



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

**PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR *Aphanothece microscopica* Nägeli A
PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

DAYANE VANESSA MORAIS

Araras

2018



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

**PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR *Aphanothece microscopica* Nägeli A
PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

DAYANE VANESSA MORAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

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

Araras

2018

Morais, Dayane Vanessa

PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR *Aphanothece* microscopica
Nägeli A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR / Dayane
Vanessa Moraes. -- 2018.
87 f. : 30 cm.

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

Orientador: Reinaldo Gaspar Bastos

Banca examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos, Sandra Regina Ceccato
Antonini, Monica de Albuquerque Bonini

Bibliografia

1. Microalgas. 2. Cultivo Heterotrófico. 3. Pigmentos. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

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

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Dayane Vanessa Moraes, realizada em 26/02/2018:

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

Profa. Dra. Monica de Albuquerque Bonini
SAEMA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Emílio e Maria, pelo amor incondicional e por sempre priorizarem a minha educação, e aos meus irmãos David e Denilson, pelo apoio durante toda essa jornada.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pela amizade, confiança e orientação desde a época de iniciação científica.

Ao meu noivo, Josh, que sempre se fez presente mesmo a 8000 km de distância.

Às amigas que nasceram no laboratório: Geise, Beatriz, Gabi, Isabely, Felipe, Carol e Tayla; pelas pizzas, pastéis e conversas, além da grande ajuda com alguns experimentos.

À Juanita, uma grande amiga que permaneceu mesmo estando longe, e esteve presente em momentos muito importantes da minha vida.

À banca de qualificação e defesa que sugeriu mudanças importantes para a conclusão deste trabalho: Prof^a. Dr^a. Sandra R. C. Antonini, Prof. Dr. André Belluco e Dr^a Ligianne Din Shirahigue e Dr^a. Mônica de Albuquerque Bonini.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSCar) e ao Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar) pela formação profissional e oportunidade de executar os experimentos.

SUMÁRIO

Página

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Corantes naturais e artificiais.....	4
3.2 Biopigmentos produzidos por micro-organismos	6
3.3 Microalgas	9
3.4 <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	11
3.5 Ficocianina.....	13
3.6 Vinhaça.....	14
3.7 Cultivo de microalgas em efluentes industriais	17
3.8 Processamento da biomassa de microalgas e extração de ficocianina	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Inóculo	21
4.2 Preparo do meio de cultivo e manutenção das cepas	21
4.3 Vinhaça.....	22
4.4 Ensaios.....	23
4.4.1 Cultivos mixotróficos	23
4.4.1.1 Influência da suplementação do meio com nitrogênio e vinhaça na produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	23
4.4.1.2 Perfil de produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça	23
4.4.2 Cultivos heterotróficos.....	24
4.4.2.1 Produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça em até 72 horas de cultivo no escuro	24
4.4.2.2 Avaliação da produção de ficocianina por cultivo heterotrófico através de planejamento experimental: efeito do inóculo, pH e salinidade	24
4.5 Avaliação da produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em biorreator de bancada.....	25
4.6 Análises	27
4.6.1 Biomassa	27
4.6.2 Contagem de células em Câmara de Neubauer	27
4.6.3 Extração de ficocianina com solução tampão fosfato 0,2 mol L ⁻¹ pH 6,85	28
4.6.4 Extração de ficocianina através de ciclos de congelamento e descongelamento	28
4.6.5 Extração de ficocianina através de tratamento ultrassônico com pérolas de vidro	28
4.6.6 Extração de ficocianina com HCl 12 mol L ⁻¹	29
4.6.7 Determinação por absorvância e cálculos para a determinação de ficocianina	29

4.7 Cinética de crescimento microbiano e produção de ficocianina	30
4.8 Caracterização da biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	30
4.8.1 Análise de lipídios totais.....	31
4.8.2 Transesterificação.....	32
4.8.3 Perfil lipídico.....	32
4.8.4 Teor de proteínas.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar.....	34
5.2 Cultivos mixotróficos: avaliação da suplementação do meio BG11 e parâmetros cinéticos do cultivo de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli na produção de ficocianina.....	36
5.3 Produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 com vinhaça.....	42
5.4 Efeito do inóculo, pH e salinidade na produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em BG11 com vinhaça.....	46
5.5 Avaliação da produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em biorreator de bancada.....	50
5.6 Comparação de diferentes métodos de extração de ficocianina	55
5.7 Caracterização da biomassa de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	57
6 CONCLUSÕES.....	61
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
8 LITERATURA CITADA	63

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Composição química média da vinhaça de cana-de-açúcar.....	16
Tabela 2 - Composição do meio BG11	22
Tabela 3 - Planejamento experimental com as três variáveis codificadas.	25
Tabela 4 - Valores das variáveis independentes X_1 , X_2 e X_3 utilizadas para o planejamento experimental DCCR.	25
Tabela 5 - Condições avaliadas em biorreator de bancada Allbiom® AllMic SCR0526	
Tabela 6 - Caracterização físico-química da vinhaça usada nos ensaios.....	35
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos dos cultivos mixotróficos de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 suplementado com 2,5 mL de vinhaça. Os parâmetros cinéticos do controle estão representados como cultivo fotoautotrófico.	42
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça ..	45
Tabela 9 - Parâmetros cinéticos dos cultivos heterotróficos em biorreator de bancada de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Suspensão contendo <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli observada em microscópio MOTIC BA 210 TL com aumento de 400x.....	12
Figura 2 - Cultivo heterotrófico de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça no biorreator Allbiom® AllMic SCR05	26
Figura 3 - Perfis de concentração celular de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli após 24 horas de cultivo em meio BG11 suplementado com diferentes concentrações de nitrato de sódio e vinhaça.....	37
Figura 4 - Produção de ficocianina após 24 horas de cultivo em meio BG11 suplementado com diferentes concentrações de nitrato de sódio e vinhaça (O quadro de cores representa 5 ciclos de congelamento e descongelamento, enquanto SCD indica a extração do pigmento.....	38
Figura 5 - Concentração e rendimento de biomassa em ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivado em meio padrão BG11 (controle), e meio padrão suplementado com vinhaça em 72 horas de cultivo.....	40
Figura 6 - Concentração e rendimento de biomassa em ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivado em meio padrão BG11 (controle), e meio padrão suplementado com vinhaça em 72 horas de cultivo.....	43
Figura 7 - Comparação entre os tempos de batelada experimentais (barra preta) e teóricos (barras brancas) na produção de ficocianina por <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em cultivos mixotrófico e heterotrófico	46
Figura 8 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis inóculo, pH e salinidade na produção de ficocianina.....	48
Figura 9 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis inóculo, pH e salinidade no crescimento celular	49
Figura 10 - Evolução do pH e oxigênio durante o cultivo de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ e B) menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$...	51
Figura 11 - Evolução do carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) durante o cultivo de <i>Aphanothece</i> em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ e B) menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$	52
Figura 12 - Evolução da concentração e rendimento de ficocianina durante o cultivo de <i>A. microscopica</i> em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ e B) menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$	54

Figura 13 - Concentrações de ficocianina obtidas sob diferentes métodos de extração.....	56
Figura 14 - Perfil lipídico (percentual em massa) de <i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli cultivada em meio BG11 suplementado com vinhaça.....	60

PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR *Aphanothece microscopica* Nägeli A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autor: DAYANE VANESSA MORAIS

Orientador: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

RESUMO

O cultivo de microalgas apresenta grande diversidade de aplicações. Os pigmentos extraídos de microalgas podem ser amplamente utilizados em várias indústrias, incluindo a alimentícia, farmacêutica e cosmética. As ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos e capturam cerca de 50% da luz necessária para manutenção do metabolismo das cianobactérias. Uma grande vantagem da utilização de microorganismos é que estes podem assimilar fontes de energia de baixo custo, incluindo águas residuárias. Neste contexto, o presente trabalho propôs a avaliação da produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de vinhaça, um efluente produzido em larga escala no Brasil. O cultivo mixotrófico de *A. microscopica* em meio BG11 suplementado com vinhaça apresentou desempenho superior ao cultivo fotoautotrófico em termos de acúmulo de ficocianina, com velocidade específica de produção (μ_P) e produtividade máxima ($Prod_{m\acute{a}x}$) de $9,86 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,0047 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Para o cultivo heterotrófico, a maior produção de ficocianina ocorreu após 6 horas, com μ_P e $Prod_{m\acute{a}x}$ de $22,59 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,0067 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas na produção de ficocianina para amplas faixas de pH, inóculo e salinidade testadas; as condições que obtiveram o melhor e pior desempenho em termos de $\mu_{Pm\acute{a}x}$ foram selecionadas para se avaliar a produção do pigmento em processo escalonado. A condição de melhor desempenho apresentou $\mu_{Pm\acute{a}x}$ de $49,18 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, e a pior, $33,83 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A extração de ficocianina com ácido clorídrico 12 mol L^{-1} mostrou-se até 5,6 vezes mais eficiente do que a sonicação com pérolas de vidro e tampão fosfato. A biomassa de *A. microscopica* apresentou 4,6% de proteínas e 6,38% de lipídios. Os resultados indicam que a vinhaça pode ser utilizada como suplemento para a produção de ficocianina por *A. microscopica*.

Palavras-chave: Cianobactérias. Ficobiliproteínas. Microalgas. Pigmentos. Cultivo heterotrófico.

PHYCOCYANIN PRODUCTION BY *Aphanothece microscopica* Nägeli FROM SUGARCANE VINASSE

Author: DAYANE VANESSA MORAIS

Adviser: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS

ABSTRACT

Microalgae cultivation has a great diversity of applications. Pigments produced by microalgae are largely used in many industries, such as food, pharmaceutical and cosmetics. Phycobiliproteins are photosynthetic pigments that capture around 50% of the light needed to maintain the metabolism of cyanobacteria. A big advantage for the use of microorganisms to produce pigments is that they can assimilate low-cost energy sources, including wastewaters. In this context, the present work proposed to evaluate the production of phycocyanin by *Aphanothece microscopica* Nägeli, through its cultivation in vinasse, an effluent generated abundantly in Brazil. The mixotrophic cultivation of *A. microscopica* in BG11 medium supplemented with vinasse showed superior performance than the photoautotrophic growth, in terms of phycocyanin accumulation, with specific rate of production (μ_P) and maximum productivity ($Prod_{max}$) of $9.86 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ mg}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.0047 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. For the heterotrophic cultivation, the highest phycocyanin production occurred after 6 hours, with μ_P and $Prod_{max}$ of $22.59 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ mg}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $0.0067 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively. No statistically significant difference was found for wide ranges of pH, inoculum and salinity tested. The conditions which had the highest and lowest performance relative to μ_{Pmax} were selected for further experiments on a benchtop bioreactor. The condition with the highest μ_{Pmax} showed maximum productivity of $49.18 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ mg}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, and the lowest, $33.83 \text{ mg}_{\text{phycocyanin}} \text{ mg}_{\text{biomass}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Phycocyanin extraction with hydrochloric acid 12 mol L^{-1} was the most efficient method, yielding up to 5,6 times more phycocyanin than sonication with glass pearls and phosphate buffer extractions. *A. microscopica* biomass contained 4.6% of proteins and 6.38% of lipids. Those results show that vinasse can be used as a supplement for the production of phycocyanin by *A. microscopica*.

Key words: Cyanobacteria. Phycobiliproteins. Microalgae. Pigments. Heterotrophic Cultivation.

1 INTRODUÇÃO

A ficocianina é um pigmento azul encontrado em cianobactérias, rodófitas e criptófitas (MARTELLI et al., 2014). A ficocianina participa do grupo das ficobiliproteínas, e pode ser utilizada como corante alimentício, em cosméticos e produtos farmacêuticos (ERIKSEN, 2008; WU e YANG, 2006; YU et al., 2016). Além disso, é citado o seu potencial para a melhora da imunidade do corpo humano e auxílio na regeneração de células sanguíneas (GLAZER; FANG; BROW, 1973; ILANI e BERNIS, 1971; SEPPÄLÄ et al., 2007; SODE et al., 1991; YU et al., 2016; ZHANG; LIU; LI, 1999).

As microalgas são geralmente classificadas como micro-organismos fotossintéticos, sendo consideradas organismos simples por não serem organizadas em órgãos como as plantas superiores. As cianobactérias (procariotos comumente chamados de algas verde-azuis) e as microalgas eucarióticas (clorofíceas, por exemplo) são potenciais produtoras comerciais de produtos químicos e biocombustíveis (WIJFFELS; KRUSE; HELLINGWERF, 2013). Cianobactérias têm capacidades metabólicas muito versáteis, o que permite que estas cresçam em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (BOTTOMLEY; VAN BAALEN, 1978; EILER, 2006; FENG et al., 2010; YANG; HUA; SHIMIZU, 2002). Uma grande vantagem da utilização de micro-organismos é que estes podem assimilar fontes de energia de baixo custo, incluindo águas residuárias. A reciclagem de nutrientes presentes nos efluentes industriais não somente beneficia o meio ambiente, reduzindo a poluição, mas também funciona como uma potencial fonte de carbono e energia para a produção de biomassa a um custo reduzido (LEE e KIM, 2001; RAJOKA et al., 2006; SILVA, 2008).

A vinhaça é uma água residuária de pH entre 3,5 – 5, cor escura, com alta carga orgânica (demanda química de oxigênio entre 50 - 150 g L⁻¹) e odor desagradável (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011;

WALISZEWSKI; ROMERO; PARDIO, 1997). De uma maneira geral, para cada litro de etanol produzido podem ser gerados de 10 a 15 L de vinhaça, dependendo das condições de fermentação e destilação (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; CORTEZ; MAGALHÃES; HAPPI, 1992).

A vinhaça pode ser considerada um meio líquido nutriente devido à sua composição química, sendo passível de utilização como meio de cultivo para microorganismos de interesse industrial, possibilitando a reciclagem e incorporação de nutrientes e macromoléculas presentes neste efluente. Desta forma, a proposta deste trabalho apresenta um caráter regional destacado por utilizar um abundante subproduto do setor sucroalcooleiro, tradicionalmente presente na cidade de Araras/SP onde está localizado o Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSCar.

A literatura é escassa no que diz respeito à produção de pigmentos microalgais por processos heterotróficos. Assim, o desenvolvimento de um processo inovador que utilize efluentes industriais para crescimento de microalgas poderia levar a obtenção de produtos biotecnológicos de alto valor agregado, como os biopigmentos, representando uma valorização ainda maior da vinhaça. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo a avaliação do crescimento e a produção de ficocianina pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de meios contendo vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas mixotróficos e heterotróficos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de meio BG11 contendo adição de vinhaça de cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento e produção de ficocianina por *A. microscopica* em meio padrão BG11 com adição de nitrato de sódio e vinhaça;
- Avaliar a produção de ficocianina em cultivos mixotróficos e heterotróficos;
- Estudar o efeito da salinidade, pH e inóculo na produção de ficocianina;
- Avaliar a produção de ficocianina em biorreator de bancada, além do monitoramento do pH, oxigênio e consumo de carbono e nitrogênio da vinhaça;
- Caracterizar a biomassa gerada em termos de lipídios, ácidos graxos e proteínas;
- Comparar diferentes métodos de extração de ficocianina da biomassa gerada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Corantes naturais e artificiais

A cor de um produto alimentício é um atributo sensorial muito importante e que muitas vezes influencia no seu sucesso de mercado, visto que o consumidor frequentemente usa essa característica como indicadora para uma variedade de atributos, como sabor, valor nutricional, segurança, entre outros (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017).

O público consumidor cada vez mais opta por produtos mais ecológicos e seguros para a saúde humana e do meio ambiente. Com isso, recursos biológicos vêm ganhando popularidade em diferentes esferas de nossas vidas (SHAHID, ISLAM e MOHAMMAD, 2013). Corantes naturais obtidos de plantas, insetos e micro-organismos são renováveis e mais sustentáveis, com menor impacto ambiental, e são utilizados desde a antiguidade para a coloração de materiais têxteis (KADOLPH, 2008; SHAHID, ISLAM e MOHAMMAD, 2013), alimentos (DWECK, 2002, SHAHID, ISLAM e MOHAMMAD, 2013) e cosméticos (FRICK, 2003; SHAHID, ISLAM e MOHAMMAD, 2013).

Segundo o Decreto 50.040 de 24 de janeiro de 1961, consideram-se aditivos para alimentos as substâncias ou misturas de substâncias, dotadas ou não de poder alimentício, adicionadas aos alimentos com a finalidade de lhes conferir ou intensificar o aroma, a cor, o sabor ou modificar seu aspecto físico geral, ou ainda prevenir alterações indesejáveis (BRASIL, 2017). Apesar de, em termos químicos,

substâncias solúveis serem chamadas de corantes e as insolúveis de pigmentos, no contexto biológico as substâncias são chamadas de pigmentos independentemente de sua solubilidade. Embora o termo “biopigmento” seja um tanto quanto redundante, ele é utilizado para designar pigmentos de origem natural (CARVALHO et al., 2014). Muitos corantes sintéticos foram banidos ou vêm sendo estudados devido à sua alergenicidade, carcinogênese e outros problemas tóxicos (REYES; VALIM; VERSECI, 1996; TULI et al., 2014).

Condições externas como luz, ar, temperatura, umidade e armazenamento têm papel fundamental na perda de cor dos alimentos (CEJUDO-BASTANTE et al., 2014; MARTINS et al., 2016; SAGDIC et al., 2013; TÜRKER e ERDOGDU, 2006). Deste modo, os corantes alimentícios são utilizados principalmente para compensar esses fatores, assim como homogeneizar a cor dos alimentos através de correções ou do realce das cores naturais dos produtos, e até mesmo proporcionando cor a alimentos incolores (MARTINS et al., 2016).

A Resolução CNNPA 44 de 1997 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta o uso de três corantes orgânicos sintéticos artificiais de cor azul: o azul brilhante FCF, o azul de idantreno RS e a indigotina. A indigotina não apresenta estabilidade satisfatória para ser adicionada em bebidas, sendo então utilizado o corante azul brilhante FCF para este fim (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014). A cor azul não é incomum na natureza, mas é extremamente difícil replicá-la em alimentos e bebidas. Tons azuis podem ser produzidos por algumas antocianinas, mas somente na faixa de pH 5 - 7, tornando-se rosa ou violeta em produtos ácidos (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014). O tom azul também pode ser alcançado com a adição de ficocianina, que foi recentemente aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration), na forma de extrato de *Spirulina* como corante de doces e gomas de mascar (FDA, 2013; NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

Quimicamente, os corantes são classificados como solúveis e insolúveis. Os corantes solúveis são subdivididos em naturais, semissintéticos e sintéticos. Os corantes naturais são aqueles obtidos de várias fontes naturais, incluindo, por exemplo, as riboflavinas, clorofilas, carotenos, betalaínas e antocianinas. Os corantes sintéticos, por sua vez, são produzidos por síntese química e não podem ser encontrados naturalmente. Os corantes sintéticos consistem de grupos como azocorantes, xantinas e antraquinonas (AMCHOVA; KOTOLOVA;

RUDAKUCEROVA, 2015). Os corantes semissintéticos são baseados em corantes naturais. Os corantes insolúveis são chamados de pigmentos. Os pigmentos podem ser inorgânicos, com variedade limitada de cores disponíveis, como por exemplo, o dióxido de titânio, carbonato de cálcio, óxido de ferro vermelho e carbono adsorvente preto. Os pigmentos orgânicos estão usualmente na forma de vernizes que são sais complexos insolúveis de azocorantes solúveis em água, em uma grande variedade de cores (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDAKUCEROVA, 2015; GOLKA et al., 2004; MOLLER e WALLIN, 2000).

Uma grande limitação dos biopigmentos é o fato de que estes são geralmente mais suscetíveis a ataques químicos do que os corantes sintéticos (ABEROUMAND, 2011; CARVALHO et al., 2014). Porém, este fato pode também ser uma característica desejada pelo consumidor, visto que isso indica que estas moléculas são comumente degradadas pelo nosso organismo. Muitos biopigmentos são facilmente oxidados (como os carotenóides), hidrolisados (ficobilinas) ou excretados devido à sua alta solubilidade em água (riboflavinas) (CARVALHO et al., 2014).

O emprego de corantes naturais é uma tendência atual do mercado devido à preocupação do consumidor sobre a segurança dos corantes artificiais, o que é reforçado pelos possíveis benefícios para a saúde conferidos pelos pigmentos naturais. A substituição dos corantes sintéticos pelos naturais é desafiadora, visto que os pigmentos naturais são geralmente menos estáveis e mais caros, além de maior quantidade ser necessária para alcançar as mesmas tonalidades dos pigmentos sintéticos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

O mercado global de corantes alimentícios naturais estava estimado em \$1,144 bilhões em 2014, e espera-se que este valor chegue à \$1,698 bilhões até 2020. Os corantes obtidos de fontes naturais representou 54,9% do mercado total de corantes alimentícios em 2014, com projeção de que este valor atinja 60% do mercado mundial até 2020 (GUAN, 2016).

3.2 Biopigmentos produzidos por micro-organismos

Os corantes utilizados atualmente são quase exclusivamente produzidos a partir de recursos não-renováveis, como óleos fósseis. A produção de corantes sintéticos é economicamente eficiente e tecnicamente avançada, com uma gama de tonalidades que cobre praticamente todo o espectro de cores. Entretanto, corantes

sintéticos enfrentam alguns desafios, como a dependência de recursos não-renováveis e a sustentabilidade dessa operação, toxicidade ambiental e preocupações relativas à saúde humana (ALIHOSSEONI et al., 2008; CHAUDHARI, 2013).

O interesse pela obtenção de fontes não vegetais de corantes através da aplicação de processos biotecnológicos vem crescendo gradualmente. Desse modo, pigmentos naturais obtidos através de cultivos microbianos apresentam vantagem em termos de produção quando comparados a corantes naturais extraídos de vegetais ou animais. Os bioprocessos que objetivam produzir pigmentos através do uso de micro-organismos são vantajosos devido à possibilidade de cultivos contínuos, além da rápida multiplicação da população microbiana, o que pode garantir uma produtividade tal para o processo que o torne vantajoso (JACOBSON e WASILESKI, 1994; RANGEL-YAGUI et al., 2004; SILVA, 2008). Além disso, a extração de corantes de plantas necessita maiores quantidades de biomassa, o que torna a purificação a partir de micro-organismos uma alternativa interessante (KOVAČ et al., 2013).

Micro-organismos são utilizados na biotecnologia para a obtenção de uma variedade de moléculas, incluindo enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos e pigmentos, sendo uma fonte promissora de corantes naturais. A produção de pigmentos tem sido reportada em toda a classe dos micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, algas e protozoários. Estes micro-organismos podem ser isolados, cultivados e purificados de várias fontes ambientais, como corpos d'água, solos, plantas, insetos e animais (TULI et al., 2014).

Os fungos produzem grande variedade de metabólitos secundários, sendo que seus pigmentos têm recebido destaque devido à sua atividade biológica e o potencial uso como corantes (CELESTINO et al., 2014; SOUZA et al., 2016). Os fungos filamentosos secretam diversas classes de pigmentos, incluindo carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas e quinonas (DUFOSSÉ et al., 2014). Bactérias produtoras de pigmentos são encontradas em diversos ambientes, podendo então ser cultivadas e purificadas. Muitos meios de cultivo podem ser utilizados para isolar diferentes tipos de bactérias que produzem moléculas corantes, porém, devido ao alto custo do uso de meios sintéticos, há necessidade de se desenvolver novos processos de baixo custo. O uso de resíduos agroindustriais é uma maneira lucrativa de se produzir pigmentos devido à redução de custo dos

substratos (SINGGIH e JULIANTI, 2015; STREIT et al., 2017; VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Pigmentos a partir de microalgas são amplamente utilizados em várias indústrias, como a alimentícia, nutracêutica, farmacêutica, aquicultura e cosmética. Além disso, os pigmentos têm sido utilizados em laboratórios clínicos e de pesquisa, devido às suas propriedades como marcadores de anticorpos e receptores (BEGUM et al, 2015; SANTIAGO- SANTOS et al., 2004). Os pigmentos naturais exibem várias atividades biológicas benéficas como propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, antiobesidade e neuroprotetoras (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011; PANGESTUTI e KIM, 2011). A fração de pigmentos das algas pode ser aplicada como suprimento de nutrientes devido aos altos conteúdos de pró-vitamina A e vitamina E (KOLLER et al., 2014; LOZANO et al., 2007) e para outras finalidades farmacêuticas, veterinárias e médicas (devido aos efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes e prevenção ao câncer) (KOLLER et al., 2014; WU e SHI, 2007), assim como na indústria cosmética e de alimentos. Além disso, beta-caroteno e luteína são utilizados na alimentação de aves devido à importância da coloração amarelo-alaranjada para as gemas de ovos (BEN-AMOTZ et al., 1986; KOLLER et al., 2014) e para a aquicultura (KOLLER et al., 2014).

Diversos parâmetros podem afetar a produção de pigmentos por micro-organismos, como o pH do meio de cultivo, a temperatura, o tipo de fermentação (submersa ou semi- sólida), condições de agitação e aeração, fontes de carbono e nitrogênio, dentre outros (KUMAR et al., 2014). Estes parâmetros devem ser otimizados levando-se em consideração o tipo de micro-organismo escolhido para o processo e a molécula de pigmento a ser produzida. Há muitas razões para se obter pigmentos através de processos biotecnológicos. Primeiramente, os corantes naturais não são associados com o aparecimento de efeitos colaterais, o que explica a preferência do consumidor em relação aos corantes sintéticos. Segundo, muitos biopigmentos têm o potencial de proporcionar efeitos positivos à saúde, como atividades antioxidativas e antitumorais (licopeno, beta-caroteno, luteína, clorofila, antocianinas) (BOER, 2013; COUNSELL; JEFFRIES; KNEWSTUBB, 1979; HUMPHREY, 2004). Por fim, a dependência de produtos vegetais como fontes de corantes possui muitas desvantagens, como a disponibilidade agrícola (épocas de plantio e colheita) e os processos de recuperação destes pigmentos. Por isso, a

produção biotecnológica é atrativa, pois pode ser feita de acordo com a demanda, e a produção pode ser altamente controlada (BOER, 2013). As microalgas também podem produzir simultaneamente outros compostos de alto valor agregado, como ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, vitaminas E e C, e compostos a granel como amido, proteínas e lipídios (ABE; NISHIMURA; HIRANO, 1999; MULDER, 2014.)

3.3 Microalgas

As microalgas são organismos predominantemente aquáticos que, assim como as plantas superiores, são capazes de utilizar a energia da luz solar para fixar dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera e convertê-lo em biomassa através da fotossíntese. As plantas evoluíram de ancestrais das algas e o aparato fotossintético das plantas e algas originam-se de cianobactérias (TRENTACOSTE; MARTINEZ; ZENK, 2015). Por séculos, as microalgas têm sido reconhecidas como a base da cadeia alimentar em ambientes aquáticos, podendo ser organismos fotossintéticos procarióticos (por exemplo, as cianobactérias) ou eucarióticos (como as clorófitas), variando em diâmetro de 0,2 a 2 mm (CHRISTAKI; BONOS; FLOROU-PANERI, 2015; LORDAN; ROSS; STANTON, 2011; RICHMOND, 2004). Devido à sua estrutura simples, estes micro-organismos podem crescer rapidamente e sobreviver em condições ambientais severas como altas e baixas temperaturas, anaerobiose, salinidade e exposição à radiação ultravioleta (BATISTA et al., 2013, CHRISTAKI; BONOS; FLOROU-PANERI, 2015; RICHMOND, 2004). As microalgas combinam propriedades típicas de plantas superiores com atributos biotecnológicos próprios das células microbianas (KOVAČ et al., 2013).

As microalgas podem ser classificadas de acordo com as cores que exibem, como as clorofíceas (verdes), rodofíceas (vermelhas), cianofíceas (azul esverdeadas) e feofíceas (marrom) (GRAHAM e WILCOX, 2000; BEGUM et al., 2015). As clorofilas, os carotenóides (carotenos e xantofilas) e as ficobilinas são as três principais classes de pigmentos fotossintéticos produzidos por microalgas (BEGUM et al., 2015). O interesse no cultivo de microalgas está baseado na variedade de aplicações que estes micro-organismos apresentam, visto que podem ser utilizados para a alimentação humana, produção de energia química, extração

de pigmentos e outras substâncias celulares de interesse industrial (ZEPKA et al., 2008; STREIT et al., 2017).

As microalgas podem exibir metabolismo autotrófico ou heterotrófico. O metabolismo autotrófico apenas necessita de compostos inorgânicos como sais, CO₂ e luz. O metabolismo heterotrófico, por sua vez, é não-fotossintético, exigindo fonte exógena de carbono orgânico. Algumas microalgas são mixotróficas, o que indica que elas têm a capacidade de fazer fotossíntese e assimilar nutrientes orgânicos exógenos no período escuro (BEHERA et al., 2014; BRENNAN e OWENDE, 2010; DRAGONE et al., 2010; HAMED, 2016).

O cultivo de microalgas pode ser realizado tanto em sistemas abertos (como lagoas e reservatórios artificiais) quanto em sistemas fechados altamente controlados, como os fotobiorreatores (CHRISTAKI et al., 2015; MATA et al., 2010; WIJFFELS et al., 2013). Porém, apenas nas últimas décadas os cultivos de microalgas evoluíram de técnicas “rústicas” de cultivo e colheita para cultivos controlados em sistemas tecnicamente avançados, como lagoas *raceway* e fotobiorreatores (CARDOZO et al., 2007; KOLLER et al., 2014; PULZ, 2001; TREDICI, 2004). Sistemas fechados oferecem melhores condições para o crescimento da maioria das microalgas, proporcionando a habilidade de proteger as culturas de contaminações externas, condições de cultivo controladas, altas produtividades e biomassa de melhor qualidade (CHRISTAKI et al., 2015). A facilidade das microalgas se adaptarem a condições flutuantes dos processos durante a biossíntese é um atributo comum; como por exemplo à altas salinidades, temperaturas, pHs e iluminação. A extensão da produção de biomassa, lipídios, pigmentos e carboidratos depende das condições as quais os organismos são expostos (KOLLER et al., 2014; RAO et al., 2007; SANTOS et al., 2013).

Cultivos heterotróficos de microalgas, não limitados pela incidência de luz, apresentam um maior potencial de produção de biomassa quando comparado aos processos fotoautotróficos. Além disso, caracterizam-se pela maior simplicidade de escalonamento em termos de tamanho do reator, mistura, transferência de gases, produtividade e prevalência de culturas axênicas (ERIKSEN, 2008).

Schmidt et al. (2005) avaliaram o crescimento da microalga *Galdieria sulphuraria* e a produção de ficocianina no cultivo em batelada alimentada. *G. sulphuraria* foi cultivada heterotroficamente no escuro em diferentes fontes de carbono. O conteúdo de ficocianina durante a fase exponencial foi de 3-4 mg g⁻¹ em

massa seca. Em condições limitantes de carbono, o acúmulo de ficocianina foi em torno de 250 e 400 mg L⁻¹. A produtividade em ficocianina de *G. sulphuraria* nos cultivos heterotróficos em batelada alimentada foi superior à produção por *Spirulina platensis* em ambientes naturais.

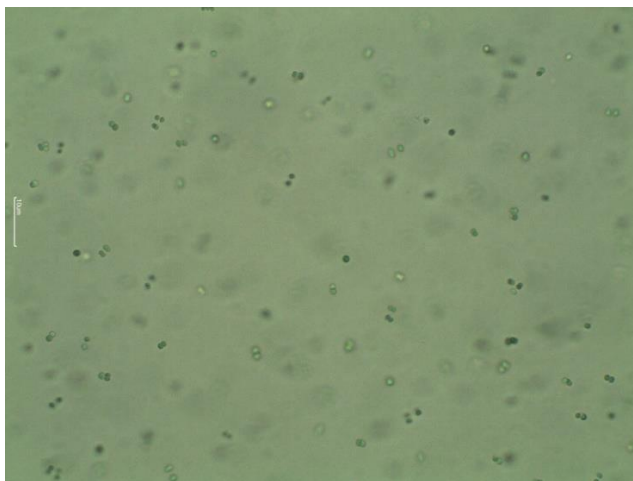
No Brasil, a clorofila utilizada como corante natural é obtida do espinafre, com rendimento de aproximadamente 0,06 mg g⁻¹, enquanto a biomassa de *Spirulina* sp. pode conter até 1,15 mg g⁻¹ deste pigmento (DANESI et al., 2002; KOVAČ et al., 2013). Esta quantidade de pigmento pode ser aumentada se alguns aspectos do cultivo forem manipulados, como, por exemplo, a fonte de nitrogênio. O uso de nitrato de potássio (KNO₃) e cloreto de amônio (NH₄Cl) no cultivo de *Spirulina* sp. resultou em conteúdo de 21,85 mg g⁻¹ de clorofila (RODRIGUES et al., 2010; KOVAČ et al., 2013). A incorporação da biomassa de microalgas como a de *Spirulina* sp. em alimentos é particularmente interessante devido a coloração verde adquirida e também ao incremento no valor nutricional do produto (DANESI et al., 2002; KOVAČ et al., 2013).

Haematococcus pluvialis, uma microalga marinha, produz astaxantina, um carotenóide de alto valor agregado, com conteúdo de aproximadamente 1,5 - 3% em sua biomassa. Microalgas sintetizam astaxantina e concentram o pigmento na cadeia alimentar através do zooplâncton e crustáceos, que são presas para os salmões, trutas, e outros animais aquáticos (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; SINGGIH e JULIANTI, 2015). Por isso, *Haematococcus* tem sido utilizada em alimentos para peixes, pois funciona como um corante vermelho natural, principalmente em cultivos de salmão e truta (DUFOSSÉ et al., 2005; SINGGIH e JULIANTI, 2015).

3.4 *Aphanothece microscopica* Nägeli

Aphanothece microscopica Nägeli é uma cianobactéria que pertence à família *Chroococcaceae* e forma colônias azul-esverdeadas que mostram estruturas macroscópicas amorfas com bainhas de mucilagem abundantes, firmes e rígidas (Figura 1). As células elípticas adultas medem aproximadamente 9,0 – 9,5 µm por 4,0 – 4,2 µm (ESTEVES, 1988; JACOB-LOPES; LACERDA; FRANCO, 2008).

Figura 1 - Suspensão contendo *A. microscopica* observada em microscópio MOTIC BA 210 TL com aumento de 400x.



Fonte: Acervo da autora (2017)

Hornes (2008) estudou o efeito da temperatura sobre a ficocianina produzida por *A. microscopica* cultivada no efluente da indústria processadora de pescado, comparando ao meio padrão BG11 a 2 klux. Os resultados indicaram que a temperatura exerce influência significativa sobre a produção de ficocianina. Os resultados obtidos pelo autor são superiores aos reportados por outros autores para diferentes espécies, alcançando até 27,2 mg de ficocianina por grama de biomassa quando *A. microscopica* foi cultivada a 20°C. Streit et al. (2017) também estudaram a produção de ficobiliproteínas e clorofila-a por esta cianobactéria em cultivos autotróficos e heterotróficos a partir de efluente da indústria de laticínios. Os autores reportaram maiores concentrações destes pigmentos na fase exponencial de crescimento, com predomínio de aloficocianina e ficoeritrina nos cultivos heterotróficos.

O perfil bioquímico de *A. microscopica* cultivada em efluente de arroz parboilizado foi estudado por Zepka et al. (2008), visando a obtenção de metabólitos de interesse industrial. A cianobactéria apresentou adaptação adequada a esta água residuária, assim como baixo tempo de geração celular, com taxa específica máxima de crescimento de 0,11 h⁻¹. Além disso, os resultados indicaram que o subproduto da parboilização do arroz é um potencial meio de cultivo para a produção de proteína unicelular e que esta biomassa microalgal representa uma importante fonte

de proteínas, carboidratos e lipídios, com destaque para os ácidos graxos poliinsaturados.

3.5 Ficocianina

Biopigmentos são várias estruturas químicas capazes de absorver luz no espectro visível (400 - 700 nm) (CARVALHO et al., 2014). Os pigmentos absorvedores de luz são a clorofila, os carotenóides e as ficobiliproteínas, sendo que as ficobiliproteínas ocorrem somente nas classes *Cyanophyceae*, *Rhodophyceae* e *Cryptophyceae*. Aproximadamente 50% da luz é capturada pelas ficobiliproteínas (HORNES, 2008; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

As ficobiliproteínas encontradas nas cianobactérias e algas vermelhas, baseando-se na absorvência em função do comprimento de onda, são caracterizadas em quatro grupos conhecidos como ficoeritrina ($\lambda_{\text{máx}} = 490 - 570$ nm), ficoeritrocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 560 - 600$ nm), ficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 610 - 625$ nm) e aloficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 650 - 660$ nm) (KATHIRESAN et al., 2007; MANIRAFASHA et al., 2016; PAWAR e PURANIK, 2014). Baseado em suas cores, as ficobiliproteínas são classificadas em dois grandes grupos: ficoeritrina (vermelho) e ficocianina (azul); além disso, ficocianinas são subdivididas em C-ficocianina, R-ficocianina (R-PC) e aloficocianina (KUDDUS et al., 2013; MANIRAFASHA et al., 2016; MORAES et al., 2011; ROMAY et al., 2003; SILVEIRA et al., 2007).

As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas que apresentam cor, são solúveis em água e que possuem grupos prostéticos tetrapirrólicos lineares (bilinas), que em seu estado funcional são covalentemente ligadas a resíduos específicos de cisteína das proteínas (MANIRAFASHA et al., 2016; ROMAY et al., 2003). As ficobiliproteínas são reunidas em partículas chamadas ficobilissomos, que são ligados em arranjos regulares à superfície externa da membrana dos tilacóides, e agem como os principais pigmentos coletores de luz em cianobactérias e algas vermelhas. Os ficobilissomos consistem de aloficocianina central cercada por ficocianina nas periferias (MANIRAFASHA et al., 2016). Em cianobactérias, as ficobiliproteínas podem abranger até 40% do conteúdo total de proteínas solúveis (PANDEY, V.; PANDEY, A.; SHARMA, 2013).

Todas as ficobiliproteínas absorvem luz incidente diretamente, mas, além disso, elas participam em uma cadeia de transferência de energia com o

ficobilissomo (MANIRAFASHA et al., 2016; VISKARI, 2001). Assim, a transferência de energia ocorre a partir da ficoeritrina → ficocianina → aloficocianina → clorofila-a (BOROWITZKA, 2013; MANIRAFASHA et al., 2016; VISKARI, 2001). A presença de uma fonte de carbono no meio juntamente com a presença de luz faz com que haja inibição de outras proteínas, favorecendo a síntese de ficobiliproteínas. Porém, o cultivo heterotrófico pode favorecer a síntese de outras proteínas (MANIRAFASHA et al., 2016; STEINMÜLLER e ZETSCHKE, 1984). A ficocianina é o principal constituinte das ficobiliproteínas, enquanto a aloficocianina funciona como uma espécie de ponte entre os ficobilissomos e a lamela fotossintética (GANTT, 1981; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). A ficocianina, encontrada apenas em cianobactérias, é uma proteína com aproximadamente 20 kDa (ABALDE et al., 1998; MARTELLI et al., 2014) e consiste em duas subunidades: α e β (MARTELLI et al., 2014). Em solução, a ficocianina é encontrada em uma mistura complexa de monômeros, trímeros, hexâmeros e outros oligômeros, sendo que a sua massa molar varia entre 44 a 260 kDa (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; MACCOLL, 1998).

Como se pode esperar de uma proteína, a ficocianina somente é estável na faixa de pH entre 5,5 – 6, e em temperaturas abaixo de 47°C (CARVALHO et al., 2014; CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012). Fora desta faixa, ocorre degradação parcial do pigmento por desnaturação, insolubilização e possivelmente devido à hidrólise (CARVALHO et al., 2014). As ficobiliproteínas possuem grande gama de potenciais aplicações biotecnológicas, como por exemplo, uso nutracêutico e farmacêutico, utilização na indústria de alimentos, cosméticos, pesquisa biomédicas e em diagnósticos clínicos (PANDEY, V.; PANDEY, A.; SHARMA, 2013). O mercado de corantes cresce a uma velocidade de 5 a 10% ao ano (SILVA, 2008). O preço da ficocianina é determinado de acordo com o grau de pureza obtido, variando entre US\$ 500 até 100.000 kg⁻¹ (BOROWITZKA, 2013).

3.6 Vinhaça

A necessidade crescente do uso de fontes de energias renováveis tem impulsionado a produção mundial de biocombustíveis. Neste cenário, o Brasil se sobressai devido ao grande uso de etanol obtido da cana-de-açúcar, sendo que o processo de produção de primeira geração já está estabelecido em larga escala no

país há décadas, enquanto os processos de segunda geração ainda estão em estágio de desenvolvimento. Em termos ambientais, a substituição de um combustível fóssil por etanol pode reduzir a emissão de gases que causam o efeito estufa. Entretanto, a produção deste biocombustível gera grandes volumes de águas residuárias, especialmente a vinhaça, que pode levar a problemas ambientais sérios dependendo da sua destinação final (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Na safra 2016/2017 de cana-de-açúcar no Brasil foram produzidos aproximadamente 26 bilhões de litros de etanol, sendo 94,2% deste volume voltado ao mercado interno (UNICA, 2017). Entretanto, apesar das contribuições que a produção de etanol trouxe à economia brasileira, o desenvolvimento deste setor não foi acompanhado por medidas de controle ambiental, especialmente em respeito à vinhaça (FERRAZ JÚNIOR et al., 2016). A vinhaça é a principal água residuária do processo de fabricação do etanol, sendo gerada em grandes volumes durante o processamento industrial da cana-de-açúcar, podendo chegar entre 10 a 15 L por litro de etanol produzido, dependendo da matéria-prima e condições da fermentação-destilação alcoólica (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; SILVA et al., 2016; SUMARDIONO, 2013). A vinhaça possui odor e coloração escura característicos, sendo altamente poluente principalmente devido às altas concentrações de matéria orgânica e pH ácido (FREIRE e CORTEZ, 2000; SILVA et al., 2016), como pode ser observado na Tabela 1. Em termos de carbono orgânico, o poder poluente da vinhaça é cerca de cem vezes maior do que o esgoto doméstico (FREIRE e CORTEZ, 2000; SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2008).

Tabela 1 - Composição química média da vinhaça de cana-de-açúcar

Parâmetro	Unidade (mg.kg⁻¹, exceto pH)
pH	4,2
DBO	5046
DQO	13380
Potássio	2056
Sódio	50,2
Sulfato	710
Cálcio	719
Magnésio	237
Fósforo	190
Cromo	0,04
Cobre	0,35
Molibdênio	0,008
Zinco	1,66

FONTE: CHRISTOFOLETTI et al., 2013

DBO: Demanda bioquímica de oxigênio;

DQO: Demanda química de oxigênio.

O aproveitamento e uso da vinhaça tem sido objeto de estudos, principalmente em termos de biodigestão, queima, concentração e ferti-irrigação (FREIRE e CORTEZ, 2000; MATTOS e BASTOS, 2015). O destino mais comum dado à vinhaça é a sua aplicação no solo como fertilizante para cultivo da cana-de-açúcar, devido ao seu alto conteúdo de matéria orgânica e nutrientes, principalmente potássio, nitrogênio e fósforo (MORAES et al., 2014). Esta prática, conhecida como ferti-irrigação, pode ocasionar problemas se praticada continuamente, como a redução da produtividade da cultura e mudanças na composição dos solos (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; SANTANA et al., 2016). A CETESB (2014) através da Norma Técnica P4.231/2005, regulamenta a aplicação da vinhaça de cana-de-açúcar em solos agrícolas; a sua disposição nos solos deve considerar o relevo, as necessidades da cultura, a concentração de potássio na vinhaça, a fertilidade e profundidade do solo, entre outros critérios. A consideração destes fatores contribui para evitar o acúmulo superficial de vinhaça, processos erosivos, geração de odores e a proliferação de vetores (CETESB, 2014).

3.7 Cultivo de microalgas em efluentes industriais

O processamento agroindustrial sempre resultou em algum tipo de resíduo, seja na forma de sólidos, líquidos ou gases. O resíduo gerado geralmente possui alta demanda bioquímica de oxigênio, podendo causar diferentes problemas, além dos custos com a coleta apropriada, descarte e tratamento ou aproveitamento. A conscientização sobre poluição ambiental e o conhecimento científico resulta na recuperação de uma grande gama de subprodutos agroindustriais valiosos e úteis, que eram anteriormente considerados resíduos (PANESAR, R.; KAUR; PANESAR, P.S., 2014). Nesse sentido, a biotecnologia tem grande participação na valorização destes resíduos via biotransformação em produtos com valor agregado.

Cianobactérias têm sido utilizadas na remoção de matéria orgânica - principalmente nitrogênio e fósforo - de efluentes industriais e urbanos, seja com células em suspensão (BASTOS et al., 2015; LINCOLN; WILKIE; FRENCH, 1996; VIEIRA et al., 2012) ou imobilizadas (BASTOS et al., 2015; DE-BASHAN e BASHAN, 2010). A reciclagem de nutrientes presentes nos efluentes industriais não somente beneficia o meio ambiente, reduzindo a poluição, mas também funciona como uma potencial fonte de carbono e energia para a produção de biomassa a um custo reduzido (KIM e LEE, 2000; RAJOKA et al., 2006; SILVA, 2008).

Carbono, nitrogênio e fósforo são macronutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. Além destes, muitos íons inorgânicos são necessários para as algas, como sulfatos, magnésio, cálcio, potássio, sódio e cloro (macronutrientes), além de ferro, manganês, zinco, cobalto, cobre e molibdênio (micronutrientes) (ANDERSEN, 2005; SU; MENNERICH; URBAN, 2016). Os custos para a produção de pigmentos são determinados principalmente pelos custos do cultivo (por exemplo, CO₂, água e nutrientes, mão-de-obra, biorreatores e consumo de energia), da colheita (equipamentos e consumo de energia) e da recuperação e separação da biomassa produzida (equipamentos, consumo de energia, reagentes químicos e mão-de-obra) (MULDERS, 2014). A literatura indica que as microalgas são agentes que podem ser úteis em determinadas etapas no tratamento de águas residuárias, visto que possuem a capacidade de remover matéria orgânica e nutrientes dos efluentes, incorporando-os à sua biomassa (BONINI, 2012).

O uso de efluentes para cultivos de microalgas, entretanto, pode acarretar em algumas limitações para os processos. Geralmente, águas residuárias apresentam

cor e turbidez, o que limita a penetração da luz e pode prejudicar o crescimento destes micro-organismos. Nestes casos, espécies mixotróficas ou heterotróficas adquirem especial importância, visto que podem utilizar a matéria orgânica na ausência de luminosidade para a produção de energia. Além da turbidez, a composição química das águas residuárias também pode ocasionar a toxicidade e consequente inibição do crescimento algal (BONINI, 2016). As características de crescimento e composição das microalgas são significativamente dependentes das condições de cultivo.

3.8 Processamento da biomassa de microalgas e extração de ficocianina

A produção de metabólitos por microalgas, incluindo as ficobiliproteínas, necessita de duas etapas: a produção propriamente dita da biomassa, com o acúmulo dos metabólitos, e a etapa *downstream*, onde ocorre a extração e recuperação. Assim, a obtenção de ficobiliproteínas de alta qualidade a partir de microalgas concilia a produção de biomassa microalgal com estimulação efetiva para o acúmulo de ficobiliproteínas na biomassa. A maioria das microalgas acumula ficobiliproteínas sob condições específicas de estresse, principalmente devido a incidência de luz (MANIRAFASHA et al., 2016).

Cada micro-organismo possui suas particularidades quanto à localização de suas proteínas intracelulares, sendo que essas moléculas podem estar situadas no citoplasma, periplasma ou até mesmo em organelas celulares. Desta forma, os protocolos de extração variam de acordo com a proteína de interesse (MORAES et al., 2011). O método de extração é uma característica essencial para a recuperação máxima de ficobiliproteínas (MORAES et al., 2011; NIU et al., 2006), sendo que a extração destas proteínas envolve a ruptura das células.

A extração de ficobiliproteínas de cianobactérias é complexa devido à resistência da parede celular e do tamanho reduzido destes micro-organismos (KUDDUS et al., 2013; STEWART e FARMER, 1984; WYMAN, 1992). Portanto, diferentes métodos de extração têm sido empregados para diferentes espécies de cianobactérias, tais como a sonicação (FURUKI et al., 2003), métodos enzimáticos (BHASKAR; GOPALASWAMY; RAGHU, 2005), congelamento e descongelamento (KUMAR et al., 2014), entre outros.

Em processos biotecnológicos que utilizam microalgas, as etapas de recuperação e purificação podem contabilizar de 50 a 80% dos custos totais de produção, dependendo das características bioquímicas do composto de interesse e do grau de pureza que precisa ser alcançado (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; MOLINA GRIMA et al., 2003). Estes custos também estão vinculados à baixa concentração final de biomassa obtida nos sistemas autotróficos convencionais de produção. Nesse sentido, os cultivos heterotróficos surgem como alternativa que facilitaria a recuperação da biomassa (MATTOS e BASTOS, 2017).

O processo de recuperação da biomassa envolve métodos de separação mecânicos, químicos, biológicos e, em menor escala, elétricos. É muito comum combinar dois ou mais destes métodos a fim de se obter maior velocidade de separação e menores custos de processo (AZEREDO, 2012; BARROS et al., 2015).

A secagem é comumente utilizada para estender a vida de prateleira da biomassa microbiana, especialmente se a biomassa é o produto final. Diversos métodos de secagem têm sido extensivamente utilizados para secar biomassa, incluindo *spray dryers*, cilindros, liofilização e incidência direta de luz solar (OLIVEIRA et al., 2008).

A cinética de crescimento de *S. platensis*, assim como métodos de extração e purificação de ficocianina foram estudados por Silva (2008). A maior quantidade de ficocianina obtida coincidiu com a máxima concentração celular em 15 dias de cultivo. Os métodos de extração utilizados foram pressão em recipiente cilíndrico (*french press*), homogeneizador de alta pressão e congelamento/descongelamento, sendo que este último proporcionou extração 5 vezes mais eficiente do que os outros dois métodos, atingindo até 126 mg de ficocianina por g de biomassa seca. A purificação realizada através de precipitação por fracionamento com diferentes concentrações de sulfato de amônio resultou em concentração de ficocianina de 30,67 mg g⁻¹ biomassa seca e razão de pureza (Abs_{620}/Abs_{280}) igual a 2, alcançando nível satisfatório para aplicação em alimentos.

Um protocolo de purificação foi desenvolvido por Kumar et al. (2014), onde a ficocianina foi extraída de *S. platensis* (CCC540) através da utilização de sulfato de amônio para a precipitação da biomassa, seguido de cromatografia com dietilaminoetil celulose e tampão acetato. A precipitação com 65% de sulfato de amônio resultou em recuperação de 80% de ficocianina com pureza de 1,5

(A_{620}/A_{280}), enquanto a aplicação de cromatografia resultou em recuperação de 80% com pureza de 4,5 (A_{620}/A_{280}).

As dificuldades mais citadas na etapa de extração de ficocianina se devem à composição multicamada da parede celular das microalgas, além da presença de contaminantes (KUMAR et al., 2014; STEWART e FARMER, 1984). O tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5 e solução $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio foram os melhores parâmetros estabelecidos por Hemlata et al. (2011) para extração de ficobiliproteínas, combinados com o congelamento/descongelamento da biomassa (-20 e 4°C).

Cada micro-organismo tem suas particularidades quanto à localização intracelular das proteínas produzidas. Portanto, não existem protocolos de extração padronizados, mas a escolha do método é essencial para a recuperação máxima de ficobiliproteínas de algas (KAMBLE et al., 2013; MORAES et al., 2011). A extração de ficobiliproteínas envolve ruptura celular e a liberação dessas proteínas das células (KAMBLE et al., 2013). Silva et al. (2009) avaliaram a técnica de precipitação para a recuperação e purificação da ficocianina de *S. platensis*. O efeito de diferentes concentrações de sulfato de amônio, volume e pH durante a ressuspensão foram estudados, sendo que a melhor condição encontrada para a purificação foi o fracionamento com sulfato de amônio a 0-20%/20-50%, com relação a um volume de ressuspensão/volume inicial de 0,52 em pH 7,0. Este protocolo aumentou a pureza do pigmento em 70% quando comparado com o extrato inicial, com recuperação de 83,8%.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Inóculo

O inóculo da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. João Sarkis Yunes da Unidade de Pesquisa em Cianobactérias (UPC) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e mantido e propagado no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar) em meio BG11.

4.2 Preparo do meio de cultivo e manutenção das cepas

As cianobactérias foram propagadas em meio BG11 (*Braun-Grunow Medium*) (RIPPKA et al., 1979), cuja composição encontra-se na Tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 7,4 – 7,6 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L⁻¹, sendo esterilizado por 20 minutos a 121°C em autoclave.

Tabela 2 - Composição do meio BG11

Componente	Solução Estoque	Quantidade para 1 L
K ₂ HPO ₄	3 g 100mL ⁻¹	1 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O	7,5 g 100mL ⁻¹	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O	3,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Citrato de amônio férrico	0,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ EDTA	0,1 g100mL ⁻¹	1 mL
Ácido cítrico	0,6 g 100mL ⁻¹	1 mL
Na ₂ CO ₃	2,0 g 100mL ⁻¹	1 mL
NaNO ₃	15 g 100mL ⁻¹	10 mL
NaCl	7,2 g 100mL ⁻¹	1 mL
<u>Metais traço</u>		1 mL
H ₃ BO ₃	286,0 mg100mL ⁻¹	
MnCl ₂ . 4H ₂ O	181,0 mg 100mL ⁻¹	
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	22,0 mg100mL ⁻¹	
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	39,0 mg 100mL ⁻¹	
CuSO ₄ . 5H ₂ O	7,9 mg100mL ⁻¹	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	4,0 mg 100mL ⁻¹	

Fonte: RIPPKA et al., 1979

As culturas foram repicadas após resfriamento do meio e mantidas a temperatura ambiente e fotoperíodo de 12:12 horas (claro – escuro) com lâmpadas fluorescentes brancas, com luminosidade máxima de 2 klux. O monitoramento através da contagem celular em Câmara de Neubauer foi realizado previamente ao início dos ensaios para verificação da concentração inicial das células e pureza dos inóculos.

4.3 Vinhaça

A vinhaça utilizada nos experimentos foi coletada em uma Usina de Açúcar e Álcool localizada em Araras/SP, sendo acondicionada em garrafas plásticas e mantida congelada no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC/CCA/UFSCar) até o momento da sua utilização. A vinhaça foi caracterizada em termos de carbono e nitrogênio em analisador TOC – LCPN SHIMADZU®. Os óxidos e micronutrientes foram analisados pelo Laboratório de Análise e Simulação Tecnológica (LAST/CCA/UFSCar). O pH foi ajustado para 7,5 e a vinhaça foi esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. A vinhaça bruta foi utilizada nos cultivos mixotróficos, enquanto que para os cultivos heterotróficos, foi previamente centrifugada a 1844 x g por 30 minutos a 25°C para retirada de sólidos sedimentáveis de difícil biodegradação.

4.4 Ensaios

4.4.1 Cultivos mixotróficos

4.4.1.1 Influência da suplementação do meio com nitrogênio e vinhaça na produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli

Os ensaios foram realizados com *A. microscopica* em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 21,5 mL de meio BG11, 3,5 mL da suspensão contendo o inóculo (concentração inicial de 300 mg L⁻¹), além de nitrato de sódio (NaNO₃) nas concentrações de 0,94 e 1,875g, ou vinhaça bruta nas concentrações de 2, 5 e 7,5 mL. O ensaio controle consistiu no meio BG11 padrão. Os experimentos foram conduzidos em agitador orbital a 100 rpm, 25°C, luminosidade de 2 klux e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) durante 24 horas. O monitoramento da concentração celular foi realizado via contagem com auxílio de Câmara de Neubauer, ao final dos cultivos. A ficocianina foi obtida pelo método de extração com solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 6,85, seguido de congelamento e descongelamento das amostras.

4.4.1.2 Perfil de produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça

Os ensaios foram realizados com *A. microscopica* em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 21,5 mL de meio BG11, 3,5 mL de inóculo (concentração inicial de 300 mg L⁻¹), e 2,5 mL de vinhaça, tendo como controle o meio BG11 padrão.

Os ensaios foram conduzidos em agitador orbital a 100 rpm, 25°C, luminosidade de 2 klux e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro) com monitoramento em 6, 12, 24, 48 e 72 horas de cultivo. Tanto contagem celular como ficocianina foram acompanhadas conforme descrito no item 4.4.1.1.

4.4.2 Cultivos heterotróficos

4.4.2.1 Produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG11 suplementado com vinhaça em até 72 horas de cultivo no escuro

Os ensaios foram realizados com *A. microscopica* em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 43 mL de meio BG11, 7 mL de inóculo (concentração inicial de 300 mg L⁻¹), e 5 mL de vinhaça. Os controles consistiam apenas de meio BG11 e inóculo de *A. microscopica*. Os ensaios foram conduzidos em agitador orbital a 100 rpm, 25°C, durante 72 horas. Os frascos Erlenmeyer foram cobertos com papel alumínio para evitar a incidência luminosa. Tanto contagem celular como ficocianina foram acompanhadas conforme informado no item 4.4.1.1.

4.4.2.2 Avaliação da produção de ficocianina por cultivo heterotrófico através de planejamento experimental: efeito do inóculo, pH e salinidade

Os ensaios foram realizados com *A. microscopica* em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 125 mL de meio BG11, 12,5 mL de vinhaça e inóculo de *A. microscopica* em diferentes concentrações.

Um planejamento experimental DCCR (delineamento central composto rotacional) foi proposto conforme apresentado na Tabelas 3 e 4. Os ensaios foram conduzidos em agitador orbital a 100 rpm, 25°C, durante 6 horas. Os frascos Erlenmeyer foram cobertos com papel alumínio para manter as condições heterotróficas e o monitoramento foi realizado conforme item 4.4.1.1.

Tabela 3 - Planejamento experimental com as três variáveis codificadas.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	-1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

X₁: pH; X₂: inóculo; X₃: NaCl

Tabela 4 - Valores das variáveis independentes X₁, X₂ e X₃ utilizadas para o planejamento experimental DCCR.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH (X ₁)	5,5	6,3	7,5	8,7	9,5
Inóculo (mg L ⁻¹) (X ₂)	100	180	300	419	500
NaCl (mol L ⁻¹) (X ₃)	0,2	0,28	0,4	0,52	0,6

4.5 Avaliação da produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli em biorreator de bancada

A partir da avaliação estatística do planejamento experimental descrito na Tabela 4, foi realizado o escalonamento em biorreator de bancada Allbiom® AllMic SCR05 (Figura 2), considerando os ensaios onde foram obtidos os melhores e piores desempenhos em termos de taxa específica de produção de ficocianina máxima ($\mu_{Pm\acute{a}x}$).

Figura 2 - Cultivo heterotrófico de *A. microscopica* em meio BG11 suplementado com vinhaça em biorreator Allbiom® AllMic SCR05



Fonte: Acervo da autora (2017)

As variáveis selecionadas para os ensaios em biorreator de bancada estão representadas na Tabela 5.

Para ambos os cultivos, foram utilizados 2L de meio BG11 suplementado com 200 mL de vinhaça. Os vasos de cultivo foram envoltos em papel alumínio para impedir a incidência de luz e assim manter o processo em condições heterotróficas.

Os cultivos foram realizados por 6 horas, a 72 rpm, 1 VVM (volume de ar por volume de meio, por minuto) e a 25°C.

Tabela 5 - Condições avaliadas em biorreator de bancada Allbiom® AllMic SCR05

Ensaio do DCCR	Inóculo (mg L ⁻¹)	pH	Salinidade (mol L ⁻¹)
7 (maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$)	419	6,3	0,52
13 (menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$)	300	7,5	0,2

A cada hora de processo, 40 mL de amostra foram coletados, sendo avaliadas em termo de biomassa, ficocianina, carbono e nitrogênio. A biomassa foi monitorada através de leituras de absorbância em espectrofotômetro conforme descrito no item 4.6.1, além de contagens em Câmara de Neubauer (item 4.6.2). A ficocianina foi extraída pelo método com solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 6,85 (item 4.6.3).

Cloreto férrico (FeCl_3) foi adicionado à biomassa de *A. microscopica* antes da centrifugação para auxiliar a separação da biomassa. A suspensão algal foi dividida em alíquotas de 450 mL, que foram então adicionadas de 100 μL de uma solução composta de 0,58 g de FeCl_3 dissolvidos em 500 μL de água miliQ. A biomassa foi centrifugada a 1844 x g por 40 minutos. Hornes (2008) avaliou o efeito de coagulantes no efluente do pescado visando a separação da biomassa de *A. microscopica*, sendo o FeCl_3 o coagulante mais eficiente e de fácil remoção através de lavagens da biomassa.

Ao final dos ensaios, a biomassa foi centrifugada e congelada até o momento de sua utilização. A biomassa de *A. microscopica* foi avaliada em termos de proteínas e lipídios (item 4.8), e dois métodos de extração de ficocianina foram avaliados (extração com ácido clorídrico (HCl) 12 mol L^{-1} e sonicação com pérolas de vidro) (MORAES et al., 2011).

4.6 Análises

4.6.1 Biomassa

A biomassa celular foi obtida através de curva padrão, onde quatro comprimentos de onda foram avaliados (620, 652, 665 e 800 nm). O comprimento de onda de 620nm foi selecionado, pois apresentou o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,964$) com a biomassa seca.

A concentração celular (X [g L^{-1}]) foi determinada por uma correlação entre a biomassa seca e a absorbância a 620 nm (A_{620}), conforme a equação 1:

$$X(\text{g L}^{-1}) = 2,192[A_{620}] + 0,178 \quad (1)$$

4.6.2 Contagem de células em Câmara de Neubauer

Para a realização das contagens, adicionou-se 1 mL da suspensão celular previamente diluída em 10x e homogeneizada, sobre a superfície quadriculada da Câmara de Neubauer cobrindo-se posteriormente com uma lamínula e aguardando por cerca de dois minutos para que as células sedimentassem sobre a superfície de contagem. As células de *A. microscopica* foram contadas com o auxílio de um microscópio óptico utilizando-se a lente objetiva de 40x. A concentração celular foi calculada pela média dos valores de contagem de cinco quadrantes, multiplicada por

25 e 10^4 , além do fator de diluição, sendo este resultado representado em células mL^{-1} .

4.6.3 Extração de ficocianina com solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 6,85

Para a extração de ficocianina, 10 mL de amostra foram adicionados de 20 mL de água e centrifugados por 25 minutos a $1844 \times g$. O sobrenadante foi descartado e 5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,85 foram adicionados ao precipitado (SILVA, 2008). Após a centrifugação, a ficocianina foi estimada através de leituras em espectrofotômetro, como especificado no item 4.6.7.

4.6.4 Extração de ficocianina através de ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras foram submetidas a ciclos de congelamento (por 24h a -6°C) e descongelamento (por 2 horas em temperatura ambiente), após extração com solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ pH 6,85 (SILVA, 2008). As leituras de absorbância foram realizadas entre os ciclos em espectrofotômetro HACH® DR 500 nos comprimentos de onda de 620 e 652 nm, sendo que a concentração de ficocianina foi calculada através do procedimento descrito em 4.6.7.

4.6.5 Extração de ficocianina através de tratamento ultrassônico com pérolas de vidro

A extração com tratamento ultrassônico (sonicação) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Moraes et al (2011), com algumas modificações. A biomassa úmida de *A. microscopica* foi adicionada de pérolas de vidro na proporção de 1:1,1 (g biomassa: g pérolas de vidro), e levada ao banho ultrassom por 48 minutos a 40 KHz. Após a centrifugação, o teor de ficocianina foi estimado através de leituras em espectrofotômetro, como especificado no item 4.6.7.

4.6.6 Extração de ficocianina com HCl 12 N

HCl 12 mol L⁻¹ foi adicionado à biomassa de *A. microscopica* nas proporções de 5:1 (g biomassa: mL de HCl). A mistura permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas. A concentração de ficocianina foi determinada através do procedimento descrito no item 4.6.7.

4.6.7 Determinação por absorvância e cálculos para a determinação de ficocianina

As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1844 x *g* e os sobrenadantes foram analisados em espectrofotômetro HACH® DR 500 nos comprimentos de onda de 620 e 652 nm. A concentração de ficocianina foi calculada através da Equação 2 (BENNET e BOGORAD, 1973).

$$FC = \frac{A_{620} - 0,474 (A_{652})}{5,34} \quad (2)$$

Onde:

FC = concentração de ficocianina (mg mL⁻¹);

A₆₂₀ = absorvância a 620nm;

A₆₅₂ = absorvância a 652nm.

e:

$$Y = \frac{(FC) V}{BM} \quad (3)$$

Onde:

Y = Rendimento de biomassa em ficocianina (mg g⁻¹);

FC = concentração de ficocianina (mg mL⁻¹);

V = volume do solvente (mL);

BM = biomassa (g L⁻¹).

4.7 Cinética de crescimento microbiano e produção de ficocianina

Os parâmetros cinéticos foram determinados com base em equações descritas por Levenspiel (2000). A taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada de acordo com a Equação 4, onde X_0 e X_1 representam a concentração celular no início e final da fase log, respectivamente:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln(X_1/X_0)}{t_1 - t_0} \quad (4)$$

O tempo de geração (t_g) foi determinado através da Equação 5:

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad (5)$$

Produtividade máxima de ficocianina ($\text{Prod}_{\text{máx}}$) foi calculada através da Equação 6, onde P_0 representa a produção de ficocianina no início dos experimentos, e P_1 a concentração final:

$$\text{Prod}_{\text{máx}} = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0} \quad (6)$$

A taxa específica de produção de ficocianina (μ_P) foi determinada pela Equação 7, para concentração máxima do produto e a respectiva concentração celular X no tempo experimental:

$$\mu_P = \frac{P_{\text{máx}}}{X_1} \quad (7)$$

4.8 Caracterização da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli

Os teores lipídico e protéico foram determinados ao final do cultivo heterotrófico em biorreator de bancada na condição de maior velocidade específica de produção de ficocianina (μ_P) (Tabela 5).

4.8.1 Análise de lipídios totais

As quantificações de lipídios totais nas amostras de microalgas foram realizadas seguindo o método de extração de lipídios em biomassa úmida proposto por Bligh e Dyer (1959).

O meio de cultivo foi centrifugado e a biomassa recuperada. Aproximadamente 1g do material recuperado foi espalhado sobre uma placa de Petri previamente seca e tarada, pesado em balança analítica e colocado para secar a 105°C por 24 horas em estufa de secagem. Após esse período o material foi colocado para resfriar em dessecador e pesado à temperatura ambiente para ter o teor de massa seca do material determinado.

Em paralelo, 5 g da biomassa recuperada úmida foram transferidos para um tubo Falcon®, sendo adicionados 10 mL de metanol. Agitou-se a mistura e em seguida foram adicionados 5 mL de clorofórmio. O material foi deixado em contato com a solução extratora por 24 horas e centrifugado após esse período. O sobrenadante foi coletado e a extração foi repetida por mais duas vezes com uma mistura de clorofórmio, metanol e água MilliQ nas proporções 1:2:0,8, dessa vez sem esperar o período de 24 horas.

Os três sobrenadantes foram reunidos e o material sólido deixado para secar. Aos sobrenadantes adicionou-se uma solução saturada de cloreto de sódio a fim de promover a separação de fases. A fase orgânica (inferior) foi pipetada para uma placa de Petri previamente seca e tarada com auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, e colocada para secar na capela até que não houvesse mais solvente na amostra. Para a remoção de eventual umidade resultante da volatilização do solvente, a placa foi colocada em dessecador por 24 horas e pesada para a determinação do teor lipídico da amostra.

Assim, a fração lipídica foi calculada de acordo com a equação 8:

$$\text{Lipídios} = \frac{\text{Mo} \times 100}{(\text{BMU} \times \text{MS})} \quad (8)$$

Onde:

Mo: massa de óleo extraída;

BMU: Biomassa úmida;

MS: % Massa seca (massa após secagem/massa úmida).

4.8.2 Transesterificação

O material extraído na quantificação de lipídios totais foi redissolvido com 500 μL de clorofórmio e transferido para um tubo de ensaio com tampa de rosca para ser transesterificado. A reação procedeu-se como uma adaptação do método apresentado por Van Wychen, Ramirez e Laurens (2015), utilizando como catalisador o ácido sulfúrico a 1% (m/v) em metanol.

Ao tubo de amostra foram adicionados 5 mL da mistura de catalisador e a reação foi conduzida em bloco digestor a 80°C por 10 minutos. Ao final do período de reação, a amostra foi rapidamente resfriada em água à temperatura ambiente para cessar a reação.

Ao tubo foram adicionados 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio e 2 mL de hexano. Agitou-se a mistura e permitiu-se a separação de fases por 10 minutos.

A fase orgânica (superior) foi transferida para um novo tubo e lavada com 5 mL de água MilliQ, sendo transferida para um vial de 2 mL após a completa separação de fases.

Para concentrar a amostra, o vial contendo a mesma foi deixado em capela por 1 hora, até que o volume da mesma fosse reduzido pela metade.

4.8.3 Perfil lipídico

A amostra transesterificada e concentrada foi analisada em um CG-FID Shimadzu® Modelo GC-2010 Plus, equipado com auto injetor e com uma coluna RTX-Wax de 30 m com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme.

Uma alíquota de 1 μL de amostra foi injetada em modo *splitless*, com a porta de injeção a 250°C e o detector a 300°C. A rampa de temperatura do forno foi a mesma utilizada por Sun (2014): 50°C por 1 minuto, então 25°C por minuto até 200°C, seguido por 3°C por minuto até 230°C.

Para a identificação dos picos, foi utilizado o padrão Supelco 37 component FAME mix (CRM-47885). Para quantificação de cada ácido graxo, utilizou-se como medida indireta a área relativa de cada pico de interesse (metil-ésteres) para com o total de picos reconhecidos como tal na amostra.

4.8.4 Teor de proteínas

O teor de proteínas foi estimado através da determinação de nitrogênio total (NT) em analisador TOC – LCPN SHIMADZU® posterior à digestão Kjeldahl (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

O meio de cultivo foi centrifugado e a biomassa recuperada. A biomassa foi lavada duas vezes com água miliQ e centrifugada por 5 minutos a 1844 x *g*.

Aproximadamente 0,2 g de biomassa úmida foram secas (3h a 120°C) em placas de Petri previamente secas e de peso conhecido. Cerca de 0,3 g de biomassa de *A. microscopica* foram transferidas para um tubo de ensaio que foi então adicionado de 5 mL de solução digestora com a seguinte composição: 6,8g de selenito de sódio (Na₂SeO₃), 10g de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O), 53,45g de sulfato de sódio (Na₂SO₄) e 500 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). Os tubos foram levados a um bloco digestor nas seguintes temperaturas e intervalos de tempo: 50°C por 30 minutos, 100°C por 120 minutos, 150°C por 30 minutos, 200°C por 30 minutos, 250°C por 30 minutos, 300°C por 30 minutos e 330°C por 30 minutos.

Após o resfriamento das amostras, o conteúdo digerido foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e água MiliQ foi adicionada até atingir o menisco. O teor de nitrogênio total (NT) das amostras foi avaliado em analisador TOC – LCPN SHIMADZU®, sendo que o conteúdo em proteínas da cianobactéria *A. microscopica* foi obtido usando o fator 6,25 (PERSSON; WENNERHOLM; O'HALLORAN, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar

A Tabela 6 apresenta a caracterização físico-química da amostra de vinhaça usada nos experimentos. Por se tratar de um efluente, seus parâmetros podem variar consideravelmente, visto que a sua composição é influenciada pela matéria-prima (safra de cana-de-açúcar) e condições de processo (fermentação-destilação). De acordo com Fay (1983), a relação de carbono e nitrogênio (C/N) entre 20 e 30 favorece o desenvolvimento de cianobactérias e, portanto, não seria necessária a complementação por matéria nitrogenada e carbonada para a correção deste efluente. Para que os micro-organismos se desenvolvam em sua máxima eficiência, carbono, nitrogênio e fósforo precisam estar em proporções balanceadas, devido à importância destes elementos para a formação de biomassa e metabólitos de interesse comercial. O carbono é importante para a formação de estruturas celulares e para a geração de energia, enquanto o nitrogênio constitui as proteínas e enzimas. Se a quantidade de nitrogênio no meio for insuficiente, os micro-organismos não serão capazes de produzir enzimas necessárias para a utilização de carbono. Porém, o excesso de nitrogênio poderá ocasionar a inibição ao crescimento (CAMPOS; GUERRERO; CÁRDENAS, 2002; HORNES, 2015; SUNG e LIU, 2003).

Tabela 6 - Caracterização físico-química da vinhaça usada nos ensaios

Parâmetro	Valor médio
pH	4,3
SS	21,8 g L ⁻¹
TOC	10036 mg L ⁻¹
TN	500,27 mg L ⁻¹
C/N	20,61
P ₂ O ₅	0,8 kgm ⁻³
K ₂ O	5,7 kgm ⁻³
CaO	5,1 kgm ⁻³
MgO	4,55 kgm ⁻³
SO ₄	0,5 kgm ⁻³
Cu	0,035mg L ⁻¹
Fe	14,5mg L ⁻¹
Mn	3,11mg L ⁻¹
Zn	0,69mg L ⁻¹

SS: sólidos suspensos; TOC: carbono orgânico total; TN: nitrogênio total; C/N: razão carbono:nitrogênio

O pH do meio possui grande influência sobre o aparato fotossintético das cianobactérias, que são geralmente alcalófilas e capazes de manter o pH interno constante na faixa de 7,1 – 7,5, mesmo que o pH do meio externo esteja na faixa de 5 a 10 (RITCHIE, 1991; SHARATH, 2016). Assim, o pH da vinhaça foi ajustado para 7,5, valor do meio padrão BG11 (RIPPKA et al., 1979), a fim de minimizar uma possível inibição do crescimento da cianobactéria no efluente. Além disso, considerando a fotossíntese como padrão metabólico desses organismos, a vinhaça apresenta teores consideráveis de potássio, magnésio, manganês e ferro. As algas utilizam esses micronutrientes, juntamente com o CO₂, para produzir biomassa através da fotossíntese (DALRYMPLE et al., 2013).

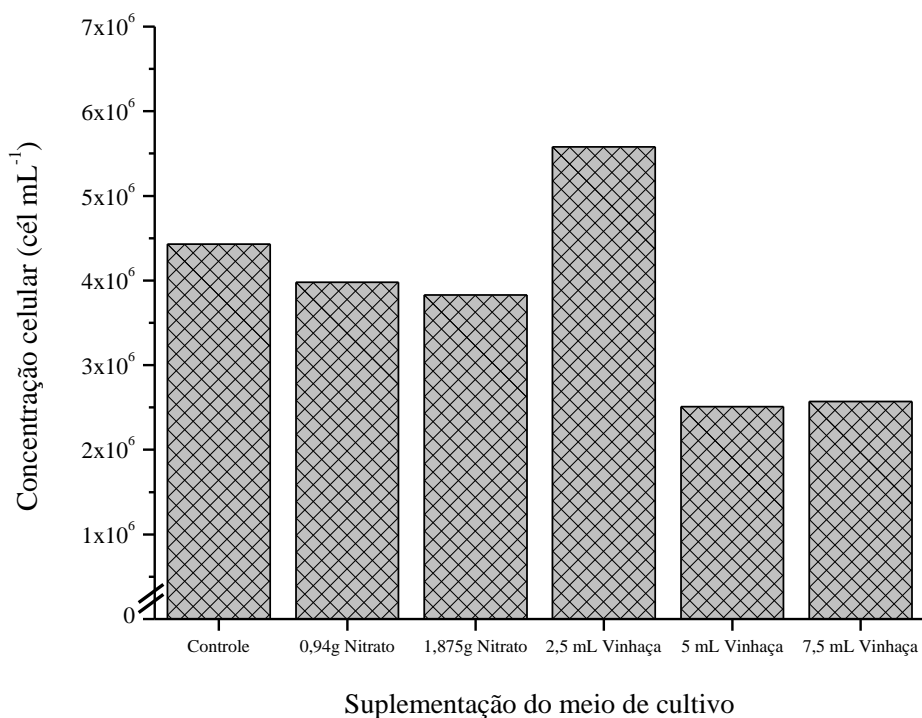
No entanto, cabe ressaltar que a elevada turbidez da vinhaça e alto teor de carbono orgânico total sugere o consumo de moléculas orgânicas por cianobactérias em metabolismo heterotrófico. Santana et al. (2017) reportam teores de ácido láctico, glicerol e ácido acético em vinhaça, os quais foram consumidos por culturas não axênicas de microalgas em condições mixotróficas, ou seja, com ciclo de claro-

escuro. De fato, o metabolismo heterotrófico não é apropriado para a maioria das microalgas e muitas espécies são autotróficas obrigatórias. Porém, algumas linhagens podem crescer de forma eficiente na ausência completa de luminosidade em biorreatores convencionais (FAY, 1983; PEREZ-GARCÍA et al., 2011).

5.2 Cultivos mixotróficos: avaliação da suplementação do meio BG11 e parâmetros cinéticos do cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli na produção de ficocianina

A Figura 3 apresenta a concentração celular de *A. microscopica* após 24 horas de cultivo nas diferentes condições experimentais. Para todas as condições, a concentração celular foi mantida na mesma ordem de grandeza (10^6 cél mL⁻¹), indicando ao menos a manutenção celular. A concentração celular máxima obtida foi de $5,58 \cdot 10^6$ cél mL⁻¹, quando o meio BG11 foi suplementado com 2,5 mL de vinhaça, superior ao tratamento controle. A habilidade desta cianobactéria crescer e manter-se em meios com carbono orgânico já foi objetivo de diversos estudos (BASTOS et al., 2004; 2011; BONINI e BASTOS; 2012; DE- BASHAN; BASHAN, 2010; DUMAS et al., 1998; FAY, 1992; JACOB-LOPES et al., 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2010). Bonini (2012), em cultivos mixotróficos em meio BG11 suplementado com glicose, obteve concentrações celulares na ordem de 10^6 para *A. microscopica* e 10^7 para *Chlorella vulgaris*. O aumento dos perfis de biomassa de cianobactérias cultivadas em meios com fontes de carbono como glicose, glicerol e acetato, presentes na vinhaça, foi reportado por vários autores. Liang et al. (2009) observaram que o uso de glicose a 1% (m/v) no cultivo mixotrófico com *C. vulgaris* resultou em maiores taxas de crescimento (2 g L^{-1}) e produtividade em lipídios ($54 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); enquanto $5,38 \text{ g L}^{-1}$ foi encontrado durante o cultivo de *S. platensis* em meio com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose (MULITERNO et al., 2005).

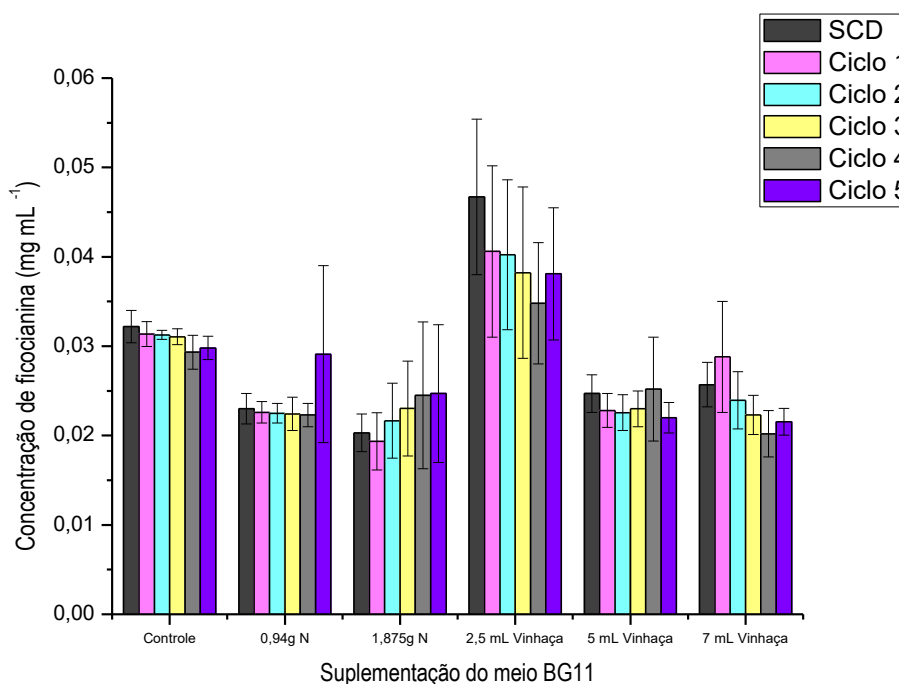
Figura 3 - Perfis de concentração celular de *Aphanothece microscopica* Nägeli após 24 horas de cultivo em meio BG11 suplementado com diferentes concentrações de nitrato de sódio e vinhaça.



A adição de 2,5 mL de vinhaça ao meio BG11 favoreceu a produção de ficocianina pela cianobactéria, atingindo concentração máxima de 0,0467 mg mL⁻¹ (Figura 4), coincidindo com a concentração celular máxima. A relação da maior produção de ficocianina com a maior concentração celular também foi observada em outros estudos, como registrado por Silva (2008), o que indica que a produção de ficocianina deve estar ligada com o crescimento celular. Como a vinhaça é um líquido escuro, a adição de 5 e 7,5 mL do efluente no meio BG11 fez com que a turbidez fosse elevada consideravelmente, o que pode ter prejudicado a captação de luz pelas células de *A. microscopica*. Como a ficocianina é um pigmento fotossintético, a sua produção tende a ser prejudicada nos meios que foram suplementados com os maiores volumes de vinhaça, que impediram a passagem de luz. Porém, este prejuízo foi compensado na condição de 2,5 mL de vinhaça com um maior crescimento celular devido ao desvio da via metabólica para crescimento a partir de moléculas orgânicas no escuro.

As cianobactérias podem utilizar nitrato ou amônia como fonte de nitrogênio para o crescimento celular. Liotenberg et al. (1996) avaliaram o efeito destas fontes de nitrogênio na produção de ficobiliproteínas, e a presença da amônia ocasionou o aumento de 46% de ficocianina nos ficobilissomos a mais nas células de *Calothrix* sp. PCC 7601 quando comparada com o nitrato como fonte de nitrogênio. As quantidades de NaNO_3 adicionadas ao meio BG11 (0,94 e 1,875g) podem ter ocasionado inibição do crescimento por excesso de nitrogênio presente no meio, visto que a Figura 3 indica que a concentração celular diminui discretamente quando NaNO_3 foi adicionado em maior quantidade. O mesmo comportamento pode ser observado na concentração de ficocianina (Figura 4), que também diminui quando 1,875g de NaNO_3 foram adicionados ao meio BG11 (comparando-se a concentração de ficocianina em termos de extração somente com tampão fosfato, sem o congelamento e descongelamento).

Figura 4 - Produção de ficocianina após 24 horas de cultivo em meio BG11 suplementado com diferentes concentrações de nitrato de sódio e vinhaça (O quadro de cores representa 5 ciclos de congelamento e descongelamento, enquanto SCD indica a extração do pigmento)



De acordo com Perez-García et al. (2011), a ficocianina pode ser produzida por cianobactérias em meio com limitada disponibilidade de carbono orgânico, desde

que tenha quantidades suficientes de nitrogênio. Nesse sentido, considerando o aporte de nitrogênio no meio BG11 e a adição de 2,5 mL de vinhaça com a sua quantidade de carbono orgânico, provavelmente nesta condição foi obtida a melhor relação C/N para síntese deste pigmento. Todos os pigmentos vinculados à fotossíntese são obtidos tradicionalmente a partir de cultivos autotróficos. Porém, a possível produtividade em biomassa mais elevada na condição heterotrófica pode suprir esta deficiência, tornando viável a produção de ficocianina a partir de águas residuárias em sistemas menos dependentes da luz.

Com relação à recuperação do produto, o método de extração por congelamento e descongelamento tem sido reportado como método mais eficiente para a extração de ficobiliproteínas de cianobactérias (HEMLATA; FAREHA; TASNEEN, 2011). Esta técnica não provoca a desnaturação das proteínas, e a ruptura celular ocorre porque os cristais de gelo formados durante o congelamento rompem a parede e membrana celulares, liberando as ficobiliproteínas para o meio. Porém, a Figura 4 mostra que este método não teve o mesmo efeito com as células de *A. microscopica*, o que pode ser atribuído ao tamanho extremamente reduzido das células desta espécie unicelular, além da possível rigidez de suas paredes celulares.

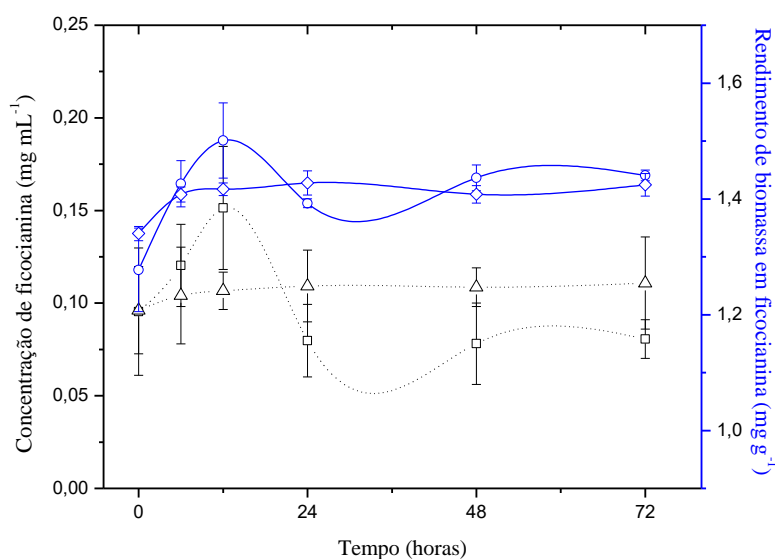
Sivasankari, Naganandhini e Ravindran (2014) avaliaram diferentes formas de extração de ficocianina de células da *S. platensis*, obtendo concentrações de 0,17 mg L⁻¹ e 0,32 mg L⁻¹ de ficocianina utilizando solução tampão fosfato e ciclos de congelamento e descongelamento, respectivamente. Porém, como trata-se de uma cianobactéria filamentosa, as células de *S. platensis* possuem formato helicoidal e tamanho muito superior, com diâmetro de 10 µm e comprimento que pode atingir centenas de µm (MORAES et al., 2013), enquanto as células de *A. microscopica* são elípticas e medem aproximadamente 9,0 – 9,5 µm por 4,0 – 4,2 µm (ESTEVES, 1988; JACOB-LOPES; LACERDA; FRANCO, 2008).

No meio de cultivo suplementado com 2,5 mL de vinhaça, por exemplo, ocorre uma perda de aproximadamente 25% nas etapas de extração somente com solução tampão e quatro ciclos de congelamento e descongelamento. Microalgas de tamanho muito reduzido, como *A. microscopica*, geralmente possuem paredes celulares com várias camadas, o que resulta em células muito resistentes à ruptura celular, fazendo com que o processo de extração seja muito mais difícil (MORAES et al., 2011; STEWART e FARMER, 1984). De qualquer forma esta perda em termos

de massa total pode ser minimizada desde que sejam obtidas concentrações celulares mais elevadas, o que seria possível considerando que as cianobactérias unicelulares tendem a apresentar velocidades de crescimento superiores às filamentosas (QUEIROZ et al., 2007).

Os efeitos da suplementação do meio BG11 com 2,5 mL de vinhaça na produção de ficocianina por *A. microscopica* em cultivos mixotróficos e fotoautotróficos (controle) foram investigados através de bateladas por 72 horas. A Figura 5 indica os teores e rendimentos em ficocianina obtidos para estes cultivos. O rendimento máximo de ficocianina foi alcançado após 12 horas de cultivo em condições mixotróficas, e em 72 horas em condições fotoautotróficas (1,5 e 1,42 mg ficocianina g⁻¹ biomassa, respectivamente); e a concentração máxima de ficocianina foi obtida também após 12 horas de cultivo em condições mixotróficas (0,15 mg mL⁻¹). Neste contexto, pode-se inferir que *A. microscopica* possui capacidades metabólicas versáteis, visto que o pigmento foi produzido em quantidades similares mesmo sob diferentes regimes de cultivo.

Figura 5 - Concentração e rendimento de biomassa em ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivado em meio padrão BG11 (controle), e meio padrão suplementado com vinhaça em 72 horas de cultivo.



Legenda: (Δ) controle, mg mL⁻¹; (□) BG11 e vinhaça, mg mL⁻¹; (◇) controle, mg g⁻¹ e (○) BG11 e vinhaça, mg g⁻¹. Linhas traçadas representam a concentração de ficocianina, enquanto as linhas sólidas representam o rendimento

O estresse causado pela presença e ausência de luminosidade é fundamental para promover mudanças nos padrões de produção de pigmentos durante os cultivos de microalgas, o que destaca a flexibilidade do seu metabolismo. A mudança na luminosidade usualmente leva ao aumento da produção de pigmentos (STREIT et al., 2017), que pode ser observado nas primeiras 12 horas de cultivo, quando *A. microscopica* aumentou a produção de ficocianina. Streit et al. (2017) avaliaram a produção de pigmentos por *A. microscopica* cultivada em resíduos da indústria de laticínios, obtendo rendimento máximo de ficocianina de 73,1 mg g⁻¹.

Cheng e Zhang (1997) estudaram a produção de ficocianina por *S. platensis* sob condições autotróficas e mixotróficas, através de um sistema de batelada alimentada. Em condições autotróficas, a taxa de produção de pigmento foi constante, o que não foi observado quando *S. platensis* cresceu em regime mixotrófico, onde a glicose representava a fonte de carbono orgânico disponível. Sob condições mixotróficas, a produção de ficocianina variou de 54 mg g⁻¹ a 125 mg g⁻¹ durante 300 horas de cultivo. Embora nossos resultados apresentem valores inferiores, é importante notar que outras características importantes para o desenvolvimento de bioprocessos não foram consideradas, além de que diferentes métodos de extração de ficocianina não foram estudados para *A. microscopica*.

A Figura 5 mostra que as primeiras 12 horas de cultivo apresentam a maior variabilidade na produção de ficocianina em regime mixotrófico (1,28 mg g⁻¹ a 1,50 mg g⁻¹), o que pode ser explicado pelas mudanças contínuas no predomínio do metabolismo fotoautotrófico ou heterotrófico (CHEN e ZHANG, 1997).

A produção de ficocianina em cultivos mixotróficos também foi reportada por Sloth et al (2006). Os autores concluíram que maiores quantidades de ficocianina foram produzidas em menores intensidades luminosas por *G. sulphuraria* 074G, independente da fonte de carbono utilizada.

Os parâmetros cinéticos do cultivo de *A. microscopica* podem ser encontrados na Tabela 7, que mostra velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) de 0,025 h⁻¹ para o cultivo mixotrófico com 2,5 mL de vinhaça, e 0,010 h⁻¹ para o cultivo fotoautotrófico (controle). O fato de que o cultivo mixotrófico apresenta $\mu_{\text{máx}}$ maior não é incomum para *A. microscopica*, pois o mesmo comportamento pode ser observado em outros estudos (STREIT et al., 2017; JACOB-LOPES et al., 2008), indicando que essa cianobactéria é fortemente influenciada pelo meio de cultura em que é cultivada.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos dos cultivos mixotróficos de *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG11 suplementado com 2,5 mL de vinhaça. Os parâmetros cinéticos do controle estão representados como cultivo fotoautotrófico.

Parâmetro	Mixotrófico	Fotoautotrófico
$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	0,025	0,010
t_g (h)	27,72	69,31
$X_{\text{máx}}$ ($\text{mg}_{\text{biomassa}} \text{L}^{-1}$)	504	404
$\text{Prod}_{\text{máx}}$ ($\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,0047	0,0011
μ_P ($\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{h}^{-1}$)	9,86	2,81

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica de crescimento máxima; t_g : tempo de geração celular; $X_{\text{máx}}$: concentração celular máxima; $\text{Prod}_{\text{máx}}$: produtividade máxima de ficocianina; μ_P : velocidade específica de produção de ficocianina.

Cheng et al (1996) avaliaram a produção de ficocianina por *S. platensis* sob condições fotoheterotróficas, utilizando glicose e acetato como fontes de carbono. O uso destes substratos aumentou a velocidade de crescimento e produção de ficocianina, obtendo $\mu_{\text{máx}}$ de $0,026 \text{ h}^{-1}$ e $0,022 \text{ h}^{-1}$ para glicose e acetato, respectivamente. Esses valores se assemelham ao $\mu_{\text{máx}}$ obtido para o cultivo mixotrófico de *A. microscopica* em meio sintético suplementado com 2,5 mL de vinhaça ($0,025 \text{ h}^{-1}$). Os autores indicam concentração máxima de $0,322 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,246 \text{ mg mL}^{-1}$ de ficocianina, quando *S. platensis* foi cultivada em glicose e acetato, sendo estes valores aproximadamente 2 vezes menores quando *A. microscopica* foi cultivada em vinhaça de cana-de-açúcar ($0,1514 \text{ mg mL}^{-1}$).

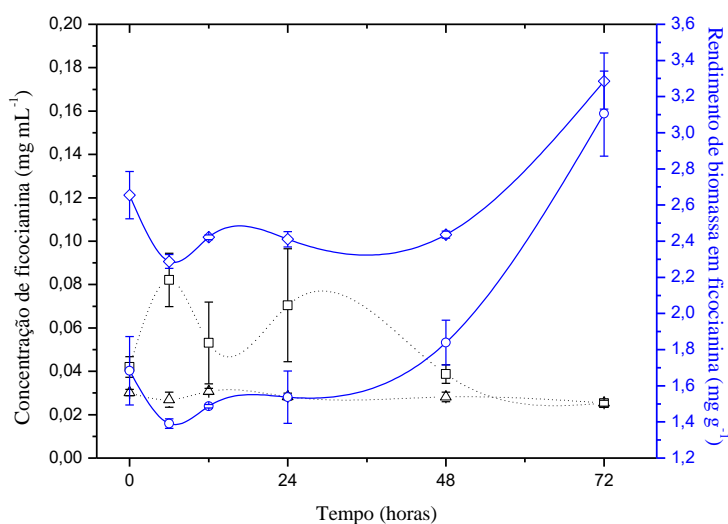
5.3 Produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG11 com vinhaça

O cultivo de cianobactérias em condições heterotróficas no escuro pode causar grandes mudanças estruturais às células, assim como interferir na organização funcional do aparato fotossintético destes micro-organismos (MANNAN e PAKRASI, 1993). Considerando que os cultivos mixotróficos apresentados no item 5.2 já apresentam uma limitação pela luminosidade, procedeu-se experimentos em

sistemas puramente heterotróficos. Podemos observar na Figura 6 que as maiores concentrações de ficocianina foram obtidas nas primeiras 12 horas de cultivo em meio suplementado com vinhaça, ao contrário do controle, onde a concentração do pigmento diminuiu sutilmente durante as primeiras horas de cultivo, assim como no cultivo mixotrófico.

Taufiqurrahmi et al. (2017) avaliaram a produção de ficocianina por *S. platensis* utilizando como meio de cultura o carvão obtido de cascas de arroz. O uso deste resíduo aumentou a concentração celular em 60% durante 8 dias de cultivo, alcançando $1,20 \text{ mg mL}^{-1}$ de ficocianina, valor 59,1% inferior do que àquele obtido quando *S. platensis* foi cultivada no meio MSI (mineral). Este comportamento não foi observado no cultivo de *A. microscopica* em vinhaça (Figura 6), onde a concentração de ficocianina foi aproximadamente o dobro à observada no cultivo controle (meio BG11).

Figura 6 - Concentração e rendimento de biomassa em ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivado em meio padrão BG11 (controle), e meio padrão suplementado com vinhaça em 72 horas de cultivo.



Legenda: (Δ) controle, mg mL^{-1} ; (□) BG11 e vinhaça, mg mL^{-1} ; (◇) controle, mg g^{-1} e (○) BG11 e vinhaça, mg g^{-1} . Linhas traçadas representam a concentração de ficocianina, enquanto as linhas sólidas representam o rendimento.

Analisando o perfil de produção da ficocianina, mesmo estando na mesma faixa de erro, a produtividade em 6 horas é superior à obtida em 12 horas, isto é,

0,007 contra 0,0009 mg_{ficocianina} L⁻¹ h⁻¹). Estes resultados sugerem que este tipo de produção deve ser realizado em sistemas com baixos tempos de batelada. Além disso, sabe-se que os cultivos heterotróficos apresentam uma tendência maior a contaminação devido à disponibilidade de carbono orgânico, o que torna processos com tempos de batelada menores mais interessantes. Deve-se destacar que, a julgar pela velocidade específica de produção de ficocianina ($\mu_P = 22,59 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), a obtenção do pigmento, mesmo que nas primeiras horas, foi superior aos cultivos mixotróficos. Geralmente, cultivos mixotróficos apresentam velocidades específicas de crescimento superiores aos cultivos heterotróficos (CHEIRSILP e TORPEE, 2012; MOHAMMAD et al., 2016; ZHOU et al. 2013). Porém, Chojnacka e Noworyta (2004), ao estudarem o cultivo fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico de *S. platensis*, reportaram que a velocidade específica de crescimento dos cultivos mixotróficos só eram superiores (0,055 h⁻¹) aos cultivos heterotróficos e fotoautotróficos para luminosidades superiores a 30 W m⁻², e concentração de glicose de 0,5 g L⁻¹. A concentração teoricamente ideal de glicose nos cultivos heterotróficos e baixas intensidades luminosas nos cultivos mixotróficos fez com que os cultivos heterotróficos possuíssem maiores taxas de crescimento em alguns casos. Portanto, faz-se necessário que outros parâmetros sejam estudados nos cultivos mixotróficos com *A. microscopica*, sendo a intensidade luminosa um fator de extrema importância.

Streit et al (2017) estudaram o cultivo heterotrófico de *A. microscopica* em resíduos industriais lácteos, assim como a produção de pigmentos. A velocidade de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g) e concentração celular obtidos foram de 0,066 h⁻¹, 10,50 h e 590 ± 15 mg L⁻¹. Em nossos estudos, a velocidade de crescimento obtida foi mais que o dobro (0,141 h⁻¹), além de menor tempo de geração, o que indica o potencial da vinhaça como um excelente suplemento para o cultivo de *A. microscopica* (Tabela 8).

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos da produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nãgeli em meio BG11 suplementado com vinhaça

Parâmetros	Valores
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	0,141
t_g (h)	4,92
$X_{m\acute{a}x}$ (mg _{biomassa} L ⁻¹)	402
Prod _{m\acute{a}x} (mg _{ficocianina} L ⁻¹ h ⁻¹)	0,0067
μ_P (mg _{ficocianina} mg _{biomassa} ⁻¹ h ⁻¹)	22,59

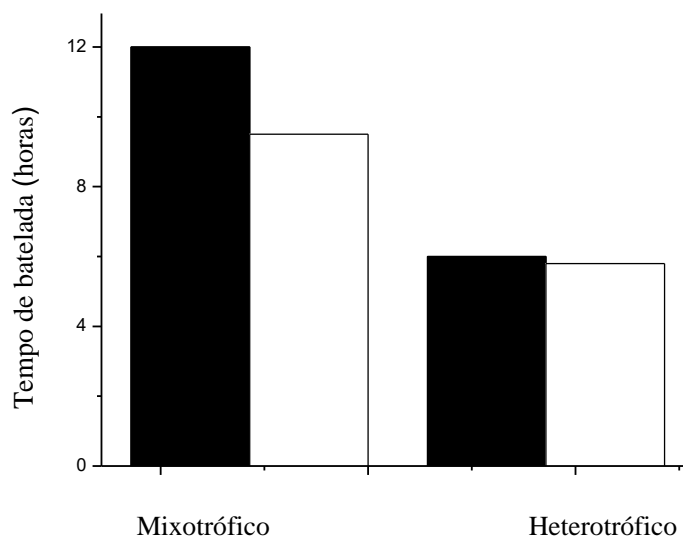
$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica de crescimento máxima; t_g : tempo de geração celular; $X_{m\acute{a}x}$: concentração celular máxima; Prod_{m\acute{a}x}: produtividade máxima de ficocianina; μ_P : velocidade específica de produção de ficocianina.

De acordo com Doran (2012), a Equação 9 descreve o balanço de massa para produtos em biorreatores batelada com micro-organismos, onde temos que o tempo de batelada ideal (t_b), ou seja, o menor possível, está relacionado com parâmetros cinéticos tais como $\mu_{m\acute{a}x}$, μ_P , inóculo (X_o) e produção ($P_f - P_o$; diferença entre final e inicial):

$$t_b = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln \left[1 + \frac{\mu_{m\acute{a}x} (P_f - P_o)}{X_o \mu_P} \right] \quad (9)$$

Nesse sentido, partindo dos resultados experimentais obtidos nos itens 5.2 e 5.3, pode-se estimar o tempo de batelada ideal (teórico). Conforme apresentado na Figura 7, o t_b calculado para cultivo heterotrófico (5,8 horas) é similar ao tempo experimental de máxima produção de ficocianina (6 horas), indicando que esta condição já está otimizada para formação deste produto nas condições do estudo.

Figura 7 - Comparação entre os tempos de batelada experimentais (barra preta) e teóricos (barras brancas) na produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivos mixotrófico e heterotrófico



De forma geral, a literatura relata concentrações superiores de ficocianina obtidas por cultivos autotróficos (MORAES et al., 2011), o que pode ser justificado pela redução da taxa fotossintética destas cianobactérias no escuro em meios com carbono orgânico. Apesar das baixas concentrações do pigmento nos cultivos heterotróficos, como apenas algumas linhagens apresentam este metabolismo versátil, os cultivos heterotróficos facilitam a produção uniespecífica, porém não axênica, em larga escala, resultando em conteúdos mais elevados de biomassa e maior rendimento em ficocianina (BUCHWEITZ, 2016).

5.4 Efeito do inóculo, pH e salinidade na produção de ficocianina por cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em BG11 suplementado com vinhaça

Considerando que nos cultivos heterotróficos foram obtidas as maiores velocidades específicas de produção de ficocianina, embora com valores ainda inferiores à obtenção fotoautotrófica convencional, foi proposto um delineamento experimental para avaliar o efeito da quantidade de inóculo, pH e salinidade (em termos de cloreto de sódio [NaCl]). Cabe ressaltar que estas variáveis são citadas

frequentemente como importantes na produção de pigmentos por microalgas (DESHMUKH e PURANIK, 2012; MOHITE e WAKTE, 2011; SHARMA et al., 2014; SORNCHAI e IAMTHAM, 2013).

Neste contexto, a Figura 8 apresenta o Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de ficocianina. Os resultados indicam que, apesar da maior produção de ficocianina ($36,8 \text{ mg L}^{-1}$) ocorrer em pH 7,5, inóculo 300 mg L^{-1} e $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl), não há efeito significativo das variáveis ao nível de 5% de significância nas faixas testadas de pH (5,5 a 9,5), inóculo (100 a 500 mg L^{-1}) e salinidade ($0,2$ a $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl). Por outro lado, a menor produção de ficocianina ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$) ocorreu nas condições pH 6,3, 180 mg L^{-1} de inóculo e $0,52 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl.

A produção de ficobiliproteínas por cianobactérias é tida como um fenômeno dependente do pH (DESHMUKH e PURANIK, 2012; HONG e LEE, 2008), aumentando a sua concentração em condições alcalinas (DESHMUKH e PURANIK, 2012). Porém, no delineamento experimental, a condição com maior produção de ficocianina apresentava pH 7,5. Em termos cinéticos, maior μ_P foi alcançada pelo ensaio 7, com pH 6,3, indicando que *A. microscopica* produz maiores quantidades de ficocianina em pHs próximos à neutralidade. Utilizando-se μ_P como critério de avaliação, a melhor (ensaio 7) e pior (ensaio 13) condição mostram a importância da salinidade para a produção de ficocianina. O ensaio 7, apresentava $0,52 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl (adicionais ao NaCl adicionado ao meio BG11 em sua composição padrão), enquanto o ensaio 13 continha $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl em seu cultivo. Estes resultados indicam a importância da salinidade para o processo, confirmado pelas estimativas do Gráfico de Pareto, que salienta a importância do efeito do inóculo e da interação do inóculo com a salinidade (Fig 8). Sharma et al. (2014) estudaram o efeito da salinidade, pH e concentração de carbono na produção de ficobiliproteínas por *S. platensis*. Para a produção de ficocianina, as melhores condições encontradas foram $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de salinidade, ausência de carbono e pH 7. Assim como *A. microscopica*, *S. platensis* produz mais ficocianina em pHs na faixa de neutralidade, e os teores próximos de salinidade evidenciam a sua relevância para o processo.

Quanto ao crescimento celular, o mesmo também não houve diferença significativa com a variação de pH, inóculo e salinidade (Figura 9), mesmo havendo uma produção maior ($5,0 \cdot 10^5$ células por mL) na condição de pH 8,7, inóculo 419 mg L^{-1} e $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Muruga et al. (2014) avaliaram o efeito de variáveis

físico-químicas (pH, salinidade e temperatura) no crescimento de cianobactérias isoladas do Lago Magadi (Quênia), um ambiente hipersalino. Quatro isolados apresentaram maiores taxas de crescimento em pH 6, enquanto dois outros isolados desenvolveram-se melhor em pH 7. Porém, todos os isolados cresceram em todas as faixas de pH testadas (6 a 10). Além disso, os isolados apresentaram altas taxas de crescimento em baixas salinidades, inclusive na ausência de NaCl. Estes resultados mostram a flexibilidade metabólica das cianobactérias, que podem crescer em pHs levemente acidificados à alcalinos, e em diversas condições de salinidade.

O efeito do pH no crescimento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 foi estudado por Touloupakis et al. (2016). Crescimento ótimo foi alcançado quando estes microorganismos foram cultivados em pH neutro, porém, as perdas em produtividade foram irrisórias (cerca de 8%) quando os cultivos ocorreram em pH entre 7,5 e 10.

Figura 8 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis inóculo, pH e salinidade na produção de ficocianina

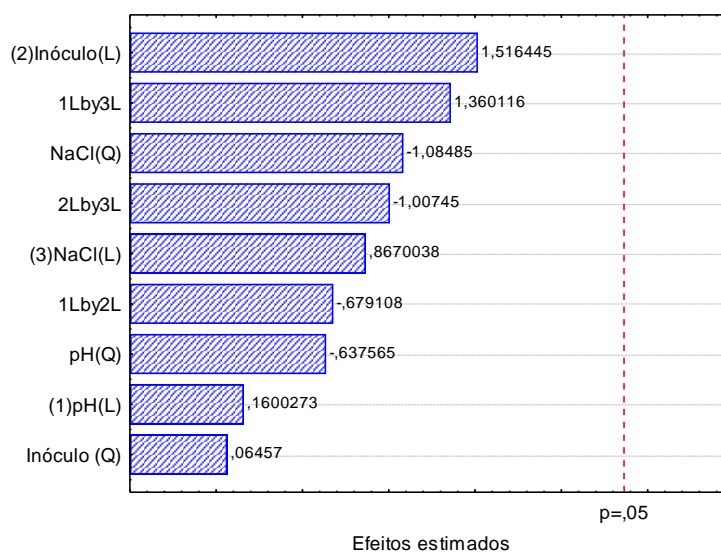
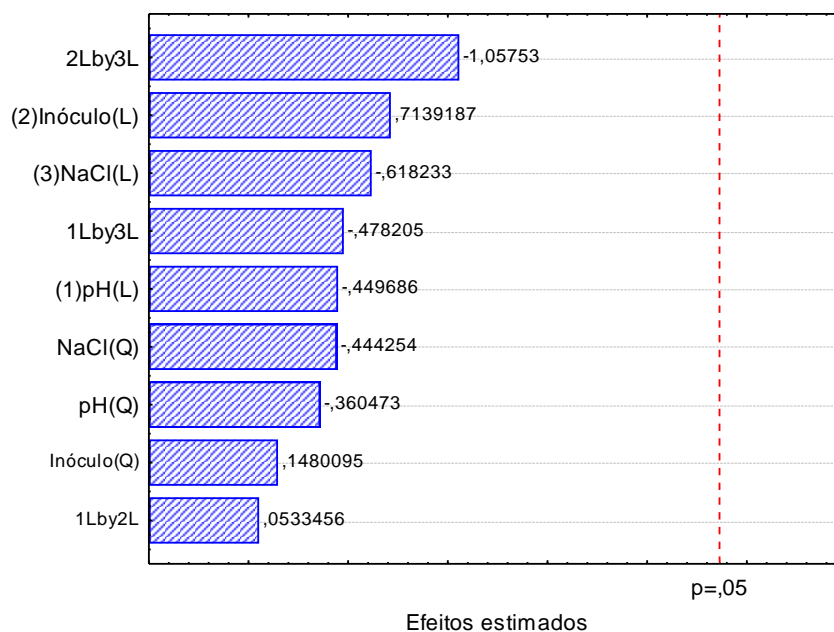


Figura 9 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis inóculo, pH e salinidade no crescimento celular



O fato do delineamento experimental indicar que não houve diferença significativa das variáveis testadas nestas condições indica uma estabilidade na produção de ficocianina, o que é importante analisando em termos de escalonamento de bioprocessos. Embora seja relatado em outros trabalhos, nas condições experimentais conduzidas, não haveria um impacto na produção de ficocianina para uma faixa ampla de pH, salinidade e quantidade de inóculo.

Essa plasticidade conferida às cianobactérias é também muito importante na prevenção de contaminação dos processos por outros micro-organismos, principalmente em condições heterotróficas, visto que muitas espécies de microalgas podem se desenvolver em pHs alcalinos e altas salinidades. Sendo assim, estes ensaios foram analisados em termos da cinética de crescimento e produção de ficocianina ($\mu_{\text{máx}}$, t_g , $X_{\text{máx}}$, $\text{Prod}_{\text{máx}}$ e μ_P). As condições selecionadas para ensaios em biorreator de bancada (com maior volume de meio e monitoramento de pH e oxigênio) foram avaliadas utilizando-se μ_P como parâmetro cinético, visto que não houve diferença estatística entre as concentrações de ficocianina obtidas nos 17 ensaios. Assim, os ensaios que obtiveram maior e menor $\mu_{P\text{máx}}$ (121,4 e 2,16 $\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente), foram selecionados para o escalonamento.

5.5 Avaliação da produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli em biorreator de bancada

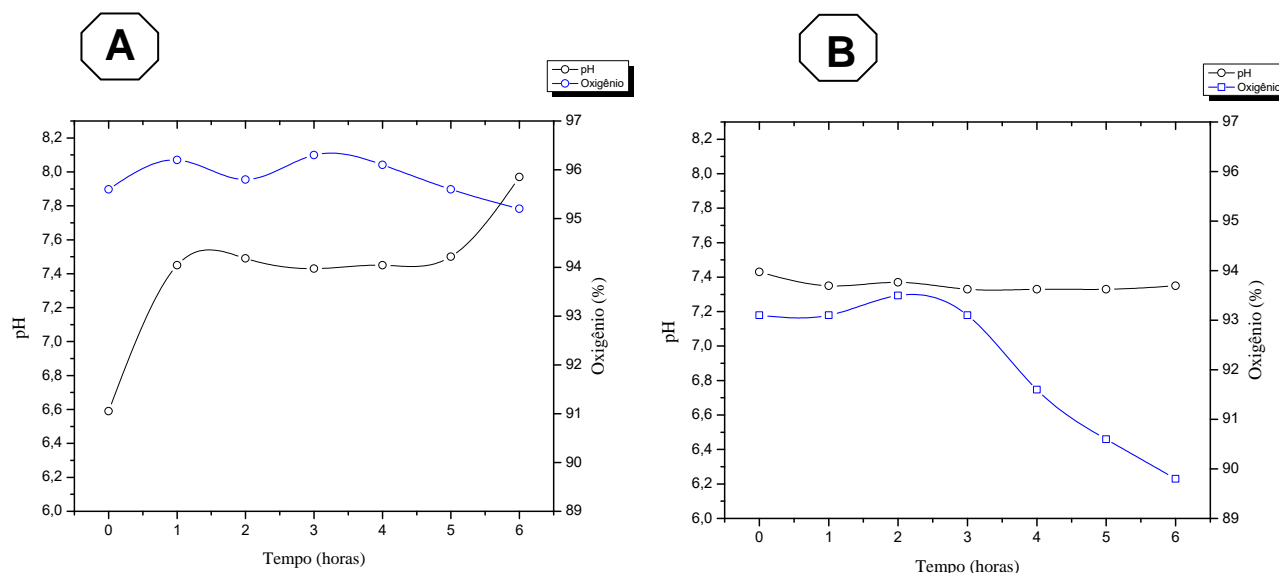
Considerando que o delineamento experimental não apresentou otimização significativa das variáveis inóculo, pH inicial e salinidade, buscou-se avaliar em escala de bancada partindo-se dos ensaios onde foram obtidos o maior e menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$, parâmetro cinético considerado mais importante em termos de produção de ficocianina.

O suprimento de oxigênio é um fator fundamental durante cultivos heterotróficos de cianobactérias. O oxigênio (O_2) é importante para a manutenção celular e biossíntese de componentes celulares (JACOB-LOPES et al., 2010; OSBORNE e GEIDER, 1989; SANTOS et al., 2017). A limitação no suprimento e transferência de O_2 durante os cultivos microbianos aeróbios afeta consideravelmente o desempenho em termos de crescimento e produção de metabólitos. A agitação e aeração são parâmetros necessários para evitar regiões de anaerobiose nos biorreatores, principalmente em meios com alta viscosidade (CHOJNACKA e MARQUEZ-ROCHA, 2004; SANTOS et al., 2017). Por isso, a agitação dos cultivos foi ajustada de 100 rpm (condição aplicada aos frascos Erlenmeyer em agitador orbital) para 72 rpm, considerando a relação geométrica entre os frascos e o vaso do biorreator de bancada.

Durante a respiração, O_2 é consumido e CO_2 produzido, sendo que a quantidade de energia liberada pela combustão de qualquer substrato orgânico é orientada para diversas funções como o crescimento e divisão celular (PEREZ-GARCIA et al., 2011). A taxa de consumo de O_2 varia durante o ciclo celular e a respiração no escuro aumenta de acordo com a taxa de crescimento (LLOYD, 1974; PEREZ-GARCIA et al., 2011). A Figura 10 apresenta os perfis de consumo de oxigênio durante os cultivos em biorreator de bancada. Em ambos os ensaios, a concentração de oxigênio diminuiu durante o cultivo, sugerindo o seu consumo pelas células de *A. microscopica*. Comparando-se ambas as figuras, nota-se que na condição de menor taxa específica de produção de ficocianina (ensaio 13) houve uma diferença 10 vezes maior entre a quantidade de oxigênio inicial fornecida ao cultivo, e ao final de 6 horas de experimento, quando comparada com o ensaio 7. Porém, cabe ressaltar que o teor de oxigênio se manteve acima de 90% da

saturação, indicando um baixo consumo pela cianobactéria, o que é importante em termos de escalonamento do processo.

Figura 10 - Evolução do pH e oxigênio durante o cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ e B) menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$



O cultivo de microalgas em condições mixotróficas e heterotróficas poderiam proporcionar benefícios em termos ambientais, visto que a eficiência de remoção de nutrientes de resíduos industriais, agrícolas e municipais pelas microalgas é maior sob condições de aerobiose e heterotrofia no escuro (ANDRADE e COSTA, 2007; OBGONNA et al., 2000; LI et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2010, 2011; PEREZ-GARCIA e BASHAN, 2015; ZHOU et al., 2013).

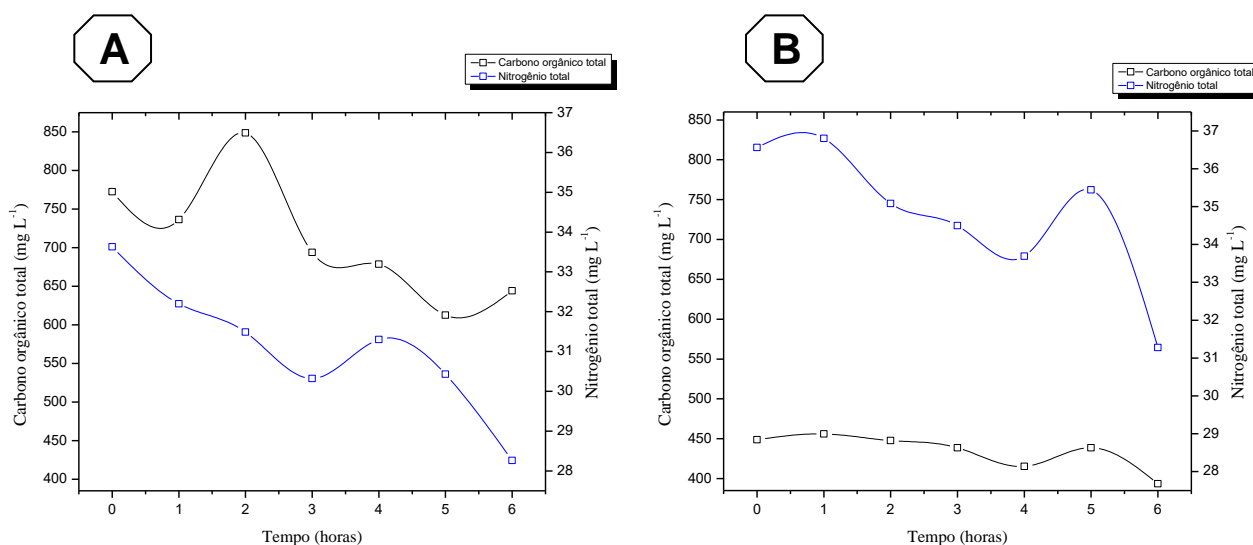
Águas residuárias provenientes do processamento agroindustrial geralmente possuem elevada turbidez e concentrações de nutrientes, além de compostos orgânicos solúveis ou não. Sendo assim, em termos de viabilidade das pesquisas, estas águas residuárias são geralmente diluídas para diminuir a turbidez (especialmente caso o tratamento aplicado ocorra em condições autotróficas), reduzindo também a concentração de nutrientes (GONZÁLEZ et al., 2008; JIA e YUAN, 2016; WOERTZ et al., 2009; ZHU et al., 2013).

O pH tende a interferir no consumo de nutrientes pelas microalgas. O pH ideal para remoção de nutrientes varia de acordo com a espécie celular. A microalga clorofícea *C. vulgaris*, por exemplo possui os maiores índices de remoção de nutrientes em pHs entre 7 e 8 (JIA e YUAN, 2016; ZHOU et al., 2015). Nos ensaios

em biorreator de bancada, o pH apresentou comportamentos diferentes nos dois cultivos, aumentando discretamente na condição de maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ (porém com períodos de estabilidade), e permanecendo estável na condição de menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$ (Figura 10). Como a influência do pH foi avaliada apenas em termos de produção de ficocianina, outros estudos são necessários para elucidar a importância desse parâmetro na remoção de nutrientes por *A. microscopica*.

O nitrogênio é essencial para a síntese dos componentes celulares das microalgas, como o material genético, enzimas, proteínas, hormônios, vitaminas, alcalóides e moléculas que transferem energia. Este nutriente está presente em abundância nas células, variando de 1 a 10% da massa seca das células (GROBBELAAR, 2013; JIA e YUAN, 2016). Os percentuais de remoção de nitrogênio variam de acordo com a espécie celular e tipo de molécula nitrogenada. *C. vulgaris*, por exemplo, alcançou 100% de remoção em 48 horas de cultivo em efluente secundário (JIA e YUAN, 2016; KIM et al., 2013); enquanto *Chlorella zofingiensis* removeu entre 65-80% de nitrogênio de águas residuárias de suinocultura em 96 horas (JIA e YUAN, 2016; ZHU et al., 2013). A concentração de nitrogênio total diminuiu em 15,97 e 14,44%, na melhor e pior condição avaliadas, respectivamente, durante 6 horas de cultivo (Figura 11).

Figura 11 - Evolução do carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) durante o cultivo de *Aphanothece* em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$ e B) menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$



NH_3 (amônia) é a forma inorgânica mais reduzida do nitrogênio, porém, o nitrogênio é comumente encontrado na natureza em formas menos reduzidas, como nitrato, nitrito e dinitrogênio. Compostos orgânicos como a ureia, aminoácidos, etc também são encontrados em alguns ecossistemas, porém, essas formas de nitrogênio geralmente requerem a sua redução para amônia antes de serem incorporadas aos esqueletos de carbono, através de processos que necessitam reduções e energia. Por este motivo, amônia é a fonte preferida de nitrogênio (MURO-PASTOR; REYES; FLORENCIO; 2005). A presença de nitrato, nitrito e nitrogênio amoniacal na vinhaça bruta têm sido reportados na literatura (PEDRO-ESCHER; MAZIVIERO; FONTANETTI, 2014).

O meio BG11 utilizado neste estudo apresenta nitrato de sódio em sua composição e, portanto, várias formas de nitrogênio poderiam estar disponíveis para *A. microscopica*. Rückert e Giani (2004) compararam o crescimento da cianobactéria *Microcystis viridis* em meio WC suplementado com amônia, nitrato e amônia + nitrato. *M. viridis* apresentou maior taxa de crescimento no tratamento com amônia do que com nitrato ($\mu_{\text{máx}}$ de 0,393 e 0,263 dia^{-1} , respectivamente). Porém, quando o meio WC foi suplementado com amônia e nitrato (na proporção de 1:1), *M. viridis* mostrou comportamento intermediário, com $\mu_{\text{máx}}$ igual a 0,325 dia^{-1} .

A remoção de amônia de águas residuárias se tornou um interesse ao redor do mundo, pois a amônia é tóxica para espécies aquáticas e causa eutrofização em corpos d'água (TCHOBANOGLIOUS et al., 2003; ZHU et al., 2008). Os compostos nitrogenados em águas residuárias são efetivamente removidos através de processos biológicos (EPA, 1993; ZHU et al., 2007a,b; ZHU et al., 2008).

Suvidha, Pandey e Sanjay (2016) estudaram faixas de utilização de carbono orgânico total (COT) e demanda química de oxigênio (DQO) a partir de águas residuárias provenientes de uma indústria alimentícia por *Chlorella* em condições mixotróficas. COT foi reduzido em até 92,9% (com DQO de 3000 mg L^{-1}), em seis dias de cultivo. Neste trabalho, *A. microscopica* removeu 16,59 e 12,32% de COT nos cultivos com maior e menor $\mu_{\text{Pmáx}}$, respectivamente. Mesmo que estes cultivos não tenham sido otimizados para a remoção de TOC e NT, percebe-se que as condições selecionadas como ótimas para a produção de ficocianina também são mais eficientes para a remoção destes compostos.

A concentração e o rendimento em ficocianina podem ser visualizados na Figura 12. A maior concentração de ficocianina obtida foi de 0,166 mg mL^{-1} para o

cultivo A, e $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$ para o cultivo B. Através da análise dos parâmetros cinéticos (Tabela 9) percebe-se que o processo conduzido com as condições que menos favorecem a produção de ficocianina apresentou $\mu_{\text{máx}}$ superior àquele em que as condições ótimas foram selecionadas, o que pode ser explicado pelo fato que a cinética relativa à produção de biomassa não foi levada em consideração para atribuir as condições que seriam aplicadas no biorreator de bancada. A melhor condição (A) apresentou μ_P superior ($49,18 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) à μ_P obtida para a pior condição ($33,83 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{ mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$), além de uma $\text{Prod}_{\text{máx}}$ cerca de duas vezes maior. Este comportamento sugere que a produção heterotrófica de ficocianina a partir de meio BG11 suplementado com vinhaça não está ligada diretamente ao crescimento, pelo menos durante as primeiras 6 horas de cultivo. Os resultados indicam um acúmulo de ficocianina no início do crescimento heterotrófico devido possivelmente à alternância do período luminoso (propagação do inóculo) e com o período escuro (cultivo).

Figura 12 - Evolução da concentração e rendimento de ficocianina durante o cultivo de *A. microscopica* em biorreator de bancada - A) maior $\mu_{P\text{máx}}$ e B) menor $\mu_{P\text{máx}}$.

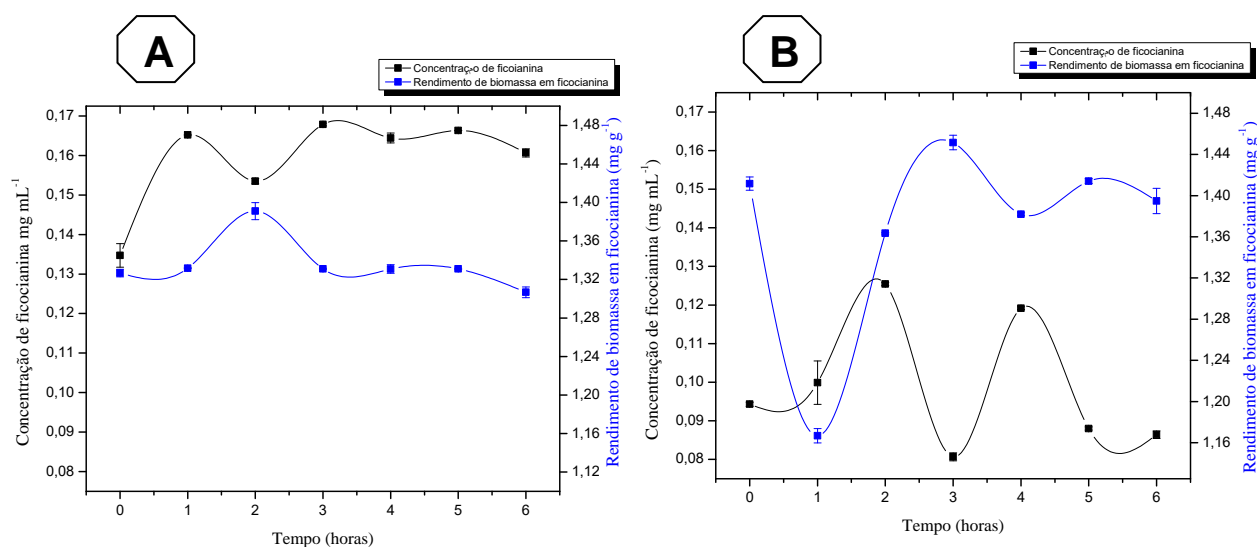


Tabela 9 - Parâmetros cinéticos dos cultivos heterotróficos em biorreator de bancada de *A. microscopica*

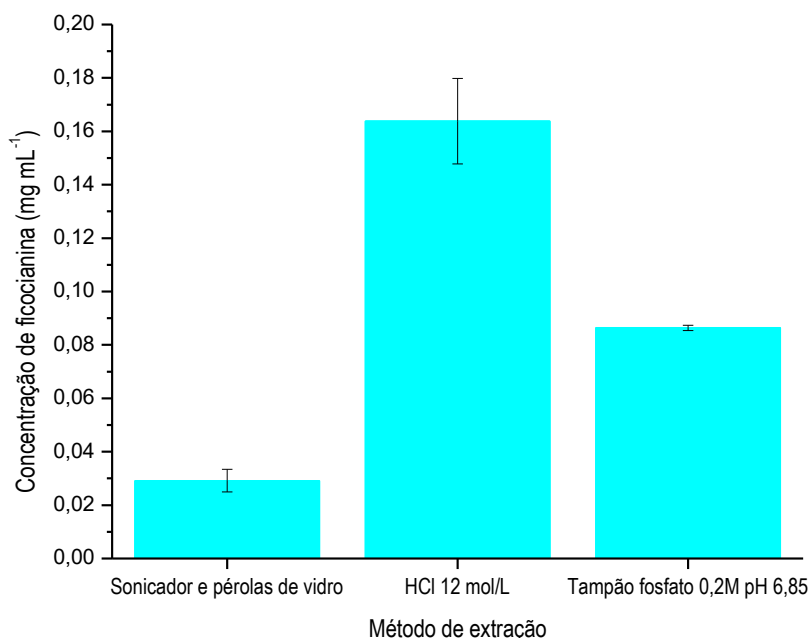
Parâmetro	Condição 7 - maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$	Condição 13 - menor $\mu_{Pm\acute{a}x}$
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0,225	0,248
t_g (h)	3,08	2,79
$X_{m\acute{a}x}$ ($mg_{biomassa} L^{-1}$)	630	460
$Prod_{m\acute{a}x}$ ($mg_{ficocianina} L^{-1} h^{-1}$)	0,030	0,015
μ_P ($mg_{ficocianina} mg_{biomassa}^{-1} h^{-1}$)	49,18	33,83

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidade específica de crescimento máxima; t_g : tempo de geração celular; $X_{m\acute{a}x}$: concentração celular máxima; $Prod_{m\acute{a}x}$: produtividade máxima de ficocianina; μ_P : velocidade específica de produção de ficocianina.

5.6 Comparação de diferentes métodos de extração de ficocianina

A Figura 13 apresenta os teores de ficocianina obtidos por diferentes métodos de extração, variando de 0,029 a 0,164 $mg mL^{-1}$. A sonificação com pérolas de vidro resultou na menor concentração de ficocianina (0,029 $mg mL^{-1}$), recuperação cerca de 5 vezes menor do que a extração com HCl 12 $mol L^{-1}$ (0,164 $mg mL^{-1}$).

Figura 13 - Concentrações de ficocianina obtidas sob diferentes métodos de extração



A extração através da sonicação é um método considerado eficiente e vantajoso, pois é geralmente rápido e não necessita de altas temperaturas, o que é importante para a extração de compostos sensíveis ao calor (DEY e RATHOD, 2013; HADIYANTO et al., 2015). A extração baseia-se na formação de bolhas de cavitação na superfície ou em volta das membranas celulares, causando colapso e ruptura das células (HADIYANTO et al., 2015; VINATORU, 2001). Diversos autores têm estudado a sonicação para a extração de compostos intracelulares, como pigmentos e lipídios (HADIYANTO et al., 2015; MITTAL et al., 2017; PEREIRA NETO et al., 2013).

Moraes et al. (2011) compararam 6 diferentes métodos de extração de ficocianina da biomassa úmida de *S. platensis*. Dentre os métodos testados (homogeneização das células com almofariz e pistilo, congelamento e descongelamento, extrações com ácidos orgânicos e inorgânicos, tratamento enzimático e sonicação), a sonicação na presença de pérolas de vidro apresentou os maiores rendimentos em ficocianina, seguido da extração com HCl 12 mol L⁻¹. Em nossos estudos, porém, a sonicação com pérolas de vidro foi o método mais inadequado em termos de recuperação do pigmento.

Sivasankari, Naganandhini e Ravindran (2014) avaliaram diferentes métodos de extração de ficocianina de *S. platensis*. Em intervalos de 24 horas de extração, as maiores concentrações de ficocianina foram obtidas na seguinte ordem: congelamento e descongelamento, ácido inorgânico (HCl 12 mol L⁻¹), tampão sódio fosfato, ácido orgânico (ácido acético 1 mol L⁻¹), homogeneização com almofariz e pistilo e sonicação. Estes resultados são similares àqueles obtidos em nossos estudos, onde a adição de HCl e tampão sódio fosfato resultaram em maiores concentrações de ficocianina do que a sonicação.

5.7 Caracterização da biomassa de *Aphanothece microscopica* Nägeli

As microalgas são consideradas fontes viáveis de proteínas. Seu teor de proteínas varia entre as espécies, sendo que algumas microalgas possuem níveis de proteínas similares a outras fontes tradicionais de proteínas, como carnes, ovos, soja e leite (BLEAKLEY e HAYES, 2017; FLEURENCE, 1999; GOUVEIA et al., 2008).

O teor de proteínas totais foi avaliado ao final dos cultivos em biorreator de bancada na condição selecionada de maior $\mu_{Pm\acute{a}x}$, sendo obtido 30,05 mg L⁻¹, perfazendo em torno de 4,6% de seu peso seco. Rajeshwari e Rajashekhar (2011) avaliaram a composição bioquímica de sete espécies de cianobactérias: *Calothrix fusca*, *Gloeocapsalivida*, *Lyngbya limnetica*, *Scytonema bohneri*, *Oscillatoria acuminata*, *O. calcuttensis* e *O. foreau*. A porcentagem de proteína total (em massa seca) encontrada para cada espécie foi, respectivamente: 1,6; 1,8; 3,1; 0,7; 6,9; 2,2 e 6,9%. As cianobactérias que apresentaram menores teores de proteína geralmente tiveram os maiores teores de carboidratos, mas não de lipídios.

O teor de carboidratos não foi avaliado para *A. microscopica* nas condições experimentais desta pesquisa. Porém, sabe-se que esta espécie apresenta mucilagem abundante (ESTEVES, 1988; JACOB-LOPES; LACERDA; FRANCO, 2008). Esta mucilagem, ou seja, material extracelular que forma camadas que cercam algumas espécies de cianobactérias, é principalmente composta de polissacarídeos (LI; HARDING; LIU, 2001). A deficiência de nitrogênio ou fósforo torna limitante o crescimento de membros do fitoplâncton, fazendo com que estes organismos acumulem carbono, enquanto que o acúmulo de nutrientes e determinadas vias metabólicas importantes para o crescimento e produção de

proteínas ficam limitados (BANSE, 1974; DE PHILIPPIS e VINCENZINI, 1998; ENGEL et al., 2004; PANNARD et al., 2015). Como a suplementação do meio BG11 com vinhaça não leva a limitação de nitrogênio, conforme a própria composição da água residuária (Tabela 7), é provável que a deficiência seja de fósforo, considerando o valor bem inferior deste elemento. O carbono em excesso pode ser excretado como polissacarídeos ou armazenado nas células como compostos de reserva (DE PHILLIPIS; SILI, VINCENZINI, 1996; PANNARD et al., 2015). Assim, o valor de proteínas totais inferior do que reportado para esta espécie em outras condições (STREIT et al., 2017) pode ter ocorrido devido a esta condição de formação de mucilagem nos cultivos em vinhaça.

Hornes et al. (2010), compararam a influência de compostos nitrogenados na concentração de proteína de *A. microscopica* cultivada em efluente da indústria de pescado. A porcentagem de proteína total variou de 48,1 a 72,4% do peso seco destas cianobactérias. *A. microscopica* apresentou maiores quantidades de proteína quando cultivada no efluente do que em meio padrão BG11, o que pode ser justificado pelo fato do meio BG11 apresentar basicamente NaNO_3 , enquanto o efluente do processamento do pescado contém formas mais reduzidas (como N-NH_4^+ , aminoácidos e uréia) e, portanto, podem ser assimiladas com mais facilidade pelas cianobactérias (ASPÉ; MARTÍ; ROECKEL, 1997; HORNES et al., 2010; LIM; KHIM, HWANG, 2003).

Silva e Abud (2016) reportaram $711 \pm 153 \text{ mg N L}^{-1}$ de nitrogênio total na vinhaça bruta, e $15,9 \pm 5,5 \text{ mg N L}^{-1}$ de nitrogênio amoniacal. A literatura é escassa para a caracterização da vinhaça em termos de nitrogênio amoniacal, nitrato, nitrito e nitrogênio total. Porém, sabe-se que estes parâmetros podem variar consideravelmente de acordo com vários fatores, como a variedade de cana-de-açúcar, processamento etc. A concentração destas formas de nitrogênio na vinhaça pode ter interferido na produção de proteínas por *A. microscopica*.

As microalgas têm recebido atenção devido ao seu potencial para a produção de biocombustíveis. Em comparação com biocombustíveis de primeira e segunda geração, este material obtido de microalgas é chamado de “terceira geração”, justificando-se devido às altas taxas fotossintéticas passíveis de serem obtidas, crescimento rápido, teores de lipídios de algumas espécies, além de demandarem menores volumes de água e menores áreas de cultivo do que culturas de terras

aráveis (HAN et al., 2016; MEDIPALLY, 2015; ZHU, 2014; ZHU, 2015; ZHU; LI; HILTUNEN, 2016).

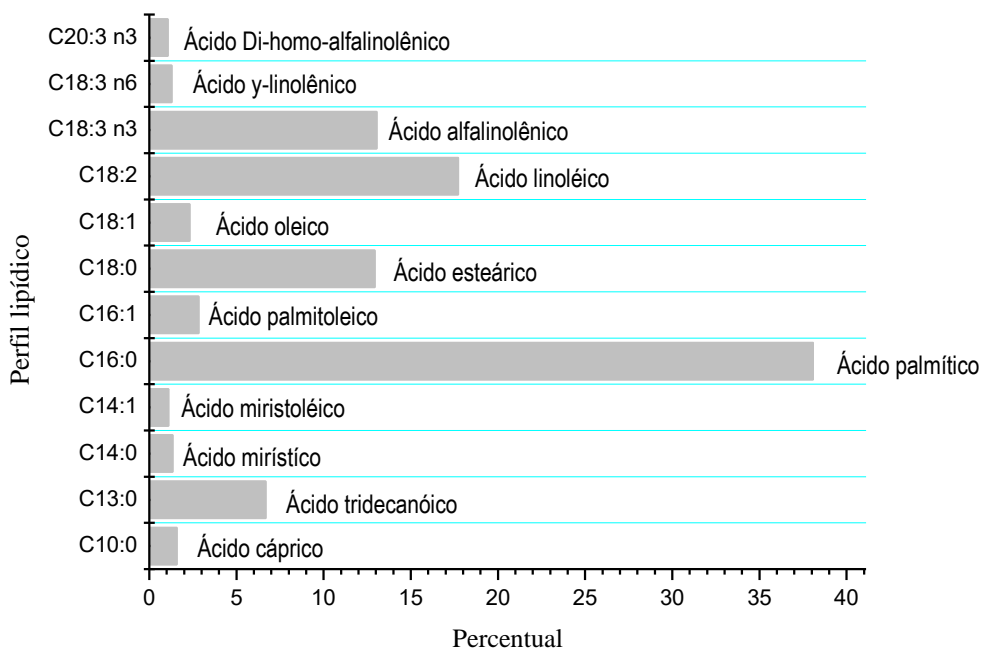
A produtividade em biomassa e teor de lipídios estão entre os principais parâmetros que afetam a viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir de óleos extraídos de microalgas e cianobactérias (CORDEIRO et al., 2017; DHUP e DHAWAN, 2014; LI et al., 2008). Porém, algumas técnicas podem ser empregadas para que ocorra maior acúmulo de lipídios nestes micro-organismos. Em resposta a limitação de nutrientes, por exemplo, o metabolismo das cianobactérias pode ser direcionado para a síntese de compostos de reserva, como ácidos graxos saturados, pausando a divisão celular e, dessa forma, reduzindo as taxas de crescimento (ALONSO et al., 2000; CORDEIRO et al., 2017; XIN et al., 2010).

De acordo com a Equação 8, *A. microscopica* apresentou 6,38% de lipídios em sua biomassa após o cultivo heterotrófico no escuro suplementado com vinhaça. Este teor de lipídios está próximo aos valores reportados por Zepka et al. (2008), onde a biomassa de *A. microscopica* cultivada no efluente da parboilização do arroz apresentou 7,15 – 7,90% de lipídios. O perfil de ácidos graxos foi estudado pelos autores, sendo os ácidos graxos poliinsaturados γ -linoléico, palmítico e linoléico presentes em maiores quantidades.

Os lipídios encontrados em microalgas são geralmente ésteres de glicerol e ácidos graxos com cadeias de 14 a 24 carbonos, com ligações saturadas e insaturadas (ZEPKA et al., 2008). As microalgas podem apresentar proporções consideráveis de ácidos graxos insaturados, variando de 25 a 60% (BOROWITZA, 1988; ZEPKA et al., 2008).

A Figura 14 apresenta o perfil lipídico de *A. microscopica* após cultivo em meio BG11 suplementado com vinhaça, sob condições heterotróficas. A biomassa de *A. microscopica* apresentou a seguinte composição de ácidos graxos (percentual em massa): ácido palmítico (38,07%), linoléico (17,72%), α -linoléico (13,05%), esteárico (12,94%), tridecanóico (6,67%), palmitoleico (2,84%), oleico (2,32%), cáprico (1,58%), mirístico (1,34%), γ -linoléico (1,3%), miristoleico (1,09%), di-homo-alfalinolênico (1,07%).

Figura 14 - Perfil lipídico (percentual em massa) de *Aphanothece microscopica* Nágeli cultivada em meio BG11 suplementado com vinhaça



O ácido palmítico (C16:0) serve como um precursor de ácidos graxos saturados de cadeia longa, podendo formar o ácido esteárico e outros ácidos graxos saturados pela adição subsequente de grupos acetilo. A maioria das cianobactérias possui desaturases e elongases, enzimas necessárias para a síntese de vários ácidos graxos poliinsaturados (CHIOU et al., 2001; SANTOS et al., 2017).

O perfil de ácidos graxos obtido nas condições experimentais sugere um potencial de aproveitamento da biomassa gerada em diversas áreas tecnológicas, sendo fundamental estudos mais aprofundados a respeito da influência de parâmetros de processo nestes valores.

6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais, foi possível concluir preliminarmente que:

- A vinhaça pode ser utilizada como suplemento para o cultivo de *A. microscopica* tanto em condições mixotróficas como heterotróficas;
- A maior produção de ficocianina ocorre em meio com 10% de vinhaça (relativos ao volume de meio e suspensão algal) em 6 horas em cultivo heterotrófico;
- Nessas condições, a produção de ficocianina ocorre para uma ampla faixa de pH, inóculo e salinidade, ou seja, não há diferença significativa para as variáveis testadas;
- *A. microscopica* pode reduzir a concentração de carbono e nitrogênio presentes na vinhaça enquanto produz ficocianina;
- *A. microscopica* possui diversidade entre os lipídios presentes em sua biomassa.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar outros métodos de extração de ficocianina da *A. microscopica*;
- Avaliar a produção de ficocianina por *A. microscopica* a partir de outras águas residuárias, assim como o efeito de outras fontes de nitrogênio;
- Estudar o efeito da agitação e transferência de oxigênio no cultivo heterotrófico desta cianobactéria;
- Avaliar o potencial de aproveitamento da fração lipídica da biomassa gerada a partir de vinhaça;
- Estudar o potencial de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo, além da incorporação de potássio na produção de ficocianina por *A. microscopica* em diferentes condições experimentais.

8 LITERATURA CITADA

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of Phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v.136, p.109–120, 1998.

ABE, K.; NISHIMURA, N.; HIRANO, M. Simultaneous production of β -carotene, vitamin E and vitamin C by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p.331-336, 1999.

ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industries. **World Journal of Dairy Food Science**, v.6, p.71–78, 2011.

ALIHOSSEONI, F.; KOU-SAN, J., JOZSEF, L., BRUCE, D., HAMMOCK, G. S. Antibacterial Colorants: Characterization of Prodiginines and Their Applications on Textile Materials. **Biotechnology Progress**, v.24, p.742-747, 2008.

ALONSO, D. L.; BELARBI, E. H.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; RODRÍGUEZ-RUIZ, J.; GRIMA, E. M. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytochemistry**, v.54, n.5, p.461-471, 2000.

AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.73, n.3, p.914-922, 2015.

ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. 1ª edição. Burlington. Elsevier, 2005. 565 p.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 24/09/2017.

ASPÉ, E.; MARTÍ, C.; ROECKEL, M. Anaerobic treatment of fishery wastewater using a marine sediment inoculum. **Water Research**, v. 31, n. 9, p. 2147-2160, 1997.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: Estimativa de custos e perspectiva de custos para o Brasil**. 2012. 171 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BANSE, K. On the interpretation of data for the carbon-tonitrogen ratio of phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v.19, p.695–699, 1974.

BARROS, A. I.; GONÇALVES, A. L.; SIMÕES, M.; PIRES, J. C. M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p.1489– 1500, 2015.

BASTOS, R. G.; BONINI, M. A.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli with potential for biomass products. **Desalination and Water Treatment**, v.56, n.3, p.608-614, 2015.

BASTOS, R. G.; PAIVA, P. R.; RIGO, M.; VEIGA, G.; QUEIROZ, M. I. Growth of cyanobacteria *Aphanothece sp.* on exogenous sugars. **Bioscience Journal**, v.27, n.1, p.156-161, 2011.

BASTOS, R. G.; QUEIROZ, M. I.; ALMEIDA, R. V.; ALMEIDA, T. L.; BENERI, R. L.; PADILHA, M. Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica* Nägeli na ausência de luminosidade. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.9, n.2, p.112-116, 2004.

BATISTA, A. P.; GOUVEIA, L.; BANDARRA, N. M.; FRANCO, J. M.; RAYMUNDO, A. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. **Algal Research**, v.2, p.164-173, 2013.

BLEAKLEY, S.; HAYES, M. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production. **Foods**, v.6, n.33, p.1-34, 2017.

BEGUM, H.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; KHATOON, H.; SHARIFF, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n.13, p.2209-2222, 2015.

BEHERA, S.; SINGH, R.; ARORA, R.; SHARMA, N. K.; SHUKLA, M.; KUMAR, S. Scope of algae as third generation biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.2, n.1, p.1-13, 2014.

BEN-AMOTZ, A.; EDELSTEIN, S.; AVRON, M. Use of the β -caroten rich alga *Dunaliella bardawil* as a source of retinol. **British Poultry Science**, v.27, p.613-619, 1986.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complimentary Chromatic Adaptation in a Filamentous BlueGreen Alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419, 1973.

BHASKAR, S. U.; GOPALASWAMY, G.; RAGHU, R. A simple method for efficient extraction of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* Geitler. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43, p.277-279, 2005.

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

BRASIL. ANVISA. **Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961**. Disponível em: <[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)> 2017a. Acesso em: 24/09/2017

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae- a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.557–77, 2010.

BOER, L. Biotechnological Production of Colorants. **Advances in Biochemistry and Engineering/Biotechnology**, v.143, p.51-89, 2013.

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012, 96 f. Dissertação (mestrado) em Agricultura e Ambiente – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

BONINI, M. A. **Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos toxicológicos e microbiológicos**. 2016,

82f. Tese (doutorado) em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

BONINI, M. A.; BASTOS, R. G. Biomass production by *Aphanothece microscopica* and *Chlorella vulgaris* in heterotrophic growth from glucose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2012.

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

BOROWITZKA, M. A. In: BOROWITZKA, L.; BOROWITZKA, M. **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge University Press: Sydney, 1988, 477p.

BOTTOMLEY, P. J.; VAN BAALEN, C. Characteristics of heterotrophic growth in the blue-green alga *Nostoc sp.* strain Mac. **Journal of General Microbiology**, n.107, p. 309-318. 1978.

BUCHWEITZ, M. Natural Solutions for Blue Colors in Food. In: CARLE, R. e SCHWEIGGERT, R. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**, 1ª edição, Elsevier, p.355-384, 2016.

CAMPOS, C.; GUERRERO, A.; CÁRDENAS, B. Removal of bacterial and viral fecal indicator organisms in a waste stabilization pond system in Choconta, Cundinamarca. **Water Science and Technology**, v.45, p.61-66, 2002.

CARDOZO, K. H.; GUARATINI, M.P.; BARROS, V.R. et al. Metabolites from algae with economical impact, **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.146, n.1, p.60-78, 2007.

CARVALHO, J.C. et al. Microbial pigments. In: BRAR, S.K. et al. **Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals**, New York: Springer Science, 2014, p.73-97.

CEJUDO-BASTANTE, M.J.; HURTADO, N.; MOSQUERA, N.; HEREDIA, F.J. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. **Food Research International**, v.64, pp.465-471, 2014.

CELESTINO, J.; DOS, R.; DE CARVALHO, L. E.; LIMA, M. DA P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; DE SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v.49, p.569–575, 2014.

CETESB. **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. Norma técnica, 3ª Ed, 2014.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v.47, p.659–664, 2012.

CHAUDHARI, V. M. Optimization of the extraction parameters for the production of biopigment from the new isolate of distillery effluent. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v.2, n.6, p.1044-1051, 2013.

CHEIRSILP, B.; TORPEE, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. **Bioresource Technology**, v.110, p.510-516, 2012.

CHENG, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, n.3, p.221-224, 1997.

CHENG, F.; ZHANG, Y.; GUO, Y. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, v.18, n.5, p.603-608, 1996.

CHIOU, S. Y.; SU, W. W.; SU, Y. C. Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. **Journal of Biotechnology**, v.85, p.247–257, 2001.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v.3, p.21–34, 2004.

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

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; FLOROU-PANERI, P. Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition. In: SE-KWON, K. (Eds), **Handbook of Marine Microalgae**. Elsevier, 2015, p.233-243.

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**, v.33, p.2752-2761, 2013.

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

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

COUNSELL, J. N.; JEFFRIES, G. S.; KNEWSTUBB, C. J. Some other natural colors and their applications. In: COUNSELL, J. N.; DUNASTABLE, J.A. (Eds). **Natural colors for foods and other uses**. London: Applied Science, 1979, p 122–151.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; AGUILAR-HERNANDEZ, I.; CARDENAS-CHAVEZ, D. L.; ORNELAS-SOTO, M. A.; ROMERO-OGAWA, R.; PARRA-SALDIVAR, R. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. **Microbial Technology**, v.8, n.2, p.190-209, 2015.

DALRYMPLE, O. K.; HALFHIDE, T.; UDOM, I.; GILLES, B.; WOLAN, J.; ZHANG, Q.; ERGAS, S. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. **Aquatic Biosystems**, v.9, n.2, 2013.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. DE O.; DE CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v.23, n.4, p.261-269, 2002.

DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects, **Bioresource Technology**, v.101, p.1611–1627, 2010.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v.22, p.151–175, 1998.

DE PHILIPPIS, R.; SILI, C.; VINCENZINI, M. Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. **Journal of Applied Phycology**, v.8, p.275–281, 1996.

DEY, S.; RATHOD, V.K. Ultrasound assisted extraction of β -caroteno from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, n.1, p.271-276, 2013.

DESHMUKH, D. V.; PURANIK, P. R. Statistical evaluation of nutritional components impacting phycocyanin production in *Synechocystis SP*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.1, p.348-355, 2012 .

DHUP, S.; DHAWAN, V. Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium sp*. **Bioresource Technology**, v.152, p.572-575, 2014.

DORAN, P. **Bioprocess Engineering Principles**. 2^a edição, Waltham: Elsevier, 2012.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; VICENTE A. A.; TEIXEIRA, J. A. Third generation biofuels from microalgae. In: VILAS, A.M. (Ed). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Formatex Research Center, p.1355–66, 2010.

DUFOSSÉ , L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S. ; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.56–61, 2014.

DUFOSSÉ, L.; GALAUPA, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science Technology**, v.16, p.389–406, 2005.

DUMAS, A.; LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P.; DE LA NOUE, J. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. **Aquacultural Engineering**, v.17, n.1, p.57-68, 1998.

DWECK, A.C. Natural ingredients for colouring and styling. **International Journal of Cosmetic Science**, v.24, p.287-302.

EILER, A. Evidence for the ubiquity of mixotrophic bacteria in the upper ocean: implications and consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 7431-7437, 2006.

ENGEL, A.; DELILLE, B.; JACQUET, S.; RIEBESELL, U.; ROCHELLE-NEWALL, E.; TERBRUGGEN, A., et al. Transparent exopolymer particles and dissolved organic carbon production by *Emiliana huxleyi* exposed to different CO₂ concentrations: a mesocosm experiment. **Aquatic Microbiology Ecology**, v.34, p.93–104, 2004.

EPA. Nitrogen control. **USEPA**, Office of Research and development, 1993.

ERIKSEN, N. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p.1-14, 2008.

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

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 574, 1988.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 56, n. 2, p. 340-373, 1992.

FAY, P. In: PUB, E. A. **The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)**, London: E. Arnold, p. 3, 1983.

FENG, X.; BANDYOPADHYAY, A.; BERLA, B.; PAGE, L.; WU, B.; PAKRASI, H. B.; YINJIE, T. Mixotrophic and photoheterotrophic metabolism in *Cyanothce* sp. ATT 51142 under continuous light. **Microbiology**, v.156, p.2566-2574, 2010.

FERRAZ JÚNIOR, A. D. N.; KOYAMA, M. H.; ARAÚJO JÚNIOR, M. M.; ZAIAT, M. Thermophilic anaerobic digestion of raw sugarcane vinasse. **Renewable Energy**, v.89, p.245-252, 2016.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.25-28, 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm335743.htm>> Acesso: 24/09/2017.

FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. 1ª ed. Livraria e Editora Agropecuária, 203p, 2000.

FRICK, D. The coloration of food. **Review of Progress in Coloration and Related Topics**, v.33, p.15-32, 2003.

FURUKI, T.; MAEDA, S.; IMAJO, S.; HIROI, T.; AMAYA, T.; HIROKAWA, T.; ITO, K.; NOZAWA, H. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **Journal of Applied Phycology**, v.15, n.4, p.319-324, 2003.

GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Reviews of Plant Physiology**, v.32, p.327–347, 1981.

GLAZER, A. N.; FANG, S.; BROWN, D. M. Spectroscopic properties of C-phycocyanin and of its α and β subunits. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.5679-5685, 1973.

GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z.W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicology Letters**, v.151, p.203-210, 2004.

GONZÁLEZ, C.; MARCINIAK, J.; VILLAVERDE, S.; LEÓN, C.; GARCÍA, P. A.; MUÑOZ, R. Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photobioreactor using algae bacteria consortia. **Water Science and Technology**, v.58, pp.95–102, 2008.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A.; BANDARRA, N. Microalgae in Novel Food Products. In: KONSTANTINOS, N., PAPADOPOULOS, P.P. **Food Chemistry Research Development**; Nova Science Publishers: New York, 2008; p. 75–112.

GRAHAM, J. E.; WILCOX, L.W. GRAHAM, L.E. **Algae**. 2.ed. Englewood Cliffs: PrenticeHall, 2000, 720p.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic algal nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of Microalgal Culture**, Oxford: John Wiley & Sons, 2013, p.123 -133.

GUAN, S. Extracting phycocyanin from *Spirulina* and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica e Biológica) - Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL. p. 85, 2016.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v.9, p. 625– 644, 2011.

HADIYANTO, SUTTRISNORHADI, SUTANTO, H.; SUZERY, M.; SOETRISNANTO, D.; AZIZAH, N. The effects of temperature and frequencies in ultrasound assisted extraction of phycocyanin from microalgae *Spirulina* sp. **AIP Conference Proceedings**, v.1699, 2016.

HAMED, I. The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.00, p. 1-20, 2016.

HEMLATA, G. P.; FAREHA, B.; TASNEEN, F. Studies on *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v.2, n.1, p.30-51, 2011.

HAN, F.; PEI, H.; HU, W.; JIANG, L.; CHENG, J.; ZHANG, L.. Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. **Bioresource Technology**, v.209, p.16–22, 2016.

HONG, S. J.; LEE, C. G. Statistical optimization of culture media for production of phycobiliprotein by *Synechocystis* sp. PCC 6701. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.13, p.491-498, 2008.

HORNES, M. O. **Valoração do efluente da indústria processadora de pescado por incorporação de nutrientes em *Aphanothece microscopica* Nägeli**. 2008, 221f., Tese (doutorado) em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

HORNES, M.; SILVA, A. G.; MITTERER, M. L.; QUEIROZ, M. I. Influência dos compostos nitrogenados na concentração de proteína da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.364-371, 2010.

HUMPHREY, C. Chlorophyll as a color and functional ingredient. **Journal of Food Science**, v.69, p.422–425, 2004.

ILANI, A.; BERNS, D. S. The effect of ferric ion on phycocyanin fluorescence. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v.45, p.1423-1430, 1971.

JACOB-LOPES, E.; LACERDA, L. M. C. F.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nægeli* in a bubble column photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p. 27-34, 2008.

JACOB-LOPES E.; SCOPARO C. H. G.; QUEIROZ M. I.; FRANCO T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v.51, p.894–900, 2010.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Protein characterization of the *Aphanothece microscopica Nægeli* cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.482-488, 2006.

JACOBSON, G.; WASILESKI, J. **Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients**. New York: John Wiley e Sons, 1994.

JIA, H.; YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, v.2, 1275089, 2016.

KADOLPH, S.J. Natural Dyes: a traditional craft experiencing new attention. **Delta Kappa Gamma Bulletin**, v. 75, n.1, p.14-17, 2008.

KAMBLE, S. P.; GAIKAR, R. B.; PADALIA, R. B.; SHINDE, K. D. Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.3, n.8, p.149-153, 2013.

KATHIRESAN, S.; SARADA, R.; BHATTACHARYA, S.; RAVISHANKAR, G. Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.96, p.456-463, 2007.

LEE, B. Y. Y.; KIM, J. K. Mass production of *Rhodospseudomonas palustris* as diet for aquaculture. **Aquacultural Engineering**, v.23, p. 281-293, 2000.

KIM, J.; LIU, Z.; LEE, J. Y.; LU, T. Removal of nitrogen and phosphorus from municipal wastewater effluent using *Chlorella vulgaris* and its growth kinetics. **Desalination and Water Treatment**, v.51, pp.7800–7806, 2013.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v.6, p.52-63, 2014.

KOVAČ, D. J.; SIMEUNOVIĆ, J. B.; BABIĆ, O. B.; MIŠAN, A. C.; MILOVANOVIĆ, I. L. Algae in Food and Feed. **Food and Feed Research**, v.40, n.1, p.21-31, 2013.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, Article ID 742859, 9 p., 2013

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v.19, n.2, p. 184-188, 2014.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3.ed. São Paulo: EdgardBlücher, 2000, 584p.

LI, P.; HARDING, S. E.; LIU, Z. Cyanobacterial Exopolysaccharides: their nature and potential biotechnological applications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.18, p.375-403, 2001.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.81, n.4, p.629-636, 2008.

LI, Y.; ZHOU, W.; HU, B.; MIN, M.; CHEN, P.; RUAN, R.R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. **Bioresource Technology**, v.102, p.10861-10867, 2011.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v.7, p. 1043-1049, 2009.

LIOTENBERG, S.; CAMPBELL, D.; RIPPKA, R.; HOUMARD, J.; DE MARSAC, N.T. Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. **Microbiology**, v.142, p.611–622, 1996.

LIM, J.; KHIM, T.; HWANG, S. Treatment of fish-processing wastewater by co-culture of *candida rugopelliculosa* and *Brachionus plicatilis*. **Water Research**, v.37, n.9, p.2228-2232, 2003.

LINCOLN, E. P.; WILKIE, A.C.; FRENCH, B.T. Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater, **Biomass Bioenergy**, v.10, p.63–68, 1996.

LLOYD, D. Dark respiration. In: Stewart, W.D.P. **Algal Physiology and Biochemistry**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1974, p. 505-529, 1974.

LORDAN, S.; PAUL ROSS, R.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v.9, p.1056-1100, 2011.

LORENZ, R.; CYSEWSKI, R. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. **TIBTECH**, v.18, p.160–166, 2000.

LOZANO, E.F.; NORES, I.G.; BEJARANO, C.C.; LOBATO, C.V. Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. In: MENDÉZ-VILAS, A. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, Badajoz: Formatex, 2007, p.356-364.

MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v.124, p.311-334, 1998.

MANIRAFASHA, E.; NDIKUBWIMANA, T.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v.109, p.282-296, 2016.

MANNAN, R. M.; PAKRASI, H. B. Dark heterotrophic growth conditions result in an increase in the content of Photosystem II units in the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. **Plant physiology**, v.103, p.971-977, 1993.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAIC, L.; DAGLIAE, M.; FERRARIA, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 154-159, 2014.

MARTINS, N.; RORIZ, C.L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, v.52, p.1-15, 2016.

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

MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v.57, p.1-9, 2015.

MEDIPALLY, S.R.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. **BioMed Research International**, v.2015, Article ID 519513, p.13, 2015.

MITTAL, R.; TAVANANDI, H. A.; MANTRI, V. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macro-algae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). **Ultrasonics Sonochemistry**, v.38, p.92-103, 2017.

MOHAMMAD, M. M. A.; KALBASI, M.; MOUSAVI, S. M.; GHOBADIAN, B. Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.46, n.2, p.150-156, 2016.

MOHITE, Y. S.; WAKTE, P. S. Assessment of Factors Influencing Growth and C-Phycocyanin Production of *Arthrospira platensis* from Meteoritic Crater Lake. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v.2, n.2, p.53– 68, 2011.

MOLLER, P.; WALLIN, H. Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. **Mutation Research**, v.462, p.13-30, 2000.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN FERNANDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; CHRISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v.90, p. 491–515, 2003.

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

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.44, p.888–903, 2015.

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-Phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.1, p.45-49, 2011.

MORAES, I.O.; ARRUDA, R. O. M.; MARESCA, N. R.; ANTUNES, A. O.; MORAES, R. O. *Spirulina platensis*: process optimization to obtain biomass. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.33, p.179-183, 2013.

MULDERS, K. J. M. **Phototrophic pigment production with microalgae**. 2014. 191 f., Tese (doutorado), Wageningen University, Wageningen, NL (2014).

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1132-1138, 2005.

MURO-PASTOR, M. I.; REYES, J. C.; FLORENCIO, F. J. Ammonium assimilation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, v.83, p.135-150, 2005.

MURUGA, B. N.; WAGACHAL, J. M.; KABARUL, J. M.; AMUGUNEL, N.; DUBOISE, S. N. Effect of physicochemical conditions on growth rates of cyanobacteria species isolated from Lake Magadi, a soda lake in Kenya. **WebPub Journal of Scientific Research**, v. 2, n.5, pp.41-50, 2014.

NEWSOME, A. G.; CULVER, C. A.; VAN BREEMEN, R. B. Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.62, p.6498-6511, 2014.

NIU, J. F.; WANG, G. C.; TSENG, C. K. Method for Large-Scale Isolation and Purification of R-Phycocerytrin Red Alga *Polysiphonia urceolata* Grev. **Protein Expression and Purification**, v.49, n.1, 2006.

OGBONNA, J. C.; YOSHIZAWA, H.; TANAKA, H. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. **Journal of Applied Phycology**, v.12, p.277-284, 2000.

OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Phycocyanin content of *Spirulina Platensis* dried in spouted bed and thin layer. **Journal of Food Process Engineering**, v.31, n.1, p.34-50, 2008.

OSBORNE B. A.; GEIDER R. J. Problems in the assessment of the package effect in five small phytoplankters. **Marine Biology**, v.100, p.151–159, 1989.

PANDEY, V. D.; PANDEY, A.; SHARMA, V. Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, n.9, p.89-97, 2013.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P.S. Production of Microbial Pigments Utilizing Agro-Industrial Waste: A Review. **Current Opinion on Food Science**, v.1, p.70-76, 2014.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.255–266, 2011.

PANNARD, A.; PEDRONO, J.; BORMANS, M.; BRIAND, E.; CLAQUIN, P.; LAGADEUC, Y. Production of exopolymers (EPS) by cyanobacteria: impact on the carbon-to-nutrients ratio of the particulate organic matter. **Aquatic Ecology**, online, 2015.

PAWAR, S. T.; PURANIK, P. R. C-phycocyanin production by halotolerant cyanobacteria. **The Journal of the Geological Society of India**, v.44, p.25-32, 2014.

PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G. T.; FONTANETTI, C. S. Mutagenic Action of Sugarcane Vinasse in the Tradescantia Pallida Test System. **Ecosystem & Ecography**, v.4, n.2, 2014.

PEREIRA NETO, A. M. et al. Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method. **Renewable Energy**, v.55, p.525-531, 2013.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L.E.; HERNANDEZ, J.; BASHAN, Y. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasiliense*. **Journal of Phycology**, v.46, p.800-812, 2010.

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

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, Y. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics. In: PROKOP, A.; BAJPAI, R.; ZAPPI, M. (Eds). **Algal Biorefineries**. Springer, p.61-131, 2015.

PERSSON, J. A.; WENNERHOLM, M.; O'HALLORAN, S. **Handbook for Kjeldahl digestion**. Hilleroed: Denmark, 79 p., 2008.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, p.287-293, 2001.

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

RAJOKA, M. I.; KHAN, S. H.; JABBAR, M. A.; AWAN, M. S.; HASHMI, A. S. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, v.97, p.1934-1941, 2006.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, p.133-141, 2004.

RAO, A. R.; DAYANANDA, C.; SARADA, R.; SHAMALA, T. R.; RAVISHANKAR, G. A. Effect of salinity on growth of Green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. **Bioresource Technology**, v.98, p.560-564, 2007.

REYES, F. G.; VALIM, M. F.; VERCESI, A. E. Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. **Food Additives and Contaminants**, v.13, n.1, p.5–11, 1996.

RICHMOND, A. 2004. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science Ltd, IA, 2004.

RIPPKA, R. et al. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v.111, p.1-61, 1979.

RITCHIE, R. Membrane-potential and pH control in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*) PCC 7942. **Journal of Plant Physiology**, v.137, p.409–418, 1991.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v.101, n.12, p. 4491-4498, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p.20-26, 2015.

ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current protein and peptide science**, v.4, p.207-216, 2003.

RÜCKERT, G.V.; GIANI, A. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Brazilian Journal of Botany**, v.27, n.2, pp.325-331, 2004.

SAGDIC, O.; EKICI, L.; OZTURK, I.; TEKINAY, T.; POLAT, B.; TASTEMUR, B.; BAYRAM, O.; SENTURK, B. Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. **Food and Chemical Toxicology**, v.58, p.432–9, 2013.

SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization, **Bioresource Technology**, v.228, p.133-140, 2017.

SANTIAGO-SANTOS, M. A. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v.39, p.2047–2052, 2004.

SANTOS, A. M.; LAMERS, P. P.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H. Biomass and lipid productivity of *Neochloris oleoabundans* under alkaline-saline conditions. **Algal Research**, v.2, n.3, p.204-211, 2013.

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

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v.34, p.795-801, 1999.

SCHMIDT, R. A.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. **Biotechnology Bioengineering**, v.90, n.1, p.77-84, 2005.

SEPPÄLÄ, J.; YLÖSTALO, P.; KAITALA, S.; HÄLLFORS, S.; RAATEOJA, M.; MAUNULA, P. Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.73, p.489-500, 2007.

SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. 2008, 91f. Dissertação (mestrado) em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2008.

SILVA, C. E. F.; ABUD, A. K. S. Anaerobic biodegradation of sugarcane vinasse under mesophilic conditions using manure as inoculum. **Ambiente & Água**, v.11, n.4, p.763-777, 2016.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A.V. KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycocyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.1, p.1-4, 2009.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, n.1, p.108–114, 2008.

SILVA, M. A.; BARBOSA, G. H.; CODATO, C. B.; MATTOS, L. F. BASTOS, R. G.; KIECKBUSCH, T. G. Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical CO₂. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n.3, p.573-579, 2016.

SILVEIRA, S.; BURKERT, J.; COSTA, J.; BURKERT, C.; KALIL, S. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource technology**, v.98, p.1629-1634, 2007.

SHAHID, M.; ISLAM, S.; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, v.53, p.310-331, 2013.

SHARATH, C. K.; RAJASHEKHAR, M. Effect of pH on Freshwater Cyanobacteria Isolated from Different Habitats of Southern Karnataka. **International Journal of Life Sciences and Technology**, v.9, n. 7, p.56-64, 2016.

SHARMA, G.; KUMAR, M.; ALI, M. I.; JASUJA, N. D. Effect of Carbon Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. **Journal of Microbiology and Biochemistry Technology**, v.6, n.4, p.202-206, 2014.

SIGURDSON, G. T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.8, n.1, p.261-280, 2017.

SINGGIH, M.; JULIANTI, E. Food Colorants from Microorganisms. LIONG, M. T. (Ed.), **Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals**, Microbiology, Springer, 290 p, 2015.

SIVASANKARI, S.; NAGANANDHINI, RAVINDRAN, D. Comparison of Different Extraction methods for Phycocyanin Extraction and Yield from *Spirulina platensis*. **International Journal of Current Microbiology Applied Sciences**, v.3, n.8, p.904-909, 2014.

SLOTH, J. K.; WIEBE, M. G.; ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga **Galdieria sulphuraria**. **Enzyme and Microbial Technology**, v.38, p.168-175, 2006.

SODE, K.; HORIKOSHI, K.; TAKEYAMA, H.; NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, T. On-line monitoring of marine cyanobacterial cultivation based on phycocyanin fluorescence. **Journal of Biotechnology**, v.21, p.209-217, 1991.

SOUZA, P. N.; GRIGOLETTO, T. L.; de MORAES, L. A.; ABREU, L. M.; GUIMARÃES, L. H.; SANTOS, C.; GALVÃO, L. R.; CARDOSO, P. G. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology**, v.162, p.12–22, 2016.

STEINMÜLLER, K; ZETSCHKE, K. Photo-and metabolite regulation of the synthesis of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and the phycobiliproteins in the alga *Cyanidium caldarium*. **Plant physiology**, v.76, p.935-939, 1984.

STEWART, D. E.; FARMER, F. H. Extraction, Identification and Quantitation of Phycobiliproteins Pigments from Phototrophic Plankton. **Limnology and Oceanography**, v. 29, n.2, p.392, 1984.

STREIT, N. M.; RAMIREZ-MERIDA, L. G.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M.I. Pigment production by *Aphanothece microscopica* Nägeli from dairy industrial waste. **Revista Chilena de ingeniería**, v.25 n. 2, 2017, p.350-358, 2017.

SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. A comparison of feasible methods for microalgal biomassdeterminations during tertiary wastewater treatment. **Ecological Engineering**, v.94, p.532–536, 2016.

SUMARDIONO, S. The effect of COD/N Ratios and pH Control to Biogas Production from Vinasse. **International Journal of Biochemistry Research**, v.3, n.4, p.401-413, 2013.

SUN, H. Determination of Fatty Acid Methyl Esters (FAMES) in Milk Matrix Using an Agilent 5977E GC/MS. **Agilent Technologies**, 2014.

SUNG, S.; LIU, T. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. **Chemosphere**, v.53, p.43-52, 2003.

SORNCHAI, P.; IAMTHAM, S. Effects of Different Initial pH of Modified Zarrok Medium on Large-scale *Spirulina* Maxima Culture. **Journal of Medical and Bioengineering**, v.2, n.4, p.266-269, 2013.

SUVIDHA, G.; PANDEY, R. A.; SANJAY, B.P. Microalgal bioremediation of food-processing industrial wastewater under mixotrophic conditions: Kinetics and scale-up approach. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v.10, n.4, pp.499-508, 2016.

TAUFIQURRAHMI, N.; RELIGIA, P.; MULYANI, G.; SURYANA, D.; ICHSAN; TANJUNG, F.A.; ARIFIN, Y. Phycocyanin extraction in *Spirulina* produced using agricultural waste. **29th Symposium of Malaysian Chemical Engineers (SOMChE)**, 2017.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, D. H. Wastewater Engineering: Treatment disposal and reuse. 4 ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

TOULOUPAKIS, E.; CICCHI, B.; BENAVIDES, A. M. S; TORZILLO, G. Effect of pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.1333-1341, 2016.

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Oxford: Blackwell Publishing, 2004, p.178-214.

TRENTACOSTE, E. M.; MARTINEZ, A. M.; ZENK, T. The place of algae in agriculture: policies for algae biomass production. **Photosynthesis Research**, v.123, p.305-315, 2015.

TULI, H. S.; CHAUDHARRY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural colors sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, n.8, p.4669-4678, 2014.

TÜRKER, N.; ERDOGDU, F. Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var L.). **Journal of Food Engineering**, v.76, p.579-583, 2006.

UNICA. **Relatório final da safra 2016/2017** - Região Centro-Sul. UNICA, 2017.

VAN BAALEN, C.; HOARE, D. S.; BRANDT, E. Heterotrophic growth of blue-green algae in dim light. **Journal of Bacteriology**, v.105, p.685–689, 1971.

VAN WYCHEN, S.; RAMIREZ, K.; LAURENS, L. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by *in situ* transesterification. **NREL – Laboratory Analytical Procedure**, 12 p, 2015.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v.48, p.1065–1079, 2013.

VIEIRA, J. G.; MANETTI, A. G. S.; JACOB-LOPES, E.; QUEIROZ, M. I. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria, **Desalination and Water Treatment**, v.40, p.224–230, 2012.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, n.3, p.303-313, 2001.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical biochemistry**, v.319, p.263-271, 2003.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V. T. Use of cane condensed molasses solubles in feeding broilers. **Animal Feed Science Technology**, v.67, p.253–258, 1997.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O. E.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v.24, pp.1-9, 2013.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, v.135, pp.1115–1122, 2009.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.13-18, 2007.

WYMAN, M. An *in vivo* method for the estimation of phycoerythrin concentration in marine cyanobacteria (*Synechococcus* spp.). **Limnology & Oceanography**, v. 37, p. 1300–1306, 1992.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v.101, n.14, p.5494-5500, 2010.

YANG, C. HUA, Q. SHIMIZU, K. Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ¹³C-labeled glucose. **Metabolic Engineering**. v.4, p. 202-216, 2002.

YU, P.; WU, Y., WANG, G.; JIA, T; ZHANG, Y. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.57, p.3840-3849, 2016.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M. I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica Nageli* submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing**, v.47, p.1305-1310, 2008.

ZHANG, Y. F.; LIU, X. C.; LI, Q. H. Study on characteristics and purification of *Spirulina* phycocyanin. **Journal of Yunnan University**, v.21, p.230-232, 1999.

ZHOU, Y.; SCHIDEMAN, L.; YU, G.; ZHANG, Y. A synergistic combination of algal wastewater treatment and hydrothermal biofuel production maximized by nutrient and carbon recycling. **Energy and Environmental Science**, v.6, p.3765-3779, 2013.

ZHOU, L.; WU, F.; ZHAO, Z.; WANG, B. Effects of environmental factors on nitrogen and phosphorus removal by *Chlorella vulgaris* in wastewater. **Current Biotechnology**, v.5, pp.60–65, 2015.

ZHU, G. B.; PENG, Y. Z.; WU, S. Y.; WANG, S. Y. Effect of influent flow rate distribution on the performance of step-feed biological nitrogen removal process. **Chemical Engineering Journal**, v.131, pp.319–328, 2007a.

ZHU, G. B.; PENG, Y.; LI, B.; GUO, J.; YANG, Q.; WANG, S. Biological removal of nitrogen from wastewater. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.192, pp.159-195, 2008.

ZHU, G. B.; PENG Y. Z.; WANG S. Y.; ZUO, S. L; WANG, Y. Y; GUO J. H. Development and experimental evaluation of a steady-state model for the step-feed

biological nitrogen removal process. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3, pp.411– 417, 2007b.

ZHU, L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 6, p. 801–814, 2015.

ZHU, L. The combined production of ethanol and biogas from microalgal residuals to sustain microalgal biodiesel: a theoretical evaluation. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.8, n.1, p.7–15, 2014.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, v.47, pp.4294–4302, 2013.

ZHU, L. D.; LI, Z. H.; HILTUNEN, E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. **BioMed Research International**, v.2016, article ID: 8792548, p.8, 2016.