido de CO_2, a produtividade em biomassa aumentou para 65,5 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ enquanto a taxa de crescimento foi 0,56 d^{-1}.

A dissolução de CO_2 em meio aquoso forma um sistema tampão ácido-base fraco ($CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \leftrightarrow CO_3^{-2} + 2H^+$). Sendo a resistência de difusão da molécula de CO_2 através da membrana plasmática menor que a resistência de difusão da molécula de HCO_3^- (ANDRADE *et al*., 2008); e sabendo que na faixa de pH entre 6,5-10 a espécie de carbono dominante é HCO_3^-, o consumo de HCO_3^- ocorre devido à conversão deste a CO_2 catalisada pela enzima *anidrase carbônica*, no carboxissoma, com consumo de prótons e aumento de pH (MARKOU *et al*., 2014). Sendo assim, a quantidade relativa de CID está intimamente relacionada ao pH do meio através do equilíbrio químico; e o CO_2 não só estimula o crescimento celular pelo fornecimento de carbono, mas também reduz o pH.

Para prevenir variações de pH com efeito negativo sobre o crescimento de *S. maxima*, o pH inicial foi periodicamente ajustado mantendo as características básicas do meio de cultura. A **figura 21b** exibe os valores de pH nos meios aerados ou não com enriquecimento de CO_2. Enquanto o pH dos cultivos controle (sem enriquecimento de CO_2) e com injeção de CO_2 durante a fase clara do fotoperíodo mantiveram o pH entre 9,5-9,7, o pH do cultivo com injeção contínua de CO_2 foi reduzido até 8,5 (apesar da correção diária). Os resultados sugerem que a injeção contínua de CO_2 aumenta os níveis de CID aumentando a produtividade, sob condição autotrófica, apesar do efeito negativo do pH sobre o crescimento celular.

Estudos recentes têm avaliado a tolerância de *Spirulina* sp. às diferentes concentrações de CO_2 (KIM *et al*., 2011; HU *et al*., 2015). A regulação da concentração de CID através de diferentes influxos de CO_2 é um caminho para investigar essa tolerância às variações de CO_2. O influxo de CO_2 é influenciado pela solubilidade e transferência de massa, os quais podem variar em função de parâmetros do cultivo como pH, salinidade, pressão, temperatura, área de contato específica, padrões de mistura no fotobiorreator resultando em gradientes de concentração entre as fases líquida e gasosa, tempo de contato e área de interface (tamanho da bolha) (LAMELAS *et al*., 2005).

Para *S. maxima*, a simples difusão e dissolução de CO_2 dentro do meio de cultura com HCO_3^- disponível pode ser desfavorável à assimilação de CO_2. Nessa condição, o CO_2 pode ser melhor assimilado através da alteração na concentração de sais bicarbonato (seção 4.2.3). Segundo Judd e colaboradores (2015), além do CID, a assimilação de CO_2 é determinada pela concentração celular e taxa de crescimento. Devido à baixa solubilidade de CO_2, seu influxo

deve ser equilibrado com sua taxa de assimilação em função do crescimento celular e não pelo tempo de retenção (capacidade do reator).

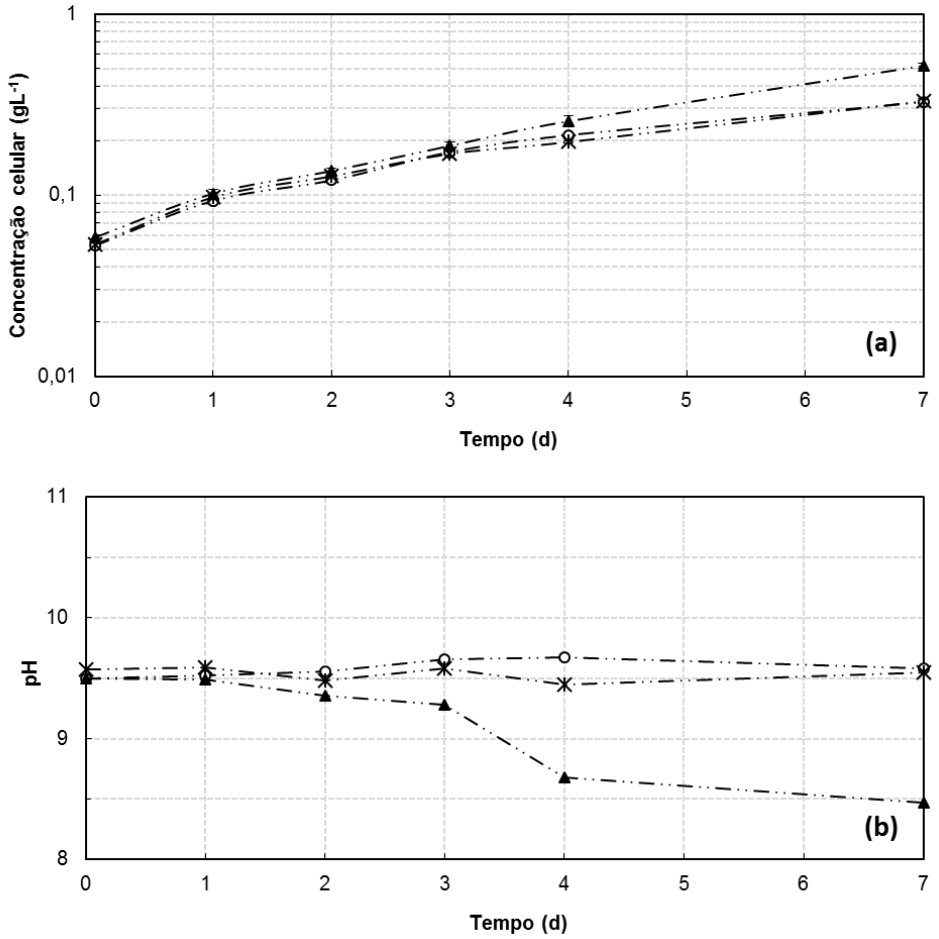


Figura 21. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH em cultivos autotróficos aerados com ar comprimido enriquecido de CO_2 a 10% v/v em diferentes influxos. (....✳....) Injeção de CO_2 durante a fase clara do fotoperíodo (12 h). (....▲....) Injeção contínua de CO_2 (24 h). (....○....) Cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2.

Antes de alterar a concentração de sais bicarbonato, o influxo de CO_2 foi observado sob condição autotrófica em cultivo com maior concentração celular. A **figura 22a** mostra o crescimento de *S. maxima* com injeção contínua de CO_2 a 10% v/v e inóculo de células nove vezes maior (i.e., 0,45 $g.L^{-1}$) que ensaios anteriores (i.e., 0,05 $g.L^{-1}$). Os cultivos aerado continuamente com ar comprimido enriquecido de CO_2 e controle aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2 apresentaram produtividade em biomassa de 58,1 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ e de 24,4 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectivamente. Se por um lado, cultivo com injeção contínua de CO_2 tende a reduzir o pH (**figura 21b**), por outro, esse procedimento em culturas densas mantem o pH na faixa entre 9,3-9,5 (**figura 22b**).

Embora a injeção contínua de CO_2 não tenha efeito negativo sobre o pH de cultivos densos, a proliferação celular é baixa em consequência à alta concentração de inóculo. O cultivo iniciando com 0,45 $g.L^{-1}$ e terminando com 0,857 $g.L^{-1}$ (**figura 22a**) obteve menor multiplicação celular que o cultivo começando com 0,05 $g.L^{-1}$ e finalizando com 0,517 $g.L^{-1}$ (**figura 21a**). Dessa forma, cultivos com alto inóculo apresentam células mais "velhas" (entram na fase estacionária no 4º dia), o que favorece o acúmulo de biomoléculas de reserva em vez da proliferação celular com consumo de substrato.

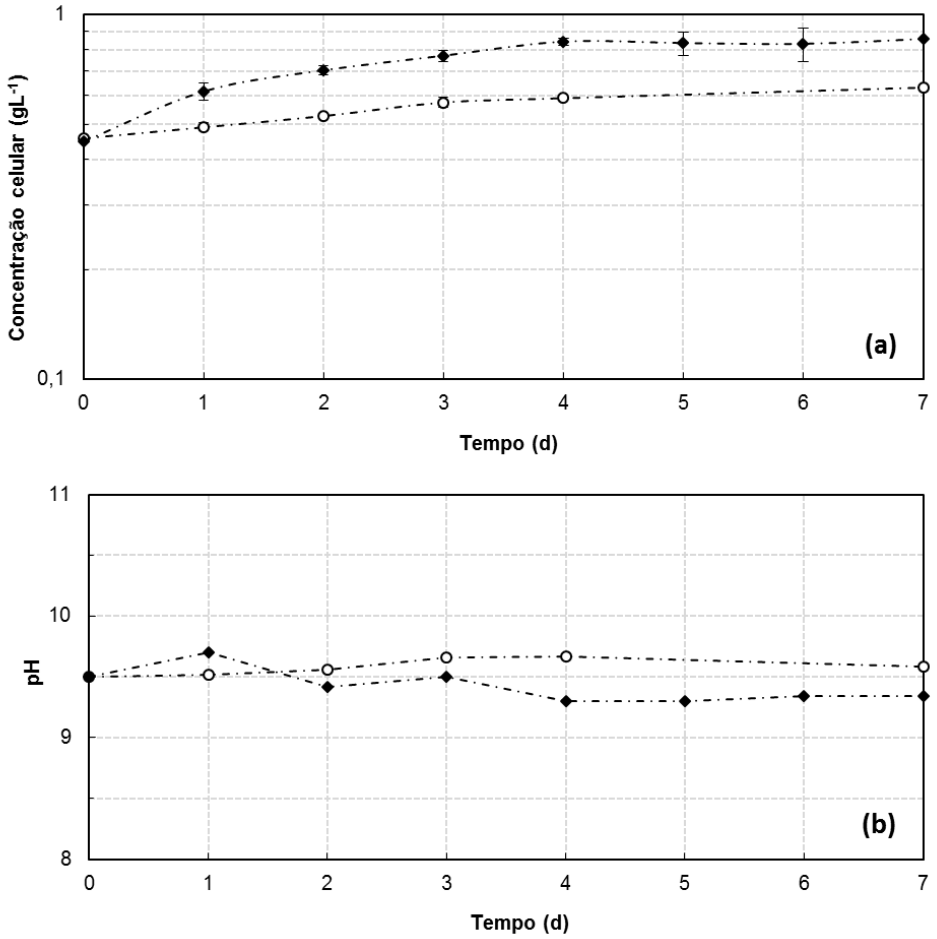


Figura 22. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH em cultivo autotrófico aerado com ar comprimido enriquecido de CO_2 a 10% v/v e inóculo de 0,45 $g.L^{-1}$. (....◆....) Injeção contínua de CO_2. (....○....) Cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2.

Em 2014, Sivakumar e colaboradores examinaram o efeito de CO_2 sobre o crescimento de *Spirulina* sp. e sua respectiva resposta fisiológica em termos de produtividade. A cepa foi cultivada em fotobiorreator de 2 L a 30 ºC e 40,54 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} em fotoperíodo 10:14

h. Embora os resultados revelem que a cepa tenha sido capaz de tolerar ar enriquecido de CO_2 até 20% v/v, melhor assimilação de CO_2 foi observada na faixa entre 4-10% v/v com rendimento de biomassa entre 67-150 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ após 9 dias de cultivo. Culturas mantidas a níveis superiores de CO_2 obtiveram o pH do meio reduzido até 6,8 favorecendo a aglomeração celular.

Zhang e colaboradores (2015) analisaram a influência de diferentes condições de cultivo sobre o crescimento de *Spirulina platensis*. As células foram cultivadas durante 6 dias em fotobiorreator de 2 L a 25 ºC, iluminação constante de 200 µmol de fótons.$m^{-2}.s^{-1}$ e aeração com ar atmosférico na vazão de 0,25 vvm enriquecido de CO_2 a 1% v/v. Em meio de cultura livre de $NaHCO_3$, a produtividade em biomassa aumentou rapidamente quando a concentração de CO_2 passou de 0,038% (ar atmosférico) para 0,5% v/v. Por outro lado, concentrações acima de 0,5% v/v acarretaram ligeira redução no rendimento da biomassa.

4.2.3 CONCENTRAÇÃO DE HCO_3^-

Sem aumentar o inóculo de células, ensaios com alteração na concentração de HCO_3^- foram propostos visando melhor desempenho do cultivo em face da carbonatação. A **figura 23a** mostra o crescimento de *S. maxima* em meio de cultura reduzido em 50% de $NaHCO_3$. Inicialmente, o efeito da redução de HCO_3^- foi analisado sob condição autotrófica em cultivo aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2. Uma vez constatada que essa redução é benéfica para a produtividade em biomassa (68,2 $mg.L^{-1}.d^{-1}$) e máxima taxa específica de crescimento (0,59 d^{-1}), em relação ao cultivo controle sem redução (38,8 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ e 0,57 d^{-1}, respectivamente), a redução de HCO_3^- foi observada em CCDE com injeção fracionada de vinhaça.

O efeito simultâneo de redução de CID e injeção fracionada de vinhaça sobre o crescimento de *S. maxima* permitiu o registro de máxima densidade celular no 5º dia de cultivo o que resultou em uma produtividade em biomassa de 115,4 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ e 0,73 d^{-1} de taxa de crescimento (ao considerar 7 dias de cultivo, a produtividade foi 84,1 $mg.L^{-1}.d^{-1}$) (**figura 23a**). Os valores de pH nos cultivos reduzidos em 50% de $NaHCO_3$ foram mantidos na faixa entre 9,4-9,8 (**figura 23b**).

A redução de HCO_3^- impacta positivamente a produtividade e, consequentemente, o custo de produção (DUERR *et al*., 1997). Alta concentração de $NaHCO_3$ resulta em rápida entrada de Na^+ dentro da célula (MORAIS & COSTA, 2007), o que está associado à alta energia

dispensada para expulsar Na^+ de dentro da célula e alta taxa de respiração (TORZILLO *et al*., 1991). Andrade e colaboradores (2008) descrevem que soluções ricas em CID contêm CO_2 livre em maior concentração que na atmosfera facilitando o fluxo de CO_2 do meio de cultura para o ambiente. Portanto alta concentração de $NaHCO_3$ pode acarretar maior perda de CO_2 e variação de pH.

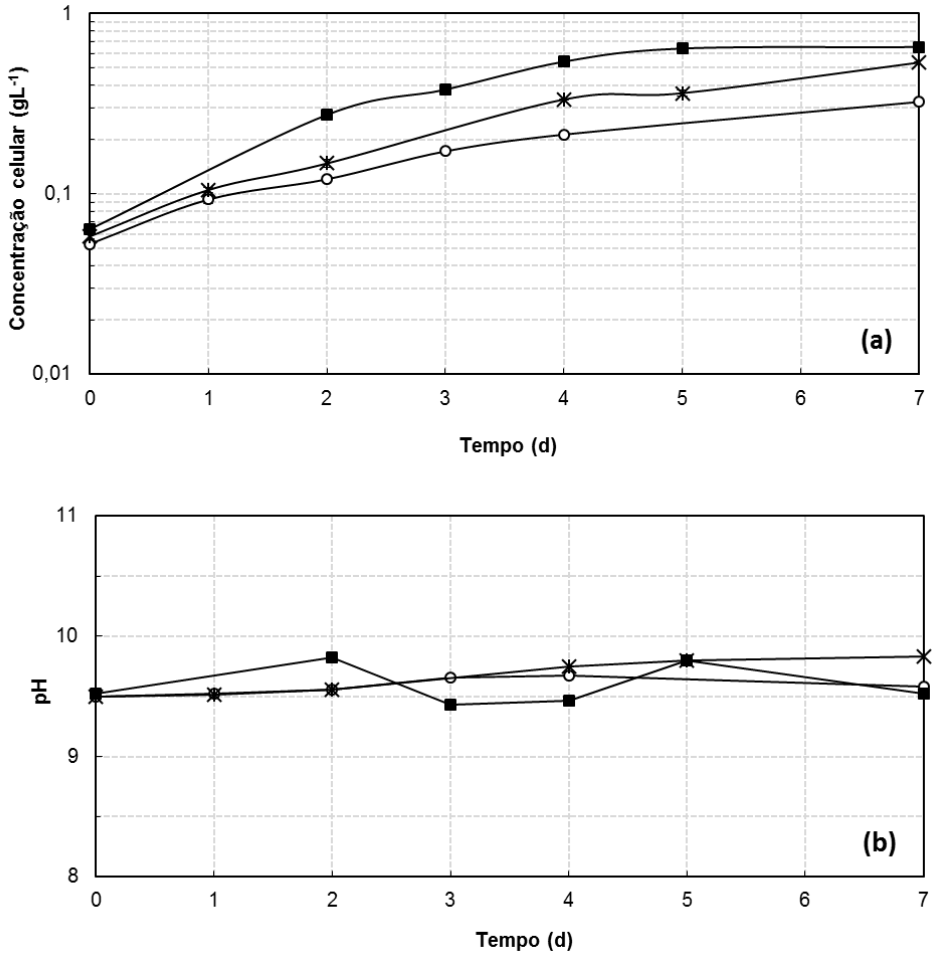


Figura 23. Efeito da redução de HCO_3^- sobre (a) crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH no meio. (--✳--) Cultivo autotrófico em meio de cultura reduzido em 50% de $NaHCO_3$. (--○--) Cultivo autotrófico em meio sem redução. (--■--) CCDE com injeção fracionada de vinhaça a 3% v/v em meio reduzido em 50% de $NaHCO_3$.

Por fim, foi observado o efeito simultâneo da redução de HCO_3^- em CCDE com injeção fracionada de vinhaça e influxo contínuo de CO_2. A máxima biomassa (0,362 $g.L^{-1}$) foi obtida no 4º dia de cultivo com máxima taxa específica de crescimento de 0,64 d^{-1} (**figura 24a**) e valores de pH no meio variando entre 9,3-9,7 (**figura 24b**). A assimilação de CO_2 em meio de cultura com HCO_3^- reduzido continua aumentando os níveis de CID, sendo favorável sob

condição autotrófica (**figura 22a**) e desfavorável em CCDE (**figura 23a**). Em relação ao cultivo controle autotrófico, elevada concentração de CO_2 dificulta a assimilação de carbono orgânico e diminui o crescimento heterotrófico.

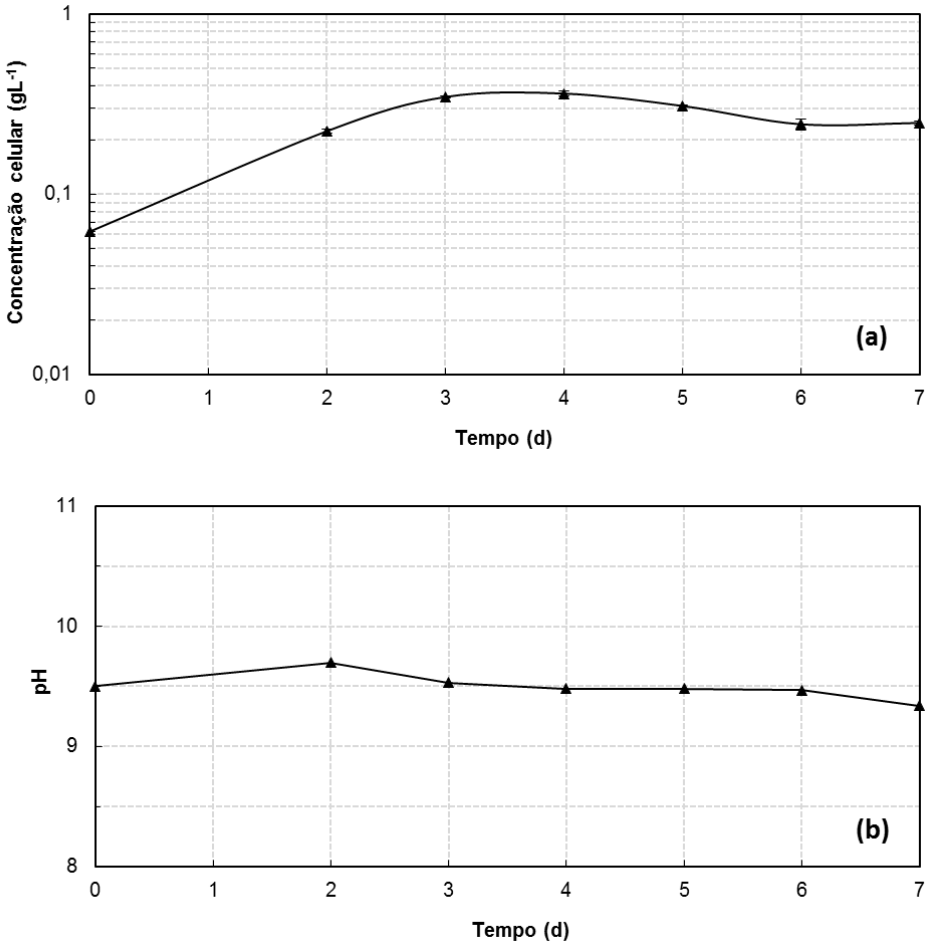
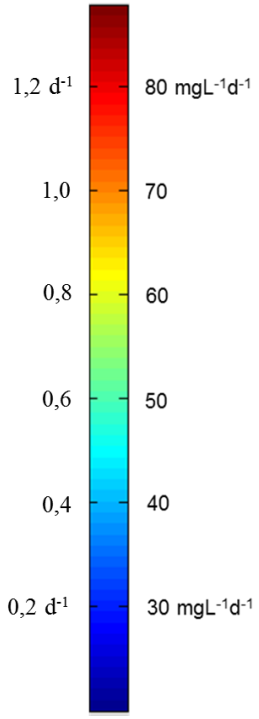


Figura 24. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* e (b) valores de pH no meio sob efeito da redução de HCO_3^- em CCDE com injeção fracionada de 3% v/v de vinhaça e influxo contínuo de CO_2 a 10% v/v.

A **tabela 7** sumariza o efeito de diferentes modos de fornecimento de carbono orgânico e alterações no nível de CID sobre a máxima taxa específica de crescimento e produtividade em biomassa. Os resultados obtidos sugerem que a assimilação de carbono é maior quando a vinhaça é injetada de forma fracionada durante a fase escura do fotoperíodo e a concentração de CID é reduzida. Essas observações experimentais demandam otimização das concentrações de carbono orgânico (vinhaça) e inorgânico (HCO_3^-) assimilados durante crescimentos heterotrófico e autotrófico, respectivamente.

Tabela 7. Comparação dos resultados decorrentes da adição de carbono orgânico e inorgânico ao cultivo de *Spirulina maxima.*

Fornecimento de carbono orgânico e nível de carbono inorgânico / Parâmetros do cultivo		Taxa de crescimento (d^{-1})	Produtividade em biomassa ($mg.L^{-1}.d^{-1}$)
Carbono orgânico (vinhaça) Fornecimento de 3% v/v durante a fase heterotrófica do CCDE	Controle autotrófico sem vinhaça		
	Injeção fracionada		
	Injeção única		
	Injeção fracionada em CCDE com água destilada		
Carbono inorgânico (CO_2) Influxo de 10% v/v durante o cultivo	Controle autotrófico sem enriquecimento de CO_2		
	Injeção na fase clara do fotoperíodo (12 h)		
	Injeção contínua (24 h)		
	Injeção contínua em cultivo com maior inóculo		
Carbono inorgânico (HCO_3^-) Redução em 50% da concentração de HCO_3^- no meio de cultura	Controle autotrófico sem redução de HCO_3^-		
	Cultivo autotrófico		
	CCDE com injeção fracionada de vinhaça		
	CCDE com vinhaça fracionado e CO_2 contínuo		



4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

A concentração de carbono fornecida durante o CCDE foi otimizada aplicando a metodologia de Superfície de Resposta (SR). A **tabela 8** apresenta as respostas observada e predita, os limites de confiança e o desvio padrão para máxima taxa específica de crescimento enquanto a **tabela 9** exibe as respostas observadas para outras variáveis *output* como produtividade em biomassa e a composição bioquímica celular. As máximas taxas específicas de crescimento foram calculadas na fase exponencial de suas respectivas curvas de crescimento, as quais são apresentadas na **figura 25**. Haja vista a quantidade de respostas *output*, a relevância da taxa de crescimento sobre a produtividade em biomassa e a similaridade na composição bioquímica entre os ensaios realizados; apenas a máxima taxa específica de crescimento foi analisada pela metodologia de SR.

Tabela 8. Máxima taxa específica de crescimento analisada pela metodologia de SR: respostas observadas e preditas, limites de confiança e desvio padrão da resposta observada.

	Máxima taxa específica de crescimento (d^{-1})				
Ensaio	Resposta observada	Resposta predita	Limite de confiança inferior	Limite de confiança superior	Desvio padrão
1	1,18	1,13	0,9801	1,2725	0,0569
2	0,80	0,84	0,6576	1,0228	0,0710
3	1,31	1,30	1,1535	1,4458	0,0569
4	0,87	0,84	0,6576	1,0228	0,0710
5	0,90	0,99	0,8401	1,1325	0,0569
6	0,85	0,79	0,6109	0,9761	0,0710
7	1,35	1,39	1,2468	1,5392	0,0569
8	1,06	1,07	0,8909	1,2561	0,0710
9	1,62	1,52	1,4106	1,6209	0,0409
9	1,49	1,52	1,4106	1,6209	0,0409
9	1,47	1,52	1,4106	1,6209	0,0409

Tabela 9. Demais variáveis *input* observadas: produtividade em biomassa, conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas.

Ensaio	Produtividade em biomassa ($mg.L^{-1}.d^{-1}$)	Composição bioquímica (% em peso seco)			
		Carboidratos	Proteínas	Lipídios	Cinzas
1	151,9	10,6	72,2	8,4	4,4
2	99,1	4,7	80,5	5,9	4,5
3	74,3	7,3	78,4	5,4	4,4
4	61,5	4,9	81,7	5,4	3,6
5	73,9	5,2	77,4	8,9	4,2
6	69,1	5,4	79,5	5,3	5,5
7	81,1	5,6	78,9	5,6	5,5
8	64,9	6,9	76,2	7,8	4,7
9	68,0	4,6	79,6	6,8	4,6
9	60,8	7,6	82,6	5,3	5,0
9	73,3	4,6	85,1	4,6	4,9

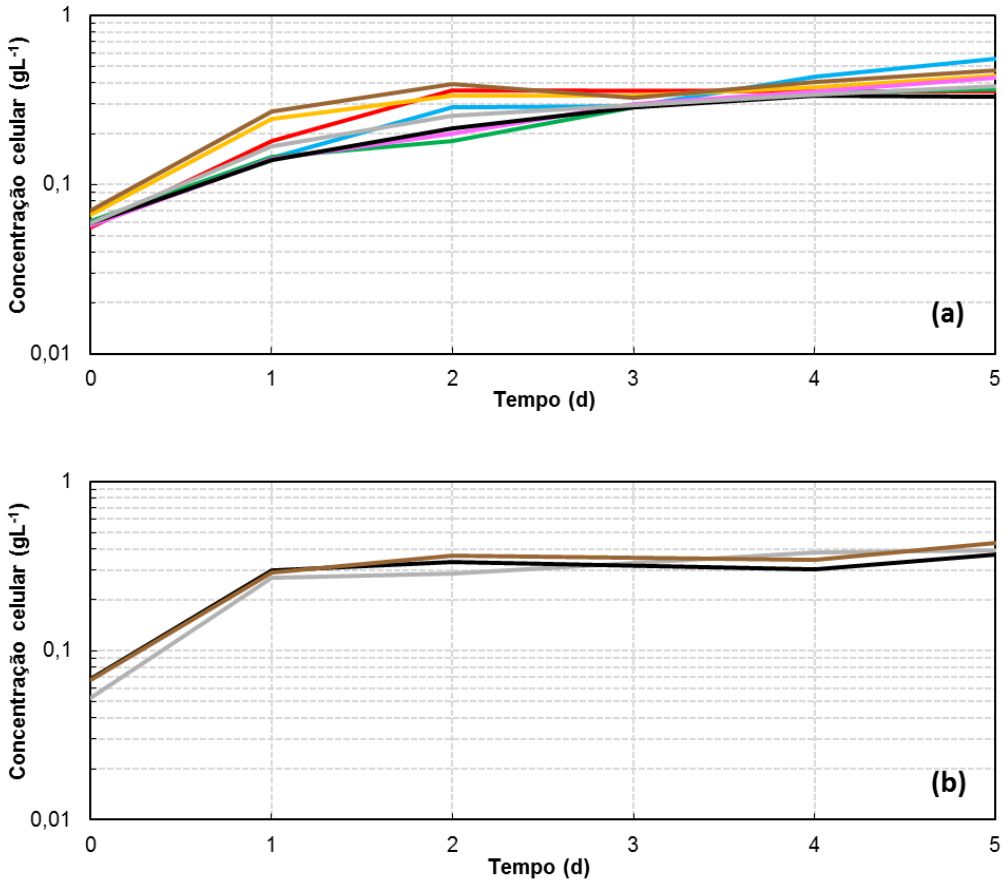


Figura 25. (a) Crescimento de *Spirulina maxima* durante os ensaios da metodologia de SR, tendo (■) ensaio 1, (■) ensaio 2, (■) ensaio 3, (■) ensaio 4, (■) ensaio 5, (■) ensaio 6, (■) ensaio 7, (■) ensaio 8. (b) Crescimento de *S. maxima* durante as três repetições do ponto central, tendo (■) ensaio 9a, (■) ensaio 9b, (■) ensaio 9c.

As respostas observadas e preditas indicaram bom ajuste, sendo o desvio padrão constante (**tabela 8**). Dentro da faixa estudada, a produtividade em biomassa variou de acordo com a taxa de crescimento e a análise bioquímica não apresentou diferença significativa em função das variáveis *input* (**tabela 9**). Aplicando a análise de regressão múltipla às respostas observadas, o efeito das variáveis *input* sobre a máxima taxa específica de crescimento (Y) pode ser descrito pelo modelo de SR expresso na Eq. (22).

$$Y = -1{,}0874 + 1{,}3496X_1 + 0{,}1608X_2 - 0{,}0114X_1X_2 - 0{,}2042X_1^2 - 0{,}0101X_2^2 \qquad (22)$$

onde X_1 é a concentração de vinhaça (% v/v) e X_2 é concentração de HCO_3^- (g.L^{-1}).

A adequação do modelo foi verificada por meio da análise de variância conforme **tabela 10**. Baixo valor para Soma de Quadrados de Resíduos Réplicas-Médias (S_L^2) indicou boa qualidade das respostas observadas enquanto baixos valores para Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Médias (S_R^2) e Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Réplicas (S_Y^2) indicaram que as respostas observadas foram satisfatoriamente representadas pela SR. Assim, a análise de variância apontou que a SR ajustada adere-se às respostas observadas indicando que o modelo foi significativo. Os coeficientes de regressão linear e quadrática ($\beta_1, \beta_2, \beta_4, \beta_5$) demonstraram significância absoluta enquanto o coeficiente de regressão interativo (β_3) apresentou menor significância para a performance dessa SR (**tabela 11**).

Tabela 10. Análise de variância do modelo. S_R^2 é Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Médias. S_L^2 é Soma de Quadrados de Resíduos Réplicas-Médias. S_Y^2 é Soma de Quadrados de Resíduos Modelo-Réplicas.

Análise de Variância	*Value*	Grau de Liberdade	*F-test*	Significante
$\boldsymbol{S_R^2}$	0,006173	3		
$\boldsymbol{S_L^2}$	0,006633	5	0,931	SIM
$\boldsymbol{S_Y^2}$	0,006357	2		

Tabela 11. Teste de significância dos parâmetros do modelo. β_0 é um termo constante. β_1 e β_2 são coeficientes de regressão linear. β_3 é coeficiente de regressão interativo. β_4 e β_5 são coeficientes de regressão quadrática.

Parâmetros	*Value*	*F-test*	Limite	Significante
β_0	-1,0874	20,5717	6,6079	SIM
β_1	1,3496	89,8448	6,6079	SIM
β_2	0,1608	12,2731	6,6079	SIM
β_3	-0,0114	3,0831	6,6079	NÃO
β_4	-0,2042	84,1295	6,6079	SIM
β_5	-0,0101	11,4454	6,6079	SIM

A adequação da regressão foi verificada por meio do histograma de distribuição de resíduos (**figura 26**). A distribuição normal com variância estimada é representada por linhas tracejadas em vermelho. Apesar de apresentar um considerável número de resíduos negativos, o histograma observado vs. predito segue aproximadamente uma distribuição normal com média zero e variância S_Y^2.

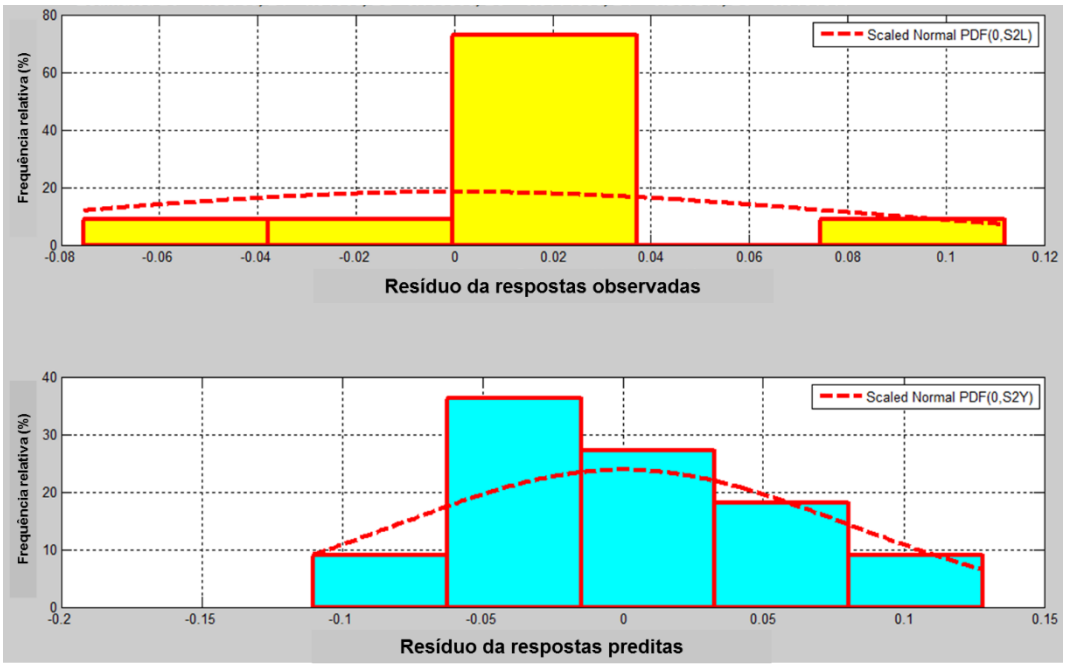


Figura 26. Histograma de distribuição de resíduos para respostas observadas e preditas.

A matriz variância-covariância para parâmetros do modelo e dados experimentais é ilustrada na **figura 27**. Observa-se baixa covariância entre os parâmetros, sendo β_0 e β_1 maiores quando comparados aos outros parâmetros. Na matriz variância-covariância para dados experimentais, os termos obtiveram baixa ordem de grandeza (10^{-3}) expressando baixa incerteza na taxa de crescimento estimada. A dominância na diagonal da matriz indica essa baixa incerteza entre as respostas de diferentes ensaios.

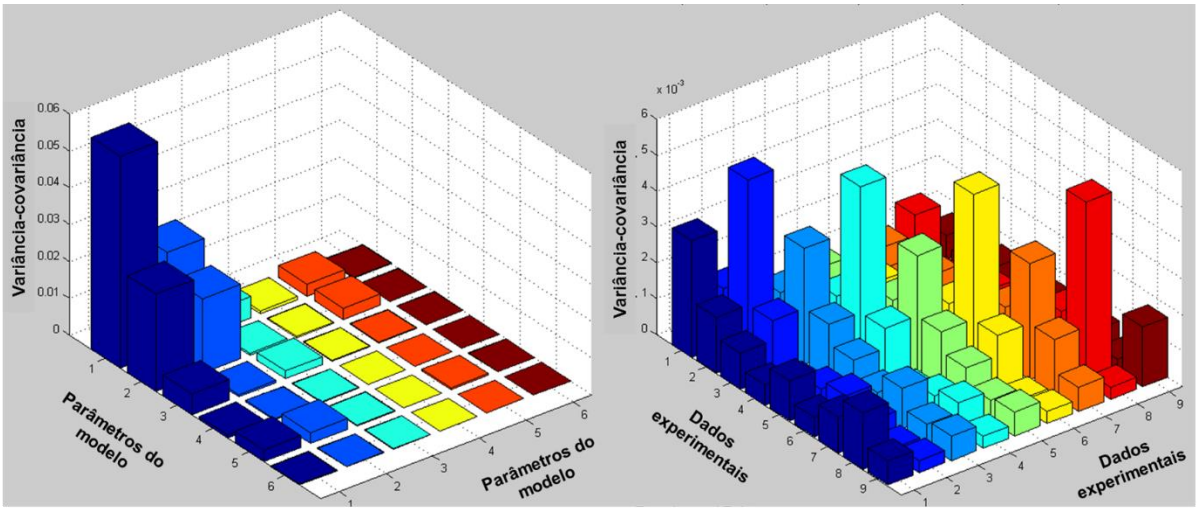


Figura 27. Matriz Variância-covariância para parâmetros do modelo e dados experimentais.

A **figura 28** ilustra a SR incluindo as respostas observadas (círculos vermelhos na superfície intermediária) e os limites de confiança (superfícies superior e inferior). A aproximação entre as três superfícies envolvendo as respostas observadas aponta SR ajustada e aderida aos dados experimentais. Dentro da faixa estudada, a SR revelou que a otimização da máxima taxa específica de crescimento ocorre quando a concentração de vinhaça está entre 3-4,5% v/v e a concentração de $NaHCO_3$ é 6,81 $g.L^{-1}$.

Para validação do modelo de SR, o crescimento de *S. maxima* foi conduzido durante 5 dias em meio de cultura contendo 6,81 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$ e 4,5% v/v de vinhaça injetada de forma fracionada durante a fase heterotrófica do CCDE. Sob níveis ótimos de variáveis *input*, o ensaio de validação exibiu máxima taxa específica de crescimento igual a 0,95 d^{-1}. O modelo foi considerado válido dado que o valor obtido está inserido no limite de confiança (0,9801-1,2725 d^{-1}, **tabela 8**).

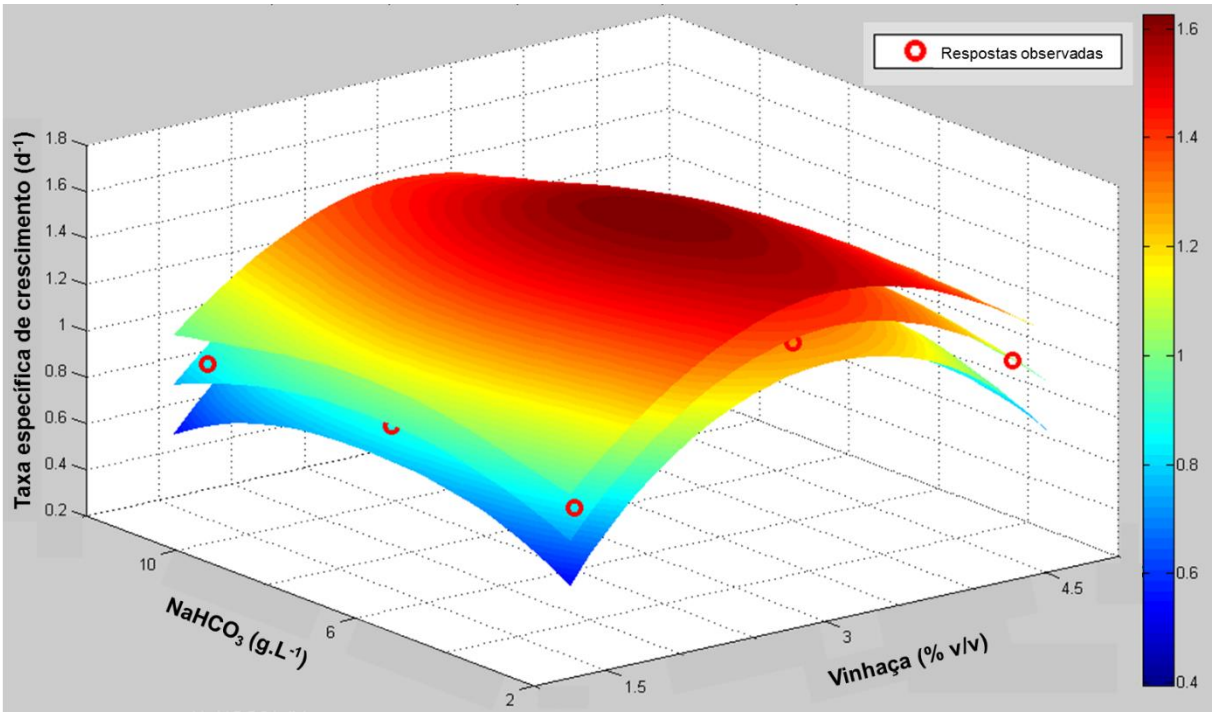


Figura 28. SR mostrando efeito interativo de vinhaça (X_1) e $NaHCO_3$ (X_2) sobre a máxima taxa específica de crescimento de *Spirulina maxima* durante CCDE.

A taxa de crescimento implica direta e indiretamente na produtividade em biomassa e remoção de matéria orgânica (OLGUÍN, 2003). Por conseguinte, uma das questões chave para o tratamento eficaz de resíduos está relacionada com a definição de condições ótimas para a taxa máxima de crescimento no sistema particular em operação. Vários parâmetros podem ser manipulados, como intensidade luminosa, temperatura, agitação ou aeração, nutriente ou substrato, concentração de CO_2 e procedimento de cultivo. Embora a SR revele que a ótima taxa específica de crescimento possa ser atingida quando a concentração de vinhaça é elevada, a adição cíclica de quantidades superiores a 4,5% v/v impede a penetração de luz durante a fase clara.

O presente trabalho revelou a possibilidade de produzir biomassa de *S. maxima* utilizando vinhaça de cana-de-açúcar como suplemento de meio de cultura através da estratégia de CCDE. Cultivos iniciais (13,61 $g.L^{-1}$ $NaHCO_3$) de 7 dias com injeção de vinhaça a 3% v/v sinalizaram máximas taxas específicas de crescimento entre 0,52-1,13 d^{-1} com conteúdo em peso seco de proteínas aproximadamente 74,3-77,3% (**figuras 16** e **19**). Após avaliar diferentes estratégias de fornecimento e otimizar concentrações de carbono orgânico (i.e., 3-4,5% v/v de vinhaça injetado de forma fracionada) e inorgânico (i.e., 6,81 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$), foi possível reduzir o tempo de cultivo (5 dias) e aumentar a máxima taxa específica de crescimento (1,18-

1,62 d^{-1}) (**figura 28**) sem comprometer significativamente o teor proteico (72,2% em peso seco, **tabela 9**). Nessa ocasião (i.e., 4,5% v/v de vinhaça injetado de forma fracionada e 6,81 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$), foi obtida a máxima produtividade em biomassa do presente trabalho (151,9 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, **tabela 9**).

A metodologia de SR foi empregada visando caracterizar matematicamente a influência causal de vinhaça e $NaHCO_3$ sobre a taxa de crescimento no sistema biológico CCDE investigado. As vantagens da metodologia incluem: (i) avaliar a variabilidade e consistência experimental; (ii) adequação do modelo ao conjunto de dados experimentais; (iii) estimar respostas em coordenadas experimentais não testadas, reduzindo custo e tempo desnecessários; (iv) testar e propor diferentes estratégias operacionais; (v) avaliar efeitos sinérgicos e antagônicos entre variáveis *input* (HIMMELBLAU, 1970). Embora vários estudos tenham otimizado o comportamento de cianobactérias no tratamento de águas residuais (RYM *et al*., 2010; PATEL *et al*., 2014), existe uma lacuna de informação na literatura sobre a metodologia de SR em cultivo de cianobactéria para tratamento de vinhaça.

Em 2015, Coca e colaboradores avaliaram a obtenção de biomassa e produção de proteínas por *Spirulina platensis* através de um *design* fatorial multinível distribuído em 18 ensaios. Como variáveis *input*, foram observadas a intensidade luminosa, o tempo de cultivo, a concentração de vinhaça no meio de cultura e a diluição do meio. As variáveis *output* foram produtividade em biomassa e teor proteico. O diagrama de Pareto indicou que a luminosidade e o tempo de cultivo têm efeito positivo sobre a produtividade em biomassa. Quanto ao teor proteico, foram a luminosidade e a concentração de vinhaça que apresentaram efeito positivo. O máximo valor obtido para produtividade em biomassa e teor proteico foi 122 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ e 72%, respectivamente.

A utilização de vinhaça de cana-de-açúcar como suplemento de meio de cultura através da estratégia de CCDE permitiu a produção de biomassa de *S. maxima* com elevado teor proteico. Levando-se em consideração o perfil, a citoxicidade e a alergenicidade dos peptídeos presentes (além de ácidos graxos e compostos fenólicos), a biomassa obtida pode ser utilizada para preparo de extrato bioativo em formulações cosmetológicas com intuito de promover regeneração celular, hidratação, fotoproteção e clareamento. Outras aplicações incluem ações antioxidante, antimicrobiana, emoliente, emulsificante, espessante e estabilizante. O uso de extrato microalgal em formulações cosmetológicas é um campo em evolução possibilitando ainda muita exploração e investimento. A quantidade de produto comercializado ainda é limitada de modo a utilizar biomoléculas isoladas restringindo o potencial multivalente das microalgas.

O processamento complementar da biomassa residual, após extração de biomoléculas de interesse comercial, inclui o reaproveitamento energético visando a produção de biogás. A biomassa, pré-tratada ou não, pode ser suplementada com mistura de vinhaça em diferentes proporções e utilizada como substrato na digestão ou codigestão anaeróbia. Embora o número de publicações abordando o processo de digestão anaeróbia tenha crescido muito nos últimos anos, este tema ainda compreende inúmeros desafios em função da variedade de matérias-primas e parâmetros envolvidos. De forma mais usual, muitos autores vêm pesquisando o processo de digestão anaeróbia, utilizando vinhaça ou biomassa microalgal de forma separada. Dois recentes trabalhos, ambos desenvolvidos no Brasil, demonstraram o processo integrado com vinhaça, biomassa e digestão anaeróbia (MARQUES *et al*., 2013; FORMAGINI *et al*., 2014).

4.3.1 CONSUMO DA MATÉRIA ORGÂNICA PRESENTE NA VINHAÇA

Os ensaios de validação do modelo de SR foram utilizados para avaliar a remoção de matéria orgânica da vinhaça. A **figura 29** exibe a remoção de matéria orgânica presente na vinhaça associada ao crescimento celular. Considerando a batelada alimentada de vinhaça na fase heterotrófica do CCDE em cada um dos dias, o consumo da matéria orgânica presente na vinhaça ao término do cultivo otimizado foi observado pela redução de 67% da DQO (de 1.896 para 1.276 $mg.L^{-1}$).

O tratamento de vinhaça resultou em formação de lodo com aumento de 12% sobre a DBO (de 218 para 245 $mg.L^{-1}$). Sendo o lodo formado biodegradável, pode-se dizer que a toxicidade da vinhaça foi reduzida. A remoção de íons foi acompanhada pela redução de 67% da condutividade elétrica (de 19,5 para 13 $mS.cm^{-1}$). Aumento parcial da condutividade elétrica entre 1º e 2º dia pode ser justificada pelo início da batelada alimentada de vinhaça durante a fase heterotrófica do CCDE.

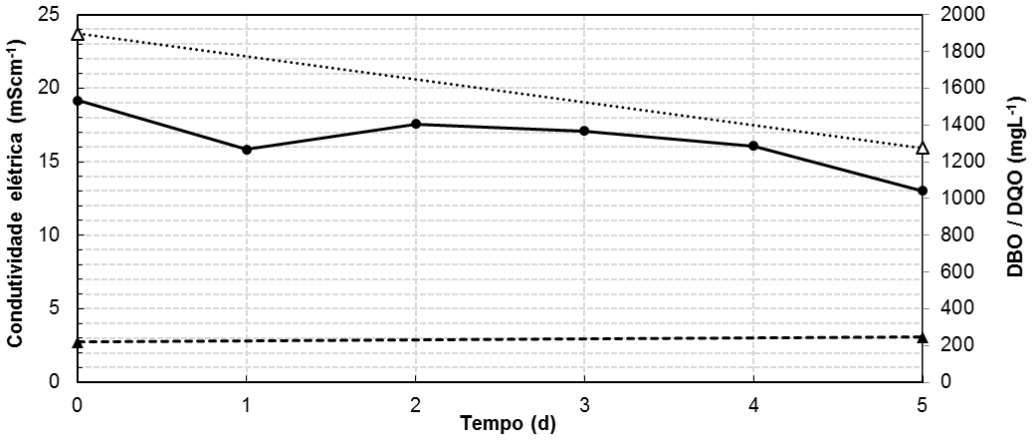


Figura 29. Remoção de matéria orgânica e íons no meio de cultura durante ensaios de validação da SR. (--▲--) Demanda bioquímica de oxigênio. (--△--) Demanda química de oxigênio. (--●--) Condutividade elétrica.

Em 2014, Mahapatra e colaboradores estudaram o tratamento de águas residuais municipais por meio de um consórcio microalgal. A água coletada, com DQO de 676 $mg.L^{-1}$, foi filtrada, esterilizada e utilizada como meio de cultura por um consórcio constituído de Bacillariophyceae (12%), Chlorophyceae (22%), Cyanophyceae (8%) e Euglenophyceae (58%). As células foram cultivadas em fotobiorreator de 10 L a 22-30 ºC, fotoperíodo 12:12 h e agitação uniforme em intervalos regulares. O inóculo inicial do consórcio foi 0,17 $g.L^{-1}$, sendo o crescimento monitorado por 12 dias. Nessas condições, a taxa específica de crescimento e produtividade em biomassa foi 0,2 d^{-1} e 122 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectivamente. A remoção de carbono orgânico foi em torno de 86% (no presente trabalho, o CCDE com batelada alimentada de vinhaça a 4,5% durante 5 dias apresentou redução de 67% da DQO).

4.4 CULTIVOS UTILIZANDO LUZ SOLAR

Cultivos autotróficos de *S. maxima* foram desenvolvidos sob luz solar. A **figura 30** apresenta o crescimento da microalga durante 10 dias sob iluminação solar em dois locais distintos. O cultivo realizado no local que recebeu luz solar apenas no período da manhã indicou comportamento similar ao cultivo controle mantido na área interna do laboratório e iluminado por lâmpadas fluorescentes (70 µmol de $fótons.m^{-2}.s^{-1}$ durante os 3 dias iniciais e 150 µmol de $fótons.m^{-2}.s^{-1}$ durante os 4 dias finais). As oscilações na luminosidade são representadas na **figura 31a**. Vale ressaltar que o cultivo exposto à luz solar foi submetido a maiores variações de temperatura durante o dia (36±9 °C) que o cultivo controle (30±3 °C).

Em contrapartida, o cultivo realizado no local que recebeu luz solar no período da manhã e da tarde resultou em morte celular (**figura 30**). Nesta situação, provavelmente a fotoinibição promovida pelo excesso da densidade do fluxo de fótons associado à grande variação de temperatura (37±16 °C) foi irreversível, apesar da exposição a períodos de baixa luminosidade (**figura 31b**).

Cabe mencionar que, em ambos os cultivos expostos à luz solar, as células não foram aclimatadas às condições experimentais. Na situação onde a quantidade de fótons foi maior que a capacidade de utilização da energia absorvida pelo aparato fotossintético, verificou-se redução da quantidade de pigmentos seguida da destruição dos tricomas (dados não apresentados).

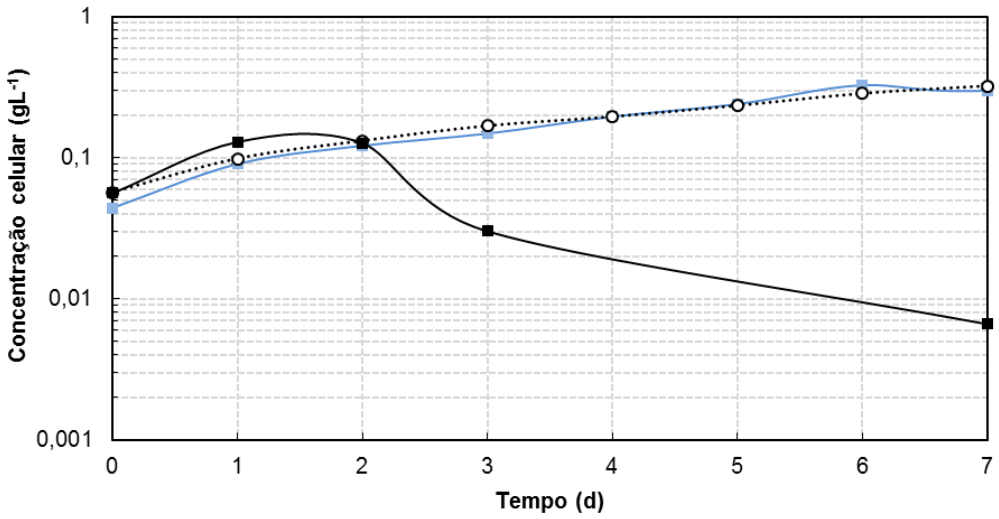


Figura 30. Crescimento de *Spirulina maxima* sob luz solar. (--■--) Cultivo iluminado por radiação solar em período matutino. (--■--) Cultivo iluminado por radiação solar em período matutino e vespertino. (--○--) Cultivo iluminado por luz artificial.

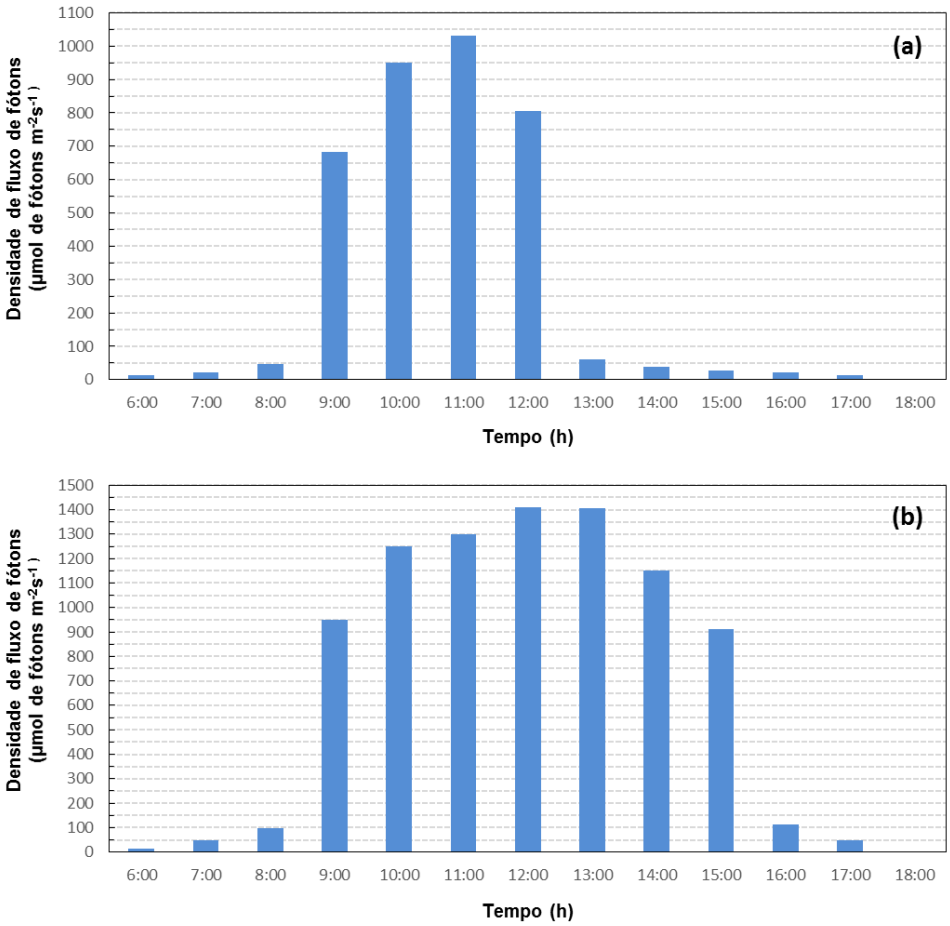


Figura 31. Valores da densidade de fluxo de fótons registrados ao longo do dia em (a) local iluminado com luz solar em período matutino e (b) local iluminado com luz solar em período matutino e vespertino.

A possibilidade de cultivar *Spirulina* sp. utilizando luz solar é viável, sendo necessário avaliar a amplitude da densidade de fluxo de fótons e o impacto de raios UV sobre a célula. Essa análise, importante e necessária, é capaz de direcionar cultivos em fotobiorreator projetado para captação solar, como no caso do objeto de patente desenvolvido no laboratório H2CIN (nº do registro: 020100092613, depositado em 04/10/2010) (PICARDO, 2012). Considerando as estações e as condições climáticas predominantes em muitas regiões do Brasil, essa prática parece ser uma possibilidade socioeconômica muito promissora em nosso país, ainda que uma grande quantidade de autores limitem-se à utilização de luz artificial.

Durante o estabelecimento do CCDE, percebeu-se a necessidade de aumentar a densidade de fluxo de fótons (70-200 µmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}, **figura 18**) em função da batelada alimentada de vinhaça. Por outro lado, embora a SR revele que a máxima taxa específica de crescimento possa ser atingida com máxima injeção de vinhaça durante a fase heterotrófica, a batelada alimentada de quantidades superiores a 4,5% v/v impediu a penetração de luz artificial

(200 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1}) durante a fase autotrófica. Sendo assim, as condições ótimas definidas pela SR devem ser aplicadas ao CCDE utilizando luz solar. A batelada alimentada de vinhaça durante a fase heterotrófica pode amenizar os efeitos do excesso da densidade do fluxo de fótons durante a fase autotrófica. Não só o índice de refração deve ser considerado, mas também os possíveis impactos sobre a composição bioquímica da biomassa produzida.

Conforme citado, os raios UV podem gerar alterações celulares, sendo necessário avaliar a proporção do impacto. Em 2005, Rajagopal e colaboradores avaliaram o efeito de complementar a iluminação artificial (50 μE.m^{-2}.s^{-1}) em cultivos de *Spirulina platensis* com diferentes intensidades de UV-B (0,2-0,6 mW.cm^{-2}, 280-320nm) por um período de até 5 h. Altas intensidades de raios UV-B diminuem a absorção nos ficobilissomas refletindo em alterações nos complexos de chl *a* e na estrutura do complexo antena.

Gupta e colaboradores (2008) analisaram o efeito da radiação UV-B (280-315nm) sobre a membrana tilacóide e perfil de ácidos graxos de *S. platensis*. Altas intensidades de raios UV-B deformaram o lado externo da membrana tilacóide e reduziram a quantidade de chl *a*. Células submetidas a raios UV-B sem proteção apresentaram alterações proteicas nos complexos de clorofila. O perfil de ácidos graxos demonstrou redução de gordura saturada e aumento de ácidos graxos poli-insaturados.

4.5 SEPARAÇÃO DE BIOMASSA POR MEIO DA FLOCULAÇÃO

A separação sólido-líquido da biomassa de *S. maxima*, produzida sob condições autotróficas, foi avaliada. A **figura 32a** mostra a eficiência do processo de separação mediado por NaOH em diferentes concentrações e tempos de incubação. A recuperação da biomassa em tempo inferior a 90 min não foi satisfatória (dados não apresentados). Nas condições testadas, a máxima redução de DO_{730nm} foi 80,7% na presença de NaOH 5 M durante 150 min. A integridade celular foi confirmada em todos os ensaios.

Alguns estudos têm descrito a ação de agentes floculantes na remoção de coloides e suspensões, acelerando o processo de clarificação. O princípio da adição desses agentes para coleta de biomassa microalgal não é diferente. As células de microalgas apresentam carga de superfície negativa decorrente da presença de grupamentos carboxílicos na superfície celular. Para manter a neutralidade elétrica, a carga da superfície celular atrai os cátions presentes nos floculantes adicionados (e.g., NaOH, NH_4OH, $AlCl_3$) (HENDERSON *et al.*, 2008). A associação entre a carga de superfície celular negativa e o cátion na solução envolvente é

conhecida como dupla camada elétrica e a diferença de potencial entre o plano hidrodinâmico e a dupla camada é definida como potencial zeta. Quando o potencial zeta é alto, a repulsão na dupla camada elétrica é forte (sistema estável). Quando o potencial zeta é próximo de zero, a dupla camada elétrica é atraída por *forças Van der Waals* formando grandes agregados celulares (floculação) (VANDAMME *et al*., 2013).

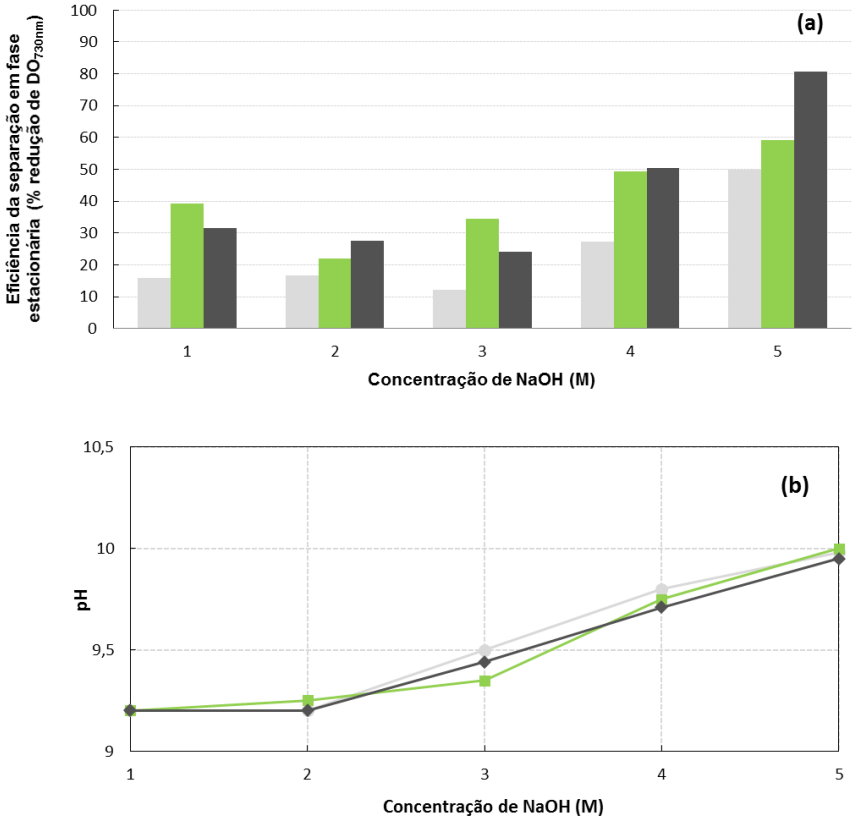


Figura 32. Separação sólido-líquido de biomassa de *Spirulina maxima* na fase estacionária de crescimento. (a) Eficiência do processo de floculação mediado por NaOH em diferentes concentrações e tempos de incubação, tendo (■) incubação por 90 min, (■) incubação por 120 min, (■) incubação por 150 min. (b) Valores de pH no meio após incubação com NaOH, tendo (--●--) 90 min, (--■--) 120 min, (--♦--) 150 min.

Assim, a floculação de microalgas depende de propriedades espécie-específica da superfície celular e do meio no qual as células estão inseridas. Para maior parte das suspensões de microalgas, a densidade dos agregados celulares induz sedimentação gravitacional. Em suspensões de *S. maxima*, o mecanismo pode ser diferente devido à existência de vacúolos gasosos. Esses vacúolos gasosos são formados exclusivamente por proteínas e cheios de gás (WALSBY, 1994). O conteúdo de água dentro da célula pode ser controlado inversamente pelos

vacúolos gasosos e a densidade celular pode ser menor que a do meio envolvente. Nessa situação ocorre flotação da biomassa (WATERBURY, 2006).

O pH também é um parâmetro determinante nos processos *dowstream* de separação de biomassa, visto que pode alterar a carga da superfície celular influenciando a floculação. A **figura 32b** exibe os valores de pH (9,3-10) no meio após adição de NaOH. O aumento do pH na presença de NaOH 4 M e 5 M pode facilitar a floculação à medida que as células apresentam menor carga eletrostática de superfície. Sales & Abreu (2014) obtiveram resultados semelhantes quando investigaram a influência do pH sobre a separação de *Nannochloropsis oculata* mediada por floculantes químicos e biológicos. Os autores descreveram a recuperação de 70% da biomassa quando adicionados NaOH 5 M e biofloculante 0,5 ppm (pH alcançou 9,6).

Diferentes agentes floculantes têm sido estudados como $CaCl_2$ (MORIOKA *et al*., 2014), $Al_2(SO_4)_3$ (CHATSUNGNOEN & CHISTI, 2016), Fe_3O_4 (ZHAO *et al*., 2015), quitosana (LAMA *et al*., 2016), *Moringa oleifera* (TEIXEIRA *et al*., 2012) e ácido γ-glutâmico (NDIKUBWIMANA *et al*., 2016). Ainda que efetiva, a adição de floculantes pode muitas vezes inviabilizar o reuso do meio de cultura contaminando ainda a biomassa coletada. Em verdade, os resultados de floculação obtidos e os mecanismos positivos dos vacúolos gasosos sugerem explorar a flotação por meio de eletroestimulação.

A aplicação de campos magnéticos e/ou elétricos é capaz de alterar as propriedades dielétricas das membranas biológicas. Enquanto os campos elétricos de baixa intensidade são capazes de alterar o metabolismo e a morfologia de células; os campos de alta intensidade induzem formação de poros (eletropermeação), deformação e quebra das membranas estimulando a liberação de componentes intracelulares (HUNT *et al*., 2009). Além de alterar o potencial zeta facilitando a floculação e auxiliando na separação de biomassa (LEE *et al*., 2015b), trabalho anterior desenvolvido no laboratório H2CIN mostrou que a eletroestimulação pode induzir diferentes respostas bioquímicas e morfológicas (EISMANN, 2014).

Outras atribuições à eletroestimulação podem ser encontradas na literatura, tais como induzir crescimento celular (SMALL *et al*., 2012; TU *et al*., 2015), síntese (LAI *et al*., 2014; HAN *et al*., 2016) e extração de biomoléculas (BAHI *et al*., 2011; COUSTETS *et al*., 2013; ZBINDEN *et al*., 2013). O desenvolvimento de tecnologias e/ou produtos englobando a eletroestimulação abrange inúmeras configurações experimentais envolvendo o tipo de campo magnético, a duração do estímulo, a distância da fonte e a intensidade da onda.

Considerando a influência da composição bioquímica sobre o mecanismo de flotação, a separação sólido-líquido mediada por NaOH também foi testada em biomassa durante a fase exponencial de crescimento (**figura 33**). Diferença significativa foi observada em ensaios com

NaOH 5 M durante 150 min, sendo a recuperação de biomassa igual a 97,4% (recuperação durante fase estacionária foi 80,7%, **figura 32a**). A **figura 34** retrata o processo de flotação de *S. maxima* na fase exponencial.

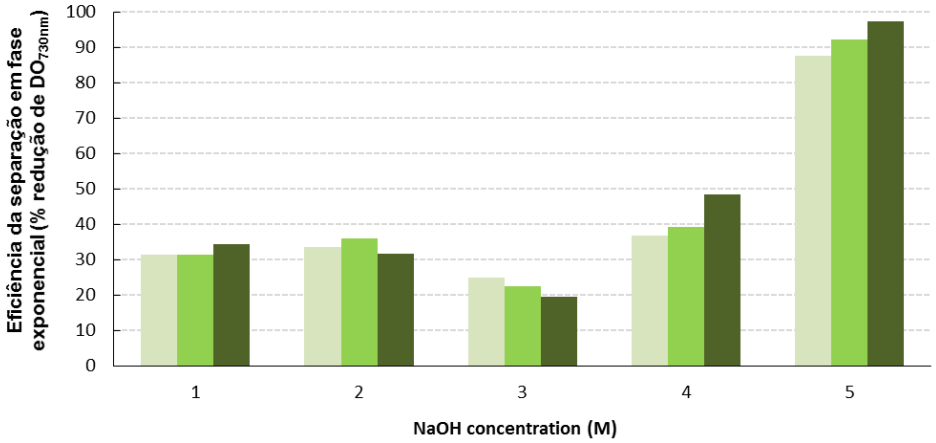


Figura 33. Separação sólido-líquido de biomassa de *Spirulina maxima* na fase exponencial de crescimento. (■) incubação por 90 min. (■) incubação por 120 min. (■) incubação por 150 min.

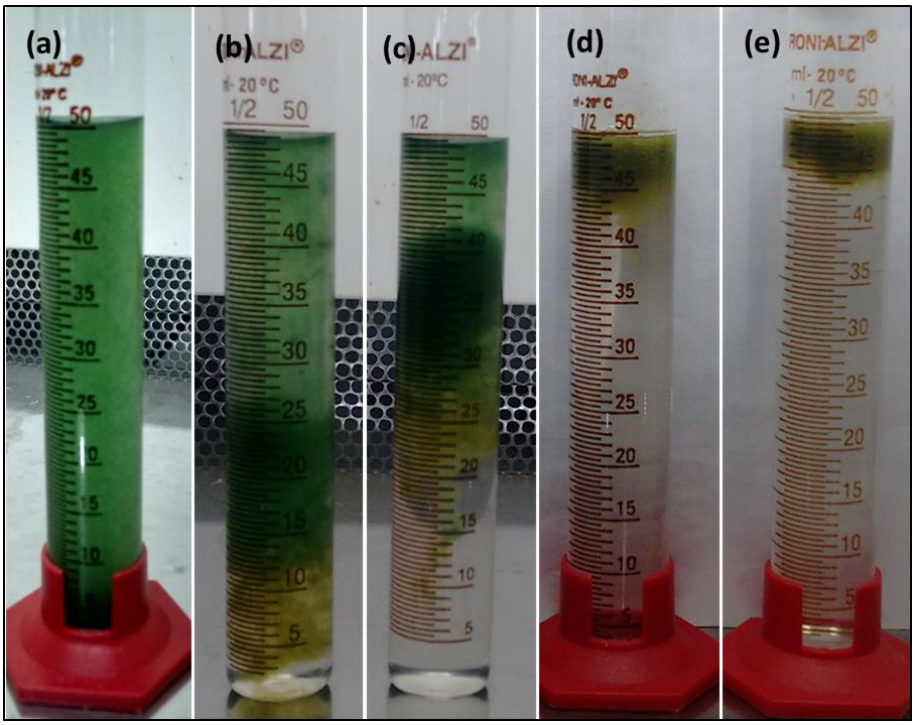


Figura 34. Processo de flotação de *Spirulina maxima* na fase exponencial de crescimento mediada pela adição de NaOH 5 M durante 150 min. (a) Suspensão celular antes da adição de NaOH. (b) Suspensão celular imediatamente após adição de NaOH. (c) Suspensão celular após 90 min de incubação. (d) Suspensão celular após 120 min de incubação. (e) Suspensão celular após 150 min de incubação.

Entre os procariotas, apenas as cianobactérias podem realizar fotossíntese oxigênica com produção de carboidratos, proteínas e lipídios a partir da alocação de carbono (WATERBURY, 2006). Assim, o crescimento implica em aumento da densidade celular, redução dos vacúolos gasosos e perda da flotação (WALSBY, 1994). Em cianobactérias que formam vesículas gasosas, a regulação do mecanismo de flotação parece estar relacionado à modulação da expressão de genes de vesículas gasosas (BEARD *et al*., 2002), colapso dos vacúolos gasosos (e.g., em virtude da pressão de turgescência) (LI *et al*., 2015b) e densidade celular (e.g., conteúdo de carboidratos à medida que realiza fotossíntese).

Sabendo do impacto direto de ciclos claro:escuro sobre o balanço fotossíntese:respiração e compreendendo a necessidade de minimizar perdas respiratórias, parece ser mais vantajoso a separação de biomassa durante a fase escura do fotoperíodo, sendo necessário avaliar a separação de biomassa produzida por CCDE a fim de que possa ser observada a influência da vinhaça e da composição bioquímica da biomassa sobre o processo de floculação/flotação.

Em 2005, Kim e colaboradores examinaram a influência da fase de crescimento sobre a flotação de *Spirulina platensis*. Ainda que a síntese de vacúolos gasosos tenha excedido o acúmulo de carboidratos, as células reduziram o potencial de flotação durante a fase estacionária de crescimento com máxima redução de DO_{680nm} igual a ~90% na presença de NaCl 2% durante 150 min. Hu e colaboradores (2013) mencionaram o aumento na dosagem de nanopartículas de Fe_3O_4 requerida para recuperar 95% da biomassa de *Nannochloropsis maritima* durante fase estacionária.

CONCLUSÕES & RECOMENDAÇÕES

Entre as microalgas utilizadas no presente trabalho, a cianobactéria *Spirulina maxima* foi escolhida como cepa mais propícia ao consumo da matéria orgânica e tratamento de vinhaça. Para proporcionar o crescimento noturno e reduzir substancial perda respiratória, foi definida como estratégia mais promissora o Cultivo Cíclico em Duas Etapas (CCDE) empregando condição autotrófica durante a fase clara do fotoperíodo (12 h) seguida de condição heterotrófica durante a fase escura (12 h). O CCDE permitiu o cultivo semicontínuo com intervalos autotróficos entre os Ciclos. A produtividade em biomassa e taxa específica de crescimento não foram prejudicadas no cultivo semicontínuo. A análise bioquímica da biomassa produzida em diferentes Ciclos de CCDE não foi significativamente diferente.

A injeção fracionada de vinhaça durante a fase escura do CCDE minimiza a inibição por substrato impactando positivamente o crescimento heterotrófico. Observou-se que a injeção contínua de CO_2 aumenta os níveis de CID aumentando a produtividade em biomassa, sob condição autotrófica, apesar do efeito negativo do pH sobre o crescimento celular. Além dos níveis de CID, a assimilação de CO_2 é determinada pela concentração celular e taxa de crescimento. Embora a injeção contínua de CO_2 seja melhor assimilada e não tenha efeito negativo em cultivos densos, a proliferação celular é baixa o que acaba favorecendo o acúmulo de biomoléculas de reserva em vez da proliferação celular com consumo de substrato.

Adicionalmente, conclui-se que a redução da concentração de sais bicarbonato diminui perdas respiratórias aumentando a produtividade em biomassa e a taxa específica de crescimento, não só sob condição autotrófica, mas principalmente em CCDE com injeção fracionada de vinhaça. No entanto, a assimilação de CO_2 em meio de cultura com HCO_3^- reduzido continua aumentando os níveis de CID, sendo favorável sob condição autotrófica e desfavorável em CCDE.

Dentro da faixa estudada, a metodologia de Superfície de Resposta revelou que a otimização da máxima taxa específica de crescimento ocorre quando a concentração de vinhaça está entre 3-4,5% v/v e a concentração de $NaHCO_3$ é 6,81 $g.L^{-1}$. Nessas condições, a produtividade em biomassa variou de acordo com a taxa de crescimento e a análise bioquímica não apresentou diferença significativa em função das variáveis *input* avaliadas.

Após avaliar diferentes estratégias para fornecimento de carbono e otimizar concentrações de carbono orgânico (i.e., 3-4,5% v/v de vinhaça injetado de forma fracionada) e inorgânico (i.e., 6,81 $g.L^{-1}$ de $NaHCO_3$), foi possível reduzir o tempo de cultivo (5 dias) e aumentar a máxima taxa específica de crescimento (1,18-1,62 d^{-1}) sem comprometer

significativamente a composição bioquímica. Nessas condições, a máxima produtividade em biomassa foi 151,9 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ com 72,2% de teor proteico.

Considerando a batelada alimentada de vinhaça na fase heterotrófica do CCDE em cada um dos dias, o consumo da matéria orgânica presente na vinhaça ao término do cultivo otimizado foi observado pela redução de 67% da DQO e da condutividade elétrica.

A possibilidade de cultivar biomassa sob luz solar sugere a realização do CCDE em fotobiorreator com captação solar. Embora as oscilações ambientais de luminosidade e temperatura possam acarretar dados irreversíveis ao cultivo celular, a batelada alimentada de vinhaça durante a fase heterotrófica pode amenizar os efeitos do excesso da densidade do fluxo de fótons durante a fase autotrófica.

A ação de vacúolos gasosos e os resultados de flotação sugerem explorar a separação sólido-líquido de *Spirulina maxima* produzida por CCDE. O potencial de flotação é significativamente reduzido na fase estacionária de crescimento e a coleta de biomassa durante a fase escura do fotoperíodo pode contribuir para minimizar perdas respiratórias. Outra sugestão de induzir flotação é através da eletroestimulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABIHPEC. 2016. Disponível em <https://www.abihpec.org.br/2016/04/setor-brasileiro-de-higiene-pessoal-perfumaria-e-cosmeticos-sofre-queda-real-de-8-em-2015/> Acesso em 06/11/2016.

ABU-GHOSH, S., FIXLER, D., DUBINSKY, Z., ILUZ, D. *Flashing light in microalgae biotechnology.* Bioresource Technology 203, 357-363, 2015.

ACIÉN, F.G., GÓMEZ-SERRANO, C., MORALES-AMARAL, M.M., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M., MOLINA-GRIMA, E. *Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?* Applied Microbiology and Biotechnology 100, 21, 9013-9022, 2016.

AHMED, F., FANNING, K., NETZEL, M., TURNER, W., LI, Y., SCHENK, P.M. *Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters.* Food Chemistry 165, 300-306, 2014.

AIBA, S. & OGAWA, T. *Assessment of growth yield of a blue-green alga, Spirulina platensis, in axenic and continuous culture*. Journal of General Microbiology I02, 179-182, 1977.

ALLAKHVERDIEV, S.I., KRESLAVSKI, V.D., ZHARMUKHAMEDOV, S.K., VOLOSHIN, R.A., KOROL'KOVA1, D.V., TOMO, T., SHEN, J.R. *Chlorophylls d and f and their role in primary photosynthetic processes of cyanobacteria.* Biochemistry (Mosc) 81, 3, 201-212, 2016.

AMBROSI, M.A., REINEHR, C.O., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V., COLLA, L.M. *Propriedades de saúde de Spirulina spp*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 29, 2, 109-117, 2008.

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

ANDRADE, M.R., CAMERINI, V.F., COSTA, J.A.V. *Chemical carbon losses and growth kinetics in Spirulina cultures*. Química Nova 31, 8, 2031-2034, 2008.

ANDREONI, W. & PIETRUCCI, F. *CO_2 capture in amine solutions: modelling and simulations with non-empirical methods*. Journal of Physics: Condensed Matter 28, 50, 503003, 2016.

APEL, A.C. & WEUSTER-BOTZ, D. *Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments*. Bioprocess and Biosystems Engineering 38, 6, 995-1008, 2015.

ARAÚJO, O.Q.F., MEDEIROS, J.L., YOKOYAMA, L., MORGADO, C.R.V. *Metrics for sustainability analysis of post-combustion abatement of CO_2 emissions: microalgae mediated routes and CCS (carbon capture and storage)*. Energy 92, 556-568, 2015.

ARAÚJO, O.Q.F., REIS, A.C., MEDEIROS, J.L., NASCIMENTO, J.F., GRAVA, W.M., MUSSE, A.P.S. *Comparative analysis of separation technologies for processing carbon dioxide rich natural gas in ultra-deepwater oil fields.* Journal of Cleaner Production xxx, 1-11, 2016.

BAHI, M.M., TSALOGLOU, M.N., MOWLEM, M., MORGAN, H. *Electroporation and lysis of marine microalga Karenia brevis for RNA extraction and amplification*. Journal of the Royal Society Interface 8, 57, 601-608, 2011.

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

BEARD, S.J., HANDLEY, B.A., WALSBY, A.E. *Spontaneous mutations in gas vesicle genes of Planktothrix spp. affect gas vesicle production and critical pressure*. FEMS Microbiology Letters 215, 2, 189-195, 2002.

BONASSA, G., SCHNEIDER, L.T., FRIGO, K.D.A., FEIDEN, A., TELEKEN, J.G., FRIGO, E.P. *Subprodutos gerados na produção de bioetanol: bagaço, torta de filtro, água de lavagem e palhagem*. Revista Brasileira de Energias Renováveis 4, 144-166, 2015.

BOROWITZKA, M.A. *High-value products from microalgae - their development and commercialization*. Journal of Applied Phycology 25, 743-756, 2013.

BRADFORD, M.M. A *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72, 248-254, 1976.

BRASIL. 2015. Disponível em <http://www.itamaraty.gov.br/images/ed_desenvsust/BRASIL-iNDC-portugues.pdf> Acesso em 31/01/2017.

BRENNAN, L. & OWENDE, P. *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renewable and Sustainable Energy 14, 557-577, 2010.

BUONO, S., LANGELLOTTI, A.L., MARTELLO, A., BIMONTE, M., TITO, A., CAROLA, A., APONE, F., COLUCCI, G., FOGLIANO, V. *Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga Botryococcus braunii*. Archives of Dermatological Research 304, 755-764, 2012.

CALIXTO, C.D., SANTANA, J.K.S., LIRA, E.B., SASSI, P.G.P., ROSENHAIM, R., SASSI, C.F.C., CONCEIÇÃO, M.M., SASSI, R. *Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues*. Bioresource Technology 221, 438-446, 2016.

CETESB. CTSA, de 28 de novembro de 2005.

CETESB. NORMA TÉCNICA P4.231, de 09 de março de 2005.

CHATSUNGNOEN, T. & CHISTI, Y. *Continuous flocculation-sedimentation for harvesting Nannochloropsis salina biomass*. Journal of Biotechnology 222, 94-103, 2016.

CHENG, F.C., LIN, A., FENG, J.J., MIZOGUCHI, T., TAKEKOSHI, H., KUBOTA, H., KATO, Y., NAOKI, Y. *Effects of Chlorella on activities of protein tyrosine phosphatases, matrix metalloproteinases, caspases, cytokine release, B and T cell proliferations, and phorbol ester receptor binding*. Journal of Medicinal Food 7, 146-152, 2004.

CHISTI, Y. *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, 25, 294, 2007.

CHISTI, Y. *Constraints to commercialization of algal fuels*. Journal of Biotechnology 167, 201-214, 2013.

CHOI, H.J., LEE, J.M., LEE, S.M. *A novel optical panel photobioreactor for cultivation of microalgae*. Water Science Technology 67, 11, 2543-2548, 2013.

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

COCA, M., BARROCAL, V.M., LUCAS, S., GONZÁLEZ-BENITO, G., GARCÍA-CUBERO, M.T. *Protein production in Spirulina platensis biomass using beet vinasse-supplemented culture media*. Food and bioproducts processing 94, 306-312, 2015.

COLDEBELLA, A., SOUZA, S.N.M., SOUZA, J., KOHELER, A.C. *Viabilidade da cogeração de energia elétrica com biogás da bonivocultura de leite*. Encontro de Energia no Meio Rural, 6, 2006.

COSTA, J.A.V. & MORAIS, M.G. *The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae*. Bioresource Technology 102, 2-9, 2011.

COUSTETS, M., AL-KARABLIEH, N., THOMSEN, C., TEISSIÉ, J. *Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae*. The Journal of Membrane Biology 246, 10, 751-760, 2013.

COUTINHO, P. & BOMTEMPO, J.V. *Roadmap tecnológico em matérias-primas renováveis: uma base para a construção de políticas e estratégias no Brasil*. Química Nova 34, 5, 910-916, 2011.

DAO-LUN, F. & ZU-CHENG, W. *Culture of Spirulina platensis in human urine for biomass production and O_2 evolution*. Journal of Zhejiang University SCIENCE B 7, 1, 34-37, 2006.

DASKALAKI, V.M., MARAKAS, H., MANTZAVINOS, D., KATSAOUNIS, A., GIKAS, P. *Use of seawater for the boron-doped diamond electrochemical treatment of diluted vinasse wastewater*. Water Science and Technology 68, 11, 2344-2350, 2013.

DEMIRBAS, A. *Progress and recent trends in biofuels*. Progress in Energy and Combustion Science 33, 1-18, 2007.

DEPRAETERE, O., FOUBERT, I., MUYLAERT, K. *Decolorisation of piggery wastewater to stimulate the production of Arthrospira platensis*. Bioresource Technology 148, 366-372, 2013.

DERNER, R.B., OHSE, S., VILLELA, M., CARVALHO, S.M., FETT, R. *Microalgas, produtos e aplicações*. Ciência Rural 36, 6, 1959-1967, 2006.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry 28, 350-356, 1956.

DUERR, E.O., EDRALIN, M.R., PRICE, N.M. *Facilities requirements and procedures for the laboratory and outdoor raceway culture of Spirulina spp*. Journal of Marine Biotechnology 5, 1-11, 1997.

EISMANN, A.I. *Resposta bioquímicas e morfológicas de Isochrysis galbana em cultivo eletroestimulado e enriquecido em CO_2*. 2014. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2014.

ELMEKAWY, A., HEGAB, H.M., MOHANAKRISHNA, G., ELBAZ, A.F., BULUT, M., PANTE, D. *Technological advances in CO_2 conversion electro-biorefinery: a step toward commercialization*. Bioresource Technology 215, 357-370, 2016.

EL-SHEEKH, M.M., BEDAIWY, M.Y., OSMAN, M.E., ISMAIL, M.M. *Mixotrophic growth of some microalgae using extract of fungaltreated wheat bran*. International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture 1,12, 2012.

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

FALAISE, C., FRANÇOIS, C., TRAVERS, M.A., MORGA, B., HAURE, J., TREMBLAY, R., TURCOTTE, F., PASETTO, P., GASTINEAU, R., HARDIVILLIER, Y., LEIGNEL, V., MOUGET, J.L. *Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture*. Marine Drugs 14, 9, E159, 2016.

FAVRE, E., BOUNACEUR, R., ROIZARD, D. *Biogas, membranes and carbon dioxide capture*. Journal of Membrane Science 328, 11-14, 2009.

FORMAGINI, E.L., MARQUES, F.R., SEREJO, M.L., PAULO, P.L., BONCZ, M.A. *The use of microalgae and their culture medium for biogas production in an integrated cycle*. Water Science Technology 69, 5, 941-946, 2014.

FRANCO, A.L.C., LÔBO, I.P., CRUZ, R.S., TEIXEIRA, C.M.L.L., NETO, J.A.A., AMADO, J., MENEZES, R.S. *Biodiesel de microalgas: avanços e desafios*. Química Nova 1-12, 2012.

GABDULKHAKOV, A.G. & DONTSOVA, M.V. *Structural studies on photosystem II of cyanobacteria*. Biochemistry 13, 1524-38, 2013.

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.

GIORDANO, L., ROIZARD, D., BOUNACEUR, R., FAVRE, E. *Data supporting the validation of a simulation model for multi-component gas separation in polymeric membranes*. Data in Brief 9, 776-780, 2016.

GUERREIRO, L.F., RODRIGUES, C.S., DUDA, R.M., DE OLIVEIRA, R.A., BOAVENTURA, R.A. MADEIRA, L.M.J. *Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation*. Environmental Management 181, 237-248, 2016.

GUIHÉNEUF, F., KHAN, A., TRAN, L.S. *Genetic engineering: a promising tool to engender physiological, biochemical, and molecular stress resilience in green microalgae*. Frontiers in Plant Science 7, 400, 2016.

GUIL-GUERRERO, J.L., NAVARRO-JUÁREZ, R., LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.C., CAMPRA-MADRID, P., REBOLLOSO-FUENTES, M.M. *Functional properties of the biomass of three microalgal species*. Journal of Food Engineering 65, 511-517, 2004.

GUILLARD, R.R.L. & LORENZEN, C.J. *Yellow-green algae with chlorophyllide*. Journal of Phycology 8, 10-4, 1972.

GUPTA, P.L., LEE, S., CHOI, H. *A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31, 1409-1417, 2015.

GUPTA, R., BHADAURIYA, P., CHAUHAN, V.S., BISEN, P.S. *Impact of UV-B radiation on thylakoid membrane and fatty acid profile of Spirulina platensis*. Current Microbiology 56, 156-161, 2008.

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

HABIB, M.A.B., PARVIN, M., HUNTINGTON, T.C., HASAN, M.R. *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish.* FAO Fisheries and Aquaculture Circular N° 1034, 2008.

HADAVIFAR, M., YOUNESI, H., ZINATIZADEH, A.A., MAHDAD, F., LI, Q., GHASEMI, Z. *Application of integrated ozone and granular activated carbon for decolorization and chemical oxygen demand reduction of vinasse from alcohol distilleries*. Journal of Environmental Management 170, 28-36, 2016.

HALLENBECK, P.C. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production.* Springer Science Business Media, LLC. 2012.

HAN, S., JIN, W., CHEN, Y., TU, R., ABOMOHRA, AEL-F. *Enhancement of lipid production of Chlorella pyrenoidosa cultivated in municipal wastewater by magnetic treatment.* Applied Biochemistry and Biotechnology 180, 6, 1043-1055, 2016.

HARUN, R., YIP, J.W.S., THIRUVENKADAM, S., GHANI, W.A.W.A.K., CHERRINGTON, T., DANQUAH, M.K. *Algal biomass conversion to bioethanol – a step-by step assessment*. Biotechnology Journal 9, 73-86, 2014.

HEIDENREICH, S. & FOSCOLO, P.U. *New concepts in biomass gasification*. Progress in Energy and Combustion Science 46, 72-95, 2015.

HELRICH, K. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 15º ed., AOAC International, Arlington, 1990.

HENDERSON, R., PARSONS, S.A., JEFFERSON, B. *The impact of algal properties and pre-oxidation on solid-liquid separation of algae*. Water research 42, 1827-1845, 2008.

HIELSCHER-MICHAEL, S., GRIEHL, C., BUCHHOLZ, M., DEMUTH, H.U., ARNOLD, N., WESSJOHANN, L.A. *Natural products from microalgae with potential against alzheimer's disease: sulfolipids are potent glutaminyl cyclase inhibitors.* Marine Drugs 14, 11, 2016.

HIMMELBLAU, D.M. *Process Analysis by Statistical Methods*. John Wiley & Sons Inc. 1970.

HO, S., YE, X., HASUNUMA, T., CHANG, J., KONDO, A. *Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae - a critical review*. Biotechnology Advances 32, 8, 1448-1459, 2014.

HU, X., LIU, B., ZHOU, J., JIN, R., QIAO, S., LIU, G. *CO_2 fixation, lipid production and power generation by a novel air-lift-type microbial carbon capture cell system*. Environmental Science & Technology 49, 17, 10710-10717, 2015.

HU, Y., WANG, F., WANG, S., LIU, C., GUO, C. *Efficient harvesting of marine microalgae Nannochloropsis maritima using magnetic nanoparticles*. Bioresource Technolology 138, 387-390, 2013.

HUNT, R.W., ZAVALIN, A., BHATNAGAR, A., CHINNASAMY, S., DAS, K.C. *Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy Applications*. International Journal of Molecular Sciences 10, 4515-4558, 2009.

INSTITUTO ESCOLHAS. 2015. Disponível em <http://escolhas.org/wp-content/uploads/2016/09/impactos-economicos-e-sociais-da-tributacao-de-carbono-no-brasil.pdf > Acesso em 31/01/17.

INOUE, K. & UCHIDA, T. *Microalgae cultured by sewage and organic constituents*. Chemosphere 93, 7, 1442-1445, 2013.

JEFFREY, S.W., MACTAVISH, H.S., DUNLAP, W.C., VESK, M., GROENEWOUD, K. *Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae*. Marine Ecology Progress Series 189, 35-51, 1999.

JIRANUNTIPON, S., CHAREONPORNWATTANA, S., DAMRONGLERD, S., ALBASI, C., DELIA, M. *Decolorization of synthetic melanoidins-containing wastewater by a bacterial consortium*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35, 1313-1321, 2008.

JORNAL DA CANA. *Usinas podem ampliar faturamento com venda de CO_2*. Jornal da Cana, 46, 2008.

JUDD, S., VAN DEN BROEKE, L.J.P., SHURAIR, M., KUTI, Y., ZNAD H. *Algal remediation of CO_2 and nutrient discharges: a review*. Water research 87, 356-366, 2015.

KEYMER, P.C., LANT, P.A., PRATT, S. *Modelling microalgal activity as a function of inorganic carbon concentration: accounting for the impact of pH on the bicarbonate system*. Journal of Applied Phycology 26, 3, 1343-1350, 2014.

KIM, H.W., MARCUS, A.K., SHIN, J.H., RITTMANN, B.E. *Advanced control for photoautotrophic growth and CO_2-utilization efficiency using a membrane carbonation photobioreactor (MCPBR)*. Environmental Science & Technology 45, 11, 5031-5038, 2011.

KIM, S.G., CHOI, A., AHN, C.Y., PARK, C.S., PARK, Y.H., OH, H.M. *Harvesting of Spirulina platensis by cellular flotation and growth stage determination*. Letters in Applied Microbiology 40, 190-194, 2005.

KOBAYASHI, M., KURIMURA, Y., TSUJI, Y. *Light-independent, astaxanthin production by the green microalga Haematococcus pluvialis under salt stress*. Biotechnology Letters 19, 507-509, 1997.

KWAK, D., YUN, D., BINNS, M., YEO, Y., KIM, J. *Conceptual process design of CO_2 recovery plants for enhanced oil recovery applications.* Industrial & Engineering Chemistry Research 53, 37, 14385-14396, 2014.

LAI, Y.S., PARAMESWARAN, P., LI, A., BAEZ, M., RITTMANN, B.E. *Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, Scenedesmus*. Bioresource Technolology 173, 457-461, 2014.

LAIME, E.M.O., FERNANDES, P.D., OLIVEIRA, D.C.S., FREIRE, E.A. *Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão*. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas 5, 3, 16-29, 2011.

LAMA, S., MUYLAERT, K., KARKI, T.B., FOUBERT, I., HENDERSON, R.K., VANDAMME, D. *Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation*. Bioresource Technolology 220, 464-470, 2016.

LAMELAS, C., WILKINSON, K.J., SLAVEYKOVA, V.I. *Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae*. Environmental Science & Technology 39, 16, 6109-6116, 2005.

LEA-SMITH, D.J., BOMBELLI, P., VASUDEVAN, R., HOWE, C.J. *Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria*. Biochimici et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1857, 3, 247-255, 2016.

LEE, E., JALALIZADEH, M., ZHANG, Q. *Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review*. Algal Research 12, 497-512, 2015a.

LEE, K., NA, J.G., SEO, J.Y., SHIM, T.S., KIM, B., PRAVEENKUMAR, R., PARK, J.Y., OH, Y.K., JEON, S.G. *Magnetic-nanoflocculant-assisted water-nonpolar solvent interface sieve for microalgae harvesting.* ACS Applied Materials & Interfaces, 7, 33, 18336-18343, 2015b.

LI, J., STAMATO, M., VELLIOU, E., JEFFRYES, C., AGATHOS, S.N. *Design and characterization of a scalable airlift flat panel photobioreactor for microalgae cultivation*. Journal of Applied Phycology 27, 1, 75-86, 2015a.

LI, P., SONG, Y., YU, S., PARK, H. *The effect of hydrodynamic cavitation on Microcystis aeruginosa: physical and chemical factors*. Chemosphere 136, 245-251, 2015b.

LIANG, Y., SARKANY, N., CUI, Y. *Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions*. Biotechnology Letters 31, 1043-1049, 2009.

LIM, S-L, CHU, W-L, PHANG S-M. *Use of Chlorella vulgaris for bioremediation of textile wastewater*. Bioresource Technology 101, 7314-7322, 2010.

LIU, J. & CHEN, F. *Biology and industrial applications of Chlorella: advances and prospects*. Advances in Biochemical Engineering 153, 1-35, 2016.

LIU, Q., HUANG, Y., ZHANG, R., CAI, T., CAI, Y. *Medical application of Spirulina platensis derived C-Phycocyanin.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 7803846, 2016.

LOURENÇO, S.O., BARBARINO, E., LAVIN, P.L., MARQUEZ, U.M.L., AIDAR, E. *Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors*. Journal of Phycology 39, 1, 17-32, 2004.

LUONG, J.H.T. *Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition*. Biotechnology and Bioengineering 29, 2, 242-248, 1987.

LUPATINI, A.L., COLLA, L.M., CANAN, C., COLLA, E. *Potential application of microalga Spirulina platensis as a protein source*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016.

LV, M., CHENG, L., XU, X., ZHANG, L., CHEN, H. *Enhanced lipid production of Chlorella vulgaris by adjustment of cultivation conditions*. Bioresource Technology 101, 6797-6804, 2010.

MAGALHÃES, A.C.M. 2012. Álcool e açúcar - unidade VII - Fermentação Alcoólica. Disponível em <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAAQ08AH/alcool-acucar-unidade-vii-fermentacao-alcoolica> Acesso em 13/02/15.

MAHAPATRA, D.M, CHANAKYA, H.N., RAMACHANDRA, T.V. *Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater*. Bioresource Technology 168, 142-150, 2014.

MARKOU, G., VANDAMME, D., MUYLAERT K. *Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients*. Water research 65, 186-202, 2014.

MARQUES, S.S.I., NASCIMENTO, I.A., ALMEIDA, P.F., CHINALIA, F.A. *Growth of Chlorella vulgaris on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment.* Applied Biochemical Biotechnology 171, 1933-1943, 2013.

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

MATA-ALVAREZ, J., MACÉ, S., LLABRÉS, P. *Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives*. Bioresource Technology 74, 3-16, 2000.

MEDEIROS, J.L., BARBOSA, L.C., ARAÚJO, O.Q.F. *Equilibrium approach for CO_2 and H_2S absorption with aqueous solutions of alkanolamines: theory and parameter estimation.* Industrial & Engineering Chemistry Research 52, 9203-9226, 2013.

MENDES, A., GUERRA, P., MADEIRA, V., RUANO, F., SILVA, T.L., REIS, A. *Study of docosahexaenoic acid production by the heterotrophic microalga Crypthecodinium cohnii CCMP 316 using carob pulp as a promising carbon source*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23, 1209-1215, 2007.

MENDES, L.B.B. & VERMELHO, A.B. *Allelopathy as a potential strategy to improve microalgae cultivation*. Biotechnology for Biofuels 6, 152, 1-14, 2013.

MORAIS, M.G. & COSTA, J.A.V. *Biofixation of carbon dioxide by Spirulina sp. and Scenedesmus obliquus cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor*. Journal of Biotechnology 129, 439-445, 2007.

MORAIS, M.G., VAZ, B.S., MORAIS, E.G., COSTA, J.A.V. *Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae*. BioMed Research International 835761, 1-15, 2015.

MORALES-SÁNCHEZ, D., MARTINEZ-RODRIGUEZ, O.A., KYNDT, J., MARTINEZ, A. *Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31, 1, 1-9, 2015.

MORIMOTO, T., NAGATSU, A., MURAKAMI, N., SAKAKIBARA, J., TOKUDA, H., NISHINO, H., IWASHIMA, A. *Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, Chlorella vulgaris*. Phytochemistry 40, 1433-1437, 1995.

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

MORONEY, J.V., JUNGNICK, N., DIMARIO, R.J., LONGSTRETH, D.J. *Photorespiration and carbon concentrating mechanisms: two adaptations to high O_2, low CO_2 conditions*. Photosynthesis Research 177, 1-3, 121-131, 2013.

MOTA, V.T., ARAÚJO, T.M., AMARAL, M.C. *Comparison of aerobic and anaerobic biodegradation of sugarcane vinasse*. Applied Biochemistry and Biotechnology 176, 5, 1402-1412, 2015.

MUÑOZ, R. & GUIEYSSE, B. *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review*. Water Research 40, 2799-2815, 2006.

MYKLESTAD, S. & HAUG, A. *Production of carbohydrates by the marine diatom Chaetoceros affinis var. willei (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 9, 2, 125-136, 1972.

NAMIKOSHI, M. *Bioactive compounds produced by cyanobacteria*. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 17, 373-384. 1996.

NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., MURWANASHYAKA, T., MANIRAFASHA, E., HE, N., SHAO, W., LU, Y. *Harvesting of freshwater microalgae with microbial bioflocculant: a pilot-scale study*. Biotechnology for Biofuels 9, 47, 2016.

NICKELSEN, J. & RENGSTL, B. *Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants*. Annual Review of Plant Biology 64, 609-635, 2013.

NITAYAVARDHANA, S. & KHANAL, S.K. *Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient*. Bioresource Technology 101, 9078-9085, 2010.

OGBONNA, J.C. & TANAKA, H. *Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles*. Bioresource Technology 65, 65-72, 1998.

OGBONNA, J.C. & TANAKA, H. *Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of Chlorella pyrenoidosa*. Journal of Fermentation and Bioengineering 82, 6, 558-564, 1996.

OLGUÍN, E.J. *Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes*. Biotechnology Advances 22, 81-91, 2003.

PANE, G., CACCIOLA, G., GIACCO, E., MARIOTTINI, G.L., COPPO, E. *Assessment of the antimicrobial activity of algae extracts on bacteria responsible of external otitis*. Marine Drugs 13, 10, 6440-6452, 2015.

PANT, D. & ADHOLEYA, A. *Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review*. Bioresource Technology 98, 2321-2334, 2007.

PATEL, V.K., MAJI, D., SINGH, A.K., SUSEELA, M.R., SUNDARAM, S., KALRA, A. *A natural plant growth promoter, calliterpenone, enhances growth and biomass, carbohydrate, and lipid production in cyanobacterium SynechocystisPCC 6803*. Journal of Applied Phycology 26, 1, 279-286, 2014.

PATIL, L. & KALIWAL, B. *Effect of CO_2 concentration on growth and biochemical composition of newly isolated indigenous microalga Scenedesmus bajacalifornicus BBKLP-07*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016 DOI: 10.1007/s12010-016-2330-2.

PEREIRA, H., CUSTÓDIO, L., RODRIGUES, M.J., DE SOUSA, C.B., OLIVEIRA, M., BARREIRA, L., NENG NDA, R., NOGUEIRA, J.M., ALROKAYAN, S.A., MOUFFOUK, F., ABU-SALAH, K.M., BEN-HAMADOU, R., VARELA, J. *Biological activities and chemical composition of methanolic extracts of selected autochthonous microalgae strains from the red sea*. Marine Drugs 13, 6, 3531-3549, 2015.

PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F., DE-BASHAN, L., BASHAN, Y. *Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products.* Water Research 45, 11-36, 2011.

PICARDO, M.C. *Desempenho de Isochrysis galbana na produção de óleo e sequestro de CO_2 com fotobiorreator piloto*. 2012. Tese (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2012.

PIRES, J.C.M., ALVIM-FERRAZ, M.C.M., MARTINS, F.G., SIMÕES, M. *Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture*. Environmental Science and Pollution Research 20, 5096-5105, 2013.

PITTMAN, J.K., DEAN, A.P., OSUNDEKO, O. *The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources*. Bioresource Technology, 102, 17-25, 2011.

PLEISSNER, D., LAM, W.C., SUN, Z., LIN, C.S.K. *Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation*. Bioresource Technology 137, 139-146, 2013.

PORTARIA DO MINISTÉRIO DO INTERIOR nº 158, de 03 de novembro de 1980.

PULZ, O. & GROSS, W. *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology 65, 635-648, 2004.

RAE, B.D., LONG, B.M., WHITEHEAD, L.F., FÖRSTER, B., BADGER, M.R., PRICE, G.D. *Cyanobacterial carboxysomes: microcompartments that facilitate CO_2 fixation*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 23, 300-307, 2013.

RAJA, R., HEMAISWARYA, S., SRIDHAR, S., RENGASAMY, R. *A Perspective on the biotechnological potential of microalgae*. Critical Reviews in Microbiology 34, 77-88, 2008.

RAJAGOPAL, S., SICORA, C., VÁRKONYI1, Z., MUSTÁRDY, L., MOHANTY, P. *Protective effect of supplemental low intensity white light on ultraviolet-B exposure-induced impairment in cyanobacterium Spirulina platensis: formation of air vacuoles as a possible protective measure*. Photosynthesis Research 85, 181-189, 2005.

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

RAVEN, J.A & GIORDANO, M. *Algae*. Current Biology 24, 13, 590-595, 2014.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RUBIO, F.C., CAMACHO, F.G., SEVILLA, J.M., CHISTI, Y., GRIMA, E.M. *A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae*. Biotechnology and Bioengineering 81, 4, 459-473, 2003.

RYM, B.D., NEJEH, G., LAMIA, T., ALI, Y., RAFIKA, C., KHEMISSA, G., JIHENE, A., HELA, O., HATEM, B.O. *Modeling growth and photosynthetic response in Arthrospira platensis as function of light intensity and glucose concentration using factorial design*. Journal of Applied Phycology 22, 6, 745-752, 2010.

SALES, R. & ABREU, P.C. *Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae Nannochloropsis oculata*. Applied Biochemistry and Biotechnology 175, 2012-2019, 2015.

SANGHVI, A.M. & LO, Y.M. *Present and potential industrial applications of macro- and microalgae*. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture 2, 187-194, 2010.

SANTANA, H., CEREIJO, C.R, TELES, V.C., NASCIMENTO, R.C, FERNANDES, M.S., BRUNALE, P., CAMPANHA, R.C., SOARES, I.P., SILVA, F.C.P., SABAINI, P.S., SIQUEIRA, F.G., BRASIL, B.S.A.F. *Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization*. Bioresource Technology, 2016 http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075.

SANTOS, R.R., MOREIRA, D.M., KUNIGAMI, C.N., ARANDA, D.A.G., TEIXEIRA, C.M.L.L. *Comparison between several methods of total lipid extraction from Chlorella vulgaris biomass*. Ultrasonics Sonochemistry 22, 95-99, 2015.

SATYAWALI, Y. & BALAKRISHNAN, M. *Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review*. Journal of Environmental Management 86, 481-497, 2008.

SEIXAS, F.L., GIMENES, M.L., FERNANDES-MACHADO, N.R.C. *Tratamento de vinhaça por adsorção em carvão de bagaço de cana-de-açúcar*. Química Nova 39, 2, 172-179, 2016.

SHENG, J., YU, F., XIN, Z., ZHAO, L., ZHU, X., HU, Q. *Preparation, identification and their antitumor activities in vitro of polysaccharides from Chlorella pyrenoidosa*. Food Chemistry 105, 533-539, 2007.

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

SIVAKUMAR, M., KUMAR, R.R., SHASHIREKHA, V., SESHADRI, S. *Influence of carbon dioxide on the growth of Spirulina sp. (MCRC-A0003) isolated from Muttukadu backwaters, South India*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30, 2775-2781, 2014.

SMALL, D.P., HÜNER, N.P., WAN, W. *Effect of static magnetic fields on the growth, photosynthesis and ultrastructure of Chlorella kessleri microalgae*. Bioelectromagnetics 33, 4, 298-308, 2012.

SPOLAORE, P., CASSAN, C.J., DURAN, E., ISAMBERT, A. *Commercial applications of microalgae*. Journal of Bioscience and Bioengineering 101, 2, 87-96, 2006.

*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewate*r 14º ed., Washington, American Public Health Association - American Water Works Association - Water Pollution Control Federation, 1976.

STOLZ, P. & OBERMAYER, B. *Manufacturing microalgae for skin care*. Cosmetics & Toiletries 120, 99-106, 2005.

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

SWAAF, M.E., PRONK, J.T., SIJTSMA, L. *Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga Crypthecodinium cohnii on ethanol*. Applied Microbiology and Biotechnology 61, 40-43, 2003.

SWARNALATHA, G.V., HEGDE, N.S., CHAUHAN, V.S., SARADA, R. *The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae*. Algal Research 9, 151-159, 2015.

TARLAN, E., DILEK, F.B., YETIS, U. *Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater*. Bioresource Technology 84, 1-5, 2002.

TEIXEIRA, C.M.L.L., KIRSTEN, F.V., TEIXEIRA, P.C.N. *Evaluation of Moringa oleifera seed flour as a flocculating agent for potential biodiesel producer microalgae*. Journal of Applied Phycology 24, 557-563, 2012.

TORZILLO, G., SACCHI, A., MATERASI, R. *Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in Spirulina platensis grown outdoors in tubular photobioreactors*. Bioresource Technolology 38, 95-100, 1991.

TU, R., JIN, W., XI, T., YANG, Q., HAN, S.F., ABOMOHRA, AEL-F. *Effect of static magnetic field on the oxygen production of Scenedesmus obliquus cultivated in municipal wastewater*. Water research 86, 132-138, 2015.

UMMALYMA, S.B. & SUKUMARAN, R.K. *Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution*. Bioresource Technology 165, 295-301, 2014.

ÚNICA. 2016. União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Acompanhamento quinzenal - Posição até 16/12/2016. Disponível em <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63> Acesso em 29/12/2016.

VANDAMME, D., FOUBERT, I., MUYLAERT, K. *Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production*. Trends in Biotechnology 31, 4, 233-239, 2013.

WAGNER, I., STEINWEG, C., POSTEN, C. *Mono-and dichromatic LED illumination leads to enhanced growth and energy conversion for high-efficiency cultivation of microalgae for application in space*. Biotechnology Journal 11, 8, 1060-1071, 2016.

WALSBY, A.E. *Gas Vesicles*. Microbiological Reviews 58, 1, 94-144, 1994.

WANA, M., ZHANG, J., HOU, D., FAN, J., LI, Y., HUANG, J., WANGB, J. *The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of Haematococcus pluvialis during a light–dark cyclic cultivation*. Bioresource Technolology 167, 276-283, 2014.

WANG, J., YANG, H., WANG, F. *Mixotrophic Cultivation of Microalgae for Biodiesel Production: Status and Prospects.* Applied Biochemistry and Biotechnology 172, 7, 3307-3329, 2014.

WARD, A.J., LEWIS, D.M., GREENB, F.B. *Anaerobic digestion of algae biomass: a review*. Algal Research 5, 204-214, 2014.

WATERBURY, J.B. *The Cyanobacteria - Isolation, purification and identification*. Prokaryotes 4, 1053-1073, 2006.

WEI, A., ZHANG, X., WEI, D., CHEN, G., WU, G., YANG, S.T. *Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae Chlorella protothecoides*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 36, 1383-1389, 2009.

WILKIE, A., RIEDESEL, K., OWENS, J. *Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks*. Biomass and Bioenergy 19, 63-102, 2000.

WU, Q., LIU, L., MIRON, A., KLÍMOVÁ, B., WAN, D., KUČA, K. *The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview.* Archives of Toxicology 90, 8, 1817-1840, 2016.

XU, Y., ISOM, L., HANNA, M.A. *Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations*. Bioresource Technology 10, 3311-3319, 2010.

YANG, C., HUA, Q., SHIMIZU, K. *Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions*. Biochemical Engineering Journal 6, 87-102, 2000.

ZBINDEN, M.D., STURM, B.S., NORD, R.D., CAREY, W.J., MOORE, D., SHINOGLE, H., STAGG-WILLIAMS, S.M. *Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae*. Biotechnology and Bioengineering 110, 6, 1605-1615, 2013.

ZHANG, L., CHEN, L., WANG, J., CHEN, Y., GAO, X., ZHANG, Z., LIU, T. *Attached cultivation for improving the biomass productivity of Spirulina platensis*. Bioresource Technolology 181, 136-142, 2015.

ZHAO, Y., LIANG, W., LIU, L., LI, F., FAN, Q., SUN, X. *Harvesting Chlorella vulgaris by magnetic flocculation using Fe_3O_4 coating with polyaluminium chloride and polyacrylamide*. Bioresource Technolology 198, 789-96, 2015.

ZHENG, Y., CHI, Z., LUCKER, B., CHEN, S. *Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production*. Bioresource Technolology 103, 484-488, 2012.

ZHOU, W., MIN, M., LI, Y., HU, B., MA, X., CHENG, Y., LIU, Y., CHEN, P., RUAN, R. *A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation*. Bioresource Technolology 110 448-455, 2012.

ZHU, C.J. & LEE, Y.K. *Determination of biomass dry weight of marine microalgae*. Journal of Applied Phycology 9, 189-194, 1997.

APÊNDICE

LEGISLAÇÃO SOBRE A VINHAÇA

É possível encontrar leis específicas que descrevem os padrões, as exigências, o licenciamento e as penalidades em relação ao controle da poluição do meio ambiente por vinhaça. De acordo com a legislação federal, Portaria do Ministério do Interior nº 158, de 03 de novembro de 1980:

I) Fica mantida a proibição do lançamento direto ou indireto da vinhaça em qualquer coleção hídrica, considerando que, além da vinhaça, os demais efluentes das destilarias de álcool e de bebidas alcoólicas, bem como os efluentes das usinas de açúcar, prejudicam de maneira sensível o abastecimento de água para as cidades e para atividades econômicas, alterando de forma intensa o equilíbrio ecológico das águas interiores e causando uma série de prejuízos aos recursos pesqueiros.

II) O sistema de tratamento e/ou utilização da vinhaça deverá obedecer a solução apresentada e aprovada pelo órgão estadual de controle do meio ambiente.

V) Os efluentes das destilarias e usinas de açúcar, que forem lançados em qualquer coleção hídrica, não poderão conferir, em qualquer trecho da mesma, características em desacordo com a sua c1asse, estabelecida nos termos da Portaria OM nº 13, de 15 de janeiro de 1964, do Ministério do Interior, referente à classificação das águas interiores.

Quanto ao órgão estadual de controle toma-se como base a CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, ligada à secretaria do Meio Ambiente do governo paulista). A norma técnica CETESB P4.231, de 09 de março de 2005, dispõe sobre critérios e procedimentos para aplicação da vinhaça em solo agrícola. A portaria CETESB CTSA - 1, de 28 de novembro de 2005 dispõe sobre os prazos e procedimentos para a impermeabilização de tanques de armazenamento de vinhaça e de canais mestres ou primários, já instalados, de uso permanente para a distribuição da vinhaça destinada à aplicação no solo que se referem os subitens 5.3 e 5.5 na Norma Técnica CETESB P4.231 - Vinhaça.

De acordo com a CETESB, a área a ser utilizada para a aplicação de vinhaça no solo deve:

5.1.6 Estar afastada, no mínimo, 1.000 m dos núcleos populacionais compreendidos na área do perímetro urbano. Essa distância de afastamento poderá, a critério da CETESB, ser ampliada quando as condições ambientais, incluindo as climáticas, exigirem tal ampliação.

5.1.7 Estar afastada, no mínimo, 6 m das Áreas de Preservação Permanente.

5.1.8 A profundidade do nível d'água do aquífero livre, no momento de aplicação de vinhaça deve ser, no mínimo, de 1,50 m.

5.2 Os tanques de armazenamento de vinhaça deverão atender ao disposto no item 5.1 desta norma e ser impermeabilizados com geomembrana impermeabilizante ou outra técnica de igual ou superior efeito. Os prazos para impermeabilização dos tanques de armazenamento instalados antes da edição da primeira versão desta norma (05 de abril de 2005), estão fixados na Portaria CTSA 01, de 28 de novembro de 2005.

5.3 Deverão ser instalados nas áreas dos tanques, uma quantidade mínima de 04 poços de monitoramento, sendo 01 à montante e 03 à jusante, localizados de acordo com o mapa potenciométrico e construídos conforme a norma NBR 13.895:1997.

5.3.1 Na água coletada dos poços de monitoramento, deverão ser determinados os seguintes parâmetros, devendo os mesmos atender aos padrões da legislação pertinente: pH; dureza; sulfato; manganês; alumínio; ferro; nitrogênio nitrato; nitrogênio nitrito; nitrogênio amoniacal; nitrogênio Kjeldhal; potássio; cálcio; cloreto; sólidos dissolvidos totais; condutividade elétrica e fenóis totais.

Observações: a) A frequência da amostragem para análise será semestral; b) As metodologias de análises, para os parâmetros assinalados acima, são aquelas contidas em normas e/ou procedimentos consagrados para tal, nas suas versões vigentes; c) Os resultados analíticos deverão ser comparados com os valores orientadores estabelecidos na Decisão de Diretoria da CETESB nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005 e com os padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria do Ministério da Saúde nº 518/04, de 25 de 03 de 2004.

5.3.2 A implantação de drenos testemunha dispensa a instalação dos poços de monitoramento.

5.4 Deverá ser imediatamente suspensa a prática de armazenamento e/ou disposição de vinhaça ou lodo em áreas de sacrifício, eliminando-se aquelas que ainda estão sendo utilizadas nas unidades produtoras, estando qualquer aplicação no solo agrícola sujeita à observância desta norma.

5.4.1 Essas áreas deverão ser avaliadas pelo responsável quanto a uma possível alteração de qualidade de águas subterrâneas, por meio da realização de uma investigação confirmatória, a qual deve seguir minimamente as seguintes recomendações:

5.4.1.1 Investigação da água subterrânea: deverão ser instalados 2 poços de monitoramento para cada área de 10.000 m^2, locados preferencialmente nos locais onde, em função do histórico de utilização da área, há maior probabilidade de alteração da qualidade. Os poços de monitoramento instalados devem ter seção filtrante com comprimento máximo de 2 m, instalada na parte superficial do aquífero freático. Os aspectos construtivos devem atender às especificações definidas na norma NBR 13.895: 1997. Devem ser coletadas amostras em todos os poços instalados, que devem ser avaliadas para os mesmos parâmetros definidos no item.

5.3.1. Os resultados analíticos deverão ser comparados com os valores orientadores estabelecidos na Decisão de Diretoria da CETESB n° 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005 e com os padrões de potabilidade estabelecidos na Portaria do Ministério da Saúde n° 518/04, de 25 de março de 2004.

5.4.2 Caso sejam constatadas alterações de qualidade na água subterrânea, superiores aos valores definidos acima, deverá ser realizada uma investigação detalhada da área, atendendo ao que for cabível às recomendações constantes do Manual de Gerenciamento de Áreas Contaminadas.

5.6 Ao término de cada safra, deverá ser promovida a limpeza dos tanques e canais mestres impermeabilizados, sendo que a vinhaça eventualmente remanescente deverá ser neutralizada.

5.6.1 A vinhaça remanescente nos tanques e canais mestres ou primários deverá ser aplicada, conforme os procedimentos estabelecidos nesta Norma, em solos agrícolas para uso da cultura canavieira.

5.7 Anualmente, deverá ser realizado ou atualizado o Plano de Aplicação de Vinhaça, a ser elaborado conforme instruções contidas no item 6, os procedimentos estabelecidos pela Portaria CTSA 01, de 28 de novembro de 2005 e assinado por profissional devidamente habilitado junto ao CREA – Conselho Regional de Engenharia, Arquitetura e Agronomia, que deverá recolher a ART (Anotação de Responsabilidade Técnica) específica.

5.7.1 Até a data de 02 de abril de cada ano, o empreendimento deverá encaminhar à CETESB o Plano de Aplicação de Vinhaça, observadas as instruções contidas no item 6 desta norma.

5.7.2 O Plano de Aplicação de Vinhaça será utilizado pela CETESB para fins de acompanhamento e fiscalização.

5.8 A dosagem para a aplicação de vinhaça para enriquecimento do solo agrícola, deverá ser calculada considerando a profundidade e a fertilidade do solo, a concentração de potássio na vinhaça e a extração média desse elemento pela cultura, conforme fórmula constante do item 6 desta norma.

5.8.1 A concentração máxima de potássio no solo não poderá exceder 5% da Capacidade de Troca Catiônica – CTC. Quando esse limite for atingido, a aplicação de vinhaça ficará restrita à reposição desse nutriente em função da extração média pela cultura, que é de 185 kg de K_2O/ha por corte. Estes parâmetros poderão ser, a critério da CETESB, revistos conforme os resultados do estudo de avaliação mencionado no item 5.10 desta norma ou outros estudos.

6 Plano de Aplicação de Vinhaça: instruções

O Plano de Aplicação de Vinhaça no solo será constituído de memorial descritivo da prática de aplicação pretendida, acompanhado de planta na escala de 1:20.000, ou superior, contendo as taxas indicativas de dosagem a serem aplicadas, em $m^3.ha^{-1}$, diferenciadas em cores, com intervalos de aplicação a cada 150 $m^3.ha^{-1}$. A planta e planilha complementares deverão indicar, no mínimo: a localização dos tanques de armazenamento e dos canais mestres ou primários de uso permanente de distribuição; a localização dos cursos d'água; poços utilizados para abastecimento; dados de geologia e hidrogeologia local; resultados analíticos dos solos; as áreas de interesse ambiental; e forma e dosagem de aplicação de vinhaça.

6.1 Caracterização da vinhaça a ser utilizada nas aplicações no solo

6.1.1 A vinhaça deverá ser caracterizada quanto aos seguintes parâmetros: pH; resíduo não filtrável total; dureza; condutividade elétrica; nitrogênio nitrato; nitrogênio nitrito; nitrogênio amoniacal; nitrogênio Kjeldhal; sódio; cálcio; potássio; magnésio; sulfato; fosfato total; DBO e DQO.

Observação: outros parâmetros poderão ser solicitados, a critério da CETESB. Essa caracterização deverá ser resultado de, no mínimo, duas amostragens realizadas no local de geração da vinhaça, durante a safra anterior à apresentação do plano de aplicação.

6.1.2 Determinação do teor de K_2O na vinhaça: semanalmente, será determinado o teor de K_2O da vinhaça, expresso em $kg.m^{-3}$.Essa determinação irá indicar a dosagem de vinhaça a ser aplicada no solo.

6.1.3 Dosagem: a dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada no tratamento de solos agrícolas em cultura de cana-de-açúcar será determinada pela equação:
m^3 de vinhaça/ha = [(0,05 x CTC – ks) x 3744 + 185] / kvi, onde:
0,05 = 5% da Capacidade de Troca Catiônica, expressa em $cmolc.dm^{-3}$, dada pela análise de fertilidade do solo realizada por laboratório de análise de solo e utilizando metodologia de análise do solo do Instituto Agronômico - IAC, devidamente assinado por responsável técnico.
ks = concentração de potássio no solo, expresso em $cmolc.dm^{-3}$, à profundidade de 0 a 0,80 m, dada pela análise de fertilidade do solo realizada por laboratório de análise de solo utilizando metodologia de análise de solo do Instituto Agronômico – IAC , devidamente assinado por responsável técnico.
3744 = constante para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em $cmolc.dm^{-3}$ ou mEq100 cm^{-3} , para kg de potássio em um volume de 1 ha por 0,80 m de profundidade.
185 = massa, em kg, de K_2O/ha extraído pela cultura, por corte.
kvi = concentração de potássio na vinhaça, expressa em kg de K_2O m^{-3}, apresentada em boletim de resultado analítico, assinado por responsável técnico.

7 Caracterização do Solo

7.1 Caracterização da qualidade do solo que receberá aplicação de vinhaça

7.1.1 Amostragem do solo

Será utilizada uma amostra composta, constituída de quatro sub-amostras, coletadas em gleba homogênea de, no máximo, 100 ha. As sub-amostras deverão ser coletadas, uma no centro de um círculo com raio de 10 m e as outras três ao longo do perímetro, distanciadas cerca de 120º uma da outra. Essa amostragem deverá estar geo-referenciada com suas coordenadas. As amostras deverão ser coletadas com trado, de maneira contínua, até a profundidade de 0,80 m. O solo deverá ser colocado em recipiente limpo, específico para essa finalidade. Após a coleta das quatro sub-amostras, homogeneizar e, por quarteamento, retirar uma amostra de 500 g, que será encaminhada para análise de solo em laboratório integrado ao Instituto Agronômico – IAC.

7.1.2 Caracterização da qualidade do solo

Deverão ser determinados nas amostras compostas, conforme descrito acima, os seguintes parâmetros: Al – alumínio trocável; Ca – cálcio; Mg – magnésio; Na – sódio; SO_4– sulfato; Hidrogênio dissociável; K – potássio; Matéria orgânica; CTC – capacidade de troca catiônica; pH e V% - saturação de bases.

FIGURAS & TABELAS COMPLEMENTARES

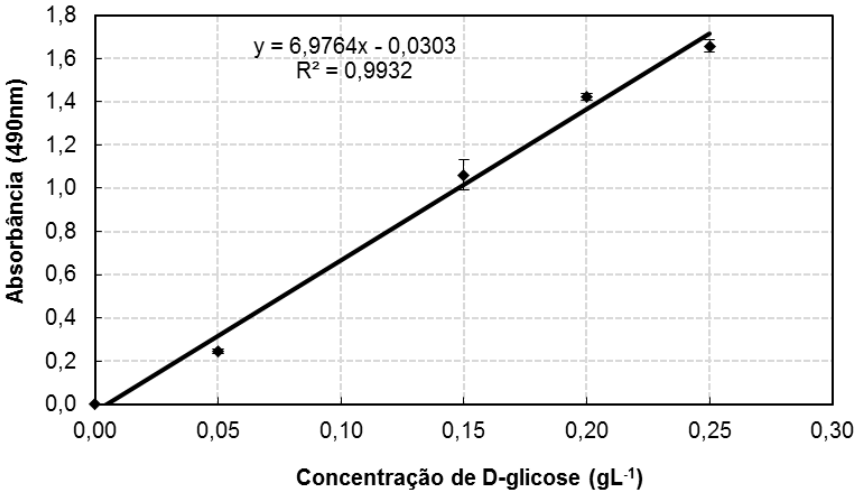


Figura A1. Curva de calibração entre absorvância e concentração de D-glicose, utilizada para quantificação de carboidratos totais na vinhaça. Barras verticais representam o desvio padrão (*n=2*).

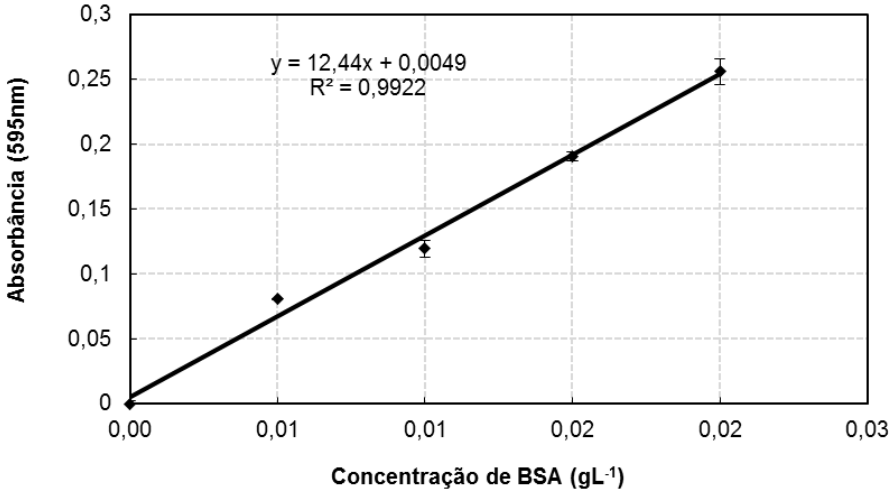


Figura A2. Curva de calibração entre absorvância e concentração de BSA (albumina do soro bovino). Barras verticais representam o desvio padrão (*n=2*).

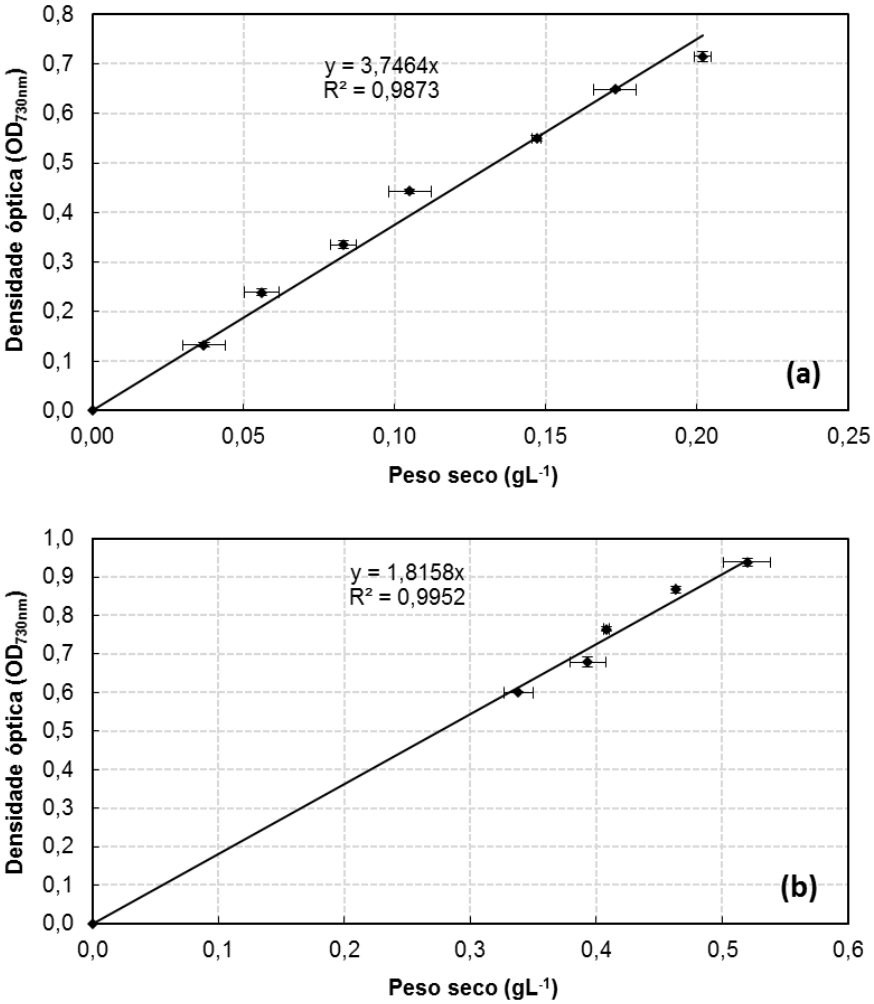


Figura A3. Curva de correlação entre densidade óptica e peso seco. (a) *Chlorella vulgaris*. (b) *Spirulina maxima*. Barras horizontais e verticais representam o desvio padrão (*n=2*).

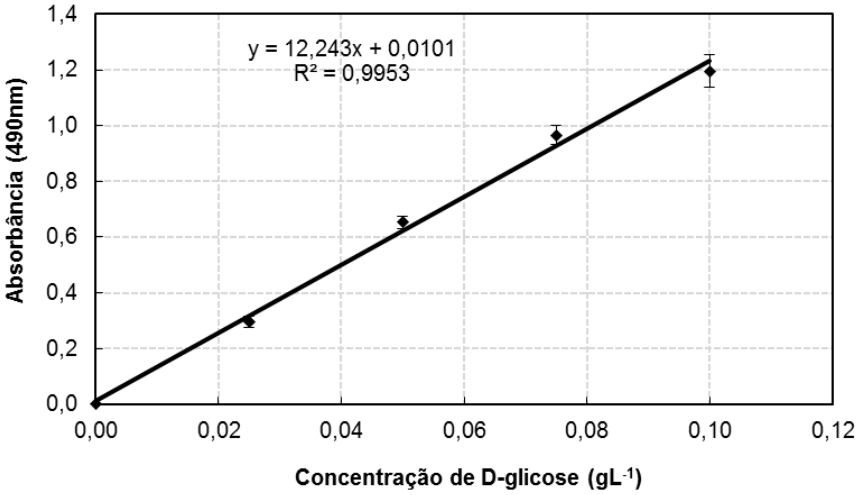


Figura A4. Curva de calibração entre absorvância e concentração de D-glicose, utilizada para quantificação de carboidratos totais na biomassa. Barras verticais representam o desvio padrão (*n=2*).

Tabela A1. Análise estatística das curvas presentes na **figura 11**: cultivo heterotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça, cultivo heterotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça, cultivo mixotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça, cultivo mixotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça e cultivo autotrófico, respectivamente.

Cultivo heterotrófico em meio contendo 0.1%v/v de vinhoto [C.vulgaris] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.049	0.049	0.049	0.049	8.5e-018	1.73e-014	0.049	0.049
1	0.06	0.073	0.07	0.06767	0.00681	10.1	0.097	0.0384
2	0.082	0.081	0.08	0.081	0.001	1.23	0.0853	0.0767
3	0.114	0.106	0.107	0.109	0.00436	4	0.128	0.0902
4	0.1	0.116	0.106	0.1073	0.00808	7.53	0.142	0.0726
7	0.096	0.094	0.097	0.09567	0.00153	1.6	0.102	0.0891
8	0.098	0.105	0.103	0.102	0.00361	3.53	0.118	0.0865
9	0.093	0.088	0.089	0.09	0.00265	2.94	0.101	0.0786
10	0.091	0.089	0.092	0.09067	0.00153	1.68	0.0972	0.0841

Cultivo heterotrófico em meio contendo 1%v/v de vinhoto [C.vulgaris] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.042	0.042	0.042	0.042	0	0	0.042	0.042
1	0.044	0.057	0.05	0.05033	0.00651	12.9	0.0783	0.0223
2	0.078	0.073	0.07	0.07367	0.00404	5.49	0.0911	0.0563
3	0.079	0.081	0.08	0.08	0.001	1.25	0.0843	0.0757
4	0.086	0.074	0.077	0.079	0.00624	7.91	0.106	0.0521
7	0.085	0.088	0.091	0.088	0.003	3.41	0.101	0.0751
8	0.087	0.104	0.1	0.097	0.00889	9.16	0.135	0.0588
9	0.077	0.073	0.082	0.07733	0.00451	5.83	0.0967	0.0579
10	0.073	0.073	0.073	0.073	0	0	0.073	0.073

Cultivo mixotrófico em meio contendo 0.1%v/v de vinhoto [C.vulgaris] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.06	0.06	0.06	0.06	0	0	0.06	0.06
1	0.074	0.078	0.083	0.07833	0.00451	5.76	0.0977	0.0589
2	0.097	0.08	0.08	0.08567	0.00981	11.5	0.128	0.0434
3	0.101	0.113	0.117	0.1103	0.00833	7.55	0.146	0.0745
4	0.16	0.158	0.157	0.1583	0.00153	0.965	0.165	0.152
7	0.135	0.136	0.134	0.135	0.001	0.741	0.139	0.131
8	0.13	0.153	0.128	0.137	0.0139	10.1	0.197	0.0772
9	0.13	0.128	0.129	0.129	0.001	0.775	0.133	0.125
10	0.128	0.128	0.128	0.128	0	0	0.128	0.128

Cultivo mixotrófico em meio contendo 1%v/v de vinhoto [C.vulgaris] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.054	0.054	0.054	0.054	0	0	0.054	0.054
1	0.076	0.07	0.076	0.074	0.00346	4.68	0.0889	0.0591
2	0.1	0.1	0.095	0.09833	0.00289	2.94	0.111	0.0859
3	0.138	0.135	0.138	0.137	0.00173	1.26	0.144	0.13
4	0.153	0.149	0.148	0.15	0.00265	1.76	0.161	0.139
7	0.154	0.151	0.151	0.152	0.00173	1.14	0.159	0.145
8	0.143	0.142	0.141	0.142	0.001	0.704	0.146	0.138
9	0.164	0.156	0.158	0.1593	0.00416	2.61	0.177	0.141
10	0.157	0.16	0.158	0.1583	0.00153	0.965	0.165	0.152

Cultivo autotrófico [C.vulgaris] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.048	0.048	0.048	0.048	8.5e-018	1.77e-014	0.048	0.048
1	0.073	0.07	0.07	0.071	0.00173	2.44	0.0785	0.0635
2	0.098	0.099	0.096	0.09767	0.00153	1.56	0.104	0.0911
3	0.124	0.109	0.114	0.1157	0.00764	6.6	0.149	0.0828
4	0.137	0.109	0.118	0.1213	0.0143	11.8	0.183	0.0598
7	0.135	0.128	0.108	0.1237	0.014	11.3	0.184	0.0634
8	0.116	0.113	0.116	0.115	0.00173	1.51	0.122	0.108
9	0.136	0.148	0.13	0.138	0.00917	6.64	0.177	0.0986
10	0.144	0.141	0.14	0.1417	0.00208	1.47	0.151	0.133

Tabela A2. Análise estatística das curvas presentes na **figura 12**: cultivo heterotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça, cultivo heterotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça, cultivo mixotrófico em meio contendo 0,1% v/v de vinhaça, cultivo mixotrófico em meio contendo 1% v/v de vinhaça e cultivo autotrófico, respectivamente.

Cultivo heterotrófico em meio contendo 0,1%v/v de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.022	0.022	0.022	0.022	4.25e-018	1.93e-014	0.022	0.022
1	0.03	0.035	0.033	0.03267	0.00252	7.7	0.0435	0.0218
2	0.065	0.064	0.066	0.065	0.001	1.54	0.0693	0.0607
3	0.099	0.099	0.097	0.09833	0.00115	1.17	0.103	0.0934
4	0.111	0.107	0.107	0.1083	0.00231	2.13	0.118	0.0984
7	0.088	0.092	0.09	0.09	0.002	2.22	0.0986	0.0814
8	0.085	0.09	0.089	0.088	0.00265	3.01	0.0994	0.0766
9	0.088	0.088	0.088	0.088	1.7e-017	1.93e-014	0.088	0.088
10	0.088	0.088	0.088	0.088	1.7e-017	1.93e-014	0.088	0.088

Cultivo heterotrófico em meio contendo 1%v/v de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.026	0.026	0.026	0.026	0	0	0.026	0.026
1	0.112	0.112	0.116	0.1133	0.00231	2.04	0.123	0.103
2	0.198	0.197	0.198	0.1977	0.000577	0.292	0.2	0.195
3	0.18	0.179	0.179	0.1793	0.000577	0.322	0.182	0.177
4	0.176	0.174	0.177	0.1757	0.00153	0.87	0.182	0.169
7	0.161	0.162	0.162	0.1617	0.000577	0.357	0.164	0.159
8	0.156	0.158	0.156	0.1567	0.00115	0.737	0.162	0.152
9	0.171	0.176	0.178	0.175	0.00361	2.06	0.191	0.159
10	0.165	0.163	0.165	0.1643	0.00115	0.703	0.169	0.159

Cultivo mixotrófico em meio contendo 0.1%v/v de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.015	0.015	0.015	0.015	0	0	0.015	0.015
1	0.037	0.034	0.035	0.03533	0.00153	4.32	0.0419	0.0288
2	0.05	0.044	0.052	0.04867	0.00416	8.55	0.0666	0.0308
3	0.065	0.064	0.065	0.06467	0.000577	0.893	0.0672	0.0622
4	0.082	0.079	0.079	0.08	0.00173	2.17	0.0875	0.0725
7	0.159	0.158	0.153	0.1567	0.00321	2.05	0.17	0.143
8	0.195	0.195	0.194	0.1947	0.000577	0.297	0.197	0.192
9	0.233	0.234	0.234	0.2337	0.000577	0.247	0.236	0.231
10	0.272	0.279	0.272	0.2743	0.00404	1.47	0.292	0.257
11	0.308	0.312	0.313	0.311	0.00265	0.851	0.322	0.3
14	0.337	0.335	0.337	0.3363	0.00115	0.343	0.341	0.331
15	0.372	0.372	0.362	0.3687	0.00577	1.57	0.394	0.344
16	0.401	0.398	0.417	0.4053	0.0102	2.52	0.449	0.361
17	0.441	0.453	0.422	0.4387	0.0156	3.56	0.506	0.371
18	0.469	0.458	0.458	0.4617	0.00635	1.38	0.489	0.434
21	0.614	0.619	0.582	0.605	0.0201	3.32	0.691	0.519
22	0.64	0.648	0.645	0.6443	0.00404	0.627	0.662	0.627
25	0.658	0.685	0.685	0.676	0.0156	2.31	0.743	0.609

Cultivo mixotrófico em meio contendo 1%v/v de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.013	0.013	0.013	0.013	0	0	0.013	0.013
1	0.049	0.052	0.05	0.05033	0.00153	3.03	0.0569	0.0438
2	0.057	0.057	0.057	0.057	0	0	0.057	0.057
3	0.065	0.067	0.07	0.06733	0.00252	3.74	0.0782	0.0565
4	0.076	0.078	0.078	0.07733	0.00115	1.49	0.0823	0.0724
7	0.156	0.158	0.157	0.157	0.001	0.637	0.161	0.153
8	0.168	0.176	0.181	0.175	0.00656	3.75	0.203	0.147
9	0.217	0.216	0.215	0.216	0.001	0.463	0.22	0.212
10	0.238	0.249	0.244	0.2437	0.00551	2.26	0.267	0.22
11	0.281	0.282	0.283	0.282	0.001	0.355	0.286	0.278
14	0.343	0.329	0.329	0.3337	0.00808	2.42	0.368	0.299
15	0.357	0.365	0.353	0.3583	0.00611	1.71	0.385	0.332
16	0.4	0.403	0.396	0.3997	0.00351	0.879	0.415	0.385
17	0.427	0.455	0.455	0.4457	0.0162	3.63	0.515	0.376
18	0.463	0.464	0.477	0.468	0.00781	1.67	0.502	0.434
21	0.589	0.563	0.596	0.5827	0.0174	2.98	0.657	0.508
22	0.607	0.603	0.618	0.6093	0.00777	1.27	0.643	0.576
25	0.733	0.685	0.732	0.7167	0.0274	3.83	0.835	0.599

Cultivo autotrófico [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.011	0.011	0.011	0.011	2.12e-018	1.93e-014	0.011	0.011
1	0.038	0.038	0.038	0.038	0	0	0.038	0.038
2	0.077	0.077	0.077	0.077	0	0	0.077	0.077
3	0.084	0.084	0.084	0.084	0	0	0.084	0.084
4	0.105	0.105	0.105	0.105	0	0	0.105	0.105
7	0.165	0.165	0.165	0.165	0	0	0.165	0.165
8	0.22	0.215	0.204	0.213	0.00819	3.84	0.248	0.178
9	0.234	0.238	0.245	0.239	0.00557	2.33	0.263	0.215
10	0.264	0.262	0.258	0.2613	0.00306	1.17	0.274	0.248
11	0.289	0.29	0.291	0.29	0.001	0.345	0.294	0.286
14	0.351	0.352	0.35	0.351	0.001	0.285	0.355	0.347
15	0.314	0.316	0.314	0.3147	0.00115	0.367	0.32	0.31
16	0.33	0.325	0.33	0.3283	0.00289	0.879	0.341	0.316
17	0.355	0.356	0.357	0.356	0.001	0.281	0.36	0.352
18	0.377	0.383	0.382	0.3807	0.00321	0.844	0.394	0.367
21	0.457	0.463	0.457	0.459	0.00346	0.755	0.474	0.444
22	0.485	0.506	0.485	0.492	0.0121	2.46	0.544	0.44
23	0.531	0.531	0.521	0.5277	0.00577	1.09	0.553	0.503
24	0.554	0.588	0.58	0.574	0.0178	3.1	0.65	0.498
25	0.586	0.591	0.591	0.5893	0.00289	0.49	0.602	0.577

Tabela A3. Análise estatística da análise bioquímica presente na **figura 13**: carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas sob condição autotrófica, condição mixotrófica em meio contendo 0,1% e 1% v/v de vinhaça, respectivamente.

Cultivo autotrófico [S.maxima] Carboidrato(%) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 Carboidrato(%)	Observed#2 Carboidrato(%)	Average Carboidrato(%)	Std.Deviation Carboidrato(%)	Std.Deviation %Carboidrato(%)	Upper 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)	Lower 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)
25	6.6	6.1	6.35	0.354	5.57	10.8	1.86

Tempo (Dia)	Observed#1 Proteina(%)	Observed#2 Proteina(%)	Average Proteina(%)	Std.Deviation Proteina(%)	Std.Deviation %Proteina(%)	Upper 95%Cfd.Limit Proteina(%)	Lower 95%Cfd.Limit Proteina(%)
25	72.1	75.7	73.9	2.55	3.44	106	41.6

Tempo (Dia)	Observed#1 Lipidio(%)	Observed#2 Lipidio(%)	Average Lipidio(%)	Std.Deviation Lipidio(%)	Std.Deviation %Lipidio(%)	Upper 95%Cfd.Limit Lipidio(%)	Lower 95%Cfd.Limit Lipidio(%)
25	10.7	10.9	10.8	0.141	1.31	12.6	9

Tempo (Dia)	Observed#1 Cinza(%)	Observed#2 Cinza(%)	Average Cinza(%)	Std.Deviation Cinza(%)	Std.Deviation %Cinza(%)	Upper 95%Cfd.Limit Cinza(%)	Lower 95%Cfd.Limit Cinza(%)
25	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2

Cultivo mixotrófico em meio contendo 0.1%v/v de vinhoto [S.maxima] Carboidrato(%) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 Carboidrato(%)	Observed#2 Carboidrato(%)	Average Carboidrato(%)	Std.Deviation Carboidrato(%)	Std.Deviation %Carboidrato(%)	Upper 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)	Lower 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)
25	4.3	4.6	4.45	0.212	4.77	7.15	1.75

Tempo (Dia)	Observed#1 Proteina(%)	Observed#2 Proteina(%)	Average Proteina(%)	Std.Deviation Proteina(%)	Std.Deviation %Proteina(%)	Upper 95%Cfd.Limit Proteina(%)	Lower 95%Cfd.Limit Proteina(%)
25	74.6	74.6	74.6	0	0	74.6	74.6

Tempo (Dia)	Observed#1 Lipidio(%)	Observed#2 Lipidio(%)	Average Lipidio(%)	Std.Deviation Lipidio(%)	Std.Deviation %Lipidio(%)	Upper 95%Cfd.Limit Lipidio(%)	Lower 95%Cfd.Limit Lipidio(%)
25	11.3	11.8	11.55	0.354	3.06	16	7.06

Tempo (Dia)	Observed#1 Cinza(%)	Observed#2 Cinza(%)	Average Cinza(%)	Std.Deviation Cinza(%)	Std.Deviation %Cinza(%)	Upper 95%Cfd.Limit Cinza(%)	Lower 95%Cfd.Limit Cinza(%)
25	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2

Cultivo mixotrófico em meio contendo 1%v/v de vinhoto [S.maxima] Carboidrato(%) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 Carboidrato(%)	Observed#2 Carboidrato(%)	Average Carboidrato(%)	Std.Deviation Carboidrato(%)	Std.Deviation %Carboidrato(%)	Upper 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)	Lower 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)
25	4.6	4.8	4.7	0.141	3.01	6.5	2.9

Tempo (Dia)	Observed#1 Proteina(%)	Observed#2 Proteina(%)	Average Proteina(%)	Std.Deviation Proteina(%)	Std.Deviation %Proteina(%)	Upper 95%Cfd.Limit Proteina(%)	Lower 95%Cfd.Limit Proteina(%)
25	76.5	76.5	76.5	0	0	76.5	76.5

Tempo (Dia)	Observed#1 Lipidio(%)	Observed#2 Lipidio(%)	Average Lipidio(%)	Std.Deviation Lipidio(%)	Std.Deviation %Lipidio(%)	Upper 95%Cfd.Limit Lipidio(%)	Lower 95%Cfd.Limit Lipidio(%)
25	10.4	9.4	9.9	0.707	7.14	18.9	0.915

Tempo (Dia)	Observed#1 Cinza(%)	Observed#2 Cinza(%)	Average Cinza(%)	Std.Deviation Cinza(%)	Std.Deviation %Cinza(%)	Upper 95%Cfd.Limit Cinza(%)	Lower 95%Cfd.Limit Cinza(%)
25	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2

Tabela A4. Análise estatística da curva presente na **figura 15**: Ciclo I e II de CCDE.

Ciclo I e Ciclo II de CCDE [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.075	0.073	0.076	0.07467	0.00153	2.05	0.0812	0.0681
1	0.191	0.204	0.18	0.1917	0.012	6.27	0.243	0.14
2	0.287	0.245	0.209	0.247	0.039	15.8	0.415	0.079
3	0.297	0.306	0.297	0.3	0.0052	1.73	0.322	0.278
4	0.348	0.338	0.301	0.329	0.0248	7.53	0.436	0.222
5	0.403	0.417	0.393	0.4043	0.0121	2.98	0.456	0.352
7	0.453	0.517	0.517	0.4957	0.037	7.45	0.655	0.337
7	0.108	0.108	0.108	0.108	0	0	0.108	0.108
8	0.218	0.218	0.218	0.218	0	0	0.218	0.218
9	0.243	0.242	0.243	0.2427	0.000577	0.238	0.245	0.24
10	0.198	0.198	0.198	0.198	3.4e-017	1.72e-014	0.198	0.198

Tabela A5. Análise estatística da curva presente na **figura 16**: Ciclo I, II e III de CCDE com intervalos autotróficos.

Ciclo I, Ciclo II e Ciclo III de CCDE [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.062	0.061	0.063	0.062	0.001	1.61	0.0663	0.0577
1	0.191	0.204	0.18	0.1917	0.012	6.27	0.243	0.14
2	0.287	0.245	0.209	0.247	0.039	15.8	0.415	0.079
3	0.297	0.306	0.297	0.3	0.0052	1.73	0.322	0.278
4	0.348	0.338	0.301	0.329	0.0248	7.53	0.436	0.222
5	0.403	0.417	0.393	0.4043	0.0121	2.98	0.456	0.352
7	0.453	0.517	0.517	0.4957	0.037	7.45	0.655	0.337
7	0.069	0.069	0.069	0.069	0	0	0.069	0.069
8	0.201	0.201	0.201	0.201	3.4e-017	1.69e-014	0.201	0.201
10	0.28	0.28	0.28	0.28	0	0	0.28	0.28
12	0.335	0.335	0.335	0.335	0	0	0.335	0.335
12	0.053	0.053	0.053	0.053	0	0	0.053	0.053
13	0.157	0.157	0.157	0.157	0	0	0.157	0.157
14	0.237	0.241	0.235	0.2377	0.00306	1.29	0.251	0.225
15	0.34	0.326	0.328	0.3313	0.00757	2.29	0.364	0.299
16	0.388	0.392	0.4	0.3933	0.00611	1.55	0.42	0.367
18	0.49	0.495	0.534	0.5063	0.0241	4.76	0.61	0.403
19	0.615	0.619	0.593	0.609	0.014	2.3	0.669	0.549
19	0.113	0.113	0.113	0.113	0	0	0.113	0.113
20	0.19	0.19	0.188	0.1893	0.00115	0.61	0.194	0.184
21	0.277	0.276	0.266	0.273	0.00608	2.23	0.299	0.247
22	0.293	0.293	0.302	0.296	0.0052	1.76	0.318	0.274
22	0.066	0.066	0.066	0.066	0	0	0.066	0.066
23	0.119	0.114	0.124	0.119	0.005	4.2	0.141	0.0975
24	0.205	0.206	0.214	0.2083	0.00493	2.37	0.23	0.187
25	0.313	0.312	0.309	0.3113	0.00208	0.669	0.32	0.302
26	0.356	0.357	0.361	0.358	0.00265	0.739	0.369	0.347
27	0.555	0.519	0.534	0.536	0.0181	3.37	0.614	0.458
29	0.57	0.59	0.58	0.58	0.01	1.72	0.623	0.537

Tabela A6. Análise estatística da análise bioquímica presentes na **figura 19**: carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas no 7º dia (Ciclo I), 19º dia (Ciclo II) e 29º dia (Ciclo III).

Ciclo I, Ciclo II e Ciclo III de CCDE [S.maxima] Carboidrato(%) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 Carboidrato(%)	Observed#2 Carboidrato(%)	Average Carboidrato(%)	Std.Deviation Carboidrato(%)	Std.Deviation %Carboidrato(%)	Upper 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)	Lower 95%Cfd.Limit Carboidrato(%)
7	7.2	7.2	7.2	0	0	7.2	7.2
19	8.6	8.8	8.7	0.141	1.63	10.5	6.9
29	7.5	7.5	7.5	0	0	7.5	7.5

Tempo (Dia)	Observed#1 Proteína(%)	Observed#2 Proteína(%)	Average Proteína(%)	Std.Deviation Proteína(%)	Std.Deviation %Proteína(%)	Upper 95%Cfd.Limit Proteína(%)	Lower 95%Cfd.Limit Proteína(%)
7	77.3	77.3	77.3	0	0	77.3	77.3
19	74.3	74.3	74.3	0	0	74.3	74.3
29	76.8	76.8	76.8	0	0	76.8	76.8

Tempo (Dia)	Observed#1 Lipídio(%)	Observed#2 Lipídio(%)	Average Lipídio(%)	Std.Deviation Lipídio(%)	Std.Deviation %Lipídio(%)	Upper 95%Cfd.Limit Lipídio(%)	Lower 95%Cfd.Limit Lipídio(%)
7	6.1	6.1	6.1	0	0	6.1	6.1
19	7.5	7.6	7.55	0.0707	0.937	8.45	6.65
29	6.1	6.6	6.35	0.354	5.57	10.8	1.86

Tempo (Dia)	Observed#1 Cinza(%)	Observed#2 Cinza(%)	Average Cinza(%)	Std.Deviation Cinza(%)	Std.Deviation %Cinza(%)	Upper 95%Cfd.Limit Cinza(%)	Lower 95%Cfd.Limit Cinza(%)
7	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2
19	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2
29	5.2	5.2	5.2	0	0	5.2	5.2

Tabela A7. Análise estatística das curvas presentes na **figura 20a**: CCDE com injeção fracionada de vinhaça, CCDE com injeção única de vinhaça, CCDE em água destilada com injeção fracionada de vinhaça e cultivo autotrófico sem injeção vinhaça, respectivamente.

CCDE com injeção devagar de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.062	0.061	0.063	0.062	0.001	1.61	0.0663	0.0577
1	0.191	0.204	0.18	0.1917	0.012	6.27	0.243	0.14
2	0.287	0.245	0.209	0.247	0.039	15.8	0.415	0.079
3	0.297	0.306	0.297	0.3	0.0052	1.73	0.322	0.278
4	0.348	0.338	0.301	0.329	0.0248	7.53	0.436	0.222
5	0.403	0.417	0.393	0.4043	0.0121	2.98	0.456	0.352
7	0.453	0.517	0.517	0.4957	0.037	7.45	0.655	0.337

CCDE com injeção rápida de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.056	0.056	0.056	0.056	0	0	0.056	0.056
1	0.171	0.172	0.174	0.1723	0.00153	0.886	0.179	0.166
2	0.225	0.231	0.231	0.229	0.00346	1.51	0.244	0.214
3	0.335	0.334	0.333	0.334	0.001	0.299	0.338	0.33
4	0.415	0.42	0.405	0.4133	0.00764	1.85	0.446	0.38
5	0.469	0.485	0.48	0.478	0.00819	1.71	0.513	0.443
7	0.641	0.646	0.639	0.642	0.00361	0.562	0.658	0.626

CCDE em água destilada com injeção devagar de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.056	0.056	0.056	0.056	0	0	0.056	0.056
1	0.167	0.17	0.167	0.168	0.00173	1.03	0.175	0.161
2	0.184	0.192	0.197	0.191	0.00656	3.43	0.219	0.163
3	0.205	0.216	0.216	0.2123	0.00635	2.99	0.24	0.185
4	0.268	0.272	0.272	0.2707	0.00231	0.853	0.281	0.261
5	0.295	0.293	0.298	0.2953	0.00252	0.852	0.306	0.285
6	0.292	0.291	0.3	0.2943	0.00493	1.68	0.316	0.273
7	0.344	0.352	0.352	0.3493	0.00462	1.32	0.369	0.329

Cultivo autotrófico sem injeção de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.057	0.057	0.057	0.057	0	0	0.057	0.057
1	0.1	0.095	0.1	0.09833	0.00289	2.94	0.111	0.0859
2	0.126	0.134	0.134	0.1313	0.00462	3.52	0.151	0.111
3	0.17	0.17	0.163	0.1677	0.00404	2.41	0.185	0.15
4	0.194	0.198	0.192	0.1947	0.00306	1.57	0.208	0.182
5	0.233	0.232	0.235	0.2333	0.00153	0.655	0.24	0.227
6	0.283	0.278	0.293	0.2847	0.00764	2.68	0.318	0.252
7	0.33	0.33	0.304	0.3213	0.015	4.67	0.386	0.257

Tabela A8. Análise estatística das curvas presentes na **figura 21a**: injeção de CO_2 durante a fase clara do fotoperíodo, injeção contínua de CO_2 e cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2, respectivamente.

Injeção de CO2 durante a fase clara do fotoperiodo [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.053	0.053	0.053	0.053	0	0	0.053	0.053
1	0.098	0.097	0.097	0.09733	0.000577	0.593	0.0998	0.0948
2	0.128	0.126	0.128	0.1273	0.00115	0.907	0.132	0.122
3	0.167	0.17	0.172	0.1697	0.00252	1.48	0.18	0.159
4	0.198	0.194	0.198	0.1967	0.00231	1.17	0.207	0.187
7	0.334	0.321	0.339	0.3313	0.00929	2.8	0.371	0.291

Injeção contínua de CO2 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.058	0.058	0.058	0.058	0	0	0.058	0.058
1	0.102	0.108	0.096	0.102	0.006	5.88	0.128	0.0762
2	0.13	0.14	0.137	0.1357	0.00513	3.78	0.158	0.114
3	0.196	0.186	0.179	0.187	0.00854	4.57	0.224	0.15
4	0.276	0.249	0.241	0.2553	0.0183	7.18	0.334	0.176
7	0.536	0.508	0.506	0.5167	0.0168	3.25	0.589	0.444

Cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO2 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.053	0.053	0.053	0.053	0	0	0.053	0.053
1	0.089	0.097	0.094	0.09333	0.00404	4.33	0.111	0.0759
2	0.12	0.121	0.121	0.1207	0.000577	0.478	0.123	0.118
3	0.175	0.171	0.171	0.1723	0.00231	1.34	0.182	0.162
4	0.208	0.216	0.217	0.2137	0.00493	2.31	0.235	0.192
7	0.324	0.319	0.33	0.3243	0.00551	1.7	0.348	0.301

Tabela A9. Análise estatística das curvas presentes na **figura 22a**: injeção contínua de CO_2 e cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO_2, respectivamente.

Injeção contínua de CO2 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.45	0.45	0.45	0.45	0	0	0.45	0.45
1	0.637	0.634	0.578	0.6163	0.0332	5.39	0.759	0.473
2	0.683	0.702	0.727	0.704	0.0221	3.13	0.799	0.609
3	0.803	0.749	0.761	0.771	0.0284	3.68	0.893	0.649
4	0.819	0.857	0.851	0.8423	0.0204	2.43	0.93	0.754
5	0.906	0.794	0.804	0.8347	0.062	7.43	1.1	0.568
6	0.731	0.881	0.88	0.8307	0.0863	10.4	1.2	0.459
7	0.857	0.857	0.857	0.857	1.36e-016	1.59e-014	0.857	0.857

Cultivo autotrófico aerado com ar atmosférico sem enriquecimento de CO2 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.457	0.463	0.457	0.459	0.00346	0.755	0.474	0.444
1	0.485	0.506	0.485	0.492	0.0121	2.46	0.544	0.44
2	0.531	0.531	0.521	0.5277	0.00577	1.09	0.553	0.503
3	0.554	0.588	0.58	0.574	0.0178	3.1	0.65	0.498
4	0.586	0.591	0.591	0.5893	0.00289	0.49	0.602	0.577
7	0.63	0.631	0.628	0.6297	0.00153	0.243	0.636	0.623

Tabela A10. Análise estatística das curvas presentes na **figura 23a**: cultivo autotrófico em meio de cultura reduzido em 50% de $NaHCO_3$, cultivo autotrófico em meio sem redução e CCDE com injeção fracionada de vinhaça a 3% em meio reduzido em 50% de $NaHCO_3$, respectivamente.

Cultivo autotrófico em meio reduzido de NaHCO3 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.059	0.056	0.059	0.058	0.00173	2.99	0.0655	0.0505
1	0.107	0.108	0.101	0.1053	0.00379	3.59	0.122	0.089
2	0.141	0.148	0.155	0.148	0.007	4.73	0.178	0.118
4	0.331	0.337	0.335	0.3343	0.00306	0.914	0.347	0.321
5	0.38	0.352	0.335	0.3557	0.0227	6.39	0.453	0.258
7	0.539	0.531	0.536	0.5353	0.00404	0.755	0.553	0.518

Cultivo autotrófico em meio sem redução de NaHCO3 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.053	0.053	0.053	0.053	0	0	0.053	0.053
1	0.089	0.097	0.094	0.09333	0.00404	4.33	0.111	0.0759
2	0.12	0.121	0.121	0.1207	0.000577	0.478	0.123	0.118
3	0.175	0.171	0.171	0.1723	0.00231	1.34	0.182	0.162
4	0.208	0.216	0.217	0.2137	0.00493	2.31	0.235	0.192
7	0.324	0.319	0.33	0.3243	0.00551	1.7	0.348	0.301

CCDE em meio reduzido de NaHCO3 com injeção devagar de vinhoto [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.064	0.064	0.064	0.064	0	0	0.064	0.064
2	0.273	0.268	0.283	0.2747	0.00764	2.78	0.308	0.242
3	0.373	0.377	0.387	0.379	0.00721	1.9	0.41	0.348
4	0.54	0.538	0.547	0.5417	0.00473	0.872	0.562	0.521
5	0.314	0.314	0.333	0.3203	0.011	3.42	0.368	0.273
7	0.659	0.652	0.648	0.653	0.00557	0.853	0.677	0.629

Tabela A11. Análise estatística da curva presente na **figura 24a**.

CCDE em meio reduzido de NaHCO3 com injeção devagar de vinhoto e influxo continuo de CO2 [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.062	0.062	0.062	0.062	0	0	0.062	0.062
2	0.225	0.219	0.229	0.2243	0.00503	2.24	0.246	0.203
3	0.345	0.349	0.349	0.3477	0.00231	0.664	0.358	0.338
4	0.376	0.355	0.356	0.3623	0.0118	3.27	0.413	0.311
5	0.309	0.307	0.312	0.3093	0.00252	0.814	0.32	0.299
6	0.266	0.235	0.233	0.2447	0.0185	7.56	0.324	0.165
7	0.277	0.264	0.266	0.269	0.007	2.6	0.299	0.239

Tabela A12. Análise estatística das curvas presentes na **figura 30**: cultivo iluminado por radiação solar em período matutino, cultivo iluminado por radiação solar em período matutino e vespertino e cultivo iluminado por luz artificial.

Cultivo iluminado por radiação solar em período matutino [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.044	0.044	0.044	0	0	0.044	0.044
1	0.091	0.09	0.0905	0.000707	0.781	0.0995	0.0815
2	0.122	0.122	0.122	0	0	0.122	0.122
3	0.151	0.145	0.148	0.00424	2.87	0.202	0.0941
4	0.196	0.196	0.196	0	0	0.196	0.196
5	0.24	0.24	0.24	0	0	0.24	0.24
6	0.327	0.327	0.327	0	0	0.327	0.327
7	0.3	0.33	0.315	0.0212	6.73	0.585	0.0455

Cultivo iluminado por radiação solar em período matutino e vespertino [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 12.7062]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.05	0.062	0.056	0.00849	15.2	0.164	-0.0518
1	0.09	0.169	0.1295	0.0559	43.1	0.839	-0.58
2	0.127	0.127	0.127	0	0	0.127	0.127
3	0.02	0.04	0.03	0.0141	47.1	0.21	-0.15
7	0.007	0.007	0.007	0	0	0.007	0.007

Cultivo iluminado por luz artificial [S.maxima] [Celular](g/L) vs Tempo(Dia)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

Tempo (Dia)	Observed#1 [Celular](g/L)	Observed#2 [Celular](g/L)	Observed#3 [Celular](g/L)	Average [Celular](g/L)	Std.Deviation [Celular](g/L)	Std.Deviation %[Celular](g/L)	Upper 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)	Lower 95%Cfd.Limit [Celular](g/L)
0	0.057	0.057	0.057	0.057	0	0	0.057	0.057
1	0.1	0.095	0.1	0.09833	0.00289	2.94	0.111	0.0859
2	0.126	0.134	0.134	0.1313	0.00462	3.52	0.151	0.111
3	0.17	0.17	0.163	0.1677	0.00404	2.41	0.185	0.15
4	0.194	0.198	0.192	0.1947	0.00306	1.57	0.208	0.182
5	0.233	0.232	0.235	0.2333	0.00153	0.655	0.24	0.227
6	0.283	0.278	0.293	0.2847	0.00764	2.68	0.318	0.252
7	0.33	0.33	0.304	0.3213	0.015	4.67	0.386	0.257

Tabela A13. Análise estatística da separação sólido-líquido presente na **figura 32a**: incubação por 90 min, 120 min, 150 min com NaOH a 1 M, 2 M, 3M, 4M e 5M.

Incubação por 90 min [Separação de S.maxima durante fase estacionária] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	13.8	17.7	15.73	1.95	12.4	24.1	7.34
2	16.3	16.9	16.6	0.3	1.81	17.9	15.3
3	11.5	12.8	12.13	0.651	5.36	14.9	9.33
4	25.4	29.2	26.1	2.82	10.8	38.2	14
5	45.9	53.7	49.8	3.9	7.83	66.6	33

Incubação por 120 min [Separação de S.maxima durante fase estacionária] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	35.8	42.5	39.13	3.35	8.56	53.5	24.7
2	22.6	21.4	22	0.6	2.73	24.6	19.4
3	34.3	34.4	34.37	0.0577	0.168	34.6	34.1
4	52.5	46.3	47.73	4.24	8.87	66	29.5
5	67	51.3	59.13	7.85	13.3	92.9	25.4

Incubaçao por 150 min [Separação de S.maxima durante fase estacionária] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	33.6	29.6	31.6	2	6.33	40.2	23
2	27.2	27.9	27.57	0.351	1.27	29.1	26.1
3	23.3	24.7	24	0.7	2.92	27	21
4	49.5	51.1	50.3	0.8	1.59	53.7	46.9
5	80.7	80.7	80.7	0	0	80.7	80.7

Tabela A14. Análise estatística da separação sólido-líquido presente na **figura 33**: incubação por 90 min, 120 min, 150 min com NaOH a 1 M, 2 M, 3M, 4M e 5M.

Incubação por 90 min [Separação de S.maxima durante fase exponencial] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	32.5	30.6	31.57	0.95	3.01	35.7	27.5
2	34.2	32.7	33.47	0.751	2.24	36.7	30.2
3	24.8	24.8	24.8	0	0	24.8	24.8
4	31.3	42.2	35.73	5.73	16	60.4	11.1
5	84.9	90.5	87.7	2.8	3.19	99.7	75.7

Incubação por 120 min [Separação de S.maxima durante fase exponencial] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	28.9	33.8	31.33	2.45	7.82	41.9	20.8
2	35.5	36.8	36.1	0.656	1.82	38.9	33.3
3	24.8	20.3	22.57	2.25	9.97	32.2	12.9
4	38.3	40.3	39.3	1	2.54	43.6	35
5	88.4	95.9	92.17	3.75	4.07	108	76

Incubaçao por 150 min [Separação de S.maxima durante fase exponencial] Eficiência(%) vs [NaOH](M)
[with 95% Probability Confidence Limits, t(0.975) = 4.3027]

[NaOH] (M)	Observed#1 Eficiência(%)	Observed#2 Eficiência(%)	Average Eficiência(%)	Std.Deviation Eficiência(%)	Std.Deviation %Eficiência(%)	Upper 95%Cfd.Limit Eficiência(%)	Lower 95%Cfd.Limit Eficiência(%)
1	34.4	34.4	34.4	0	0	34.4	34.4
2	34.9	28.6	31.77	3.15	9.92	45.3	18.2
3	24.1	15	19.57	4.55	23.3	39.1	-0.0108
4	48.8	48.2	48.5	0.3	0.619	49.8	47.2
5	96.9	97.2	97.17	0.252	0.259	98.2	96.1

PUBLICAÇÕES NO TEMA

Bioresource Technology 204 (2016) 38–48

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse

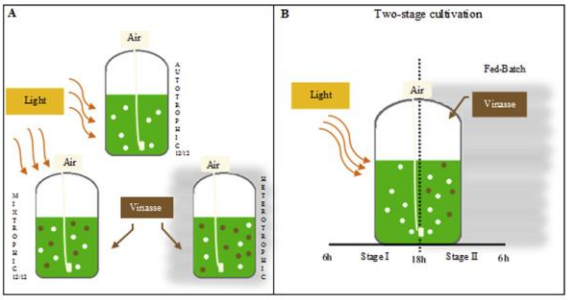
Raquel Rezende dos Santos [a,*], Ofélia de Queiroz Fernandes Araújo [a], José Luiz de Medeiros [a], Ricardo Moreira Chaloub [b]

[a] *Escola de Química, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, 2030, Centro de Tecnologia, Bl. E, Sala 201, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil*
[b] *Instituto de Química, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149, Centro de Tecnologia, Bl. A Sala 532, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil*

HIGHLIGHTS

- Microalgae is a potential alternative for biologic treatment of sugarcane vinasse.
- Sugarcane vinasse is an organic carbon source for *Spirulina maxima*.
- *Spirulina maxima* grow under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions.
- Cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic strategy increases biomass productivity.
- Protein content in *Spirulina maxima* is appropriate for human and animal nutrition.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 November 2015
Received in revised form 24 December 2015
Accepted 26 December 2015
Available online 4 January 2016

Keywords:
Microalgae cultivation
Spirulina maxima
Sugarcane vinasse
Cyclic two-stage cultivation
Biochemical composition

ABSTRACT

The feasibility of sugarcane vinasse as supplement in growth medium of *Spirulina maxima* was investigated. The cell was cultivated under autotrophic (no vinasse, 70 μmol photons m^{-2} s^{-1}), heterotrophic (no light, culture medium supplemented with vinasse at 0.1% v/v and 1.0% v/v) and mixotrophic conditions (70 μmol photons m^{-2} s^{-1}, vinasse at 0.1% v/v and 1.0% v/v). These preliminary results suggested a cyclic two-stage cultivation – CTSC, with autotrophic condition during light phase of the photoperiod (12 h, 70–200 μmol photons m^{-2} s^{-1}) and heterotrophic condition during dark phase (12 h, 3.0% v/v vinasse). The adopted CTSC strategy consisted in three cycles with 75% withdrawal of suspension and reposition of medium containing 3.0% v/v vinasse, separated by autotrophic rest periods of few days between cycles. Results show an increase of biomass concentration between 0.495 g L^{-1} and 0.609 g L^{-1} at the 7th day of each cycle and high protein content (between 74.3% and 77.3% w/w).
© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae are prokaryotic or eukaryotic microorganisms carrying out oxygenic photosynthesis found in both freshwater and marine environments, with a great potential for biotechnological applications (Stengel et al., 2011). Biofixation of CO_2 by microalgae potentially combines the steps of CO_2 capture from flue gases (replacing gas scrubbing technologies) and CO_2 utilization (through adequate biomass processing technologies), building a promising road for mitigation of greenhouse gas emissions. According to Chisti (2007), 1 kg of dry microalgae biomass utilizes about 1.83 kg of CO_2. Besides their high growth rates, they produce and accumulate biomaterials of commercial interest as pharmaceutical and nutraceutical products (Spolaore et al., 2006; Borowitzka, 2013) as well as renewable raw material for fuels

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3938 7535.
E-mail address: raquel.c.rezende@gmail.com (R.R. dos Santos).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.077
0960-8524/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Biomass and Bioenergy 92 (2016) 55–60

Contents lists available at ScienceDirect

Biomass and Bioenergy

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/biombioe

Research paper

Assessment of triacylglycerol content in *Chlorella vulgaris* cultivated in a two-stage process

Raquel Rezende dos Santos [a, *], Claudete Norie Kunigami [b], Donato Alexandre Gomes Aranda [c], Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira [a]

[a] *Laboratório de Biotecnologia de Microalgas, Divisão de Energia, Instituto Nacional de Tecnologia, CEP: 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*
[b] *Laboratório de Análise Orgânica Instrumental, Divisão de Química Analítica, Instituto Nacional de Tecnologia, CEP: 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*
[c] *Laboratório de Tecnologia Verde, Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 20 July 2015
Received in revised form
22 January 2016
Accepted 13 May 2016
Available online 18 June 2016

Keywords:
Chlorella vulgaris
Biomass productivity
Nitrogen starvation
Triacylglycerol (TAG) content
Two-stage process

A B S T R A C T

Chlorella vulgaris cultivation in two-stage process was applied to increase the lipid productivity without compromising the biomass productivity. At the first stage, microalgae was cultivated under nutrient sufficient conditions to obtain a maximized cell density; at the second stage, nitrate conditions are changed to trigger the accumulation of TAG. During first stage, the maximum biomass productivity (32 mg L^{-1} d^{-1}) was observed after 13 days under nutrient sufficient conditions with 1.21 g L^{-1} $NaNO_3$ and 0.00449 g L^{-1} K_2HPO_4. Maximum lipid content (25.4% DW), lipid productivity (7.5 mg L^{-1} d^{-1}) and TAG content (41.3% in total lipids) were favored by the nitrogen starvation conditions for more 4 days, at the second stage. Oil extracted at the second stage contained lower percentage of PUFAs being more suitable for the biodiesel production when compared with the oil extracted at the first stage. This two-stage phototrophic process is promising to provide a more efficient way for on a large-scale production of algal biomass and biodiesel production.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae are prokaryotic or eukaryotic photosynthetic microorganisms that grow at an exceptional fast rate in open oceans, rocky shores, and freshwater habitats including rivers, lakes, ditches and ponds [1]. Microalgae biodiversity is enormous and represents an almost untapped resource [2]. This biodiversity permits the use of microalgae in biotechnology applications as pharmaceutical and nutraceutical products as well as raw material for biofuels production [1].

Microalgae lipids have attracted attention as future raw materials for biodiesel synthesis, among other factors, due to the microalgae potential of attaining higher lipid productivity in relation to the oilseed crops and modulation of the biochemical composition of the microalgae biomass by varying growth conditions [3]. Accordingly, the choice of the most appropriate condition for the microalgae cultivation is of paramount importance to the viability of the process.

Usually, biochemical composition of microalgae in exponential phase and growth in batch respects to the following order: protein > carbohydrate = lipid > nucleic acid. However, under conditions of nutritional stress and aging culture, this ratio can change with the increase of lipids and decrease of the protein concentration [4].

Being the nitrogen essential for the synthesis of amino acids, limiting conditions of this nutrient makes it impossible to the synthesis of other proteins involved in the cell division. When cells are no longer able to divide, lipids are synthesized and stored within cells as an energy source [5]. For this reason, it is easy to realize that the amount of nitrogen is an important intracellular factor involved in lipid biosynthesis. On one side nitrogen starvation favors biosynthesis of intracellular lipids in cells already developed, on the other, it can affect the cell growth of new cells. In this sense, increasing the lipid content and getting biomass simultaneously become a challenge for researchers.

A two-stage process strategy can be an option for enhancing lipid productivity [6]. In order to increase the biomass productivity,

* Corresponding author.
E-mail addresses: raquel.c.rezende@gmail.com (R.R. dos Santos), claudete.kunigami@int.gov.br (C.N. Kunigami), donato@eq.ufrj.br (D.A. Gomes Aranda), claudia.teixeira@int.gov.br (C.M. Luz Lapa Teixeira).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.014
0961-9534/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Ultrasonics Sonochemistry 22 (2015) 95–99

Contents lists available at ScienceDirect

Ultrasonics Sonochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ultson

Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass

Raquel Rezende dos Santos [a,*], Daniel Mendonça Moreira [a], Claudete Norie Kunigami [b], Donato Alexandre Gomes Aranda [c], Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira [a]

[a] *Laboratório de Biotecnologia de Microalgas, Divisão de Energia, Instituto Nacional de Tecnologia, CEP: 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*
[b] *Laboratório de Análise Orgânica Instrumental, Divisão de Química Analítica, Instituto Nacional de Tecnologia, CEP: 20081-312, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*
[c] *Laboratório de Tecnologia Verde, Departamento de Engenharia Química, Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP: 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 August 2013
Received in revised form 2 April 2014
Accepted 19 May 2014
Available online 28 May 2014

Keywords:
Microalgae
Biodiesel
Lipid extraction
Potter homogenizer
Solvent
Ultrasound

ABSTRACT

The use of lipids obtained from microalgae biomass has been described as a promising alternative for production of biodiesel to replace petro-diesel. It involves steps such as the cultivation of microalgae, biomass harvesting, extraction and transesterification of lipids. The purpose of the present study was to compare different methods of extracting total lipids. These methods were tested in biomass of *Chlorella vulgaris* with the solvents ethanol, hexane and a mixture of chloroform:methanol in ratios 1:2 and 2:1. The solvents were associated with other mechanisms of cell disruption such as use of a Potter homogenizer and ultrasound treatment. The percentage of triglycerides in the total lipids was determinated by the glycerol-3-phosphate oxidase-p-chlorophenol method (triglycerides monoreagent K117; Bioclin). Among the tested methods, the mixture of chloroform:methanol (2:1) assisted by ultrasound was most efficient, extracting an average of 19% of total lipids, of which 55% were triglycerides. The gas chromatographic analysis did not show differences in methyl ester profiles of oils extracted under the different methods.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Given the current technological process and increased exploitation of new unconventional reserves (i.e., natural gas), it is probable that fossil fuels will continue to be available for a considerable period of time, although there may be variations in the supply and in the cost arising from geopolitical developments over time [1].

The steadily growing costs of petroleum, a desire for energy security in countries with limited petroleum resources and the inevitable depletion of fossil fuels are common concerns that have increased worldwide interest in biofuels [2]. In addition to these concerns, burning fossil fuels causes numerous environmental problems, including greenhouse gas (GHG) effects, which significantly contribute to global warming [3].

Microalgae are prokaryotic or eukaryotic photosynthetic microorganisms that can grow rapidly and live in harsh conditions due to their simple cellular structure [4]. Known as one of the oldest life forms on the Earth, these microorganisms have a diversity of forms and ecological functions [5]. This diversity creates the capability for microalgae to be a valuable source in a multitude of products, such as value-added products for pharmaceutical purposes, food crops for human or animal consumption and as energy sources [4].

Microalgae biomass is considered a promising feedstock for producing a variety of renewable fuels, such as biodiesel, bioethanol, biohydrogen and methane [6,7]. Microalgae lipids have attracted attention as future raw materials for biodiesel synthesis, among others, because (1) microalgae have potential to attain higher lipid productivity in relation to oilseed crops [8]; (2) the biochemical composition of the microalgae biomass can be modulated by varying growth conditions, so the oil yield can be significantly increased [9]; (3) the microalgae biomass production can result in biofixation of waste CO_2 (1 kg of dry microalgae biomass utilizes about 1.83 kg of CO_2) [10]; (4) microalgae can be cultivated in brackish water or on non-arable land [11]; (5) the microalgae cultivation does not require application of herbicides or pesticides [12].

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2123 1262.
E-mail addresses: raquel.c.rezende@gmail.com (R.R. dos Santos), dm-moreira@hotmail.com (D.M. Moreira), claudete.kunigami@int.gov.br (C.N. Kunigami), donato@eq.ufrj.br (D.A.G. Aranda), claudia.teixeira@int.gov.br (Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.015
1350-4177/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.