



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA - DB  
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE ALGAS

---

**FISIOLOGIA DE MICROALGAS EM VINHAÇA  
TRATADA E A TEMÁTICA DOS RESÍDUOS NA  
EDUCAÇÃO AMBIENTAL**

**Camila Candido**

**São Carlos – 2019**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS – PPGERN  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA - DB  
LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE ALGAS

---

# **FISIOLOGIA DE MICROALGAS EM VINHAÇA TRATADA E A TEMÁTICA DOS RESÍDUOS NA EDUCAÇÃO AMBIENTAL**

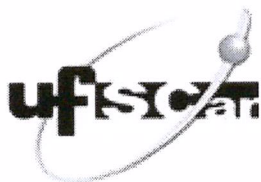
**Camila Candido**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN)  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutora em Ciências

Orientadora: **Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Teresa Lombardi**

**São Carlos – 2019**





# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Camila Candido, realizada em 11/11/2019:

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Andre Bernardo  
UFSCar

---

Profa. Dra. Andréa Cristina Moralez de Souza  
EE Dr. Álvaro Guião

---

Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
USP



## **Agradecimentos**

À professora Dra. Ana Teresa Lombardi pela orientação, pelo incentivo, por todo aprendizado e paciência ao longo de oito anos de estudo e trabalho, por contribuir em meu amadurecimento pessoal e profissional e, graças às coincidências desta vida, por ter colaborado para que eu traçasse o caminho que me fez chegar até aqui;

À minha família, em especial aos meus pais Nivaldo e Matilde e aos meus irmãos Caroline e Caio, por todo incentivo nesta longa trajetória de estudos e de formação, pela paciência nos desabafos, pelo carinho nos conselhos e por serem minhas raízes, minha base, que sempre me levantaram após cada queda;

Ao meu namorado Victor, pela companhia, aprendizado, carinho, compreensão e planos futuros, que amenizaram o caminho árduo ao longo destes quatro anos de doutorado;

Aos colegas de laboratório, presentes e passados, Douglas, Leonardo, Suleiman, Silvia, Isara, Eduardo, Rafael, Grazi, Dani, Farid, Tamires, Jenna, Mônica, Andréa, Alex, Raquel, Pedro, Felipe, Vinícius e, em especial, a Jaque, pela companhia no dia-a-dia do laboratório, pelas ideias e por toda ajuda;

Ao técnico aposentado do Departamento de Botânica (UFSCar) Carlos Aparecido Casali, por toda ajuda na parte prática do trabalho;

À Usina sucroalcooleira São João (Araras/SP) e, principalmente, aos funcionários Bruno e Gustavo, pela cordialidade e pelo apoio no fornecimento da vinhaça utilizada na parte experimental deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. André Bernardo, do Departamento de Engenharia Química (UFSCar), pelas sugestões e contribuições no primeiro capítulo desta tese, desde a concepção de seu desenho experimental até a submissão dos artigos referentes;

À coordenadora da Escola Estadual Dr. Álvaro Guião e amiga Andréa Cristina Moralez, à diretora do Colégio Objetivo Naira Ferreira Cavichioli e a coordenadora do Colégio Objetivo Ariane Barros pela contribuição e disponibilidade para a realização da parte pedagógica deste trabalho;

À professora Zezé, da Escola Estadual Dr. Álvaro Guião, por gentilmente ter cedido algumas de suas aulas de Ciências para a realização do curso planejado na parte pedagógica deste trabalho;

Aos professores Dr. Clóvis Wesley de Souza (Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar), Dra. Inessa Lacativa (Departamento de Botânica - UFSCar) e Dra. Silvia Govani Bondi (EMBRAPA) pelas contribuições na parte experimental deste trabalho;

À Profª Dra. Maria Inês Salgueiro de Lima, aposentada do Departamento de Botânica (UFSCar), pelos incentivos iniciais na época de graduação que me trouxeram até aqui;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), seus secretários João Augusto da Silva Affonso, Roseli Aparecida Gonçalves e Maria Elizabeth Guimarães Moreira, e coordenadores, em especial ao Profº Dr. Marcelo Adorna Fernandes, pela oportunidade, formação e orientações práticas ao longo deste período de doutorado;

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida (001), e às agências CNPq (302175/2015-6) e FAPESP (2018/07988-5), pelo financiamento de projetos do Laboratório de Biotecnologia de Algas que, indiretamente, beneficiaram este estudo.



# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	01
LISTA DE TABELAS .....	07
LISTA DE QUADROS .....	11
LISTA DE SÍMBOLOS .....	13
Resumo .....	15
Abstract .....	16
APRESENTAÇÃO .....	17
OBJETIVO GERAL .....	19
Objetivos específicos .....	19
CAPÍTULO 1: TRATAMENTOS DA VINHAÇA PARA O CULTIVO ALGAL .....	21
Resumo .....	21
1.0 Introdução .....	22
2.0 Material e Métodos .....	24
2.1 Centrifugação .....	24
2.2 Adsorção .....	25
2.3 Comparação entre os tratamentos .....	29
3.0 Resultados .....	31
3.1 Centrifugação .....	31
3.2 Adsorção .....	32
3.3 Comparação entre os tratamentos .....	36
4.0 Discussão .....	40
5.0 Conclusões .....	43
CAPÍTULO 2: MELHORIA DO CULTIVO ALGAL EM VINHAÇA TRATADA .....	45
Resumo .....	45
1.0 Introdução .....	46
2.0 Material e Métodos .....	48

3.0 Resultados .....	54
4.0 Discussão .....	64
5.0 Conclusões .....	72
CAPÍTULO 3: ANÁLISE DA BIOMASSA PRODUZIDA EM VINHAÇA TRATADA ....	73
Resumo .....	73
1.0 Introdução .....	74
2.0 Material e Métodos .....	76
3.0 Resultados .....	83
4.0 Discussão .....	93
5.0 Conclusões .....	100
CAPÍTULO 4: A TEMÁTICA DOS RESÍDUOS NA EDUCAÇÃO AMBIENTAL .....	103
Resumo .....	103
1.0 Introdução .....	104
2.0 Metodologia .....	107
3.0 Resultados e Discussão .....	111
3.1 <i>Concepções dos alunos</i> .....	111
3.2 <i>Curso “Pensando o ambiente”</i> .....	130
4.0 Conclusões .....	144
Anexo 1 .....	145
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	147
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1:

**Figura 1. Materiais utilizados no tratamento da vinhaça.** Materiais utilizados no tratamento de adsorção da vinhaça: (a) argila esmectita, (b) carvão ativado, (c) bagaço de cana-de-açúcar e (d) cinzas do bagaço de cana. .... 25

**Figura 2. Tratamentos da vinhaça.** Sequências de adsorção dos oito tratamentos realizados na vinhaça coletada em Araras (Usina São João). .... 26

**Figura 3. Processos envolvidos no tratamento de adsorção da vinhaça.** Processos selecionados e aprimorados para o tratamento da vinhaça em escala laboratorial: (a) agitação da vinhaça com argila esmectita, (b) decantação da argila e do material adsorvido da vinhaça e (c) percolação por carvão ativado. .... 29

**Figura 4. Absorbâncias em 570 e em 455 nm para as vinhaças centrifugadas.** Valores de absorbância (UA) em (a) 570 nm e em (b) 455 nm ao longo do tempo de centrifugação (min) nas condições (■) 2510 g / 25 °C, (●) 1410 g / 25 °C, (▲) 630 g / 25 °C, (■) 2510 g / 20 °C, (●) 1410 g / 20 °C (▲) 630 g / 20 °C, (■) 2510 g / 15 °C, (●) 1410 g / 15 °C, (▲) 630 g / 15 °C, (□) 2510 g / 10 °C, (○) 1410 g / 10 °C e (△) 630 g / 10 °C. .... 31

**Figura 5. Tempos mínimos para eliminação de leveduras e particulado.** Tempos mínimos de centrifugação (min) em cada condição de intensidade/temperatura para eliminação de leveduras (barras claras) e outros materiais particulados (barras escuras) perceptíveis em microscopia óptica. .... 32

**Figura 6. Valores de pH e de absorbâncias para os tratamentos de adsorção da vinhaça.** Valores médios (n = 3) de (a) pH e (b) reduções (%) das absorbâncias em 570 nm (barras claras) e em 455 nm (barras escuras) em relação aos valores da vinhaça bruta (Br). Siglas das etapas: vinhaça bruta (Br), passada pelo bagaço de cana-de-açúcar (Bc), agitada com argila esmectita (Ae), percolada pelas cinzas de bagaço de cana (Cb) ou por carvão ativado (Ca). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )..... 33

**Figura 7. Parâmetros de crescimento algal.** Taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ , barras claras) e densidade celulares em 96 h (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ , barras escuras) para os tratamentos. Siglas das etapas: vinhaça bruta (Br), passada pelo bagaço de cana-de-açúcar (Bc), agitada com argila esmectita (Ae), percolada por carvão ativado (Ca) e centrifugada (Cn). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). ..... 33

**Figura 8. Reduções das absorvâncias promovidas pela argila esmectita.** Reduções nas absorvâncias (%) em (a) 570 nm e em (b) 455 nm promovidas pela agitação da vinhaça com concentrações de argila esmectita de (■)  $250 \text{ g L}^{-1}$ , (○)  $200 \text{ g L}^{-1}$ , (▲)  $150 \text{ g L}^{-1}$ , (▽)  $100 \text{ g L}^{-1}$ , (◆)  $80 \text{ g L}^{-1}$  e (◁)  $50 \text{ g L}^{-1}$  ao longo do tempo de contato com a vinhaça (min). ..... 34

**Figura 9. Decantação da argila esmectita.** (a) Volume de sedimento (argila + material particulado da vinhaça; mL) e (b) redução das absorvâncias (UA) em (■) 570 nm e em (□) 455 nm ao longo do tempo de decantação (h) em Cones de Imhoff. ..... 35

**Figura 10. Adsorção por carvão ativado.** (a) Valores de (■) pH e (□) tempo de percolação (s) em função do volume de vinhaça adicionada em relação ao volume de carvão ativado utilizado (v/v). (b) Redução dos valores de absorvância em (■) 570 nm e em (□) 455 nm em relação à vinhaça bruta em função do volume de vinhaça adicionada em relação ao volume de carvão ativado utilizado. ..... 36

## Capítulo 2:

**Figura 1. Esquema metodológico.** Etapas de cultivo realizadas no teste de aclimação e reisolamento para cada uma das oito espécies microalgais testadas. ..... 52

**Figura 2. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios ( $n = 3$ ) das densidades de células viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) diárias no (■) controle em BG11 e nas concentrações de (●) 5%, (▲) 10%, (▼) 15%, (◆) 20%, (◁) 30%, (▶) 40% e (●) 50% de vinhaça centrifugada para as algas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *Cyclotella sp.*, (e) *D. spinosus*, (f) *H. pluvialis*, (g) *Monoraphidium sp.*, (h) *N. gaditana*, (i) *S. quadricauda* e (j) *T. gracilis*. As linhas tracejadas indicam as densidades celulares nas concentrações ótimas de vinhaça diluída com meio BG11 para (c) *C. vulgaris* e (i) *S. quadricauda*. ..... 55

**Figura 3. Parâmetros de crescimento algal.** Valores médios ( $n = 3$ ) das (■) taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) e (□) densidades celulares viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) no 4º dia de cultivo (96 h) em relação às concentrações de vinhaça (%) para algas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *Cyclotella sp.*, (e) *D. spinosus*, (f) *H. pluvialis*, (g) *Monoraphidium sp.*, (h) *N. gaditana*, (i) *S. quadricauda* e (j) *T. gracilis*. A concentração de 0% nos eixos horizontais dos gráficos representa os parâmetros para os controles em BG11. .... 56

**Figura 4. Valores de EC50 e viabilidades algais.** (a) Valores médios ( $n = 3$ ) de (a) concentração de vinhaça centrifugada (%) em que houve redução de 50% das taxas de crescimento para cada microalga em relação aos respectivos controles em meio BG11 e de (b) viabilidade celular (%) em 96 h de cultivo nas concentrações ótimas (barras claras) e em 50% (barras escuras) de vinhaça centrifugada. As viabilidades nos controles variaram entre 99% e 100%. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ). ..... 58

**Figura 5. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios ( $n = 3$ ) de densidades celulares viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) diárias no (□) controle em BG11 e nos (■) tratamentos com vinhaça centrifugada nas quatro etapas experimentais para as microalgas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas tracejadas representam as culturas com inóculo inicial e reisolamento em meio LC Oligo para (c) *C. vulgaris*. ..... 60

**Figura 6. Taxas de crescimento.** Valores médios ( $n = 3$ ) das taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) nos meios com vinhaça centrifugada em cada etapa experimental para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas pontilhadas representam os valores médios das taxas de crescimento nos controles em BG11 para as quatro etapas. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Asteriscos (\*) indicam valores em vinhaça que diferem dos respectivos controles. .... 61

**Figura 7. Densidades celulares em 96 h.** Valores médios ( $n = 3$ ) das densidades celulares viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) no 4º dia de cultivo (96 h) nos meios com vinhaça centrifugada em cada etapa experimental para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas pontilhadas representam os valores médios das densidades celulares em 96 h nos controles em BG11 para as quatro etapas. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Asteriscos (\*) indicam valores em vinhaça que diferem dos respectivos controles. .... 62

**Figura 8. Viabilidades celulares.** Valores médios (n = 12 nos controles e 3 nos tratamentos em vinhaça) das viabilidades celulares (%) no 4º dia de cultivo (96 h) para cada microalga nos controles em BG11 (barras hachuradas) e nos tratamentos com vinhaça nas 1ª (barras claras), 2ª (barras cinza-claro), 3ª (barras cinza-escuro) e 4ª (barras escuras) etapas experimentais. .... 63

**Figura 9. Material particulado.** Valores médios (n = 12 nos controles e 3 nos tratamentos em vinhaça) de absorvância em 570 nm (U.A.) no 4º dia de cultivo (96 h) para cada microalga nos controles em BG11 (barras hachuradas) e nos tratamentos com vinhaça nas 1ª (barras claras), 2ª (barras cinza-claro), 3ª (barras cinza-escuro) e 4ª (barras escuras) etapas experimentais. .... 63

### Capítulo 3:

**Figura 1. Fluorescências da clorofila a captadas pelo PAM.** Representações gráficas das emissões de fluorescência pela clorofila a após estimulação por pulso de luz saturante (representado por meio dos raios) em microalgas adaptadas ao escuro (centros de reação abertos) e ao claro (centros de reação parcialmente fechados) (Campostrini, 2010). ..... 79

**Figura 2. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios (n = 3) das densidades celulares (célula 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>, linhas sólidas) e das concentrações de clorofila a *in vivo* (mg L<sup>-1</sup>, linhas tracejadas) nos (□) controles em BG11 e nos (■) tratamentos em vinhaça centrifugada para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. ..... 84

**Figura 3. Produtividades e biomassas secas.** Valores médios (n = 3) de (a) produtividade (mg C L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) e (b) biomassa seca (mg L<sup>-1</sup>) em 96 h de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nas culturas em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Letras diferentes indicam valores que não diferiram significativamente entre si (p < 0,05). ..... 86

**Figura 4. Correlação entre biovolume total e biomassa seca.** Biovolume total (cm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>) em função da biomassa seca (mg L<sup>-1</sup>) para (□ / ■) *Chlamydomonas sp.*, (○ / ●) *C. sorokiniana*, (△ / ▲) *C. vulgaris*, (▽ / ▼) *D. spinosus*, (◇ / ◆) *H. pluvialis*, (◁ / ◀) *Monoraphidium sp.*, (▷ / ►) *S. quadricauda* e (◊ / ♦) *T. gracilis*. Os símbolos claros se referem aos controles e os escuros às culturas em vinhaça. A regressão linear entre os pontos tem equação  $y = 1,20x - 0,01$ , com  $R^2 = 0,70$ . *H. pluvialis* e *T. gracilis* não foram consideradas na regressão devido ao ciclo de vida complexo e habitat marinho, respectivamente. ..... 87

**Figura 5. Absorbâncias.** Valores médios (n = 3) de absorbâncias (U.A.) em 570 nm (linhas sólidas) e em 684 nm (linhas tracejadas) nos controles em BG11 (símbolos claros) e culturas em vinhaça (símbolos escuros) para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. ... 88

**Figura 6. Rendimentos fotossintéticos máximos e operacionais.** Valores médios (n = 3) dos (a) rendimentos fotossintéticos máximos ( $\phi_M$ ) e (b) operacionais ( $\phi'_M$ ) em 48 horas de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nos tratamentos em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ). ..... 90

**Figura 7. Decaimentos fotoquímicos e não fotoquímicos.** Valores médios (n = 3) dos decaimentos (a) fotoquímico qP, (b) não fotoquímico qN e (c) não fotoquímico NPQ em 48 horas de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nos tratamentos em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ )..... 91

**Figura 8. Curvas de saturação luminosa.** Taxas relativas de transporte de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos controles (linhas sólidas) e tratamentos em vinhaça (linhas tracejadas) para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. ..... 92

**Figura 9. Parâmetros fotossintéticos.** Valores médios (n = 3) das (a) inclinações iniciais das curvas de luz ( $\alpha$ ,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$ ), (b) taxas relativas de transporte de elétrons máximas (rETR<sub>m</sub>;  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (c) irradiâncias de saturação ( $E_K$ ;  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e (d) quantias teóricas de carbono fixado autotróficamente (mg C [mg Chl a]<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) nos controles em BG11 (símbolos claros) e em vinhaça (símbolos escuros) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro. ..... 93

#### Capítulo 4:

**Figura 1. Slides apresentados aos alunos.** Miniaturas dos slides apresentados aos alunos para contextualização e realização da pesquisa em cada uma das salas de 8º ano abordadas. .... 108

**Figura 2. Espaços visitados no Centro de Divulgação Científica e Cultural (CDCC).** Visita à injetora de plástico e ao quintal agroecológico, abordando as importâncias da reciclagem, da compostagem e da reutilização de resíduos em atividades domésticas. .... 137

**Figura 3. Espaços visitados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).** Visita ao Laboratório de Biotecnologia de Algas, à Biblioteca Comunitária e a um fragmento de cerrado, retratando locais que geram e disponibilizam conhecimentos científicos, bem como um ambiente natural existente na cidade. .... 138

**Figura 4. Jogo de perguntas e respostas sobre resíduos.** Cartas com perguntas, letras das alternativas, números das questões e medalha entregue aos vencedores do jogo proposto no encontro. .... 140

**Figura 5. Entrega do certificado.** Momento da entrega do certificado aos participantes do curso de uma das turmas ao final das apresentações de trabalhos aos outros alunos de 8º ano da escola. .... 143



## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1:

**Tabela 1. Meio BG11.** Composição das soluções utilizadas para produção do meio BG11 e concentrações finais de cada componente no meio preparado (Rippka et al., 1979). ..... 27

**Tabela 2. Análise das amostras de vinhaça tratadas.** Valores de pH, absorvâncias em 570 e em 455 nm, DQO, DBO, sólidos suspensos totais, dureza calculada, condutividade eletrolítica e composição química das amostras de vinhaça (Usina São João, Araras/SP) bruta, centrifugada (Cn), tratada por argila esmectita (Ae) e tratada por argila esmectita e carvão ativado (Ae Ca) ..... 38

### Capítulo 2:

**Tabela 1. Meio LC Oligo.** Composição das soluções utilizadas (1 – 8) para confecção do meio LC Oligo e concentrações finais de cada componente no meio preparado (AFNOR, 1980). ..... 53

**Tabela 2. Caracterização da vinhaça.** Parâmetros físico-químicos determinados para a vinhaça centrifugada e para as diferentes concentrações ótimas do resíduo usadas nos cultivos comparados à composição do meio BG11. .... 59

### Capítulo 3:

**Tabela 1. Parâmetros de crescimento algal.** Valores médios (n = 3) das taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ), densidades celulares em 96 h ( $\text{células } 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) e biovolumes celulares em 96 h ( $\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1}$ ) nos controles em BG11 e nas culturas em vinhaça. Os desvios padrão estão representados entre parênteses. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro representado..... 85

**Tabela 2. Proteínas e carboidratos totais e razões proteínas/carboidratos (P/C).** Valores médios ( $n = 3$ ) de proteínas totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ), carboidratos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e razões entre proteínas e carboidratos (razões P/C) em 96 h nos controles em BG11 e nos tratamentos em vinhaça para cada microalga. O desvio padrão são apresentados entre parênteses. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro representado. .... 89

#### Capítulo 4:

**Tabela 1. Análise geral dos questionários.** Assuntos gerais das questões com respectivas porcentagens de alunos que não responderam ou não souberam e que responderam, número médio de citações por questionário e por questionário respondido. .... 111

**Tabela 2. Impactos ambientais.** Impactos mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram e categorias nas quais foram classificados, também com as respectivas porcentagens de citações. .... 112

**Tabela 3. Resíduos.** Exemplos de resíduos mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram e categorias nas quais foram classificados, também com as respectivas porcentagens de citações. .... 114

**Tabela 4. Efluentes.** Efluentes mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram. .... 116

**Tabela 5. Imagens atribuídas ao esgoto.** Imagens utilizadas para descrever esgoto com as respectivas porcentagens de alunos que as citaram e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações. .... 118

**Tabela 6. Impactos ambientais e resíduos gerados na produção dos combustíveis.** Impactos ambientais e resíduos da produção de combustíveis (etanol, gasolina e diesel) mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram. .... 120

<b>Tabela 7. Justificativas sobre a forma que lidamos com os resíduos.</b> Justificativas dadas pelos alunos que responderam afirmativa e negativamente à forma que lidamos com os problemas gerados pelos resíduos. ....	122
<b>Tabela 8. Instituições fiscalizadoras.</b> Instituições fiscalizadoras das normas referentes ao destino e cuidado com os resíduos com as respectivas porcentagens de menções. ....	123
<b>Tabela 9. Ideias de atuação para governantes e cientistas.</b> Ideias dos alunos para a melhoria ou solução do problema dos resíduos caso fossem governantes ou pesquisadores, com as respectivas porcentagens de citações e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações. ....	125
<b>Tabela 10. Ideias de atuação como cidadãos.</b> Ideias para a melhoria ou solução do problema dos resíduos que os alunos, suas famílias e amigos podem realizar, com as respectivas porcentagens de citações e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações. ....	127
<b>Tabela 11. Curiosidades sobre impactos ambientais e resíduos.</b> Curiosidades específicas sobre impactos ambientais e resíduos mencionadas pelos alunos com as respectivas porcentagens de citações. ....	129



# LISTA DE QUADROS

## Capítulo 1:

**Quadro 1. Caracterização da vinhaça.** Métodos usados para caracterização físico-química da vinhaça. .... 30

**Quadro 2. Comparação entre os tratamentos da vinhaça.** Avaliação e comparação dos diversos aspectos econômicos e ambientais envolvidos nos tratamentos da vinhaça por centrifugação ou adsorção por argila esmectita e carvão ativado. .... 39

## Capítulo 2:

**Quadro 1. Cepas algais utilizadas nos cultivos.** Cepas microalgais utilizadas nos testes ecotoxicológicos deste capítulo com suas respectivas classificações (divisão – classe – ordem), locais de origem e bancos de manutenção. .... 49

## Capítulo 4:

**Quadro 1. Atividades do curso “Pensando o Ambiente”.** Duração, descrição dos temas abordados e metodologias empregadas em cada um dos nove encontros desenvolvidos ao longo do curso “Pensando o Ambiente”. .... 110



## LISTA DE SÍMBOLOS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

Alfa ( $\alpha$ ) – inclinação inicial da curva de saturação luminosa

ATP – adenosina tri-fosfato

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CO – monóxido de carbono

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO – demanda bioquímica de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

EC50 – concentração de um resíduo que reduz em 50% o crescimento de uma cepa

E<sub>K</sub> (ou I<sub>K</sub>) – intensidade luminosa de saturação da fotossíntese

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

ETR – taxa de transporte de elétrons

aETR – taxa absoluta de transporte de elétrons

rETR – taxa relativa de transporte de elétrons

rETR<sub>m</sub> – taxa relativa de transporte de elétrons máxima

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

HCl – ácido clorídrico

H<sub>2</sub>S – sulfeto de hidrogênio

MMA – Ministério do Meio Ambiente

NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina

NaOH – hidróxido de sódio

NBR – Norma Brasileira

NH<sub>3</sub> – amônia ou amoníaco

NO<sub>x</sub> – óxidos de nitrogênio

NPQ – decaimento (*quenching*) não fotoquímico correspondente ao calor

ONG – organização não-governamental

PAM - fluorimetria de pulso de amplitude modulada

PCNs – Parâmetros Curriculares Nacionais

pH – potencial hidrogeniônico

PSI – fotossistema I

PSII – fotossistema II

Q<sub>A</sub> – acceptor de elétrons plastoquinona A

qP – decaimento (*quenching*) fotoquímico

qN – decaimento (*quenching*) não fotoquímico correspondente à fluorescência

RLC – (Rapid Light Curves) Curvas rápidas de saturação de luz

RSU – resíduos sólidos urbanos

SO<sub>x</sub> – óxidos de enxofre

TIE – testes de identificação e avaliação de toxicidade



## RESUMO

A vinhaça é um resíduo da indústria sucroalcooleira altamente poluente e gerado em grandes quantidades. O cultivo de microalgas em vinhaça é uma maneira de utilizar e tratar o resíduo, economizar com a produção de meios de cultura e gerar biomassa com alto valor agregado. Diversos estudos abordam este possível uso, mais ainda faltam investigações que aprimorem as condições para tornar sua aplicação em larga escala viável. São ainda necessários estudos para seleção de cepas tolerantes à vinhaça, tratamentos do resíduo menos custosos, além de medidas de produtividade da biomassa algal que considerem os microorganismos contaminantes inerentes a cultivos em resíduos, tais como fungos e bactérias. Neste estudo foram selecionadas condições menos custosas para realização de dois tratamentos do resíduo, a centrifugação e a adsorção em argila esmectita e carvão ativado, que foram comparados após este melhoramento. A centrifugação foi mais viável econômica e ambientalmente e, por isso, foi adotada no decorrer desta pesquisa. Dez cepas de microalgas foram cultivadas em diferentes concentrações do resíduo centrifugado e as espécies mais produtivas foram selecionadas. Foram avaliadas as eficiências da aclimação e seleção artificial das microalgas para o incremento da produção de biomassa nos cultivos das oito espécies selecionadas. Os resultados mostraram que estes processos biológicos não foram eficientes no aumento das produtividades. Realizando cultivos em concentrações predeterminadas de vinhaça tratada, foram obtidas maiores biomassas secas, biovolumes celulares, produtividades e quantias de proteínas totais do que nos controles em BG11. Além disso, as biomassas produzidas em vinhaça tiveram baixa proporção de contaminantes, de até 22%. *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus quadricauda* e *Tetraselmis gracilis* se destacaram em relação à alta produtividade. Todas as cepas avaliadas apresentaram metabolismo mixotrófico, mas com diferentes proporções quanto ao uso de carbono inorgânico e orgânico. Avaliando concepções de alunos do ensino fundamental em relação à temática dos resíduos, foi observado que questões envolvendo efluentes, legislação ambiental, órgãos fiscalizadores e medidas mitigadoras são pouco conhecidas, o que pode explicar a falta de atuação e de reconhecimento das pesquisas ambientais pela sociedade. Foi proposto um curso de curta duração abordando diferentes aspectos do tema, o qual se mostrou importante para a mudança de comportamento perante o meio ambiente, podendo contribuir para a ocorrência de futuras ações de preservação ambiental. Seja por meio da seleção de condições mais promissoras para os cultivos algais em vinhaça ou pelo trabalho de Educação Ambiental com a temática dos resíduos, esta tese de doutorado traz medidas que podem contribuir para uma produção de etanol mais sustentável e limpa.

**Palavras chave:** Resíduo sucroalcooleiro; Produção de biomassa; Fisiologia microalgal; Concepções ambientais; Educação Ambiental.

## ABSTRACT

Vinasse is a highly polluting waste of the sugar-alcohol industry and generated in large quantities. Microalgae cultivation in vinasse is a way to use and treat the waste, save on the production of culture media and generate high value biomass. Several studies address this use, but there is a literature gap on investigations that improve the conditions to make its large-scale application viable. Studies are needed to select vinasse-tolerant strains, less costly residue treatments and algal biomass productivity determinations that consider the contaminant microorganisms inherent in waste cultures, such as fungi and bacteria. In this study two waste treatments, centrifugation and adsorption on smectite clay and activated charcoal were compared. Centrifugation was more economically and environmentally viable and, therefore, was adopted during this research. Ten microalgae strains were cultivated at different concentrations of the centrifuged vinasse and the most productive species were selected. As a means of increasing biomass production, the efficiencies of acclimation and artificial selection of microalgae were evaluated, but no positive results were obtained. However, high microalgae productivities were obtained cultivating microalgae at predetermined concentrations of treated vinasse. Higher dry biomass, cell biovolumes, productivities and amount of total proteins were obtained in comparison with controls in BG11. In addition, these biomass produced in vinasse had a low proportion of contaminants, up to 22%. *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus quadricauda* and *Tetraselmis gracilis* stood out for their high productivity. All strains evaluated had myxotrophic metabolism, but with different proportions regarding the use of inorganic and organic carbon. Evaluating conceptions of elementary students in relation to the theme of waste, it was observed that issues involving effluents, environmental legislation, regulatory agencies and mitigating measures are little known, which may explain the lack of action and recognition of environmental research by the society. We proposed a short course addressing different aspects of the theme, which proved to be important for changing behaviors towards the environment, and may contribute to the occurrence of future environmental preservation actions. Either by the selection of promising conditions for algal cultivation in vinasse or by the environmental education approach having *waste* as theme, this doctoral thesis is a contribution to a more sustainable and clean ethanol production.

**Keywords:** Sugar-alcohol residue; Biomass production; Microalgal physiology; Environmental conceptions; Environmental Education.

## APRESENTAÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar, sendo que, para cada litro de etanol produzido, são gerados cerca de 12 L de vinhaça, resultando em aproximadamente  $3,8 \cdot 10^{11}$  L do resíduo anualmente (UNICA, 2017). A vinhaça apresenta elevada quantidade de matéria orgânica, nutrientes minerais, DQO, DBO, turbidez e baixo pH (Silva et al., 2007), tendo, portanto, elevado potencial poluente. Daí a proibição de seu descarte em corpos d'água pelas portarias nº 323, de 29 de novembro de 1978, e nº 158, de 03 novembro de 1980, do extinto Ministério do Interior. Devido à presença de quantidade elevada de nutrientes minerais e orgânicos na vinhaça, as usinas sucroalcooleiras a utilizam na fertirrigação de culturas de cana-de-açúcar.

Porém, devido às elevadas quantias de nutrientes minerais, principalmente potássio, o uso excessivo da vinhaça na fertirrigação das plantações de cana-de-açúcar pode salinizar o solo (Silva et al., 2007). Por isso, existem regulamentações brasileiras criadas pela CETESB no estado de São Paulo (CETESB, 2006) que limitam a quantidade de vinhaça que pode ser aplicada no solo em função dos seus teores de potássio. Entretanto, o uso da vinhaça no solo pode ocasionar também variação na proporção de cátions e ânions dependendo das suas características e de como ocorre seu manejo (Bebé et al., 2009), privilegiando a sobrevivência de microorganismos com reprodução mais lenta (Chen et al., 2012). Moraes et al. (2014) ressaltam que este resíduo tem uma capacidade impactante ainda maior, podendo trazer prejuízos não só ao solo, mas também para o ar e as águas subterrâneas. A fertirrigação com vinhaça modifica a dinâmica do carbono e do nitrogênio no solo, aumentando a liberação de gases do efeito estufa como o  $\text{CO}_2$  e o  $\text{N}_2\text{O}$  (Galvez et al., 2012; Carmo et al., 2013). Os compostos presentes na vinhaça podem ainda contaminar os lençóis freáticos por percolação e as águas superficiais por escoamento, trazendo prejuízos principalmente devido à sua elevada DQO (Silva et al., 2007; Cruz et al., 2008). Estas ressalvas quanto ao uso da vinhaça para fertirrigação do solo obriga as indústrias sucroalcooleiras a buscarem aplicações alternativas para o resíduo ou mesmo maneiras de tratá-lo.

A mesma disponibilidade de nutrientes que permite o uso da vinhaça na fertirrigação das culturas de cana-de-açúcar, permite seu uso em meios de cultura para microalgas, já que estes organismos fotossintetizantes demandam nutrientes minerais

para seu crescimento autotrófico. Além disso, diversas espécies microalgais têm a capacidade de utilizar nutrientes orgânicos do meio pela via mixotrófica, investindo ainda mais em biomassa e crescimento (Marchello et al., 2015; Candido e Lombardi, 2018). A geração de biomassa algal é interessante comercialmente pois é fonte de carotenóides, ficobilinas, vitaminas, esteróis, ácidos graxos poli-insaturados e outras substâncias bioativas (Borowitzika, 2013). Portanto, investigações que busquem melhorar o cultivo de microalgas em vinhaça são importantes tanto para o uso e tratamento do resíduo quanto para a produção de biomassa algal.

Apesar dos trabalhos sobre cultivos de microalgas em vinhaça se iniciarem na década de 1980 (Oliveira, 1988), ainda existem muitas lacunas. Faltam investigações que busquem tratamentos mais viáveis para o resíduo e cepas microalgais tolerantes e mais produtivas, que melhorem as condições de cultivo, que investiguem a fisiologia dos organismos no resíduo e que discutam sobre a contaminação biológica presente na biomassa produzida. Neste sentido, esta pesquisa de doutorado busca melhorar todo o processo de produção de biomassa algal em vinhaça, desde o tratamento prévio do resíduo até a análise da biomassa gerada. Além disso, buscando avaliar os aspectos sociais da temática, investigou-se o conhecimento de alunos do ensino fundamental quanto à produção e descarte de resíduos, gerando subsídios para novas metodologias de abordagem do assunto e buscando melhorar a forma como lidamos com este problema.

Para o desenvolvimento da pesquisa, utilizou-se vinhaça coletada na Usina São João, localizada em Araras/SP. A primeira coleta (80 L) foi feita em junho de 2016, na qual obteve-se material para os capítulos 1 e 2. A segunda coleta (100 L) foi realizada em abril de 2017, fornecendo material para os capítulos 2 e 3. A vinhaça foi congelada em frascos de 1 L por no máximo 10 meses, descongelada e usada conforme necessidade.

Este texto foi organizado em quatro capítulos como descrito a seguir.

Capítulo 1. Tratamentos da vinhaça para o cultivo algal

Capítulo 2. Melhoria do cultivo algal em vinhaça tratada

Capítulo 3. Análise da biomassa produzida em vinhaça tratada

Capítulo 4. A temática dos resíduos na Educação Ambiental

## OBJETIVO GERAL

O objetivo biotecnológico central deste trabalho foi melhorar as condições para o uso da vinhaça em cultivos de microalgas, envolvendo tratamentos prévios do resíduo, seleção de cepas tolerantes, uso de processos biológicos de aclimatação e seleção artificial, avaliações produtivas e fisiológicas dos organismos e análises bioquímicas da biomassa produzida. Quanto à área educacional, buscou-se desenvolver um curso com metodologias diversificadas para trabalhar a temática dos resíduos e meio ambiente, tendo como base a avaliação do conhecimento prévio dos alunos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Melhorar dois processos de tratamento da vinhaça quanto a seus aspectos procedimentais;
- ✓ Comparar as viabilidades econômica e ambiental dos tratamentos da vinhaça, permitindo a escolha de um deles para a realização das demais etapas do trabalho;
- ✓ Cultivar dez espécies microalgais (água doce e marinha) em diferentes concentrações de vinhaça tratada por meio do processo selecionado como mais viável, avaliando sua toxicidade para os organismos.
- ✓ Selecionar as concentrações ótimas de vinhaça para o desenvolvimento das espécies algais que se mostrarem mais tolerantes à toxicidade do resíduo.
- ✓ Investigar sobre a eficiência da aclimatação e da seleção artificial de indivíduos resistentes no incremento da produção microalgal em vinhaça;
- ✓ Analisar os parâmetros de crescimento e a composição bioquímica das comunidades microbianas (microalgas, fungos e bactérias) para cada cultivo;
- ✓ Avaliar a fisiologia fotossintética e inferir sobre o metabolismo energético das microalgas no resíduo;
- ✓ Investigar conhecimentos prévios e opiniões de alunos do 8º ano do ensino fundamental sobre a produção, descarte, tratamento e problemas gerados pelos resíduos.
- ✓ Desenvolver, aplicar e analisar um curso para abordar os diversos aspectos da temática resíduos e meio ambiente com alunos do 8º ano do ensino fundamental.



# CAPÍTULO 1: TRATAMENTOS DA VINHAÇA PARA O CULTIVO ALGAL

## Resumo

Um possível destino para a vinhaça, resíduo altamente poluente da indústria sucroalcooleira, é a composição de meios de cultura para microalgas. A literatura mostra que este resíduo pode reduzir os custos com a produção de meios de cultura e gerar biomassa algal com alto valor agregado. No entanto, características da vinhaça bruta como alta turbidez, osmolaridade e toxicidade e baixo pH, limitam seu uso em cultivos algais a baixas concentrações. Por isso, tratamentos do resíduo que melhorem estas características tornam esta possibilidade de utilização mais promissora. Os objetivos deste capítulo foram melhorar e comparar dois tratamentos da vinhaça para o crescimento de microalgas: a centrifugação e a adsorção em argila esmectita e carvão ativado. Na centrifugação, a intensidade de rotação foi mais efetiva do que a temperatura na melhoria da vinhaça, sendo que o processo ótimo envolveu centrifugação por 12 min, a 25 °C e 2510 g. Na adsorção, a adição de uma etapa prévia de centrifugação, a inserção ou a substituição da argila esmectita e do carvão ativado por bagaço ou cinzas do bagaço de cana-de-açúcar não a tornaram mais viável. A comparação entre os tratamentos mostrou que melhorias mais acentuadas nas características físico-químicas e na qualidade da vinhaça para o crescimento de microalgas foram obtidas por meio da adsorção. No entanto, a centrifugação foi mais rápida, menos custosa e gerou menos resíduos adicionais. Logo, o tratamento de adsorção da vinhaça foi considerado desvantajoso por ter menores viabilidades econômica e ambiental. Considerando a existência de muitos estudos que relacionam o uso de resíduos tratados com os parâmetros de crescimento algal, mas poucos que investigam os aspectos processuais dos tratamentos, este capítulo traz uma nova visão sobre a temática, possibilitando um destino lucrativo para um resíduo poluente e gerado em grandes quantidades.

**Palavras-chave:** Produção de biomassa; Uso de resíduos; Aplicação industrial, Materiais adsorventes.

## 1.0 INTRODUÇÃO

O valor nutritivo da vinhaça possibilita seu uso como meio de cultura para microalgas. Porém, algumas características do resíduo podem prejudicar o crescimento algal, como sua elevada turbidez e coloração escura (Silva et al., 2007), que reduzem a passagem de luz e prejudicam a fotossíntese. Outro fator prejudicial é a alta concentração de nutrientes minerais na vinhaça, o que causa problemas osmóticos e dificulta a sobrevivência e a reprodução algal (Kadioglu e Algur, 1992). Além disso, a composição complexa deste resíduo pode envolver substâncias tóxicas às células algais como as melanoidinas (Robles-González et al., 2012). Devido a estes fatores, a vinhaça bruta em altas concentrações não se constitui um bom meio de cultivo para microalgas. Como um dos valores máximos encontrados na literatura, Gollo et al. (2016) utilizaram vinhaça bruta a 3% como meio de cultura para *Haematococcus pluvialis*. Daí a necessidade de tratamentos que amenizem as condições negativas inerentes da vinhaça.

Mitra et al. (2012) cultivaram *Chlorella vulgaris* em sobrenadante de vinhaça de milho previamente sedimentada e sifonada e conseguiram elevar a quantia de lipídios na biomassa algal. Já Marques et al. (2013) cultivaram *C. vulgaris* em vinhaça de cana-de-açúcar tratada anaerobiamente, atingindo taxas de crescimento de  $0,76 \text{ dia}^{-1}$ . Candido e Lombardi (2017) realizaram os tratamentos de centrifugação e de adsorção em argila esmectita e carvão ativado das vinhaças convencional e biodigerida da indústria sucroalcooleira, conseguindo atingir taxas de crescimento para a mesma alga de até  $1,2 \text{ dia}^{-1}$ , um dos maiores valores encontrados na literatura. Porém, enquanto foi possível obter bons parâmetros de crescimento algal em vinhaça centrifugada à até 20%, com a vinhaça convencional adsorvida foi possível utilizar concentrações de até 60% (Candido e Lombardi, 2017).

A argila esmectita é um mineral da família dos filossilicatos ricos em  $\text{SiO}_2$  em combinação com Al, Mg, Fe e outros elementos em menor quantidade, sendo amplamente utilizada devido à sua alta capacidade adsorviva (Klopprogge et al., 1999). Esta argila tem a capacidade de retenção de pesticidas maior que a matéria orgânica presente no solo (Sheng et al., 2001). Já o carvão ativado é um material com granulometria reduzida, obtido da queima controlada de determinadas madeiras, que é amplamente utilizado na clarificação, desodorização e purificação de líquidos ou gases com uso industrial, agrícola e medicinal (Pereira et al., 2008; Musso et al., 2014; Okada



et al., 2014). Este composto é utilizado para o clareamento de resíduos, como demonstrado para o melão (Liakos e Lazaridis, 2016) e para efluentes têxteis (Duarte et al., 2013). A combinação de argila esmectita e carvão ativado proposta por Candido e Lombardi (2017) para o tratamento da vinhaça promoveu redução do material particulado, da coloração, da quantidade de nutrientes orgânicos e minerais e aumento do pH do resíduo, melhorando características que comprometem o crescimento de algas. No entanto, o processo exige grandes quantidades de materiais, alto tempo de processamento e gera muitos resíduos. Por isso, sua melhoria é necessária para torná-lo econômica e ambientalmente viável.

O bagaço da cana-de-açúcar é um subproduto e as cinzas do bagaço de cana-de-açúcar são resíduos sólidos da indústria sucroalcooleira, também com alta capacidade adsorviva (Yu et al., 2015; Werkneh et al., 2014). Usá-los como substitutos ou materiais adicionais no tratamento da vinhaça com argila esmectita e carvão ativado seria uma maneira de baratear o processo, bem como de dar um destino útil para ambos. A centrifugação prévia do resíduo bruto ainda pode reduzir a quantidade de partículas na vinhaça (Candido e Lombardi, 2017), tornando o tratamento com materiais adsorventes comerciais mais fácil e rápido.

Em geral, os tratamentos físicos, químicos e biológicos da vinhaça propostos na literatura são caros e necessitam de muitas tecnologias. Tendo em vista que a maior parte dos estudos relacionam estes tratamentos apenas ao crescimento algal, são necessários estudos que considerem seus aspectos econômicos e ambientais, almejando a aplicação em larga escala. Neste contexto, nossos objetivos foram melhorar e comparar os dois diferentes tratamentos da vinhaça propostos em Candido e Lombardi (2017): a centrifugação e a adsorção por argila esmectita e carvão ativado. O melhoramento destes processos consistiu em utilizar o mínimo possível de materiais, energia, maquinário e tempo para os tratamentos da vinhaça. Além disso, incluiu-se uma etapa prévia de centrifugação e materiais substitutos como o bagaço e as cinzas do bagaço de cana-de-açúcar no tratamento de adsorção da vinhaça na tentativa de barateá-lo. Após este aprimoramento, avaliamos a viabilidade econômica e ambiental de ambos os tratamentos e os comparamos, discutindo sobre suas aplicações em usinas sucroalcooleiras.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas da vinhaça realizadas neste trabalho de doutorado foram feitas utilizando-se galões plásticos de 20 L previamente lavados com sabão, enxaguados com água, lavados com ácido clorídrico a 4% e enxaguados com água deionizada. A vinhaça foi coletada a aproximadamente 80 °C, deixada resfriar por entorno de oito horas até atingir a temperatura ambiente (~25 °C). Posteriormente, o resíduo foi passado por peneira com poro de 0,8 mm para retirada de materiais grandes como galhos e areia e distribuída em garrafas plásticas de 1 L previamente higienizadas da mesma maneira que se realizou com os galões. Foram adicionadas 800 mL de vinhaça em cada garrafa e estas foram congeladas a  $-5 \pm 2$  °C até o momento de seu uso, por um período máximo de dez meses.

A seguir, estão descritas as melhorias dos tratamentos da vinhaça de centrifugação e de adsorção por argila esmectita e carvão ativado.

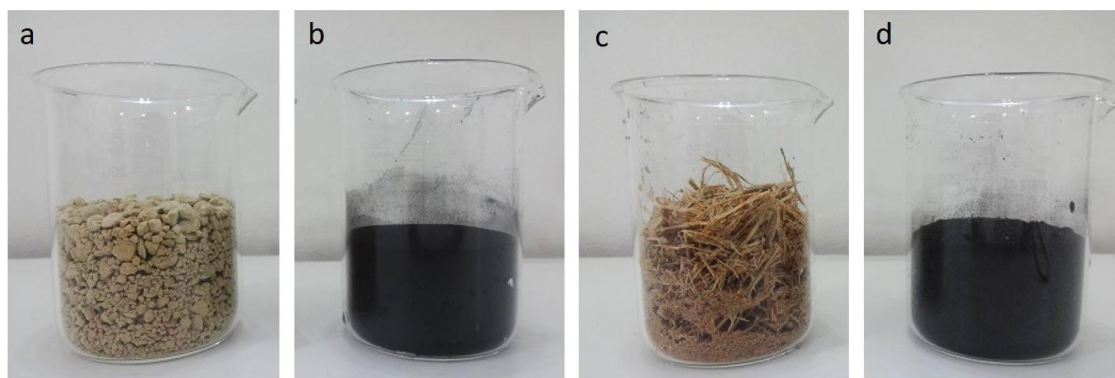
### 2.1 Centrifugação

Adicionaram-se 45 mL de vinhaça bruta em doze tubos Falcon com capacidade de 50 mL. Cada tubo foi submetido separadamente a um período de 20 minutos de centrifugação em temperaturas de 10, 15, 20 ou 25°C, com rotações de 2000, 3000 ou 4000 rpm, correspondentes a valores aproximados de 630, 1410 ou 2510 g respectivamente. A cada 2 minutos a centrifugação foi pausada e extraíram-se amostras de sobrenadante para determinação de pH em pHmetro Logen Scientific ® (Brasil), absorvância em 570 nm e em 455 nm em espectrofotômetro Nanocolor Macherey-Nagel (Reino Unido) e visualização em microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200 (Japão), com ampliação de 400 vezes, para percepção de leveduras e materiais particulados. A absorvância em 570 nm está relacionada a quantia de materiais particulados presentes no meio (Costa et al., 2003) e a absorvância em 455 nm é relativa à coloração da vinhaça (APHA, 1995).

A partir dos dados coletados foram selecionados os menores tempos, velocidades de rotação e temperaturas que permitiram a melhoria mais acentuada da vinhaça, com pH menos ácido, menores valores de absorvâncias e sem a presença de leveduras e particulados visíveis em microscopia óptica.

## 2.2 Adsorção

Os procedimentos de adsorção da vinhaça por argila esmectita e carvão ativado encontram-se descritos no depósito de patente número BR 10 2015 024100 3 do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Candido et al., 2015) e em Candido e Lombardi (2017). Neste processo, a vinhaça é colocada sobre uma coluna de argila esmectita e, após ser percolada, é colocada sobre uma coluna de carvão ativado, por onde flui. Na tentativa de diminuir a quantidade de materiais adsorventes comerciais utilizados neste processo, foram realizados testes incluindo bagaço de cana-de-açúcar e cinza de bagaço. Devido à capacidade do bagaço de cana em absorver grandes partículas (Yu et al., 2015; Werkneh et al., 2014), a passagem por este material foi feita antes dos tratamentos subsequentes. Cinzas do bagaço de cana foram testadas como substitutas da argila esmectita e do carvão ativado. A Figura 1 mostra o aspecto geral de cada um dos materiais mencionados.

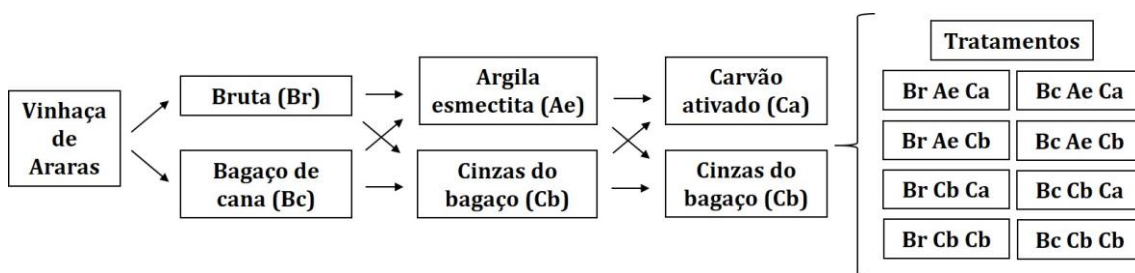


**Figura 1. Materiais utilizados no tratamento da vinhaça.** Materiais utilizados no tratamento de adsorção da vinhaça: (a) argila esmectita, (b) carvão ativado, (c) bagaço de cana-de-açúcar e (d) cinzas do bagaço de cana.

Como a percolação da vinhaça pela argila esmectita é um processo demorado, realizamos o contato da argila com a vinhaça por suspensão do material sólido a partir de agitação mecânica, utilizando um motor rotativo com pás acopladas. A separação do material adsorvente do resíduo foi feita por gravidade. Testes preliminares mostraram

que a suspensão da argila causou as mesmas melhorias que a percolação da vinhaça em relação às absorvâncias, mas exigiu menos tempo e menor consumo do material adsorvente. Nos tratamentos em que a cinza do bagaço de cana foi utilizada como substituto da argila, o material sólido não foi misturado à vinhaça, pois sua separação não foi viável por decantação, filtração por papel filtro ou centrifugação.

Usando a percolação de um litro de vinhaça por 300 g de bagaço de cana como um tratamento e tentando-se substituir a argila e/ou o carvão pelas mesmas massas de cinzas de bagaço de cana (250 g de argila esmectita ou 100 g de carvão ativado por litro de vinhaça), realizaram-se oito diferentes sequências de adsorção da vinhaça. Foram utilizadas quantias elevadas de bagaço de cana, argila esmectita, carvão ativado e cinzas de bagaço de cana para que não houvesse limitação do processo nestes testes. Em cada um dos tratamentos finais realizaram-se medições de pH e absorvâncias em 570 nm e em 455 nm. Na Figura 2 estão representados de forma esquemática as sequências de processos adsorptivos descritas anteriormente.



**Figura 2. Tratamentos da vinhaça.** Sequências de adsorção dos oito tratamentos realizados na vinhaça coletada em Araras (Usina São João).

Devido à semelhança entre os tratamentos Br Ae Ca e Bc Ae Ca quanto aos parâmetros avaliados, realizaram-se cultivos de uma cepa de *C. vulgaris* oriunda de uma Estação de Tratamento de Esgoto (*C. vulgaris* ETE) nestes tratamentos e em suas etapas intermediárias. Além disso, como a função do bagaço da cana-de-açúcar era a de reduzir a quantidade de partículas grandes da vinhaça, tentou-se também removê-las com uma centrifugação (Cn) antes da adsorção por argila esmectita e/ou carvão ativado. Desta maneira, os meios adotados nos cultivos foram Cn, Br Ae, Br Ae Ca, Bc Ae, Bc Ae Ca, Cn Ae, Cn Ca e Cn Ae Ca, com controle em meio BG11. Nos tratamentos descritos, foi utilizada a concentração ótima de vinhaça tratada de 60% em água deionizada, de

acordo com os resultados obtidos por Candido e Lombardi (2017). A concentração ótima foi a maior concentração de vinhaça que permitiu o crescimento máximo da cepa microalgal utilizando o resíduo tratado diluído como meio de cultura. Para a vinhaça centrifugada, também foi utilizada a concentração de 20%, de acordo com valores ótimos obtidos pelas mesmas autoras para este tratamento. Tanto o meio BG11 quanto os produzidos com vinhaça tratada tiveram seus pHs ajustados para 6,8 – 7,0 utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH). As concentrações dos componentes do meio BG11 (Rippka et al., 1979), utilizado como controle, estão representadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Meio BG11.** Composição das soluções utilizadas para produção do meio BG11 e concentrações finais de cada componente no meio preparado (Rippka et al., 1979).

<b>Solução</b>	<b>Componentes</b>	<b>Concentração final (mol L<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	1,8 x 10 <sup>-2</sup>
<b>2</b>	Ácido cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	3,1 x 10 <sup>-5</sup>
	Citrato férrico de amônio	3,0 x 10 <sup>-5</sup>
<b>3</b>	Fosfato de potássio bibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O)	1,8 x 10 <sup>-4</sup>
<b>4</b>	Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	3,0 x 10 <sup>-4</sup>
<b>5</b>	Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	2,5 x 10 <sup>-4</sup>
<b>6</b>	Carbonato de sódio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	1,9 x 10 <sup>-4</sup>
<b>7</b>	EDTA (MgNa <sub>2</sub> EDTA . H <sub>2</sub> O)	2,8 x 10 <sup>-6</sup>
<b>8</b>	Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	4,6 x 10 <sup>-5</sup>
	Cloreto de manganês (MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O)	9,5 x 10 <sup>-6</sup>
	Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	7,7 x 10 <sup>-7</sup>
	Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)	3,6 x 10 <sup>-7</sup>
	Molibdato de sódio (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)	1,6 x 10 <sup>-6</sup>
	Nitrato de cobalto (Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O)	1,7 x 10 <sup>-7</sup>

Os cultivos foram iniciados com  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , em frascos plásticos de cultura de tecidos com 150 mL de meio, mantidos em temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e luminosidade de  $130 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

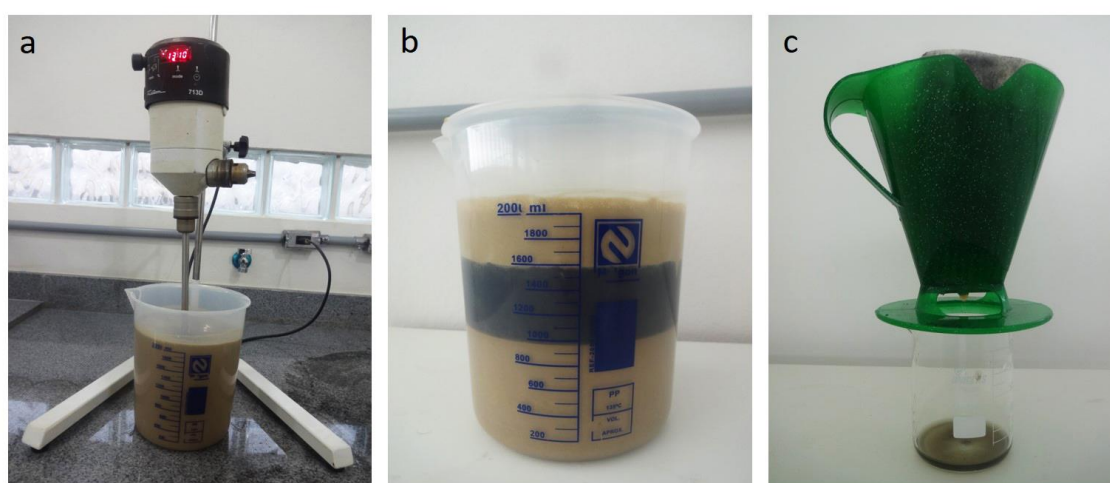
Acompanhou-se diariamente a densidade celular algal das culturas por meio do contador automático de células Muse Cell Count & Viability Assay (Merck Millipore, EUA). Como a vinhaça é rica em leveduras, cujo formato e diâmetro são semelhantes às células de *C. vulgaris*, diferindo apenas pela coloração (marrom na levedura e verde na alga), realizaram-se também contagens manuais das densidades celulares em uma câmara de Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse E200, Japão). A comparação entre as contagens feitas no contador automático e ao microscópio óptico demonstra que a contagem automática é numericamente maior do que a manual. Porém, esta diferença nunca supera 10% em relação à contagem manual, a qual inclui erros humanos inerentes à visualização celular. Logo, o contador automático contabilizou apenas células algais, desconsiderando outros contaminantes e, por isso, foi usado nas demais etapas deste trabalho.

Estes cultivos nos mostraram que a melhor sequência de adsorção foi a com argila esmectita e carvão ativado, que foi posteriormente aprimorada. Para a melhoria da adsorção da vinhaça por argila esmectita utilizaram-se quantias de 250, 200, 150, 100, 80 e 50 g de argila por litro de vinhaça. A rotação empregada no rotor (90 a 130 rpm) foi a mínima que possibilitou a suspensão de toda a argila na vinhaça, o que foi diretamente proporcional a massa de argila empregada. Nos intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 60 minutos de mistura foram coletadas amostras, que foram centrifugadas a 1410 g,  $20^\circ\text{C}$  por 10 min apenas para acelerar a separação da argila da vinhaça e possibilitar uma determinação imediata do pH e das absorvâncias em 570 e 455 nm. Entretanto, centrifugar a mistura de vinhaça com argila na indústria acrescentaria mais uma etapa ao tratamento e o encareceria. Uma alternativa mais barata para esta separação é a decantação da argila. Para avalia-la, realizamos testes de tempo de decantação e volume decantado em um cone de Imhoff. Em tempos pré-determinados de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 e 150 min e 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18 e 24 horas foram retiradas amostras para medição do pH e das absorvâncias em 570 e 455 nm.

Quanto à adsorção por carvão ativado, testes prévios mostraram que um tempo de contato de um minuto da vinhaça com o carvão em uma coluna é suficiente para reduzir a coloração da vinhaça. Porém, após a passagem de uma determinada quantia de vinhaça previamente tratada com a argila esmectita, o material deixa de ser poroso e

fica compacto, impedindo a passagem de líquido. Portanto, no melhoramento desta etapa medimos a quantia máxima de vinhaça que poderia ser passada pelo carvão antes de sua saturação. Aqui também tentamos misturar o carvão com a vinhaça como fizemos com a argila, mas este não se separou posteriormente por decantação, filtragem ou centrifugação, confirmando a necessidade da percolação.

A Figura 3 exemplifica os processos de agitação da vinhaça com argila esmectita, decantação do precipitado e percolação por carvão ativado em escala laboratorial.



**Figura 3. Processos envolvidos no tratamento de adsorção da vinhaça.** Processos selecionados e aprimorados para o tratamento da vinhaça em escala laboratorial: (a) agitação da vinhaça com argila esmectita, (b) decantação da argila e do material adsorvido da vinhaça e (c) percolação por carvão ativado.

Com estes procedimentos, determinaram-se as quantias mínimas de materiais necessários no tratamento de adsorção, permitindo compará-lo à centrifugação.

### *2.3 Comparação entre os tratamentos*

Características físico-químicas das mostras de vinhaça bruta, centrifugada, tratada apenas por argila esmectita e tratada por argila esmectita e por carvão ativado em condições aprimoradas foram analisadas. Realizaram-se medidas de pH e de

absorbância em 570 nm e em 455 nm. Análises de DQO, DBO e composição química foram feitas pela empresa ASL Análises Ambientais - Laboratório São Lucas (Rio Claro/SP). Concentrações de ácido málico e ácido trans-acotínico foram determinadas pela empresa Global Análises & Consultoria. Concentrações de carbono e nitrogênio orgânicos e totais foram obtidas no Laboratório de Ficologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os métodos usados nestas análises, que permitiram comparar as modificações promovidas por cada tratamento, estão descritos no Quadro 1.

Os resultados obtidos nesta e nas demais etapas deste doutorado foram plotados em gráficos utilizando-se o programa Origin 8.5. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa R 3.3.1, com os testes paramétricos ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de todos tratamentos entre si.

**Quadro 1. Caracterização da vinhaça.** Métodos usados para caracterização físico-química da vinhaça.

<b>Parâmetro</b>	<b>Métodos</b>
<b>Ânions</b>	USEPA300.1 rev 1:1997- POPDAM054 vs. 08:2013
<b>Nitrogênio amoniacal</b>	POPDAM016 vs.14:2013 - SMEWW 22 <sup>a</sup> Ed 2012 - Método 4500-NH3D
<b>Nitrogênio Kjeldahl</b>	POPDAM107 vs.06:2013 - SMEWW 22 <sup>a</sup> Ed 2012 – Método 4500-Norg B
<b>Metais totais</b>	SMEWW 22 <sup>a</sup> Ed 2012 - Método 3030E USEPA 6010 C - rev.03:2007 POPDAM060
<b>Ácidos málico e trans-acotínico</b>	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)
<b>Carbono e nitrogênio orgânicos e totais</b>	Auto Sampler Shimadzu modelo ASI-L (Japão).

A partir destes resultados, traçamos um panorama em relação à quantia de materiais, equipamentos e procedimentos necessários para a execução de cada tratamento, bem como mecanismos de ação, geração de resíduos e durabilidade do

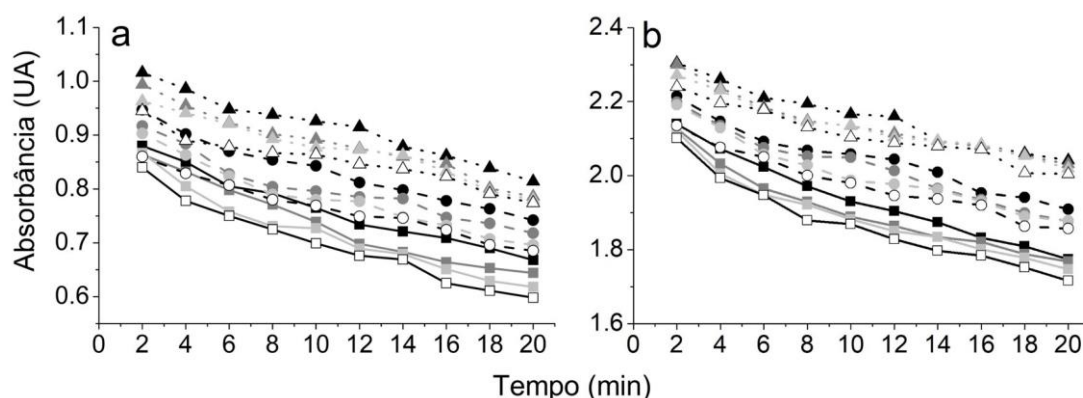


maquinário envolvido, a fim de inferirmos sobre as viabilidades econômica e ambiental dos processos. Com isso, pudemos selecionar o tratamento da vinhaça mais viável, a ser usado nas demais etapas deste doutorado para os cultivos algais.

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 Centrifugação

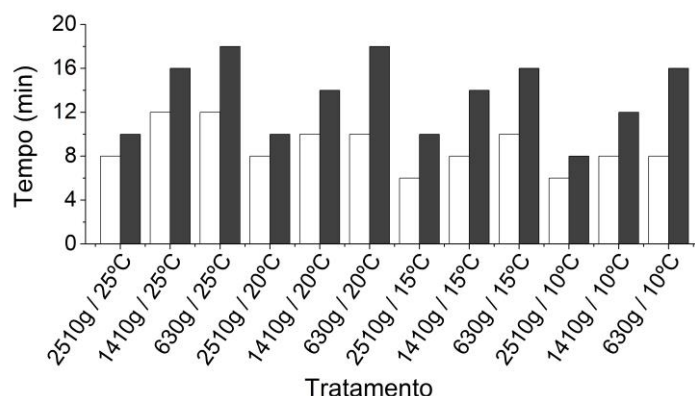
A centrifugação não resultou em alterações significativas no pH da vinhaça, que variou entre 4,52 e 4,61 nos diferentes tratamentos. A Figura 4 representa as variações nos valores de absorvância em 570 e em 455 nm promovidas ao longo do tempo pela centrifugação em diferentes intensidades (g) e temperaturas (°C).



**Figura 4. Absorbâncias em 570 e em 455 nm para as vinhaças centrifugadas.** Valores de absorvância (UA) em (a) 570 nm e em (b) 455 nm ao longo do tempo de centrifugação (min) nas condições (■) 2510 g / 25 °C, (●) 1410 g / 25 °C, (▲) 630 g / 25 °C, (■) 2510 g / 20 °C, (●) 1410 g / 20 °C (▲) 630 g / 20 °C, (■) 2510 g / 15 °C, (●) 1410 g / 15 °C, (▲) 630 g / 15 °C, (□) 2510 g / 10 °C, (○) 1410 g / 10 °C e (△) 630 g / 10 °C.

A partir da Figura 4, observa-se que as diferenças de intensidades de centrifugação influenciam mais na redução das absorvâncias para os dois comprimentos de onda do que as diferenças de temperatura.

Analisando a presença ou ausência de leveduras e de outros particulados nas amostras de vinhaça centrifugadas ao microscópio óptico, obtivemos os tempos mínimos para eliminação destes componentes em cada condição de centrifugação, os quais estão representados na Figura 5.

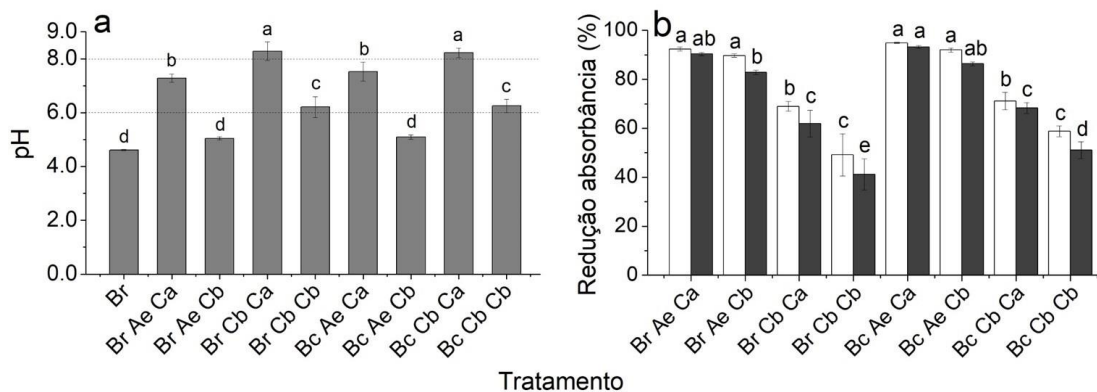


**Figura 5. Tempos mínimos para eliminação de leveduras e particulado.** Tempos mínimos de centrifugação (min) em cada condição de intensidade / temperatura para eliminação de leveduras (barras claras) e outros materiais particulados (barras escuras) perceptíveis por microscopia óptica.

Novamente observa-se maior influência da intensidade do que da temperatura de centrifugação na melhoria da vinhaça. Tendo-se em vista que as usinas sucroalcooleiras já apresentam centrífugas industriais (Sauze, 1973; Sales et al., 1986) e que estas não são refrigeradas como as centrífugas laboratoriais, adotou-se como tratamento padrão de centrifugação para as análises posteriores a temperatura de 25°C, correspondente à temperatura ambiente da maioria das regiões brasileiras (INMET, 2015), com intensidade de 2510 g e tempo de centrifugação de 12 minutos.

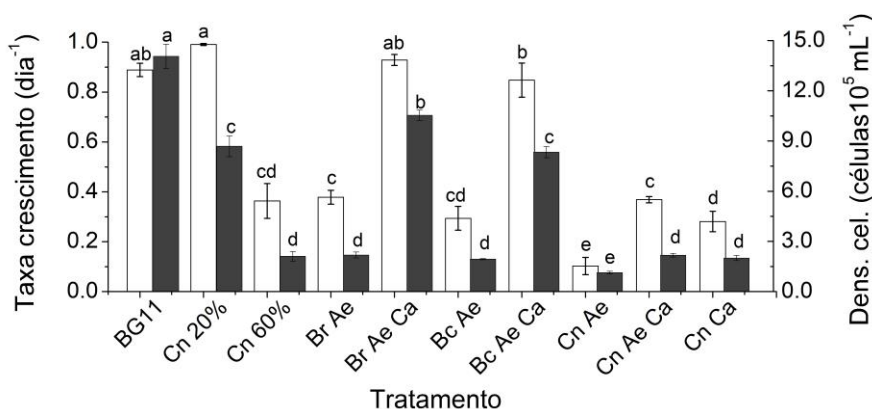
### 3.2 Adsorção

Os pHs finais das amostras de vinhaça tratadas por cada sequência de adsorção e as absorbâncias em 570 e em 455 nm estão representados na Figura 6.



**Figura 6. Valores de pH e de absorvâncias para os tratamentos de adsorção da vinhaça.** Valores médios (n = 3) de (a) pH e (b) reduções (%) das absorvâncias em 570 nm (barras claras) e em 455 nm (barras escuras) em relação aos valores da vinhaça bruta (Br). Siglas das etapas: vinhaça bruta (Br), passada pelo bagaço de cana-de-açúcar (Bc), agitada com argila esmectita (Ae), percolada pelas cinzas de bagaço de cana (Cb) ou por carvão ativado (Ca). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si (p < 0,05).

Podemos notar que os dois tratamentos que possibilitaram neutralização do pH e maiores reduções nas quantias de particulado e na coloração da vinhaça foram Br Ae Ca e Bc Ae Ca. Já que estes parâmetros físico-químicos não foram suficientes para selecionar o melhor tratamento, foram efetuados cultivos de *C. vulgaris* ETE, cujas taxas de crescimento e densidades celulares finais encontram-se na Figura 7.

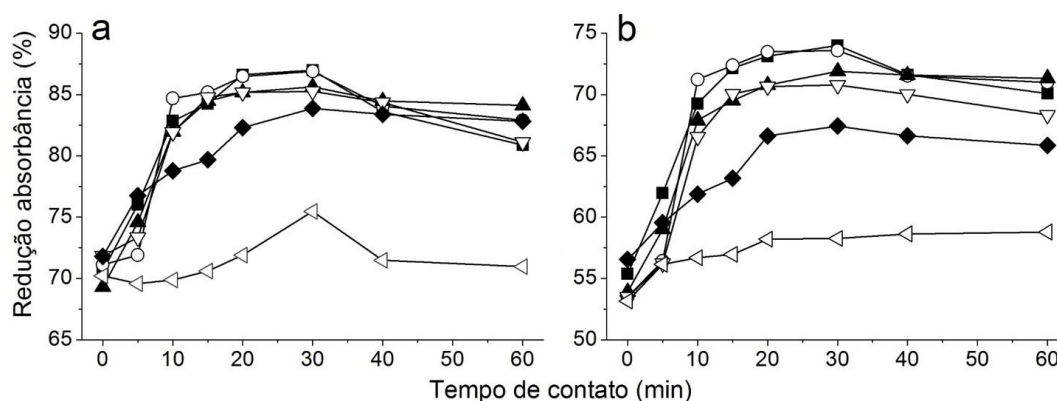


**Figura 7. Parâmetros de crescimento algal.** Taxas de crescimento (dia<sup>-1</sup>, barras claras) e densidades celulares em 96 h (células 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>, barras escuras) para os tratamentos. Siglas das etapas: vinhaça bruta (Br), passada pelo bagaço de cana-de-açúcar (Bc), agitada com argila esmectita (Ae), percolada por carvão ativado (Ca) e centrifugada (Cn). Letras diferentes indicam valores que diferem significativamente entre si (p < 0,05).

A partir dos cultivos, observamos que as etapas intermediárias Br Ae e Bc Ae não possibilitaram crescimentos algais relevantes, denotando a importância da etapa de percolação por carvão ativado. Dentre os dois tratamentos com parâmetros físico-químicos ótimos notamos que o Br Ae Ca possibilitou maior crescimento de *C. vulgaris* do que Bc Ae Ca. Por isso, foram melhoradas as etapas da sequência Br Ae Ca.

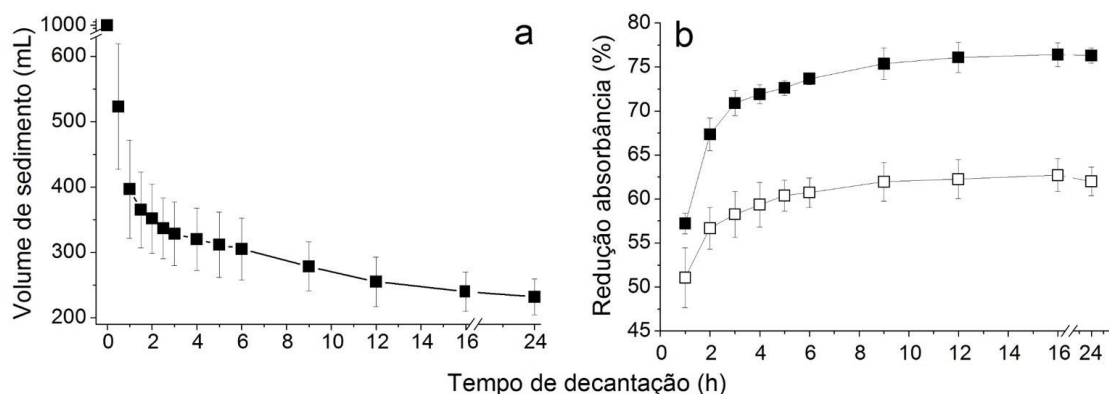
Na avaliação da quantidade mínima de argila esmectita necessária para o tratamento da vinhaça, não houve alterações significativas de pH, com valores deste parâmetro variando entre 4,47 e 4,58. A Figura 8 demonstra as reduções nas absorvâncias em 570 e em 455 nm promovidas pela agitação da vinhaça com diferentes quantias de argila.

As reduções de absorvâncias promovidas pelas concentrações de 250, 200, 150 e 100 g L<sup>-1</sup> de argila esmectita por litro de vinhaça foram semelhantes. Por isso admitiu-se que a quantidade mínima de argila necessária para o tratamento da vinhaça é de 100 g L<sup>-1</sup>, com tempo mínimo e ótimo de contato de 20 minutos.



**Figura 8. Reduções das absorvâncias promovidas pela argila esmectita.** Reduções nas absorvâncias (%) em (a) 570 nm e em (b) 455 nm promovidas pela agitação da vinhaça com concentrações de argila esmectita de (■) 250 g L<sup>-1</sup>, (○) 200 g L<sup>-1</sup>, (▲) 150 g L<sup>-1</sup>, (▽) 100 g L<sup>-1</sup>, (◆) 80 g L<sup>-1</sup> e (◁) 50 g L<sup>-1</sup> ao longo do tempo de contato com a vinhaça (min).

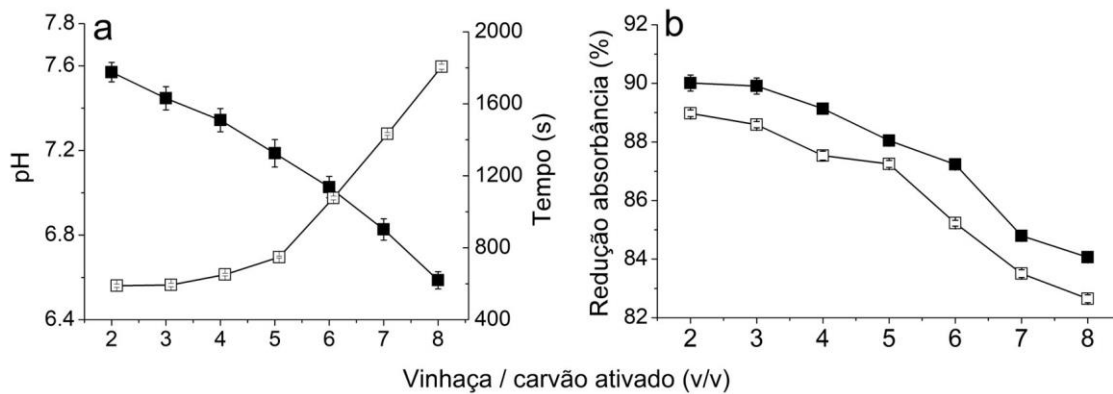
No teste de velocidade de decantação da argila, os valores encontrados de volume de sedimento e reduções nas absorvâncias em 570 e em 455 nm ao longo do tempo encontram-se na Figura 9.



**Figura 9. Decantação da argila esmectita.** (a) Volume de sedimento (argila + material particulado da vinhaça; mL) e (b) redução das absorvâncias (UA) em ( ■ ) 570 nm e em ( □ ) 455 nm ao longo do tempo de decantação (h) em Cones de Imhoff.

Após uma hora de decantação, cerca de 50% da argila já se depositou e, após 6 horas, uma decantação de 68% foi obtida, o que não sofreu grandes modificações até as 24 horas avaliadas. Portanto, podemos dizer que aproximadamente 30% do volume inicial da vinhaça utilizada se perde no processo de adsorção pela argila esmectita. O período de seis horas de decantação levou a uma redução de aproximadamente 73% na absorção em 570 nm e 60% em 455 nm. Após nove horas de decantação, não existem grandes variações no volume de precipitado e nos valores de absorvâncias do sobrenadante. Porém, em seis horas de decantação, os parâmetros já correspondem à ao menos 90% do obtido em nove horas. Por isso determinou-se que seis horas é o tempo necessário de decantação do sedimento para retirada da vinhaça sobrenadante.

A vinhaça previamente tratada com argila esmectita foi utilizada para determinar a quantia máxima de vinhaça que pode ser percolada antes da saturação do carvão ativado. Os resultados encontrados são mostrados na Figura 10.



**Figura 10. Adsorção por carvão ativado.** (a) Valores de ( ■ ) pH e ( □ ) tempo de percolação (s) em função do volume de vinhaça adicionada em relação ao volume de carvão ativado utilizado (v/v). (b) Redução dos valores de absorvância em ( ■ ) 570 nm e em ( □ ) 455 nm em relação à vinhaça bruta em função do volume de vinhaça adicionada em relação ao volume de carvão ativado utilizado.

Ao adicionarmos as primeiras 100 mL de vinhaça previamente tratada com argila esmectita em 30 g (100 mL) de carvão ativado, não obtivemos nenhum filtrado, já que é necessária uma quantia inicial de líquido igual ao volume utilizado de carvão ativado para unidê-lo. Por isso, só a partir da adição de mais 100 mL de vinhaça (volume acumulado 2x superior ao volume de carvão ativado usado) é que foram mensurados o pH, o tempo de percolação e as absorvâncias em 570 e em 455 nm. Até a adição de 5 volumes de vinhaça em relação ao volume utilizado de carvão, o processo ainda mantinha uma velocidade próxima da inicial, com valores de pH e absorvâncias próximos aos obtidos para o primeiro volume de vinhaça coletado. A partir daí o tempo de percolação aumenta consideravelmente, comprometendo as melhorias ocasionadas pelo carvão ativado. Logo, é possível adicionar até 5 volumes de vinhaça por volume de carvão ativado utilizado antes da saturação do material adsorvente (1 L de vinhaça / 0,2 L ou 60 g de carvão ativado).

### 3.3 Comparação entre os tratamentos

A Tabela 2 traz os valores de pH, absorvância em 570 e em 455 nm, DQO, DBO e composição química de amostras de vinhaça bruta, centrifugada, tratada apenas por

argila esmectita e tratada por argila esmectita e carvão ativado, obtidas nas condições ótimas determinadas anteriormente.

Em geral, o tratamento com apenas argila esmectita promoveu modificações químicas menores do que as promovidas pelo tratamento com argila esmectita e carvão ativado, confirmando a importância da etapa com o carvão ativado demonstrada nos cultivos com *C. vulgaris*. O tratamento com argila esmectita e carvão ativado foi o que ocasionou maiores mudanças químicas na vinhaça, reduzindo os nutrientes orgânicos e minerais. Quanto à redução de material particulado, a centrifugação ocasionou melhorias semelhantes às possibilitadas pelos tratamentos de adsorção.

Considerando um panorama geral dos tratamentos, buscamos compará-los a fim de discutirmos qual seria mais viável econômica e ambientalmente para uma usina sucroalcooleira. Os aspectos comparados se encontram no Quadro 2.

O tratamento com argila esmectita e carvão ativado permite o uso da vinhaça tratada em maior concentração, assim como descrito por Candido e Lombardi (2017). Porém, a rentabilidade é maior e a necessidade de materiais e equipamentos são menores na centrifugação, a qual é suficiente para eliminar materiais particulados que atrapalham a entrada de luz e o crescimento algal em vinhaça.

**Tabela 2. Análise das amostras de vinhaça tratadas.** Valores de pH, absorvâncias em 570 e em 455 nm, DQO, DBO, sólidos suspensos totais, dureza calculada, condutividade eletrolítica e composição química das amostras de vinhaça (Usina São João, Araras/SP) bruta, centrifugada (Cn), tratada por argila esmectita (Ae) e tratada por argila esmectita e carvão ativado (Ae Ca).

Parâmetros avaliados	Amostras de vinhaça			
	Bruta	Cn	Ae	Ae Ca
pH (-log [H <sup>+</sup> ])	4,58	4,55	4,53	7,38
Absorvância em 570 nm (UA)	3,650	0,683	0,592	0,391
Absorvância em 455 nm (UA)	5,653	1,864	1,476	0,651
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	51817,0	44863,0	37909,0	32560,0
DBO por incubação (mg L <sup>-1</sup> )	24207,0	17011,0	16870,0	12766,0
Sólidos suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	45900,0	1220,0	2050,0	840,0
Dureza calculada (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	3034,0	1573,6	1928,0	1676,2
Condutividade eletrolítica (µS cm <sup>-2</sup> )	19852,0	11620,0	10910,0	13620,0
Carbono total (mg L <sup>-1</sup> )	17416,0	16160,0	15064,0	10438,0
Carbono orgânico total (mg L <sup>-1</sup> )	17388,0	16138,0	15030,0	10362,0
Carbono inorgânico total (mg L <sup>-1</sup> )	28,16	21,34	34,02	75,36
Nitrogênio orgânico total (mg L <sup>-1</sup> )	764,0	632,2	547,4	316,4
Nitrogênio nítrico (mg L <sup>-1</sup> )	<11,4	<11,4	<11,4	<11,4
Nitrogênio nitroso (mg L <sup>-1</sup> )	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Nitrogênio Amoniacal (mg L <sup>-1</sup> )	134,7	34,0	29,0	24,8
Nitrogênio Kjendahl (mg L <sup>-1</sup> )	492,0	340,5	276,6	199,4
Sódio (mg L <sup>-1</sup> )	36,6	10,4	13,8	12,6
Cálcio (mg L <sup>-1</sup> )	735,0	648,0	772,0	777,0
Potássio (mg L <sup>-1</sup> )	4340,0	4280,0	3819,0	3828,0
Magnésio (mg L <sup>-1</sup> )	498,0	498,0	484,0	473,0
Sulfato (mg L <sup>-1</sup> )	1327,0	1316,0	1855,0	2130,0
Fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
Teor de K <sub>2</sub> O (kg K <sub>2</sub> O m <sup>-3</sup> )	5,21	5,16	4,58	4,59
Ácido málico (mg L <sup>-1</sup> )	1630,6	1947,0	1004,7	1037,0
Ácido trans-acotínico (mg L <sup>-1</sup> )	626,9	503,9	303,3	235,2



**Quadro 2. Comparação entre os tratamentos da vinhaça.** Avaliação e comparação dos diversos aspectos econômicos e ambientais envolvidos nos tratamentos da vinhaça por centrifugação ou adsorção por argila esmectita e carvão ativado.

<b>Aspecto avaliado</b>	<b>Centrifugação</b>	<b>Adsorção</b>
<b>Concentração ótima para <i>C. vulgaris</i></b>	20% de vinhaça centrifugada.	60% de vinhaça adsorvida.
<b>Rendimento celular de <i>C. vulgaris</i></b>	$1,7 \cdot 10^{12}$ células $m^{-3}$ de meio de cultivo.	$9,5 \cdot 10^{11}$ células $m^{-3}$ de meio de cultivo.
<b>Rentabilidade do tratamento</b>	97% (v/v) de vinhaça tratada em relação à bruta.	40% (v/v) de vinhaça tratada em relação à bruta.
<b>Tempo de processamento</b>	~ 0,2 h usando 2510 g.	~ 8 h.
<b>Materiais necessários para o tratamento</b>	NaOH para correção do pH do meio.	Argila esmectita ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ), membrana porosa (papel filtro) e carvão ativado ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ).
<b>Resíduos gerados</b>	0,02 kg de torta de centrifugação $L^{-1}$ vinhaça	0,10 kg de argila, 0,06 kg de carvão e ~ 0,60 kg de materiais adsorvidos $L^{-1}$ de vinhaça e uma membrana porosa
<b>Equipamentos necessários</b>	Centrífuga industrial (já presente em usinas sucroalcooleiras).	Agitador mecânico, tanque para decantação e coluna de percolação.
<b>Etapas envolvidas no processo</b>	Centrifugação e obtenção do sobrenadante.	Agitação com argila esmectita, decantação do precipitado, obtenção do sobrenadante e percolação por carvão ativado.

## 4.0 DISCUSSÃO

Tanto a centrifugação quanto o tratamento com argila esmectita e carvão ativado tornaram a vinhaça mais adequada para o crescimento de *C. vulgaris* (Candido e Lombardi, 2017), mas a natureza das modificações promovidas e os mecanismos de ação de cada processo são diferentes. A centrifugação promove mais alterações físicas do que químicas na vinhaça, o que pode ser confirmado pela manutenção dos valores de pH após o processo. Dentre o material particulado retirado da vinhaça pela centrifugação estão as leveduras, cuja densidade inicial na vinhaça bruta variou entre  $10^5$  e  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>. As leveduras são um grande problema para o crescimento de microalgas em vinhaça, pois reduzem a penetração da luz e competem com elas pelos nutrientes (Candido e Lombardi, 2017).

A adsorção da vinhaça apenas por argila esmectita promoveu redução de partículas semelhante à centrifugação, mas causou também redução na concentração de componentes minerais e orgânicos da vinhaça, com exceção do cálcio e sulfato. Segundo Lira Junior et al. (2017), isso pode ter ocorrido devido à solubilização de íons cálcio e sulfato da própria argila, devido à sua composição. Apesar destas alterações, esta etapa não é suficiente para possibilitar o uso da vinhaça como meio de cultura de maneira tão eficaz quanto o tratamento por argila esmectita e carvão ativado. Entretanto, caso a vinhaça bruta seja tratada diretamente pelo carvão ativado, este material se solubiliza e o resíduo se torna completamente preto. Acredita-se que, ao remover o particulado presente na vinhaça bruta e reduzir os componentes solubilizados, a argila possibilite maior contato do carvão ativado com as substâncias sobre as quais ele atua. Nabil et al. (2014) demonstraram que a ação do carvão ativado na remoção de corantes de resíduos industriais ocorre por meio de interações iônicas, o que explica a necessidade de contato direto entre o carvão e as substâncias removidas do resíduo.

A adsorção da vinhaça por argila esmectita e carvão ativado foi o tratamento mais eficiente na remoção do conteúdo mineral, assim como de sua coloração. Segundo Robles-González et al. (2012), as melanoidinas são os principais componentes da vinhaça responsáveis pela sua cor escura. Portanto, o carvão ativado pode ter retido estes compostos, confirmando os resultados de Liakos e Lazaridis (2016), que utilizaram carvão ativado para descoloração do melaço. Além disso, o tratamento com esmectita e carvão foi o que mais reduziu as concentrações de ácido trans-acônico (TAA), o ácido orgânico predominante no caldo de cana (Zapata, 2007). Sua maior

redução pode indicar a capacidade destes substratos na remoção de partículas orgânicas complexas. Assim, o tratamento com argila esmectita e carvão ativado resultou em maior penetração de luz, menor teor de nutrientes e de componentes tóxicos para as microalgas, daí a possibilidade de uso do resíduo tratado em maiores concentrações.

Yu et al. (2015) e Werkneh et al. (2014) demonstraram elevada capacidade do bagaço de cana-de-açúcar em reter material particulado, nutrientes minerais e componentes tóxicos de resíduos industriais. No entanto, o tratamento da vinhaça pelo bagaço de cana-de-açúcar não permitiu reduções mais acentuadas no número de partículas ou componentes que conferem coloração à vinhaça. Além disso, quando observamos as culturas no microscópio óptico, notamos que os meios que passaram por este tratamento apresentaram contaminação fúngica maior do que quando não o fizemos. Como o bagaço de cana é rico em várias classes de carboidratos, como xiloses, celulose, hemicelulose, arabinose, entre outros (Moraes-Rocha et al., 2015), estes compostos podem ter favorecido o desenvolvimento de contaminantes, que competiram com a alga *C. vulgaris* e reduziram seu crescimento.

As cinzas do bagaço de cana não causaram a mesma retenção de partículas da argila esmectita, corroborando a alta capacidade de adsorção desta argila já demonstrada em outros trabalhos (Musso et al., 2014; Okada et al., 2014). Este resíduo sólido também não causou as mesmas melhorias que o carvão ativado, não trazendo neutralização no pH ou clarificação da vinhaça semelhantes às geradas pelo material comercial (Candido e Lombardi, 2017).

Quando a centrifugação foi usada como um tratamento para as etapas de adsorção por argila esmectita e carvão ativado, houve redução do crescimento da microalga. Estudos que investigam a capacidade adsorvente da argila esmectita e do carvão ativado relatam a necessidade de interação molecular dos materiais com as partículas do meio para que ocorra o tratamento (Okada et al., 2014; Lira Júnior et al., 2017; Liakos e Lazaridis, 2016). Ao remover estas partículas, a centrifugação não permitiu a ação dos materiais, explicando a redução no crescimento das algas em relação aos tratamentos sem esta etapa.

Comparando-se os dois tratamentos, pode-se argumentar que o uso das concentrações ótimas de vinhaça adsorvida a 60% para as culturas em relação à vinhaça centrifugada a 20% (Candido e Lombardi, 2017) levaria a uma economia de 40% do volume total de água adicionado no meio de cultura. No entanto, esta economia não é real, considerando que 60% do volume da vinhaça bruta pode ficar retido nos materiais

adsorventes durante o tratamento com argila esmectita e carvão ativado enquanto a centrifugação levou a perda de apenas 3% da vinhaça bruta na forma de material particulado. Para produzir 1000 L de meio de cultivo para *C. vulgaris* sob as condições descritas, seriam necessários 1500 L de vinhaça e 400 L de água no tratamento com argila esmectita e carvão ativado e 206 L de vinhaça e 800 L de água na centrifugação. Considerando que a vinhaça é um resíduo composto principalmente por água (Silva et al., 2007), a produção de meio de cultura com vinhaça tratada por adsorção utiliza ~ 90% mais líquido, incluindo o resíduo e a água utilizada na diluição, do que quando avaliamos a vinhaça centrifugada, que foi vantajosa quanto ao volume de líquidos usados.

Outros aspectos econômicos são vantajosos no tratamento de centrifugação, uma vez que menos materiais e equipamentos são necessários, há maior durabilidade do maquinário envolvido, menor tempo de processamento e menos etapas procedimentais. A produção de meios de cultura por este processo ainda não exigiria investimentos em ativo fixo por parte das usinas sucroalcooleiras, uma vez que as centrífugas industriais já são utilizadas no processo de produção de etanol (Sauze, 1973; Sales et al., 1986). Nesta comparação, ambos os tratamentos foram feitos em escala laboratorial. A argila esmectita e o carvão ativado poderiam ser possivelmente reutilizados se uma etapa de eluição fosse considerada. Apesar desta possibilidade resultar em menos materiais usados, haveria um consumo adicional de água e geração de novos efluentes. Em escala industrial até podem existir tecnologias que melhorem ambos processos de tratamento comparados, porém a necessidade de altas quantias de materiais na adsorção é inegável e o torna inviável economicamente.

Em termos ambientais a centrifugação também é vantajosa, já que o resíduo do tratamento é composto majoritariamente por leveduras, as quais podem ser reincorporadas à fermentação do caldo-de-cana ou comercializadas como fonte proteica para ração animal (Polyorach et al., 2013). Já no tratamento com argila esmectita e carvão ativado, estes materiais em geral não podem ser reaproveitados em outros processos industriais. Além disso, observando a saturação do papel de filtro utilizado na etapa com carvão ativado em escala laboratorial, retardando o processo, supõe-se que a membrana porosa utilizada em escala industrial também deva ser trocada periodicamente, gerando mais um resíduo sólido.

Um dos grandes problemas para a destinação da vinhaça é o excesso de potássio e nutrientes minerais neste resíduo que, ao ser usado intensamente na fertirrigação das

plantações de cana-de-açúcar, ocasionaria a salinização do solo (Silva et al., 2007). Por isso, a CETESB, através da Norma Técnica PA.4231 de dezembro de 2006 (CETESB, 2006), limita a aplicação da vinhaça no solo por meio de cálculos a partir de sua concentração de potássio. Porém, de acordo com os funcionários da Usina São João, na qual a vinhaça foi coletada, o que ocorre é a dificuldade de transporte e distribuição da vinhaça para toda a área de plantio. Com isso, uma região da plantação próxima à área industrial da Usina ficaria com o solo saturado, enquanto seria necessário comprar fertilizantes e água para o restante das áreas cultivadas. Com o desenvolvimento de bombas mecânicas mais potentes nos últimos anos, a vinhaça tem sido distribuída para regiões cada vez mais distantes da área industrial, fazendo com que as empresas destinem uma maior parte deste resíduo e economizem com a compra de nutrientes e água. Assim, o cultivo de microalgas em vinhaça centrifugada em concentrações menores do que na adsorvida, ainda é um destino mais rentável para este resíduo, não desperdiçando como ocorre com o tratamento de adsorção. A técnica de centrifugação da vinhaça pode, no futuro, possibilitar o uso apenas do que for realmente excedente do resíduo, sem gerar mais problemas econômicos e ambientais e aumentando a lucratividade das empresas.

## 5.0 CONCLUSÕES

No tratamento de centrifugação, a intensidade de rotação influenciou mais do que a temperatura na melhoria da vinhaça, demandando um tempo ótimo de 12 min a 25 °C e 2510 g. Já na adsorção, o uso de bagaço de cana-de-açúcar e cinzas de bagaço como aditivos ou substitutos para a argila esmectita e carvão ativado não causaram melhorias físico-químicas ou de crescimento algal em relação ao tratamento original. A centrifugação do resíduo bruto antes da adsorção pelos materiais comerciais também reduziu o crescimento da microalga *C. vulgaris*, prejudicando o processo. Infelizmente, os materiais comerciais são mais eficazes do que estes resíduos sólidos na retenção de materiais particulados, redução da coloração e aumento do pH da vinhaça. Apesar da argila esmectita e do carvão ativado possibilitarem o uso do resíduo no crescimento da microalga em concentrações mais elevadas, as quantias de materiais usados, resíduos gerados, equipamentos, processos e tempos de execução também são maiores neste

tratamento. Portanto, a centrifugação foi o tratamento da vinhaça mais viável econômica e ambientalmente visando o posterior cultivo algal em larga escala.

## CAPÍTULO 2: MELHORIA DO CULTIVO ALGAL EM VINHAÇA TRATADA

### Resumo

Muitos trabalhos utilizam a vinhaça no cultivo de microalgas. Porém, devido à alta salinidade, toxicidade e baixo pH da vinhaça, estes estudos incluem poucas espécies e diferentes manipulações do resíduo. Nesta pesquisa buscamos verificar a efetividade das estratégias biológicas de seleção de cepas, aclimação e seleção artificial por reisolamento para o incremento da produção algal no resíduo. Dez cepas foram avaliadas quanto às densidades, viabilidades celulares e taxas de crescimento nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50% de vinhaça centrifugada, com controle em meio BG11, além de determinações de EC50. Cultivos das oito espécies mais produtivas nas concentrações ótimas de vinhaça serviram como inóculos aclimatados para as culturas seguintes, que foram reisoladas para os terceiros cultivos, os quais serviram como inóculos reisolados e aclimatados para os quartos cultivos. Inicialmente, *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella vulgaris* apresentaram os melhores crescimentos, de 2,0 e 1,5 dia<sup>-1</sup> em 15 e 20% de vinhaça, respectivamente. *Desmodesmus spinosus* teve crescimento significativo até 20% de vinhaça, de 0,8 dia<sup>-1</sup>. *Chlamydomonas sp.*, *Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium sp.*, *Scenedesmus quadricauda* e *Tetraselmis gracilis* tiveram crescimentos máximos na concentração de 5% (0,8 a 1,1 dia<sup>-1</sup>) e *Cyclotella sp.* e *Nanocloropsis gaditana* não cresceram em qualquer concentração do resíduo. Os valores de EC50 variaram de 2,5% a 65,0% de vinhaça, indicando que o resíduo pode ocasionar graves desequilíbrios ao fitoplâncton. A aclimação e a seleção artificial por reisolamento diminuíram o crescimento algal em relação às culturas iniciais, possivelmente devido à contaminação biológica excessiva, não sendo estratégias biológicas efetivas para aumentar a produção algal em vinhaça.

**Palavras-chave:** Seleção de cepas; Adaptação; Resíduos em cultivos; Melhoramento biológico.

## 1.0 INTRODUÇÃO

As investigações sobre o cultivo de microalgas em vinhaça visando produção de biomassa algal e remediação do resíduo utilizam poucas espécies, dentre elas *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Desmodesmus sp.* A microalga *C. vulgaris* é uma das mais utilizadas, devido à sua capacidade de aproveitar componentes orgânicos do meio, desempenhando metabolismos mixotrófico e heterotrófico (Marchello et al., 2015; 2018), além de sua robustez (Lananan, 2013). Utilizando sobrenadante de vinhaça de milho, Mitra et al. (2012) demonstraram rendimento final de até 9 g L<sup>-1</sup> para esta alga, enquanto Marques et al. (2013) obtiveram uma produtividade de 70 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> em vinhaça de cana-de-açúcar biodigerida anaerobiamente. Reduzindo o pH da vinhaça da indústria sucroalcooleira para aproximadamente 3 para promover decantação de sulfetos e cianetos, Bonini (2016) obteve rendimento de 3,6 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para esta espécie, com taxas de crescimento de até 1,2 dia<sup>-1</sup> em vinhaça convencional tratada a 80% e 1,0 dia<sup>-1</sup> em vinhaça orgânica tratada e diluída a 50%. Candido e Lombardi (2017), utilizando vinhaça adsorvida por argila esmectita e carvão ativado na concentração de 60% ou vinhaça centrifugada a 20%, obtiveram taxas de crescimento de 1,2 dia<sup>-1</sup> também para *C. vulgaris*.

Kadioglu e Algur (1992) aumentaram dez vezes a densidade celular de *Chlamydomonas reinhardtii* após três dias de cultivo em vinhaça diluída a 1%. Ramirez et al. (2014) conseguiram rendimentos de *Scenedesmus sp.* de 0,5 g L<sup>-1</sup> em meio Guillard suplementado com até 40% de vinhaça. Já Mattos e Bastos (2016) chegaram a taxas de crescimento máximas de 0,15 h<sup>-1</sup> para *Desmodesmus sp.* em cultivos heterotróficos em vinhaça, observando reduções de até 50% no teor de nitrogênio e na DQO do resíduo. Assim, nota-se que os estudos sobre culturas de microalgas em vinhaça geralmente envolvem uma única espécie, com diferentes tratamentos do resíduo, dificultando a comparação entre os resultados e a escolha de condições mais produtivas para uso biotecnológico.

Neste sentido, a seleção de espécies mais tolerantes às condições de cultivo e com maiores crescimentos pode aumentar a produção algal, principalmente em meios com resíduos. Rodolfi et al. (2009), por exemplo, realizaram cultivos de 30 cepas microalgais e selecionaram as quatro espécies mais robustas, com maior produtividade e conteúdo lipídico, objetivando produção de óleos para biocombustíveis. Sydney et al.



(2011), cultivando 20 cepas microalgais em esgoto doméstico tratado, selecionaram as espécies *Botryococcus braunii* e *Chlorella vulgaris* como as com maiores capacidades de crescerem no resíduo, removerem nitrogênio e fósforo e sintetizarem lipídios. Já Santana et al. (2017) realizaram a prospecção de 40 cepas, pertencentes a nove famílias, em condições axênicas em vinhaça e observaram que *Micractinium sp.* Embrapa/LBA32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa/LBA40 foram as linhagens mais produtivas no resíduo.

Apesar das diversas propostas de tratamentos físicos ou químicos para melhoria da vinhaça visando produção de biomassa algal (Mitra et al., 2012; Marques et al., 2013; Candido e Lombardi, 2017), pouco se investe em recursos biológicos que permitam um melhor desempenho das microalgas no resíduo. De acordo com Wood et al. (2005), as taxas de crescimento microalgal possuem amplitudes de variação genética intraespecífica e são influenciadas pelas características do cultivo. Neste contexto, a aclimatação consiste em submeter previamente a microalga às condições que serão testadas, permitindo que as cepas realizem os ajustes fisiológicos para que possam manter as taxas de crescimento constantes após múltiplas repicagens no novo meio (Wood et al., 2005).

A variabilidade genética intraespecífica em uma população é gerada aleatoriamente por meio de mutações (Snustad e Simmons, 2008) e possibilita a existência de nichos mais amplos ou estritos em cada espécie ou linhagem (Ricklefs e Relyea, 2014). De acordo com o conceito de seleção natural atrelado ao naturalista Charles Darwin, as variabilidades fenotípicas mais aptas se tornam mais frequentes nas populações ao longo das gerações (Darwin, 1880). Portanto, ao domesticarmos espécies selvagens de vegetais, animais ou microorganismos, estamos tornando as características destes organismos que nos trazem benefícios mais frequentes, por meio de um processo denominado seleção artificial. Este processo vem acontecendo nos últimos dez mil anos e tem importância fundamental para o desenvolvimento de nossas sociedades (Buckler et al., 2001). Um exemplo de seleção artificial ocorreu com gramíneas alimentícias como o milho, o sorgo, a aveia, a cevada, o trigo e o arroz que, por terem origens evolutivas semelhantes, tiveram o mesmo conjunto de genes selecionados (Buckler et al., 2001). De acordo com Buckler et al. (2001), a domesticação reduz a diversidade genética dos organismos em relação aos seus ancestrais selvagens por meio do chamado “gargalo da domesticação”, afetando principalmente os genes relacionados à produtividade. Sendo assim, a seleção artificial ocasionada pela domesticação de

espécies promove rápidas mudanças fenotípicas e age de maneira direcional sobre características de interesse para os humanos, como crescimento acelerado, resistência a pragas e qualidade nutricional (Wright et al. 2005).

De acordo com as premissas apresentadas, ao inserirmos uma cepa algal em vinhaça, os indivíduos que apresentarem variações genéticas que garantam maior capacidade mixotrófica, habilidade de lidar com o alto potencial osmótico, com a toxicidade e contaminação do resíduo (Kadioglu e Algur, 1992; Candido e Lombardi, 2017) tendem a ser selecionados. Reisolando cepas de algas previamente cultivadas em vinhaça teríamos, portanto, populações com maior frequência de indivíduos com capacidade de lidar com o resíduo, em um processo de seleção artificial em nível de indivíduos (Wright et al., 2005). Cultivando estas cepas reisoladas novamente em vinhaça, espera-se que as culturas apresentem melhor crescimento e maior tolerância à toxicidade do resíduo, o que é interessante para a produção comercial de biomassa algal.

Desta forma, buscamos avaliar e comparar o efeito ecotoxicológico de diferentes concentrações de vinhaça centrifugada para 10 microalgas unicelulares, selecionando espécies com potencial biotecnológico, ao mesmo tempo em que obtivemos informações para inferir sobre efeitos da vinhaça na comunidade fitoplanctônica de ecossistemas aquáticos. Além disso, usamos os processos biológicos de aclimação e seleção artificial por meio de reisolamento, na tentativa de ampliar a produtividade algal no resíduo.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com os resultados obtidos no Capítulo 1 desta pesquisa, a centrifugação (2510 g, a 25 °C por 12 min) da vinhaça foi o melhor tratamento e, por isso, foi adotada para o desenvolvimento das etapas sequenciais deste trabalho.

As cepas utilizadas para a finalidade deste capítulo estão apresentadas no Quadro 1.

**Quadro 1. Cepas algais utilizadas nos cultivos.** Cepas microalgais utilizadas nos testes ecotoxicológicos deste capítulo com suas respectivas classificações (divisão – classe – ordem), locais de origem e bancos de manutenção.

<b>Cepas algais</b>	<b>Classificações</b>	<b>Origens</b>	<b>Bancos de manutenção</b>
<i>Chlamydomonas sp.</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Volvocales	Ambiente lótico extremófilo (pH = 3,6)	Laboratório de Ficologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil.
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Chlorococcales	Ambiente lótico (água doce)	Instituto de Bioquímica de Vegetais e Fotossíntese, Universidade de Sevilha, Espanha.
<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Chlorococcales	Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)	Laboratório de Biotecnologia de Algas, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
<i>Monoraphidium sp.</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Sphaeropleales	Vinhaça (resíduo orgânico)	
<i>Cyclotella sp.</i>	Heterontophyta Bacillariophyceae Stephanodiscales	Ambiente lótico (água doce)	Laboratório de Ficologia, Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
<i>Desmodesmus spinosus</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Sphaeropleales	Ambiente lótico (água doce)	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Clamydomonadales	Ambiente lêntico	Departamento de Botânica, Universidade de British Columbia, EUA.
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Chlorophyta Chlorophyceae Sphaeropleales	Ambiente lótico (água doce)	
<i>Nanocloropsis gaditana</i>	Heterokontophyta Eustigmatophyceae Eustigmatacea	Ambiente marinho	Banco de Microorganismos Aidar & Kutner, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, Brasil.
<i>Tetraselmis gracilis</i>	Chlorophyta Prasynophyceae Chlorodendrales	Ambiente marinho (estuário)	

As cepas testadas pertencem às divisões Heterokontophyta e Chlorophyta. As algas da divisão Heterokontophyta apresentam dois flagelos com tamanhos diferentes e

armazenam clorofilas *a* e *c*, além de fucoxantina, pigmento de coloração dourada (Lee, 2008). Nesta divisão temos diversas classes, como Eustigmatophyceae, composta por algas verde-amareladas (*N. gaditana*), e Bacillariophyceae, ou também chamadas de diatomáceas (*Cyclotella sp.*). As diatomáceas são microalgas ricas em lipídios, que possuem um revestimento de sílica chamado de frústula, muito utilizado industrialmente. Já a divisão Chlorophyta envolve as algas verdes, ricas em clorofilas *a* e *b*, e é muito diversa, apresentando representantes distribuídos em todas as regiões do planeta. Neste trabalho incluímos organismos das classes Chlorophyceae (*Chlamydomonas sp.*, *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *D. spinosus*, *H. pluviavis*, *Monoraphidium sp.* e *S. quadricauda*), que envolve a maior parte das espécies dentro da divisão, e Prasinophyceae (*T. gracilis*), a qual agrupa os organismos com as características mais primitivas dentro do grupo (Lee, 2008). A escolha de representantes de ordens variadas, bem como isolados de locais de origem diferentes, foi uma maneira de diversificar as capacidades metabólicas e adaptativas testadas. Foram incluídas cepas oriundas de ambientes com características mais próximas às da vinhaça, como alta osmolaridade, baixo pH e presença de materiais orgânicos, na tentativa de facilitar a adaptação das células aos meios contendo o resíduo.

Para todas as cepas adotadas foram realizados cultivos com controle em meio BG11 (Rippka et al., 1979), que é rico em nutrientes minerais e muito utilizado comercialmente, e vinhaça centrifugada nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50%, com pH inicial ajustado para 6,8 – 7,0. Para a microalga *Chlamydomonas sp.* oriunda de ambiente ácido, o pH de todos os tratamentos, inclusive do controle, foi ajustado inicialmente para 4,8 - 5,0, mais próximo também do pH original da vinhaça.

A diluição da vinhaça foi feita com água deionizada autoclavada e, para as microalgas marinhas (*T. gracilis* e *N. gaditana*), os meios foram produzidos utilizando água deionizada com 30 g L<sup>-1</sup> de sal marinho comercial para aquário (Blue Treasure, Noruega), de acordo com as especificações do fabricante. Testes prévios mostraram que diluições da vinhaça com água deionizada sem adição de sal para estas duas espécies reduziu seus desenvolvimentos. Para avaliar se as condições utilizadas impunham restrição nutritivas aos organismos, foram selecionadas cepas que tiveram concentrações ótimas de vinhaça nos cultivos correspondentes às mínimas (5%) e máximas (20%) dentre as espécies avaliadas. Desta forma, *S. quadricauda* e *C. vulgaris* também foram cultivadas em suas concentrações ótimas de vinhaça, nas mesmas condições descritas anteriormente, mas com diluição feita com o meio BG11 (Rippka et

al., 1979) ao invés de água deionizada. A vinhaça centrifugada não foi autoclavada ou esterilizada por qualquer outro método para evitarmos modificações físico-químicas do resíduo e para nos aproximarmos das condições industriais possíveis em uma usina sucroalcooleira. Para a microalga *Cyclotella sp.*, que é uma diatomácea e demanda sílica para seu crescimento (Lee, 2008), foi adicionado silicato de sódio ( $\text{NaSiO}_3$ ) na concentração de  $28 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ), tanto no meio BG11 quanto nos tratamentos com vinhaça centrifugada diluída.

Cada amostra foi inoculada com a densidade inicial de  $5 \cdot 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ , a partir de culturas em meio BG11 que estavam em fase exponencial de cultivo. Os cultivos foram realizados em trélicas experimentais, em frascos de cultura de tecido com  $250 \text{ cm}^3$  com tampa ventilada contendo 150 mL de meio e mantidos em sala de cultivo a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . A luminosidade nos frascos foi de  $130 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , com exceção dos cultivos com as microalgas *Cyclotella sp* e *H. pluvialis*, para as quais a luminosidade de  $90 \mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  foi usada. Para obter tal luminosidade, os tratamentos com maior concentração de vinhaça centrifugada foram menos distanciados da fonte luminosa do que os tratamentos mais diluídos.

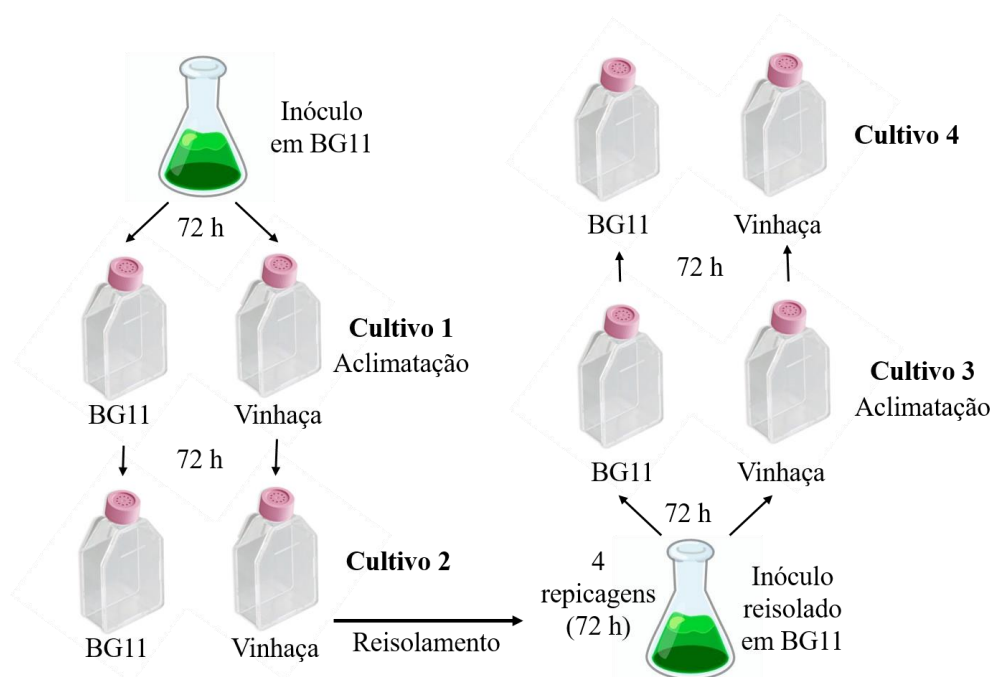
Durante seis dias (144 h), foram feitas análises diárias da densidade de células algais viáveis e totais e da viabilidade celular no equipamento Muse Cell Count & Viability Assay (Merck Millipore, EUA). A partir dos gráficos das densidades de células viáveis diárias, foram calculadas as taxas de crescimento por regressão linear na fase exponencial de cultivo. Com as taxas de crescimento médias foram calculadas as concentrações de vinhaça que geraram inibição do crescimento algal em 50% em relação ao controle para cada alga avaliada (EC50), permitindo uma análise ecotoxicológica do resíduo. A caracterização físico-químicas da vinhaça centrifugada foi realizada pelo laboratório São Lucas, da empresa ASL Análises Ambientais (Rio Claro/SP, Brasil), por meio dos métodos descritos no capítulo anterior deste trabalho.

Foram selecionadas oito cepas algais com altas produtividades em vinhaça centrifugada, bem como as concentrações ótimas do resíduo nas quais os maiores crescimentos ocorreram. As microalgas selecionadas foram posteriormente cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando-se as respectivas concentrações ótimas de vinhaça e o meio artificial BG11 (Rippka et al., 1979) como controle. Em 72 horas de cultivo, estas primeiras culturas serviram de inóculo aclimatado para o segundo cultivo, de forma que os inóculos para os controles foram

extraídos dos controles prévios e os inóculos para as culturas em vinhaça foram obtidos das culturas prévias em vinhaça.

Ao final do segundo experimento, com 96 horas de cultivo, os conteúdos totais das amostras em vinhaça para cada microalga foram centrifugados separadamente a 4000 rpm (2510 g), por 10 min a 25°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets microalgais sedimentados foram ressuspensos em meio BG11 com pH ajustado de acordo com o pH inicial das culturas. Como as culturas iniciais eram monoalgais e o meio BG11 não apresenta nenhuma fonte orgânica de carbono (Rippka et al., 1979), necessária para a sobrevivência e o crescimento de fungos e bactérias, a purificação das cepas centrifugadas se deu por repicagens sequenciais em meio BG11. Cada cepa foi repicada a cada 72 h por quatro vezes. Ao final do processo, que durou 13 dias, não foi possível observar contaminações nas culturas por fungos e bactérias ao microscópio óptico Nikon, modelo Eclipse E200 (Japão), com ampliação de 400 vezes.

Cada cultura reisolada da vinhaça foi usada como inóculo para os terceiros cultivos, tanto em vinhaça diluída quanto no controle em meio BG11. Estas terceiras culturas foram utilizadas em 72 h como inóculos reisolados e aclimatados para as quartas culturas. Todos os tratamentos foram testados com réplicas experimentais e iniciados com a densidade de  $5 \times 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Na Figura 1 temos um esquema mostrando as etapas sequenciais de cultivo relacionadas anteriormente.



**Figura 1. Esquema metodológico.** Etapas de cultivo realizadas no teste de aclimação e reisolamento para cada uma das oito espécies microalgais testadas.

Inicialmente, as culturas usadas como inóculo para os primeiros cultivos desta fase experimental estavam mantidas em meio BG11, que é altamente rico em nutrientes minerais. A fim de verificarmos se os estoques de nutrientes das células oriundas do meio BG11 influenciaram em nossos resultados, avaliamos novamente todo o processo de quatro etapas de cultivo com inóculo de *C. vulgaris* mantido previamente por 30 dias em meio LC Oligo (AFNOR, 1980), reconhecidamente pobre em nutrientes. Neste caso, o processo de reisolamento também foi realizado em meio LC Oligo, cuja composição está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1. Meio LC Oligo.** Composição das soluções utilizadas (1 – 8) para confecção do meio LC Oligo e concentrações finais de cada componente no meio preparado (AFNOR, 1980).

Solução	Componentes	Concentração final (mol L <sup>-1</sup> )
1	Nitrato de sódio (NaNO <sub>3</sub> )	4,7 x 10 <sup>-4</sup>
2	Nitrato de amônio (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	5,0 x 10 <sup>-4</sup>
3	Nitrato de cálcio (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	1,7 x 10 <sup>-4</sup>
4	Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	1,2 x 10 <sup>-4</sup>
5	Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,3 x 10 <sup>-4</sup>
6	Sulfato de cobre (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	6,0 x 10 <sup>-8</sup>
	Molibdato de amônia ((NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O)	2,4 x 10 <sup>-8</sup>
	Sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	1,0 x 10 <sup>-7</sup>
	Cloreto de cobalto (CoCl <sub>2</sub> ) · 6H <sub>2</sub> O)	1,3 x 10 <sup>-7</sup>
	Sulfato de manganês (MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	1,2 x 10 <sup>-7</sup>
7	Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	4,9 x 10 <sup>-7</sup>
	Citrato de ferro (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> · 5H <sub>2</sub> O)	2,9 x 10 <sup>-4</sup>
	Cloreto de ferro (FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	3,1 x 10 <sup>-4</sup>
	Sulfato de ferro (FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	2,2 x 10 <sup>-4</sup>
8	Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	1,8 x 10 <sup>-4</sup>

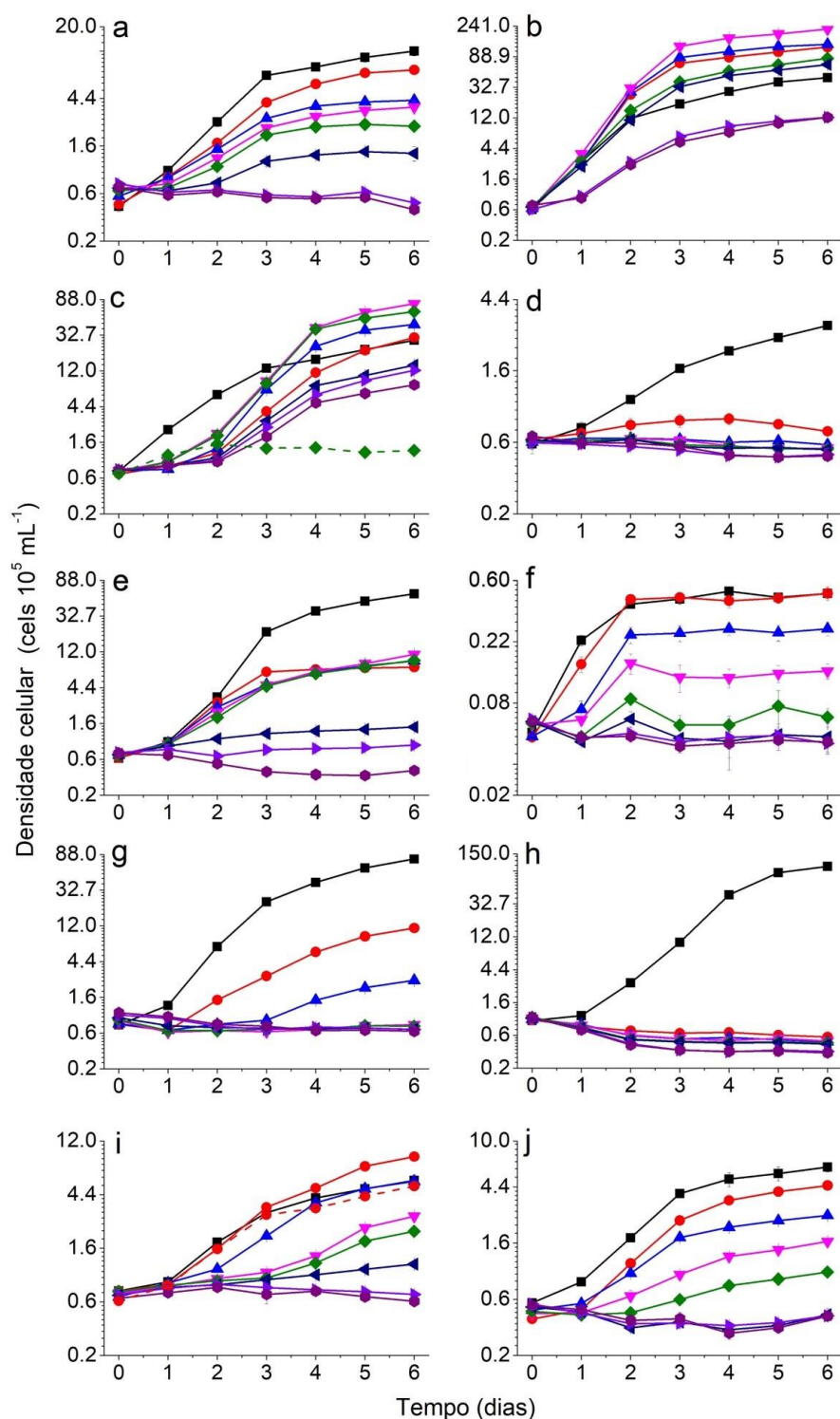
Em todas as etapas de cultivo foram avaliadas diariamente as densidades celulares viáveis e totais e viabilidades celulares utilizando-se o contador automático Muse Cell Count & Viability Assay (Merck Millipore, EUA) e as absorvâncias em 570 nm no espectrofotômetro Nanocolor Macherey-Nagel (Reino Unido). Esta última medida se refere a presença de particulados no meio (Costa et al., 2003), incluindo contaminantes e células algais. Comparando-se estes dados com as densidades celulares algais pudemos inferir sobre a contaminação das culturas.

Os resultados obtidos foram plotados em gráficos utilizando-se o programa Origin 8.5. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa R 3.3.1, com os testes paramétricos ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de todos tratamentos entre si.

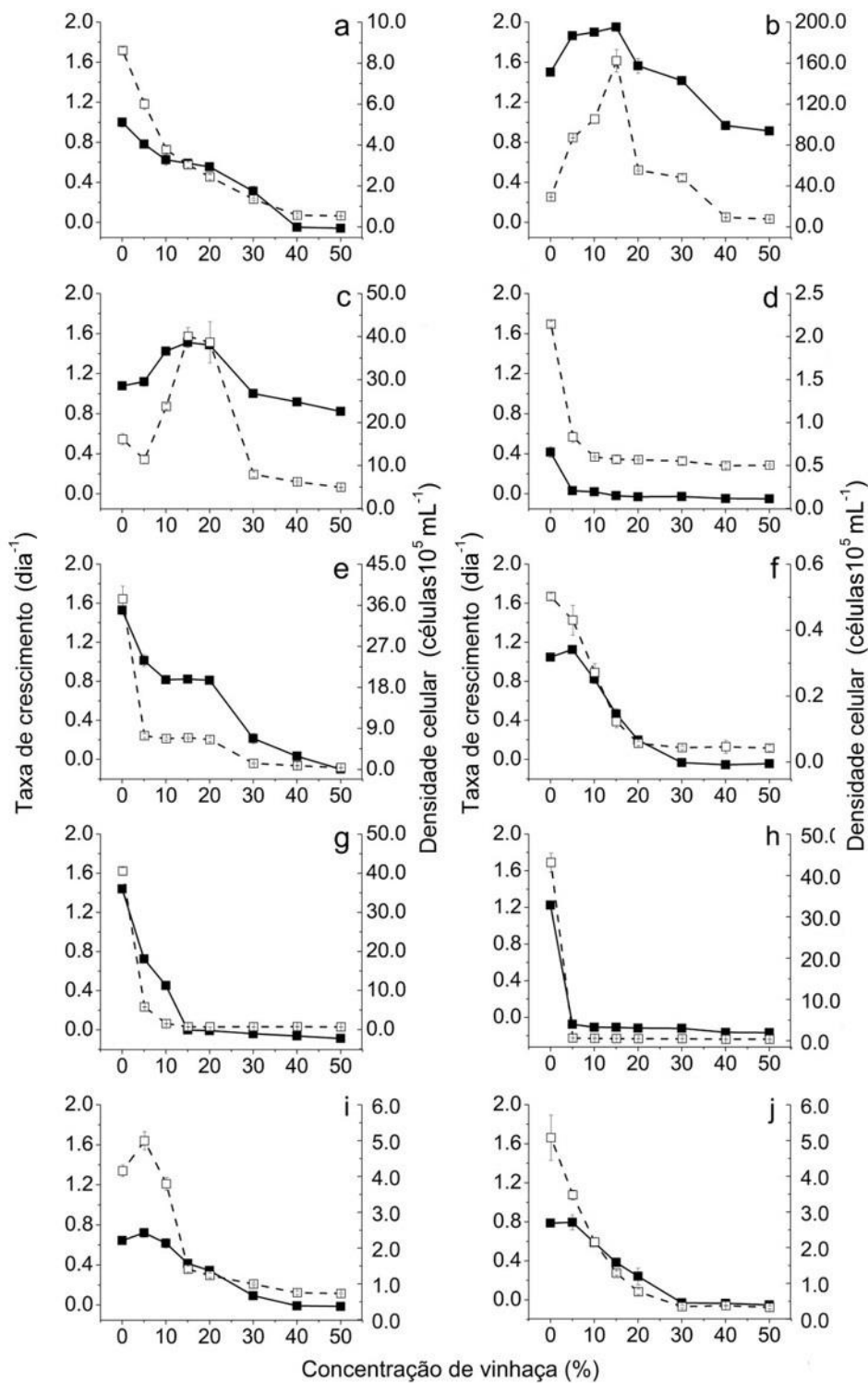
### 3.0 RESULTADOS

A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento do teste ecotoxicológico do resíduo para dez microalgas no controle e nas sete concentrações de vinhaça centrifugada usadas. Já a Figura 3 demonstra as taxas de crescimento e as densidades celulares viáveis no 4º dia (96 h) de cultivo em relação às concentrações da vinhaça. Todas as microalgas estavam no final da fase exponencial ou início da fase estacionária de crescimento no 4º dia de cultivo (96 h), com células fisiologicamente saudáveis e densidades celulares altas, o que é interessante para a produção comercial (Wood et al, 2005). Portanto, consideramos as densidades celulares finais neste ponto, e não em 144 h, quando os experimentos foram finalizados.





**Figura 2. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios ( $n = 3$ ) das densidades de células viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) diárias no (■) controle em BG11 e nas concentrações de (●) 5%, (▲) 10%, (▼) 15%, (◆) 20%, (◄) 30%, (◄) 40% e (◄) 50% de vinhaça centrifugada para as algas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *Cyclotella sp.*, (e) *D. spinosus*, (f) *H. pluvialis*, (g) *Monoraphidium sp.*, (h) *N. gaditana*, (i) *S. quadricauda* e (j) *T. gracilis*. As linhas tracejadas indicam as densidades celulares nas concentrações ótimas de vinhaça diluída com meio BG11 para (c) *C. vulgaris* e (i) *S. quadricauda*.

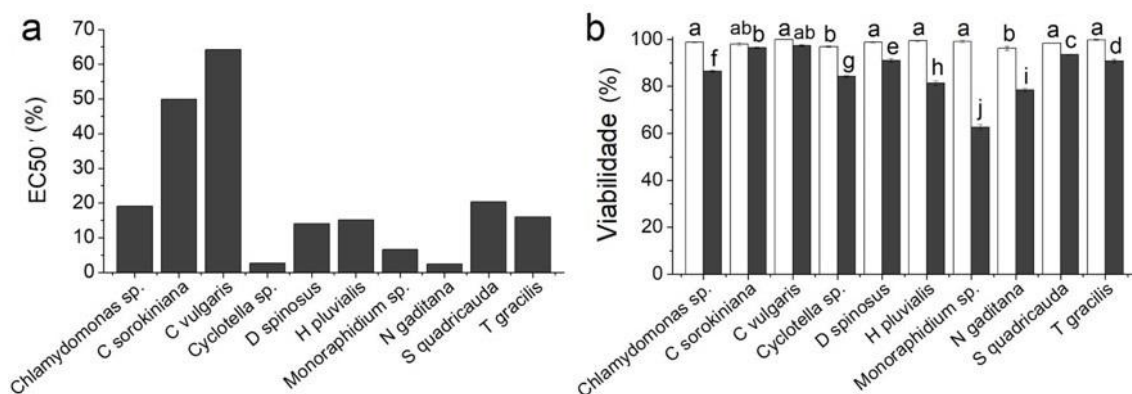


**Figura 3. Parâmetros de crescimento algal.** Valores médios (n = 3) das (■) taxas de crescimento (dia<sup>-1</sup>) e (□) densidades celulares viáveis (células 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>) no 4<sup>o</sup> dia de cultivo (96 h) em relação às concentrações de vinhaça (%) para as algas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *Cyclotella sp.*, (e) *D. spinosus*, (f) *H. pluvialis*, (g) *Monoraphidium sp.*, (h) *N. gaditana*, (i) *S. quadricauda* e (j) *T. gracilis*. A concentração de 0% nos eixos horizontais dos gráficos representa os parâmetros para os controles em BG11.

Notamos um maior efeito restritivo da vinhaça nas densidades celulares em 96 h do que nas taxas de crescimento, já que as culturas em vinhaça tiveram um dia de fase lag, diferentemente dos controles, que não tiveram fase lag. *C. sorokiniana* e *C. vulgaris*, foram as espécies que apresentaram melhores desempenhos em vinhaça, com taxas de crescimento de 2,0 e 1,5 dia<sup>-1</sup> em 15 e 20% de vinhaça centrifugada, respectivamente. *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *H. pluvialis* e *S. quadricauda* apresentaram parâmetros de crescimento melhores nas concentrações ótimas de vinhaça do que nos respectivos controles. Para as microalgas *Chlamydomonas sp.*, *D. spinosus*, *Monoraphidium sp.* e *T. gracilis*, os crescimentos em vinhaça representaram ao menos 50% dos valores obtidos nos controles. Já para as microalgas *Cyclotella sp.* e *N. gaditana*, as reduções nos crescimentos em relação ao controle superaram os 50%, demonstrando elevada toxicidade da vinhaça para estas espécies. As concentrações ótimas de vinhaça centrifugada, que estimularam os maiores crescimentos algais, foram de 5% para *Chlamydomonas sp.*, *H. pluvialis*, *Monoraphidium sp.* e *S. quadricauda*, 15% para *C. sorokiniana* e 20% para *D. spinosus* e *C. vulgaris*. *Cyclotella sp.* e *N. gaditana* não apresentaram crescimento em qualquer concentração de vinhaça.

As diluições da vinhaça nas concentrações ótimas com meio BG11 para *C. vulgaris* e *S. quadricauda* inibiram seus crescimentos, o que pôde ser demonstrado através das reduções nas respectivas taxas de crescimento de 1,49 para 0,41 dia<sup>-1</sup> e de 0,72 para 0,65 dia<sup>-1</sup>, e nas densidades celulares em 96 h de 3,9 10<sup>6</sup> para 1,3 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> e de 9,0 10<sup>5</sup> para 5,2 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>.

A Figura 4 representa os valores de EC50, obtidos a partir das taxas de crescimento, e as viabilidades celulares das microalgas no 4º dia de cultivo (96h) para as concentrações ótimas e em 50% de vinhaça centrifugada.



**Figura 4. Valores de EC50 e viabilidades algais.** (a) Concentração de vinhaça centrifugada (%) em que houve redução de 50% das taxas de crescimento para cada microalga em relação aos respectivos controles em meio BG11 e (b) valores médios (n = 3) de viabilidade celular (%) em 96 h de cultivo nas concentrações ótimas (barras claras) e em 50% (barras escuras) de vinhaça centrifugada. As viabilidades nos controles variaram entre 99% e 100%. Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente entre si (p < 0,05).

As espécies com melhores parâmetros de crescimento nas concentrações ótimas de vinhaça são também as mais tolerantes à toxicidade do resíduo, mesmo em concentrações mais elevadas, o que é indicado pelos altos valores de EC50. A variação dos valores de EC50, que foram de 2,5 a 65,0% de vinhaça, indica que o efeito tóxico do resíduo sobre a comunidade fitoplânctônica é variado, o que pode acarretar em desequilíbrios ecológicos graves. Os valores de viabilidade algal também demonstraram que as cepas foram diferentemente afetadas pela vinhaça centrifugada. A viabilidade em 96 h na maior concentração de vinhaça usada (50%) foi significativamente menor do que nas concentrações ótimas do resíduo para crescimento, enfatizando o efeito tóxico concentração-dependente do resíduo para as microalgas avaliadas.

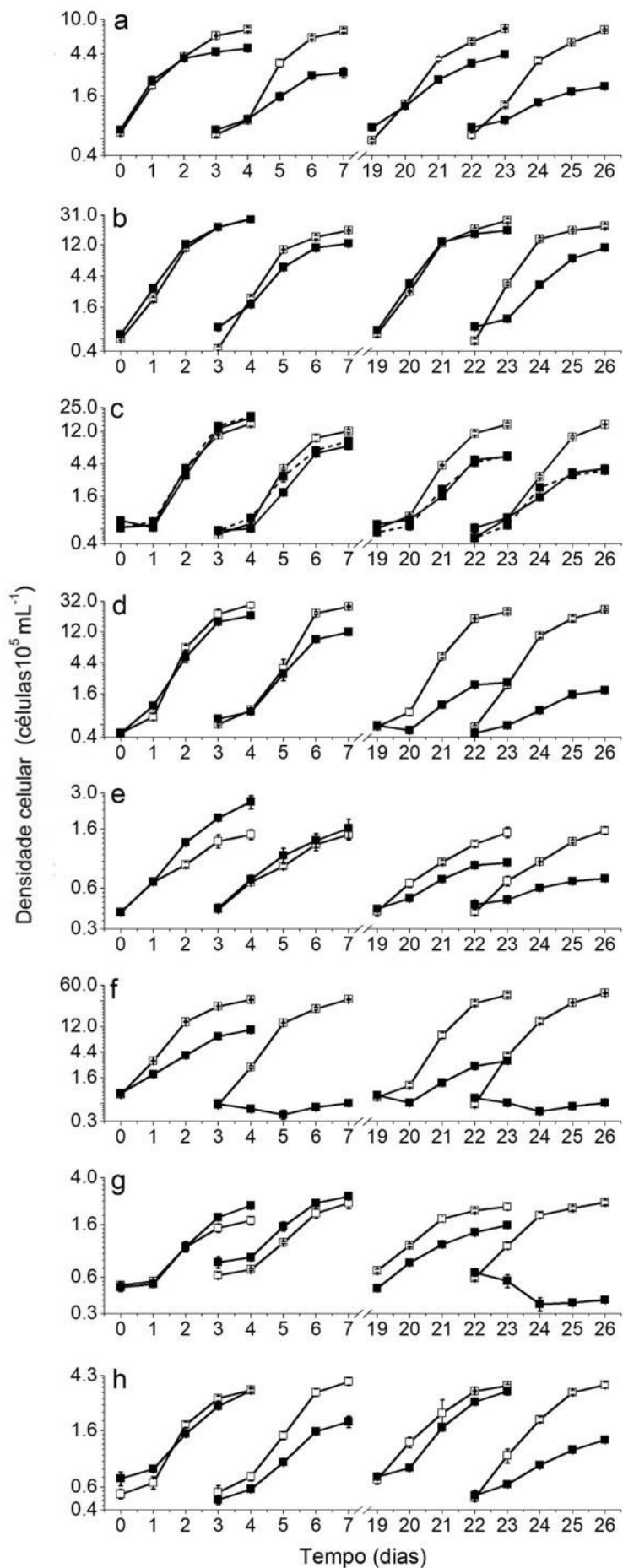
Os parâmetros físico-químicos da vinhaça centrifugada sem diluição, bem como para as concentrações ótimas utilizadas no crescimento das microalgas, são mostrados na Tabela 2. Os valores para as concentrações ótimas foram obtidos proporcionalmente à vinhaça não diluída. Para fins de comparação, relatamos também a composição do meio BG11 usado como controle.

**Tabela 2. Caracterização da vinhaça.** Parâmetros físico-químicos determinados para a vinhaça centrifugada e para as diferentes concentrações ótimas do resíduo usadas nos cultivos microalgais comparados à composição do meio BG11.

Parâmetro (mg L <sup>-1</sup> )	Vinhaça centrifugada				BG11
	100%	20%	15%	5%	
Sólidos Suspensos Totais (SST)	1220	244	183	61	-
Dureza calculada	1573,6	314,7	236,0	78,7	-
Condutividade eletrolítica (µS cm <sup>-1</sup> )	11620	2324	1743	581	-
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	44863	8973	6729	2243	-
Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD)	17011	3402	2552	851	-
Nitrogênio Total Kjeldahl	340,5	68,2	51,3	17,1	1116,6
Sulfato	1416	283	212	71	29
Fosfato	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	5,6
Sódio	10,4	2,1	1,6	0,5	421,0
Cálcio	648	130	97	32	10
Potássio	4380	876	657	219	7
Magnésio	498	99	76	25	7

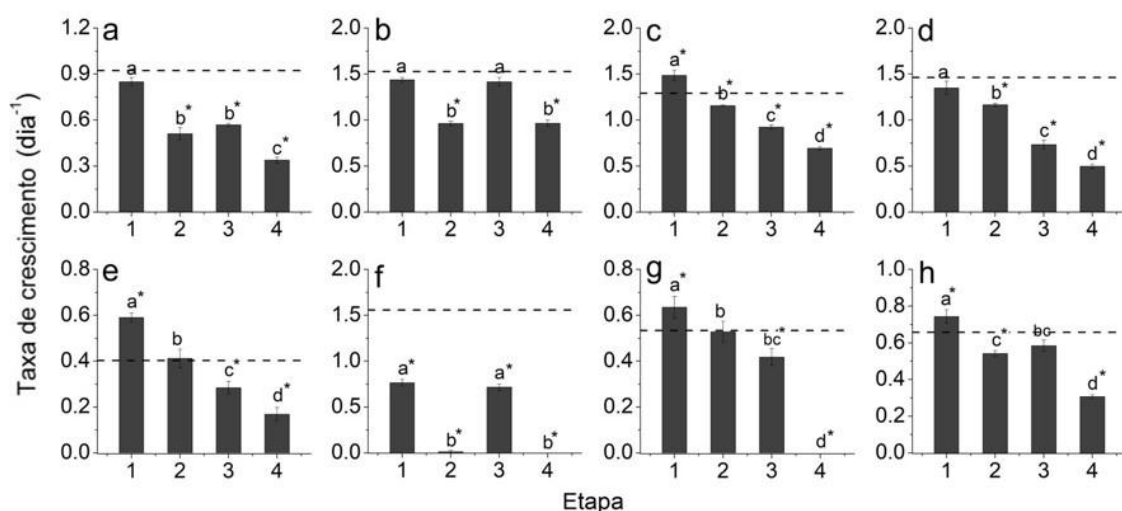
A partir das densidades de células algais viáveis diárias na fase experimental de avaliação da aclimação e do reisolamento de cepas em vinhaça, foram construídas curvas de crescimento para cada microalga em cada etapa de cultivo, que estão representadas na Figura 5.

**Figura 5. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios (n = 3) de densidades celulares viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) diárias no (□) controle em BG11 e nos (■) tratamentos com vinhaça centrifugada nas quatro etapas experimentais para as microalgas (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas tracejadas representam as culturas com inóculo inicial e reisolamento em meio LC Oligo para (c) *C. vulgaris*.



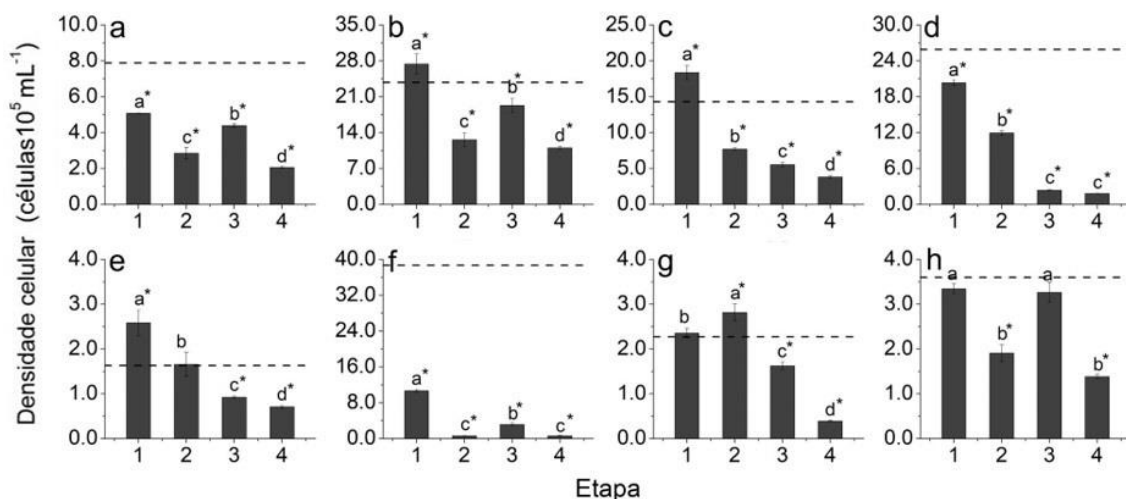
Utilizando-se inóculos iniciais oriundos de meio BG11 ou LC Oligo, com reisolamento nos respectivos meios, para *C. vulgaris*, observa-se que não houveram diferenças de crescimento em qualquer uma das quatro etapas de cultivo.

Com base nas densidades celulares viáveis apresentadas, foram obtidas as taxas de crescimento nas fases exponenciais de cultivo, as quais estão representadas na Figura 6.



**Figura 6. Taxas de crescimento.** Valores médios ( $n = 3$ ) das taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ) nos meios com vinhaça centrifugada em cada etapa experimental para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas pontilhadas representam os valores médios das taxas de crescimento nos controles em BG11 para as quatro etapas. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Asteriscos (\*) indicam valores em vinhaça que diferem dos respectivos controles.

A Figura 7 demonstra os valores de densidades celulares finais, no 4º dia de cultivo (96 h).

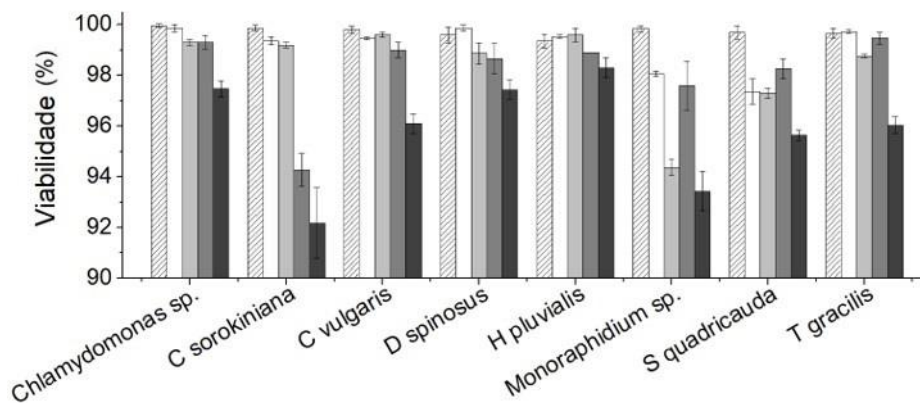


**Figura 7. Densidades celulares em 96 h.** Valores médios ( $n = 3$ ) das densidades celulares viáveis (células  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) no 4º dia de cultivo (96 h) nos meios com vinhaça centrifugada em cada etapa experimental para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*. As linhas pontilhadas representam os valores médios das densidades celulares em 96 h nos controles em BG11 para as quatro etapas. Letras diferentes indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). Asteriscos (\*) indicam valores em vinhaça que diferem dos respectivos controles.

De maneira geral, os parâmetros de crescimento nas culturas em vinhaça foram melhores na 1ª etapa experimental. Os menores valores foram encontrados na 4ª etapa, que foi realizada com as cepas reisoladas e aclimatadas. Para *C. sorokiniana*, *Monoraphidium sp.* e *Tetraselmis gracilis*, as algas apenas reisoladas (3ª etapa) se desenvolveram melhor do que as que foram apenas aclimatadas (2ª etapa). Em *Chlamydomonas sp.* e *C. vulgaris* as taxas de crescimento da 2ª etapa foram iguais ou superiores às da 3ª etapa, mas as densidades celulares finais tiveram o mesmo comportamento descrito anteriormente para as outras espécies. Somente para *D. spinosus* e *S. quadricauda* as algas apenas aclimatadas cresceram melhor do que as reisoladas. Estes resultados mostram que tanto a aclimação em vinhaça quanto o reisolamento de cepas prejudicaram o crescimento algal para todas as espécies, sendo que a aclimação atuou de maneira mais drástica.

A Figura 8 mostra as viabilidades celulares algais, que estão relacionadas à saúde fisiológica das microalgas, no 4º dia de cultivo (96h).

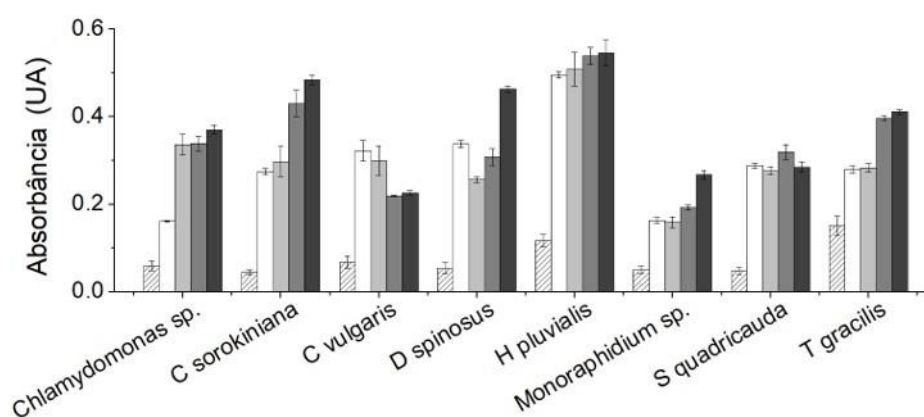




**Figura 8. Viabilidades celulares.** Valores médios (n = 12 nos controles e n = 3 nos tratamentos em vinhaça) das viabilidades celulares (%) no 4º dia de cultivo (96 h) para cada microalga nos controles em BG11 (barras hachuradas) e nos tratamentos com vinhaça nas 1ª (barras claras), 2ª (barras cinza-claro), 3ª (barras cinza-escuro) e 4ª (barras escuras) etapas experimentais.

De maneira semelhante ao que aconteceu para os parâmetros de crescimento, os melhores valores de viabilidade ocorreram na 1ª etapa e os piores na 4ª etapa experimentais. Entretanto, para a maioria das espécies a viabilidade da 2ª etapa foi igual ou superior à 3ª etapa. Apenas para *Monoraphidium sp.* e *S. quadricauda*, a viabilidade das algas reisoladas foram superiores às das algas apenas aclimatadas.

A Figura 9 apresenta os valores de absorvância em 570 nm no 4º dia de cultivo (96 h).



**Figura 9. Material particulado.** Valores médios (n = 12 nos controles e 3 nos tratamentos em vinhaça) de absorvância em 570 nm (U.A.) no 4º dia de cultivo (96 h) para cada microalga nos controles em BG11 (barras hachuradas) e nos tratamentos com vinhaça nas 1ª (barras claras), 2ª (barras cinza-claro), 3ª (barras cinza-escuro) e 4ª (barras escuras) etapas experimentais.

Os valores de absorvância em 570 nm estão relacionados à quantia de materiais particulados no meio, incluindo células algais e contaminantes como bactérias e fungos (Costa et al., 2003). As absorvâncias em 570 nm foram sempre menores nos controles do que em vinhaça, já que o meio BG11 tem composição inorgânica, não permitindo elevada contaminação bacteriana ou qualquer contaminação fúngica. Os elevados valores para a microalga *T. gracilis* em BG11, se comparado aos controles das demais algas, ocorrem devido a presença de sais marinhos dos meios. Já em vinhaça, as absorvâncias na 1ª etapa tendem a ser menores do que nas demais, apesar do maior crescimento algal. O aumento da absorvância em 570 nm nas etapas seguintes, para a maioria das microalgas, estaria atrelado à maior contaminação dos cultivos, principalmente com as algas reisoladas e aclimatadas. Vale ressaltar que, mesmo quando as absorvâncias foram semelhantes entre as etapas, como ocorreu com *S. quadricauda*, o menor crescimento algal implica em maior contaminação dos meios.

#### 4.0 DISCUSSÃO

Ao cultivar dez espécies microalgais nas mesmas concentrações e tratamento da vinhaça, observamos respostas variadas em relação ao crescimento populacional. Diferentemente da maior parte dos trabalhos com o resíduo, que utilizam apenas uma espécie, este estudo permitiu comparar as tolerâncias de várias microalgas, um importante subsídio para seleção de linhagens para aplicação biotecnológica. Além disso, a centrifugação é um processo simples em comparação com outros tratamentos da vinhaça propostos na literatura (Mitra et al., 2012; Marques et al. 2013; Bonini 2016; Candido e Lombardi 2017), tornando sua aplicação em escala comercial mais viável.

As duas espécies do gênero *Chlorella* foram as que apresentaram melhores desempenhos em vinhaça. O gênero *Chlorella* é reconhecido por sua robustez e capacidade de adaptação em ambientes com diferentes salinidades, cargas nutricionais, temperaturas e pHs (Lananan et al., 2013). Além disso, estas microalgas já apresentam taxas de crescimento elevadas nos controles, indicando um elevado potencial reprodutivo que, aliado à tolerância à toxicidade da vinhaça, podem ter facilitado a competição com bactérias e fungos que se desenvolvem no resíduo. Um dos melhores resultados com este gênero de microalgas em vinhaça foi obtido por Candido e

Lombardi (2017), cujas taxas de crescimento para *C. vulgaris* atingiram  $1,2 \text{ dia}^{-1}$  em vinhaça previamente adsorvida por argila esmectita e carvão ativado e diluída a 60%. Tal valor foi superado por este trabalho ( $1,5 \text{ dia}^{-1}$ ), mostrando que um tratamento simples como a centrifugação pode trazer crescimento de *C. vulgaris* tão ou mais promissor do que a literatura (Oliveira, 1988; Mitra et al., 2012; Candido e Lombardi, 2017). Embora o crescimento de *C. vulgaris* em vinhaça já tenha sido observado, este trabalho indica também a elevada tolerância de *C. sorokiniana*, apontando um uso promissor deste gênero na biorremediação do resíduo.

As microalgas *Chlamydomonas sp.*, *D. spinosus* e *Monoraphidium sp.*, que apresentaram taxas de crescimento em BG11 de 1,0, 1,6 e  $1,5 \text{ dia}^{-1}$ , respectivamente, não apresentaram o mesmo desempenho em vinhaça, com taxas máximas de crescimento em torno de  $0,8 \text{ dia}^{-1}$ . Apesar das altas capacidades reprodutivas apresentadas nos controles, os valores de EC50 para estas três espécies não excederam 20% de vinhaça, indicando baixa tolerância às condições adversas impostas pelo resíduo em altas concentrações. Entretanto, os crescimentos em 5% de vinhaça para estas espécies ainda foram significativos, provavelmente devido as suas elevadas capacidades reprodutivas.

De maneira semelhante, Kadioglu e Algur (1992) mostraram crescimento aumentado de *Chlamydomonas reinhardtii* em meio TAP suplementado com 1 a 5% de vinhaça em relação ao controle em meio TAP, mas redução do crescimento em concentrações superiores. Esta redução foi observada em todas as concentrações de vinhaça testadas neste trabalho em relação ao meio BG11 para a cepa do mesmo gênero. No entanto, vale lembrar que o meio BG11 é rico em nutrientes e amplamente utilizado em cultivos industriais (Rippka et al., 1979), de maneira que, mesmo com tal redução, o crescimento de *Chlamydomonas sp.* em vinhaça centrifugada a 5% ainda é bastante significativo. Kadioglu e Algur (1992) obtiveram  $5 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  em 96 h de cultura em meio TAP suplementado com 1% de vinhaça, enquanto que, na presente pesquisa, atingimos  $7 \cdot 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  em 5% de vinhaça em água, um diluente mais barato. Portanto, a cepa desta espécie isolada de um ambiente ácido trouxe melhores resultados do que a literatura, com maior concentração de vinhaça e sem adição de nutrientes sintéticos.

Mattos e Bastos (2016) utilizaram *Desmodesmus sp.* para o tratamento de vinhaça, ocasionando reduções de 50% nas concentrações de nitrogênio e de 35% na DQO, com potencial para produção de biomassa, assim como descrito neste trabalho. Já

Silva et al. (2017) obtiveram taxa de crescimento máxima de  $0,045 \text{ h}^{-1}$  ( $1,08 \text{ dia}^{-1}$ ) para *D. subspicatus* em vinhaça autoclavada cultivada sob condições heterotróficas, o que contribui para um aumento na contaminação da cultura. Assim, a taxa de crescimento de  $0,8 \text{ dia}^{-1}$  em vinhaça centrifugada obtida para *D. spinosus* na presente pesquisa é significativa, considerando que nossa vinhaça não foi autoclavada.

Não encontramos na literatura trabalhos que cultivem *Monoraphidium sp.* em vinhaça. No entanto, Patidar et al. (2014) observaram crescimento mixotrófico de *M. minutum* em quatro diferentes meios de cultura contendo os componentes orgânicos glicose, frutose, resíduo de biodiesel com glicerina ou acetato de sódio. Os autores obtiveram o maior rendimento de biomassa, de  $303 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ , no meio com  $15 \text{ g L}^{-1}$  de frutose, enquanto que no resíduo de biodiesel este crescimento foi de  $85,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Yu et al. (2012) obtiveram taxas de crescimento de  $0,52 \text{ dia}^{-1}$  para *Monoraphidium sp.* em meio de cultura BG11 com glicose e  $0,15 \text{ dia}^{-1}$  sob condições autotróficas. Assim, apesar do nosso crescimento reduzido para *Monoraphidium sp.* de  $0,8 \text{ dia}^{-1}$  em 5% de vinhaça centrifugada em relação ao crescimento de  $1,5 \text{ dia}^{-1}$  no controle em meio BG11, este resultado ainda é significativo quando comparado à literatura, na qual o gênero é tido como promissor para a produção de lipídios visando a geração de biocombustíveis (Yu et al. 2012).

As cepas marinhas *N. gaditana* e *T. gracilis* foram incluídas neste estudo porque vivem em ambientes com altas osmolaridades, mais próximas à da vinhaça. No entanto, nossos resultados mostraram que esta semelhança não ajudou as células de *N. gaditana* a lidarem com as condições adversas impostas pelo resíduo. Esta cepa foi inibida totalmente pela vinhaça, mesmo na concentração de 5%, apesar da taxa de crescimento de  $1,3 \text{ dia}^{-1}$  em BG11. Independentemente da alta capacidade de crescimento biótico demonstrada no controle, o EC50 para esta microalga foi inferior a 3% de vinhaça, indicando baixa tolerância ao resíduo, ainda que muito diluído. Os oceanos, principalmente em regiões distantes da costa, são ambientes com carga orgânica reduzida devido à alta velocidade em que esta matéria é oxidada e sedimentada (Hedges et al, 1997). A cepa de *N. gaditana* foi isolada do ambiente marinho, o que pode explicar a alta sensibilidade à carga orgânica da vinhaça.

Já *T. gracilis*, a outra espécie marinha testada, cresceu de forma semelhante ao controle em 5% de vinhaça, apresentando maior tolerância ao resíduo do que *N. gaditana*, com EC50 de 16% de vinhaça e viabilidade celular de 90%, mesmo em vinhaça a 50%. De acordo com Asma e Mathew (2001), *T. gracilis* é uma espécie

estuarina, adaptada a maiores influências de poluentes vindos da costa. De acordo com os autores, esta espécie foi capaz de reduzir a concentração de inseticidas organoclorados em até 30% em soluções aquosas, confirmando sua capacidade de sobreviver em meio com compostos orgânicos desfavoráveis (Asma e Mathew, 2001). Desta maneira, o crescimento de *T. gracilis* em vinhaça, ainda que a 5%, é vantajoso, uma vez que a água do mar é um diluente abundante e barato.

As similaridades entre as taxas de crescimento de *H. pluviialis* e *S. quadricauda* em 5% de vinhaça e em seus respectivos controles ( $p > 0,05$ ), além das menores taxas de crescimento em concentrações de vinhaça superiores à 10%, indicam a presença de componentes da vinhaça que afetam suas fisiologias. Além disso, os baixos potenciais bióticos, representados pelos crescimentos lentos destas espécies nos controles em BG11, indicam que seus desenvolvimentos podem ter sido mais comprometidos pela contaminação do resíduo do que os das espécies com crescimento acelerado. Ainda assim, pesquisas recentes mostraram a capacidade destas espécies em crescer em vinhaça, com potencial para a biorremediação do resíduo. Gollo et al. (2016) cultivou *H. pluviialis* em vinhaça a 3% com adição de 0,7% de NaCl durante 15 dias, permitindo o posterior uso do resíduo para a irrigação de plantas sem causar-lhes efeitos deletérios, já que sua citotoxicidade, estresse salino e quantia de compostos fenólicos foram reduzidos. Haque et al. (2017) obtiveram taxa de crescimento de  $0,32 \text{ dia}^{-1}$  e biomassa de  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  para a mesma espécie em aproximadamente 1,6% de vinhaça suplementada com 5% de  $\text{CO}_2$ , com reduções equivalentes a 67% no carbono total e 91% no nitrogênio total do resíduo. Em relação a *S. quadricauda*, Ramirez et al. (2014) obteve  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  em meio Guillard suplementado com até 40% de vinhaça. Rocha et al. (2015) obtiveram taxa de crescimento máxima de  $0,41 \text{ d}^{-1}$  para *S. quadricauda* em meio sintético, menor do que a taxa de crescimento de  $0,75 \text{ dia}^{-1}$  obtida em vinhaça diluída à 5%. Portanto, os crescimentos que obtivemos em vinhaça centrifugada para as espécies *H. pluviialis* e *S. quadricauda* foram vantajosos em relação à literatura.

A diatomácea de água doce *Cyclotella sp.*, que possui baixa reprodução mesmo no controle em BG11, foi altamente sensível à vinhaça e não pôde crescer em nenhuma das concentrações testadas. Geralmente, as diatomáceas têm reprodução lenta porque precisam sintetizar as frústulas de sílica que as revestem (Lee, 2008). Além disso, mudanças bruscas no ambiente, como pode ocorrido ao inocular *Cyclotella sp.* em vinhaça, são estressantes e desencadeiam a reprodução sexuada, a qual exige um período ainda mais longo para geração de novos indivíduos (Raven, 2007). A matéria

orgânica e os nutrientes presentes em elevada quantidade na vinhaça ainda estimulam o crescimento de bactérias e fungos (Silva et al., 2007), os quais podem ter competido com a diatomácea, contribuindo ainda mais para inibi-la. Segundo Saros e Anderson (2015), a distribuição de *Cyclotella* em ambientes aquáticos é guiada pela disponibilidade de fósforo e nitrogênio e pela clareza da água, além destas espécies não tolerarem ambientes ácidos. Assim, a presença de vinhaça no meio aumenta a carga de matéria orgânica dissolvida e sua turbidez, afetando a sobrevivência e a reprodução da cepa. Possivelmente, estas restrições estão relacionadas à ausência de estudos que utilizem esta diatomácea em culturas com vinhaça ou outros resíduos orgânicos.

Na literatura, investigações sobre o crescimento de microalgas em vinhaça expressam os efeitos tóxicos ou promotores do resíduo em termos de biomassa, densidade celular ou teor de clorofila *a* (Kadioglu e Algur, 1992; Oliveira, 1988; Mitra et al., 2012; Candido e Lombardi, 2017; Gollo et al., 2016; Ramirez et al., 2014). Na presente pesquisa, adicionamos o parâmetro da viabilidade celular, que está relacionada à preservação do formato celular e da fluorescência da clorofila *a* nas células microalgais e, portanto, às capacidades fisiológicas de sobrevivência e reprodução. Nas concentrações ótimas de vinhaça, as viabilidades em 96 horas de cultivo foram sempre superiores a 96%, demonstrando pequeno efeito da vinhaça quando utilizada em concentrações reduzidas. Por outro lado, nas culturas em vinhaça a 50%, as viabilidades atingiram valores mais baixos, a partir de 62%, ajudando a explicar a limitação do crescimento das algas acima de 20% de vinhaça. A osmolaridade e a toxicidade da vinhaça são fatores que podem ter comprometido as células algais, reduzindo a capacidade reprodutiva da população. Assim, as baixas viabilidades de *Monoraphidium sp.*, *Cyclotella sp* e *N. gaditana* indicam danos drásticos que prejudicaram suas sobrevivências, culminando em declínios acentuados nos crescimentos populacionais.

Os testes de Identificação e Avaliação de Toxicidade (TIE) consistem em uma série de manipulações baseadas em um protocolo estabelecido pela USEPA (1991), que promovem a remoção de compostos específicos de um resíduo de composição desconhecida, para determinar as causas de sua toxicidade. Na vinhaça, Bonini (2016) aplicou o procedimento TIE e observou que a manipulação que permitiu o melhor crescimento de *C. vulgaris* foi a redução do pH para 3,0, o que promoveu a remoção de sulfetos e cianetos (USEPA, 1991). Esta é uma das poucas pesquisas que investiga os compostos de vinhaça que podem ser correlacionados à toxicidade do resíduo para microalgas. Outros autores relacionam a toxicidade e a cor escura dos resíduos da

destilaria, como a vinhaça, à presença de compostos fenólicos chamados melanoidinas (Ryan et al., 2008; Mohana et al., 2009). Além da toxicidade, a cor escura causada por estas substâncias dificulta a penetração da luz, necessária para o processo fotossintético das microalgas (Reynolds et al., 2006).

Comparando a composição nutricional da vinhaça centrifugada a 5% com os nutrientes do BG11, observamos que as concentrações de cálcio, potássio, magnésio e sulfato do resíduo diluído superam as do meio sintético, enquanto sódio, nitrogênio e fósforo foram menores em vinhaça. Apesar destas diferenças, a vinhaça a 5% não causou limitação nutricional nas microalgas, como pôde ser visualizado pelas taxas de crescimento de *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* nestas concentrações, que foram equivalentes ao BG11, um meio rico em nutrientes (Rippka et al. 1979). Além disso, nas culturas de *C. vulgaris* em 20% e de *S. quadricauda* em 5% de vinhaça centrifugada diluída com meio BG11 houveram reduções nos crescimentos em relação aos meios diluídos com água deionizada. Pode-se afirmar que a vinhaça centrifugada diluída, portanto, foi suficiente para suprir a demanda de nutrientes dos organismos e, de maneira oposta, o excesso de nutrientes providos pela diluição com BG11 pode ter elevado a osmolaridade dos meios de cultura, danificando as células algais (Kadioglu e Algur, 1992). Portanto, os nutrientes fornecidos pela vinhaça, ainda que mais diluída, foram suficientes para suportar o crescimento das microalgas sem limitá-las.

O cultivo de microalgas em resíduos reduz os custos de produção de biomassa, ao mesmo tempo que promove suas biorremediações. Utilizando organismos isolados de locais com características semelhantes às da vinhaça, ou mesmo da própria vinhaça, não se garantiu o sucesso do crescimento algal, devido a elevada complexidade do resíduo e aos efeitos sinérgicos de suas características. Portanto, investigações sistemáticas relacionadas à prospecção de microalgas em meios com vinhaça ou outros resíduos são importantes para sua aplicação biotecnológica.

Microalgas são organismos que compõem a base das cadeias tróficas em ecossistemas aquáticos (Reynolds et al. 2006). Considerando que as dez espécies de microalgas testadas possuem diferentes tolerâncias à vinhaça, a contaminação dos ecossistemas aquáticos por este resíduo pode desequilibrar a abundância das espécies, afetando a biodiversidade fitoplanctônica e o equilíbrio das interações presentes nas cadeias alimentares aquáticas. Segundo Silva et al. (2007), a aplicação excessiva da vinhaça na irrigação e fertilização dos solos das culturas de cana-de-açúcar pode contaminar lençóis freáticos subterrâneos e águas superficiais através de sua lixiviação e

percolação. Neste sentido, outros usos da vinhaça que impeçam tal contaminação, como a composição de meios de cultura de microalgas, ganham ainda mais importância.

As estratégias biológicas de aclimação e reisolamento trouxeram prejuízos para todas espécies microalgais cultivadas em vinhaça, tanto para o crescimento, quanto para a viabilidade celular e a contaminação. Na etapa experimental que teve como inóculo células aclimatadas e reisoladas, o efeito negativo foi ainda mais drástico, principalmente para as espécies *Monoraphidium sp.* e *S. quadricauda*. Um importante fator que limita o crescimento algal em resíduos é a contaminação por fungos e bactérias, os quais regulam as populações naturais, inclusive dificultando a ocorrência de blooms algais (Carney e Lane, 2014). Os organismos contaminantes aumentam a turbidez do meio, prejudicando a entrada de luz e a fotossíntese (Raven, 2007), e consomem matéria orgânica dissolvida, que também é fonte de nutrientes para as microalgas no metabolismo mixotrófico por meio da osmotrofia (Schoonhoven, 2000). Apesar destes prejuízos, quando as microalgas conseguem crescer exponencialmente em cultivos e superar esta contaminação, atingindo elevada densidade celular, a própria população algal controla a quantidade de contaminantes na vinhaça (Candido e Lombardi, 2018). Portanto, caso a contaminação seja intensa nos primeiros dias de cultivo, os contaminantes superam competitivamente a capacidade das algas, dificultando seus aumentos populacionais (Ricklefs e Relyea, 2014).

Na 2ª e, principalmente, na 4ª etapa experimentais, com microalgas aclimatadas, **notam**-se elevadas absorvâncias em 570 nm, apesar do menor crescimento algal. Isso indica que estas culturas contaminaram mais do que as não aclimatadas da primeira etapa (Costa et al., 2003), o que se deve aos fungos e bactérias vindos nos inóculos. Ao gastarem mais energia neste processo competitivo, as microalgas não conseguem dispende tantos recursos com sua sobrevivência e reprodução (Ricklefs e Relyea, 2014) e, por isso, têm suas viabilidades e crescimentos populacionais reduzidos. Algumas cepas lidaram de forma pior com esta contaminação, como é o caso de *C. sorokiniana*, *D. spinosus* e *Monoraphidium sp.*, enquanto *C. vulgaris* foi a que teve a melhor capacidade competitiva.

Quando cultivada a partir de uma cultura inóculo mantida em meio LC Oligo (AFNOR, 1980), *C. vulgaris* apresentou o mesmo desempenho do que quando mantida inicialmente em meio BG11 (Rippka et al., 1979). Este padrão mostra que os crescimentos nas etapas sem aclimação não foram maiores devido a acúmulos de nutrientes do meio de origem, já que o meio LC Oligo é mais pobre nutricionalmente do



que o BG11. Portanto, a contaminação, e não a limitação nutricional, é o fator predominante na redução de crescimentos nas etapas com aclimações.

*T. gracilis* teve um aumento de absorvância ao longo das etapas proporcionalmente menor do que nas demais espécies, possivelmente devido ao uso de água marinha na diluição. Segundo Carney e Lane (2014), apenas 0,6% das espécies de fungos contaminantes de culturas algais são marinhos. Sendo assim, a busca por espécies marinhas para cultivos em resíduos diluídos é bastante vantajosa pois, além da água do mar ser um recurso abundante para a diluição, ainda temos a vantagem de a contaminação dos cultivos ser menor.

Candido e Lombardi (2018) demonstraram que uma repicagem para aclimação de *C. vulgaris* em vinhaça adsorvida por argila esmectita e carvão ativado causou aumento das taxas de crescimento em relação às culturas não aclimatadas, de 1,2 para 1,6 dia<sup>-1</sup>. Segundo as autoras, a contaminação do primeiro inóculo no processo de aclimação não foi suficiente para comprometer o crescimento algal já que, diferentemente da centrifugação em nosso trabalho, o tratamento prévio de adsorção da vinhaça reduziu sua carga orgânica. Porém, o mesmo comportamento aqui descrito ocorreu a partir da segunda repicagem em vinhaça adsorvida, confirmando a influência da contaminação na inibição do crescimento algal (Candido e Lombardi (2018).

Na 3<sup>a</sup> etapa experimental, com algas apenas reisoladas, apesar dos inóculos não trazerem contaminações prévias aos meios, a presença de fungos e bactérias também é elevada. Esta contaminação possivelmente ocorre devido à menor capacidade competitiva das microalgas reisoladas, o que pode ser evidenciado pelas menores viabilidades celulares. Carney e Lane (2014) afirmam que a contaminação é um grande problema em culturas algais, pois bactérias e fungos trazem restrições ao desenvolvimento das microalgas.

A seleção artificial é um mecanismo que possibilita o melhoramento biológico de características de interesse dos organismos em detrimento da redução de suas variabilidades genéticas (Wright et al., 2005; Buckler et al., 2001; Flynn et al., 2010). A redução nas variabilidades genéticas de cepas reisoladas impõe menos dificuldades ao crescimento dos demais contaminantes, dificultando a sobrevivência de organismos selecionados artificialmente em ambientes naturais. Nestes ambientes, as variabilidades genéticas das espécies auxiliam no controle do crescimento das demais populações e na manutenção do equilíbrio ambiental (Flynn et al., 2010). Apesar de diversos trabalhos apontarem a seleção artificial de variações genéticas que privilegiem fenótipos mais

resistentes como vantajosa (Swenson et al., 2000), o mesmo não foi observado com as microalgas em vinhaça. Portanto, esta estratégia biológica atuou negativamente quanto à produção de biomassa algal em vinhaça.

## 5.0 CONCLUSÕES

*C. sorokiniana* em 15% e *C. vulgaris* em 20% de vinhaça centrifugada cresceram melhor do que em BG11, com taxas de crescimento de respectivamente 2,0 e 1,5 dia<sup>-1</sup>. *Chlamydomonas sp.*, *H. pluvialis*, *Monoraphidium sp.*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* apresentaram desempenhos ligeiramente inferiores em vinhaça centrifugada a 5% do que nos respectivos controles, assim como *D. spinosus* em vinhaça a 20%, com crescimentos entre 0,8 e 1,0 dia<sup>-1</sup>. Portanto, o uso destas espécies em vinhaça centrifugada diluída pode ser vantajoso em relação aos custos de produção de microalgas em meios artificiais, uma vez que resultaria em economia com nutrientes. Para as espécies *Cyclotella sp.* e *N. gaditana*, a vinhaça foi altamente tóxica, inviabilizando qualquer crescimento. Elevada capacidade reprodutiva, tolerância à toxicidade e origem de ambientes com características semelhantes às da vinhaça não garantiram que as algas tivessem um bom desempenho no resíduo, tornando ainda mais importantes estudos com seleção de cepas. Os valores de EC50 para as microalgas indicam que a contaminação dos ambientes aquáticos pela vinhaça, que pode ocorrer por percolação ou escoamento, pode interferir na biodiversidade de espécies do fitoplâncton, gerando desequilíbrios ambientais graves.

Apesar de estratégias biológicas como a aclimação e a seleção artificial por reisolamento serem relacionadas à melhoria da produção, tais processos não trouxeram bons resultados para os cultivos algais em vinhaça. A aclimação aumentou os contaminantes biológicos no inóculo, os quais limitaram o crescimento algal. A seleção artificial também não contribuiu com a melhoria do crescimento algal em vinhaça, pelo contrário, prejudicou a sobrevivência e reprodução destes organismos. Os resultados apresentados neste capítulo são uma contribuição aos setores ecotoxicológico, ambiental e biotecnológico, contribuindo para o desenvolvimento de usos para a vinhaça.

## CAPÍTULO 3: ANÁLISE DA BIOMASSA PRODUZIDA EM VINHAÇA TRATADA

### Resumo

Apesar de terem se iniciado na década de 1980, os estudos sobre o cultivo de microalgas em vinhaça ainda focam no crescimento e produção de poucas espécies, não abordando aspectos fisiológicos dos organismos no resíduo. Neste capítulo investigamos e comparamos parâmetros produtivos e fisiológicos das microalgas *Chlamydomonas sp.*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus spinosus*, *Haematococcus pluvialis*, *Monoraphidium sp.*, *Scenedesmus quadricauda* e *Tetraselmis gracilis* em vinhaça. Culturas com duração de 96 h foram realizadas em concentrações ótimas de vinhaça centrifugada, com controles em meio BG11. Diariamente, avaliaram-se as densidades celulares, concentrações de clorofila *a*, absorbâncias em 570 e em 684 nm e, ao final dos experimentos, os biovolumes celulares e totais, biomassas secas, proteínas e carboidratos totais. Em 48 horas, avaliaram-se as eficiências fotossintéticas máximas e operacionais, decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímicos (qN e NPQ), curvas de saturação luminosa e parâmetros relacionados como  $\alpha$ , rETR<sub>m</sub> e E<sub>K</sub>, bem como as fixações teóricas de carbono. Apesar das taxas de crescimento em vinhaça serem semelhantes aos controles, a vinhaça gerou aumentos nos biovolumes celulares e totais, nas biomassas secas e nas proteínas totais. O resíduo não causou danos ao aparato fotossintético ou mesmo interferência na produção de clorofila *a*. Entretanto, todas as espécies fizeram uso do metabolismo mixotrófico, sendo que *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* e *D. spinosus* investiram mais em heterotrofia e *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* mantiveram maiores investimentos autotróficos. Logo, é possível afirmar que o uso de vinhaça em cultivos microalgais estimula diversas vias metabólicas energéticas e, em termos produtivos, é mais promissor do que o previsto na literatura.

**Palavras-chave:** Biomassa algal; Biovolumes; Biomoléculas; Phyto PAM; Mixotrofia.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre produção de microalgas em vinhaça avaliam os crescimentos algais por meio de diferentes parâmetros, como densidades celulares, taxas de crescimento, biomassas secas e análises bioquímicas. Utilizando concentrações de até  $5,0 \text{ g L}^{-1}$  de vinhaça de beterraba em meio Schlösser, Barrocal et al. (2010) geraram até  $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de *Spirulina maxima*, em uma taxa de  $0,1 \text{ dia}^{-1}$ . Marques et al. (2013) produziram  $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de *Chlorella vulgaris* em vinhaça digerida anaerobicamente, com produtividades de lipídeos de  $0,5$  a  $1,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Coca et al. (2014) geraram  $6,5 \text{ g L}^{-1}$  de *Spirulina platensis*, contendo  $168 \text{ mg L}^{-1}$  de proteínas. Mais recentemente, Santana et al. (2017) quantificaram as biomassas secas, proteínas e carboidratos para rastrear espécies com alta produtividade em vinhaça dentre 40 cepas, obtendo bons resultados com linhagens de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas sp.*

Com excessão de Candido e Lombardi (2018), não há investigações dos parâmetros fisiológicos das microalgas no resíduo, que poderiam ser usadas para melhorar as condições de cultivo. Além disso, a biomassa produzida neste resíduo orgânico contém contaminantes (Candido e Lombardi, 2018), sobre os quais geralmente não se discute. Portanto, não encontramos na literatura estudos que englobem várias medidas de produtividade das microalgas, seus parâmetros fisiológicos e a contaminação oriunda de meios contendo compostos orgânicos como a vinhaça.

As microalgas são organismos com metabolismos energéticos variados, podendo ser autotróficos, heterotróficos ou mesmo mixotróficos, quando usam fontes inorgânicas e orgânicas de carbono ao mesmo tempo (Schoonhoven, 2000). Cada espécie pode ter diferentes adaptações metabólicas ao ambiente e, portanto, finalidades biotecnológicas. Espécies com maior investimento heterotrófico são indicadas para o tratamento de resíduos orgânicos (Marchello et al., 2015), enquanto espécies que mantêm altas taxas fotossintéticas ocasionam maior fixação de gás carbônico e são interessantes para a mitigação do aquecimento global (Borges et al., 2007). Sabendo que a vinhaça é um resíduo complexo, rico em nutrientes minerais e orgânicos (Silva et al., 2007), sua presença em cultivos e nos ambientes aquáticos pode interferir de formas diferenciadas na fisiologia das espécies algais.

Na fotossíntese, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é fixado em moléculas orgânicas utilizando energia luminosa (Raven et al., 2013). Na etapa fotoquímica, a energia

luminosa incide nos fotossistemas dos tilacóides e é direcionada pelo sistema antena até os centros de reação, onde existem clorofilas P680. Quando excitadas, estas clorofilas perdem elétrons, que são carreados ao longo da cadeia transportadora por moléculas associadas à membrana dos tilacóides. Este transporte gera um gradiente de prótons entre o lúmen do tilacóide e o estroma do cloroplasto, permitindo a produção de ATP e NADPH, que fornecem energia e poder redutor à etapa bioquímica da fotossíntese, possibilitando a fixação do carbono no Ciclo de Calvin (Raven et al., 2013).

O processo fotossintético microalgal pode ser quantificado de diversas maneiras, como pela técnica do decaimento do  $^{14}\text{C}$  (Reynolds, 2006). Entretanto, esta técnica necessita de reagentes caros e que trazem riscos para quem os manipula, além de demandar uma incubação prolongada, não permitindo análises instantâneas da fotossíntese. Já a técnica de quantificação do oxigênio liberado mostra-se pouco precisa, pois a respiração de organismos contaminantes e as variações nas taxas respiratórias das próprias microalgas podem afetar o balanço entre consumo e liberação de oxigênio. Como alternativa, a fluorometria por Pulso de Amplitude Modulada (PAM) mensura as fluorescências emitidas pela clorofila *a* durante a etapa fotoquímica da fotossíntese (Campostrini, 2010; Martins et al., 2009; Morris et al., 2008) de maneira instantânea e precisa. A partir das fluorescências detectados, vários parâmetros são obtidos, tais como rendimentos, decaimentos fotoquímicos e não fotoquímicos, taxas de transporte de elétrons (ETR) e curvas rápidas de saturação de luz (RLC). Como o passo fotoquímico da fotossíntese está diretamente relacionado ao bioquímico (Raven et al., 2013), ainda é possível calcular a fixação autotrófica teórica de carbono a partir de relações matemáticas estabelecidas na literatura (Juneau e Harrison, 2005; Morris et al., 2008).

O rendimento quântico ou fotossintético máximo indica a eficiência de absorção de energia pelos fotossistemas II quando os aceptores de elétrons estão oxidados e ávidos por receberem elétrons (Genty et al., 1989). Estes valores são proporcionais à energia luminosa direcionada aos processos fotoquímicos (qP) e também são influenciados por processos de dissipação não fotoquímicos (Genty et al., 1989). Já o rendimento fotossintético operacional indica a proporção de energia luminosa incidente nos fotossistemas II que é utilizada pela microalga com os aceptores de elétrons reduzidos, em uma condição semelhante aos ambientes naturais ou às luminosidades dos cultivos (Campostrini, 2010; Martins et al., 2009).

As curvas rápidas de saturação de luz (RLC) são baseadas nas taxas relativas de transporte de elétrons (rETR), determinadas a partir dos rendimentos fotossintéticos

operacionais em luminosidades crescentes (Ralph e Gademann, 2005). Estas curvas indicam como a fotossíntese se comporta em diferentes luminosidades nas microalgas com o estado fisiológico mantido ao longo dos cultivos (Ralph e Gademann, 2005). Enquanto a luz é um fator limitante para a fotossíntese, os valores de rETR aumentam acentuadamente. A inclinação tangencial desta parte da curva ( $\alpha$ ) está relacionada à capacidade de captura e conversão da energia luminosa (Henley, 1993). Aumentando as intensidades luminosas, os valores de rETR estabilizam devido à capacidade máxima de captação luminosa do aparato fotossintético, ocasionando a saturação fotossintética (Raven et al., 2013). No final da curva há redução nos valores de rETR devido ao processo de fotoinibição, já que existe um limite energético com o qual os mecanismos dissipadores de energia conseguem lidar (Dewez et al., 2005; Raven et al., 2013). Já a fixação autotrófica de carbono é proporcional à eficiência absoluta no transporte de elétrons (aETR) a partir do PSII e é dada por cálculos já estabelecidos (Genty et al., 1989; Morris et al., 2008; Juneau e Harrison, 2005, Lombardi e Maldonado, 2011).

Neste capítulo, investigamos parâmetros bioquímicos, fotossintéticos e metabólicos de oito cepas microalgais em vinhaça centrifugada diluída, gerando subsídios para a seleção de espécies e condições mais produtivas e para a compreensão das adaptações no metabolismo energético de microalgas que sustentam seu desenvolvimento em um resíduo complexo como a vinhaça.

## 2.0 MATERIAL E MÉTODOS

Cultivos em vinhaça centrifugada de *Chlamydomonas sp.*, *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *D. spinosus*, *H. pluvialis*, *Monoraphidium sp.*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*, nas concentrações ótimas e controles em meio BG11 (Rippka et al., 1979), foram realizados em trélicas experimentais em frascos para cultura de tecidos de 250 cm<sup>3</sup> com 150 mL de meio. O pH inicial dos meios foi ajustado para 6,8 – 7,0, exceto para *Chlamydomonas sp.* que foi cultivada com pH inicial ajustado para 4,8 – 5,0. Os cultivos foram mantidos em temperatura de 25 ± 2 °C e luminosidade interna de 130  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , exceto para *H. pluvialis*, para a qual utilizou-se 90  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

A densidade celular inicial foi de  $5 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, exceto para *H. pluvialis*, cujos cultivos foram inoculados com  $2,5 \cdot 10^4$  cistos mL<sup>-1</sup>. Os processos de aclimação e reisolamento de cepas a partir de meios com vinhaça, testados no capítulo anterior, reduziram os crescimentos algais. Por isso, os inóculos utilizados foram retirados diretamente de meio BG11 em fase exponencial de crescimento, com rendimento fotossintético máximo ( $\phi_M$ ) de ao menos 0,70, o qual indica que a alga está com o metabolismo fotossintético saudável (Lombardi e Maldonado, 2011).

As culturas foram monitoradas diariamente por 96 h para densidade celular (células mL<sup>-1</sup>) por contagem em câmara Fuchs-Rosenthal em microscópio óptico (Nikon – modelo Eclipse E200, Japão), absorvância em 570 e em 684 nm (espectrofotômetro Nanocolor Macherey-Nagel, Reino Unido) e fluorescência da clorofila *a* (fluorímetro Trilogy - Turner Designs, EUA). Foram obtidas taxas de crescimento (dia<sup>-1</sup>) de cada amostra a partir das regressões lineares nas fases exponenciais das curvas com as densidades celulares diárias. As absorvâncias em 570 nm se referem à quantidade de material particulado no meio (Costa et al., 2003), incluindo microalgas e contaminantes como fungos e bactérias. Já as absorvâncias em 684 nm se relacionam às partículas clorofiladas dos cultivos (Rodrigues et al., 2011), no caso, as microalgas. A comparação destes valores fornece uma estimativa da representação da contaminação nas biomassas geradas. A fluorescência da clorofila *a* foi utilizada para obtenção das concentrações de clorofila *a* (mg L<sup>-1</sup>) *in vivo* por meio da equação 1, após calibração do equipamento com clorofila *a* obtida de culturas de *Chlorella sorokiniana*.

$$[\text{Clorofila } a] = (\text{Fluorescência} + 2870,2) / 7064,4 \quad (1)$$

A vinhaça centrifugada, mesmo diluída, apresenta coloração e turbidez que podem modificar as medidas espectrofotométricas e fluorimétricas citadas. Por isso, para realizar estas medições, foram coletadas diariamente amostras de 4 mL de cada cultura, as quais foram centrifugadas a 4000 rpm (2510 g) e 25 °C por 15 min. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets algais foram suspensos com 4 mL de meio BG11, mantendo as concentrações iniciais das culturas. Antes das medições com as amostras suspensas, os equipamentos foram zerados com meio BG11, o qual tem turbidez praticamente igual à da água limpa. Os processos de centrifugação e suspensão também foram realizados com os controles em BG11 para que possíveis alterações

fisiológicas pudessem ser identificadas. Amostras de vinhaça bruta sem a inoculação de microalgas também foram centrifugadas e ressuspendidas em meio BG11. A análise destas amostras pela técnica PAM não captou nenhuma fluorescência, confirmando que as medições geradas pelo Phyto PAM nas culturas se referiram apenas às microalgas.

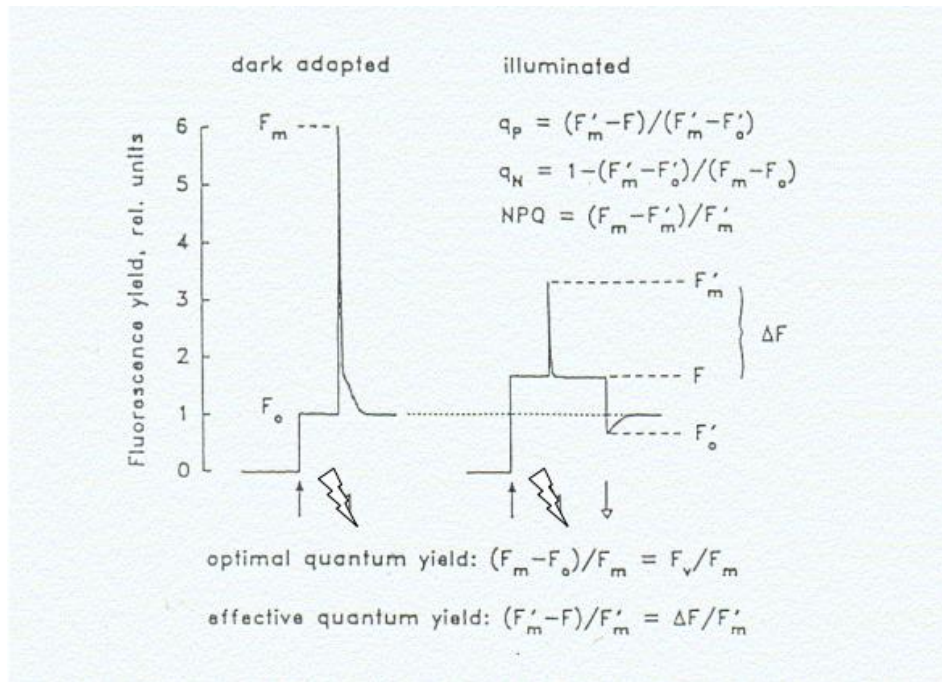
No início do experimento e em 96 h, as dimensões de 30 células microalgais por amostra foram obtidas para o cálculo dos biovolumes celulares ( $\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1}$ ) de acordo com Hillebrand et al. (1999), que consideram as formas geométricas da qual as células se assemelham. Foram obtidos os biovolumes totais ( $\text{mm}^3 \text{ mL}^{-1}$ ) das culturas multiplicando-se os biovolumes celulares médios de cada tratamento pelas respectivas densidades celulares iniciais ou finais das culturas. As variações entre os biovolumes totais finais e iniciais foram multiplicadas pelo fator de conversão  $0,12 \cdot 10^{-12} \text{ g C } \mu\text{m}^{-3}$  (Turley et al., 1986) para obtenção das produções em  $\text{mg C L}^{-1}$ . Considerando a duração experimental de quatro dias, foram obtidas as produtividades em  $\text{mg C L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ .

Para obtenção da biomassa seca de cada cultura ( $\text{mg L}^{-1}$ ), foram realizadas filtrações com uma bomba à vácuo de alíquotas de 30 mL de cada cultura final (96 h) por filtros de fibra de vidro pré-pesados com diâmetro de 47 mm e porosidade de 0,6  $\mu\text{m}$ . Os filtros foram colocados em estufa a  $40^\circ\text{C}$  por 48 horas para secagem e, posteriormente, foram pesados novamente para o cálculo das biomassas secas.

Ainda em 96 h de cultivo, foram coletadas amostras de 50 mL para análise de proteínas totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ), extraídas de acordo com Rausch (1981) e determinadas a partir de Bradford (1976), e amostras de 30 mL para análise de carboidratos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ), determinados por meio de Albalasmeh et al. (2013). A partir destas quantificações, obtivemos as razões proteína/carboidrato (P/C). As análises de biomassa seca e de proteínas e carboidratos totais se deram na biomassa total produzida, incluindo as microalgas e os contaminantes das amostras, como fungos e bactérias.

Em 48 horas de cultivo, quando todas as culturas estavam em fase exponencial de crescimento, foram avaliados os parâmetros fotossintéticos no fluorímetro Phyto PAM (Walz - Alemanha). Este equipamento capta e quantifica as variações nas fluorescências emitidas pelas moléculas de clorofila *a* após a excitação por um pulso luminoso saturante em algas aclimatadas ao escuro ( $F_0$ ,  $F_m$  e  $F_v$  ou  $\Delta F$ ), quando os centros de reação dos fotossistemas II estão abertos, ou após aclimação à luz ( $F'_0$ ,  $F'_m$  e  $F'_v$  ou  $\Delta F'$ ), quando os centros de reação estão parcialmente fechados. A Figura 1 representa as emissões de fluorescência mencionadas.





**Figura 1. Fluorescências da clorofila *a* captadas pelo PAM.** Representações gráficas das emissões de fluorescência pela clorofila *a* após estimulação por pulso de luz saturante (representado por meio dos raios) em microalgas adaptadas ao escuro (centros de reação abertos) e ao claro (centros de reação parcialmente fechados) (Campostrini, 2010).

O rendimento fotossintético máximo ( $\phi_M$ ), obtido utilizando-se células adaptadas ao escuro durante 20 min, está relacionado à fluorescência mínima ( $F_0$ ) e à fluorescência máxima ( $F_m$ ) emitidas por estas células após a aplicação de um pulso de luz saturante de  $2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 0,2 s. O pr\u00f3prio equipamento PAM determina estes valores por meio da equa\u00e7\u00e3o 2 (Campostrini, 2010; Martins et al., 2009).

$$\phi_M = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m \quad (2)$$

O rendimento fotossint\u00e9tico operacional ( $\phi'_M$ ), os decaimentos fotoqu\u00edmico ( $q_P$ ) e n\u00e3o fotoqu\u00edmicos ( $q_N$  e  $NPQ$ ) foram obtidos em c\u00e9lulas adaptadas \u00e0 luz act\u00ednica do equipamento, com intensidade de  $128 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Para obter o rendimento fotossint\u00e9tico operacional ( $\phi'_M$ ), o equipamento mede o valor m\u00ednimo de fluoresc\u00eancia “steady-state” emitido pela microalga adaptada \u00e0 luz act\u00ednica ( $F$  ou  $F_s$ ) e o valor m\u00e1ximo de fluoresc\u00eancia ( $F'_m$ ) ap\u00f3s a emiss\u00e3o de pulsos de satura\u00e7\u00e3o de luz a cada 20 segundos, at\u00e9 a estabiliza\u00e7\u00e3o dos valores de fluoresc\u00eancia (Campostrini, 2010; Martins

et al., 2009). O próprio equipamento determina este rendimento por meio da equação 3 (Campostrini, 2010; Martins et al., 2009).

$$\phi'_M = (F'm - F_s) / F'm = F'v / F'm \quad (3)$$

O decaimento fotoquímico qP indica a proporção de energia luminosa que é utilizada nos processos fotoquímicos fotossintéticos. Já o decaimento não fotoquímico qN está relacionado à fração da energia luminosa não utilizada na fotossíntese, enquanto o NPQ mostra-se proporcional à energia dissipada na forma de calor (Campostrini, 2010; Martins et al., 2009). Para o cálculo dos decaimentos são utilizados os valores de fluorescência fornecidos pelo próprio Phyto PAM, bem como o valor de F'o, dado pela equação 4 (Oxborough e Baker, 1997). Os valores de qP, qN e NPQ foram calculados por meio das equações 5, 6 e 7 respectivamente (Schreiber et al., 1986; Bilger e Björkman, 1990; Maxwell and Johnson 2000).

$$F'o = F_o / ((F_v/F_m) + (F_o/F_m')) \quad (4)$$

$$qP = (F'm - F_s) / (F_m - F'o) \quad (5)$$

$$qN = (F'm - F'o) / (F_m - F_o) \quad (6)$$

$$NPQ = (F_m - F'm) / F'm \quad (7)$$

Ao aplicar pulsos de luz saturante a cada 20 segundos em amostras aclimatadas a intensidades de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) crescentes, de 0 a 1730  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o PAM obt\u00e9m valores sequenciais de rendimentos fotossint\u00e9ticos operacionais ( $\phi'_M$ ), usados para calcular as taxas relativas de transporte de el\u00e9trons (rETR,  $\mu\text{mol el\u00e9trons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de acordo com a equa\u00e7\u00e3o 8 (Ralph et al., 2002). Os valores obtidos foram utilizados para a constru\u00e7\u00e3o de curvas r\u00e1pidas de luz (RLC) ou tamb\u00e9m chamadas de curvas de satura\u00e7\u00e3o luminosa.

$$rETR = \phi'_M \times PAR \quad (8)$$

As curvas de saturação luminosa (rETR vs PAR) descrevem a resposta fotossintética em relação à irradiância (Ralph e Gademann, 2005) e foram modeladas de acordo com Platt et al. (1980), por meio da equação 9.

$$rETR = rETR_m \times \tanh(\alpha \times I / rETR_m) - R^B \quad (9)$$

Onde:

rETR = taxa relativa de transporte de elétrons ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

rETR<sub>m</sub> = taxa relativa de transporte de elétrons máxima ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

$\alpha$  = inclinação inicial da curva ( $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$ )

I = intensidade luminosa (PAR ou  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

R<sup>B</sup> = perdas por respiração

Tais modelagens foram feitas no programa IgorPro 5.03, que nos forneceu as inclinações iniciais das curvas ( $\alpha$ ) e os valores de rETR máxima (rETR<sub>m</sub>). Com estes parâmetros calculou-se a irradiância de saturação (E<sub>K</sub>,  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) por meio da equação 10.

$$E_K = rETR_m / \alpha \quad (10)$$

Foram realizadas estimativas da fixação teórica de carbono (produtividade primária bruta) utilizando-se varreduras de absorvâncias entre os comprimentos de onda de 300 a 700 nm no espectrofotômetro NANOCOLOR UV / VIS (Macherey-Nagel, EUA) em extratos de clorofila *a* preparados de acordo com Shoaf e Lium (1976). Para preparação destes extratos, alíquotas de 10 mL de cada cultura foram filtradas através de filtros de acetato de celulose (25 mm de diâmetro e 0,45  $\mu\text{m}$  de poro), os quais foram posteriormente dissolvidos em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Na faixa de absorvância rastreada, dois picos de absorção da clorofila *a* (aproximadamente em 430 e 650 nm) foram obtidos. Os valores de absorvância nestes dois picos, os rendimentos fotossintéticos operacionais e as concentrações de clorofila *a* ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtidas por meio da equação 11 (Jeffrey e Humphrey, 1975) foram utilizados nos cálculos de fixação teórica de carbono.

$$[\text{Clorofila } a] = (11,93 \times \lambda_{664} - 1,93 \times \lambda_{647}) \times (V_s / V_f) \quad (11)$$

Em que:

$\lambda_{664}$  = absorbância em 664 nm

$\lambda_{647}$  = absorbância em 647 nm

$V_s$  = volume de solvente DMSO (3 mL)

$V_f$  = volume de cultura filtrado (10 mL)

Para os cálculos de fixação teórica de carbono, obtiveram-se os coeficientes de absorção de luz da clorofila *a* (*a*) de acordo com a equação 12 (Cosgrove e Borowitzka, 2010). Já o coeficiente de absorção específico para clorofila *a* (*a\**), dado em função da concentração de clorofila *a* na amostra ([Chl *a*]), pode ser obtido pela equação 13.

$$a = 2,303 \times (A/l) \quad (12)$$

$$a^* = a / [\text{Chl } a] \quad (13)$$

Em que:

*a* ( $\text{m}^{-1}$ ) = coeficiente de absorção de luz da clorofila *a*

*A* = média dos picos de absorbância obtidos na varredura em espectrofotômetro

*l* = largura da cubeta utilizada, que equivale à 0,01 m.

Em posse deste coeficiente específico é possível calcular a taxa absoluta de transporte de elétrons (aETR) de acordo com a equação 14, proposta por Kromkamp e Forster (2003) e modificada por Morris et al. (2008).

$$a\text{ETR} = 0,5 \times a^* \times \text{PAR} \times \phi'_M \quad (14)$$

A partir dos valores de aETR, calcularam-se as fixações teóricas de carbono ( $P^B$ , mol C  $[\text{mg Chl } a]^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) de acordo com a equação 15 (Kromkamp e Forster, 2003; Morris et al., 2008). Para isso utiliza-se o coeficiente de rendimento da fixação de carbono ( $\Phi_e$ , mol C  $[\text{mol elétrons}]^{-1}$ ), que indica quanto carbono foi fixado por mol de elétrons carregados na cadeia transportadora. Utilizou-se o valor de 0,2 para este

coeficiente, já que é necessário o transporte de cinco elétrons para cada carbono fixado (Morris et al., 2008).

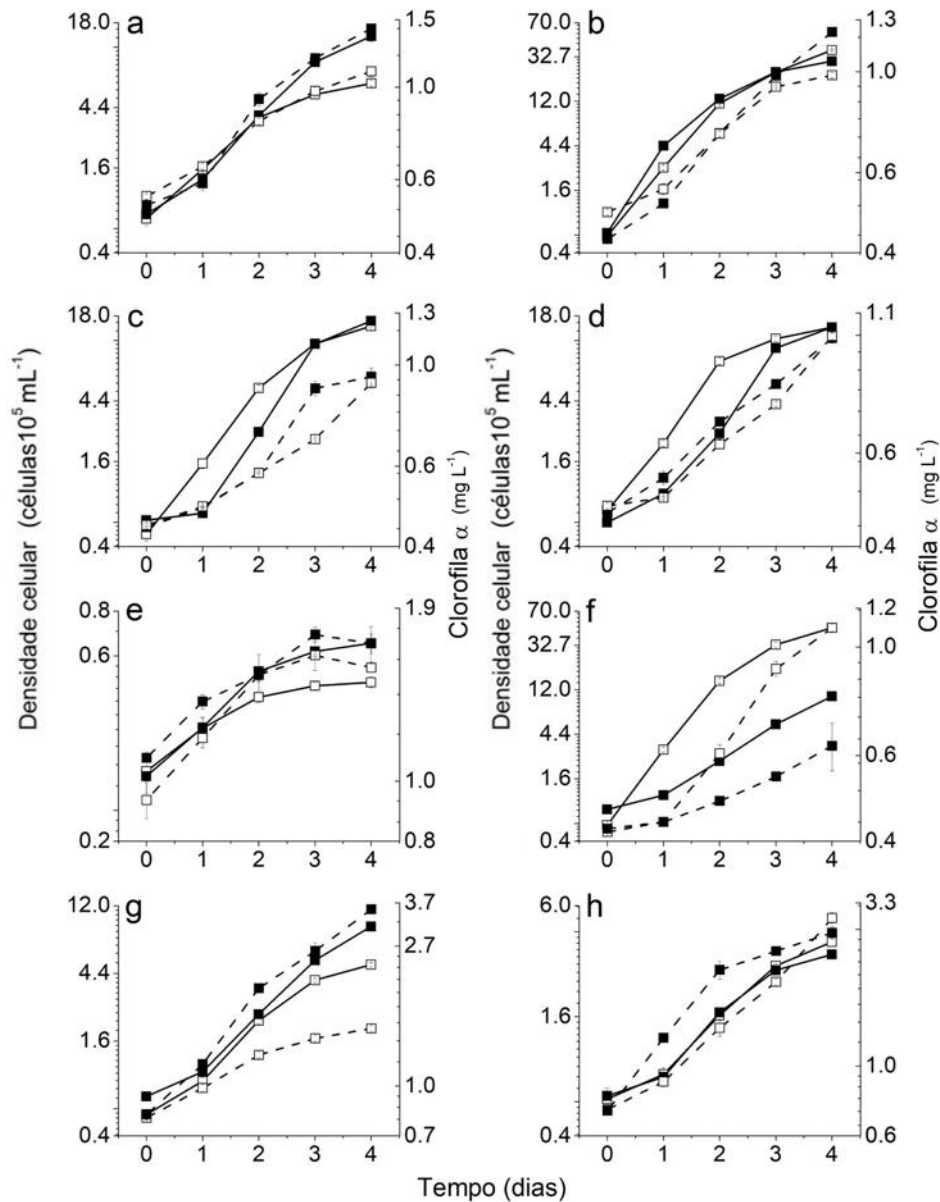
$$P^B = aETR \times \Phi_e \quad (15)$$

Multiplicando-se os valores de fixação autotrófica de carbono obtidos pela massa molar do carbono (12,0107), foi possível obter a taxa teórica de incorporação do carbono em g C [mg Chl *a*]<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Os resultados foram plotados em gráficos utilizando-se o programa Origin 8.5. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa R 3.3.1, com os testes paramétricos ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ) para comparação de todos tratamentos entre si. Ainda foram realizados testes-t de Student no programa Excel 2016, para comparação dos parâmetros dos controles com os respectivos tratamentos em vinhaça para cada microalga ( $p < 0,05$ ).

### 3.0 RESULTADOS

As densidades microalgais e concentrações de clorofila *a* diárias para os tratamentos em vinhaça e nos controles estão representadas na Figura 2. Em geral, as concentrações de clorofila *a* seguem os mesmos padrões das densidades celulares, tanto em BG11 quanto em vinhaça, indicando que o resíduo não afetou a síntese deste pigmento, essencial para a fotossíntese. Em *Chlamydomonas sp.*, *H. pluvialis* e *S. quadricauda*, os tratamentos em vinhaça cresceram mais do que os respectivos controles. Para as outras microalgas, o crescimento em vinhaça foi similar aos controles, exceto para *Monoraphidium sp.*, que apresentou crescimento reduzido no resíduo.



**Figura 2. Curvas de crescimento.** Ln dos valores médios ( $n = 3$ ) das densidades celulares (célula  $10^5 \text{ mL}^{-1}$ , linhas sólidas) e das concentrações de clorofila  $a$  *in vivo* ( $\text{mg L}^{-1}$ , linhas tracejadas) nos ( $\square$ ) controles em BG11 e nos ( $\blacksquare$ ) tratamentos em vinhaça centrifugada para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*.

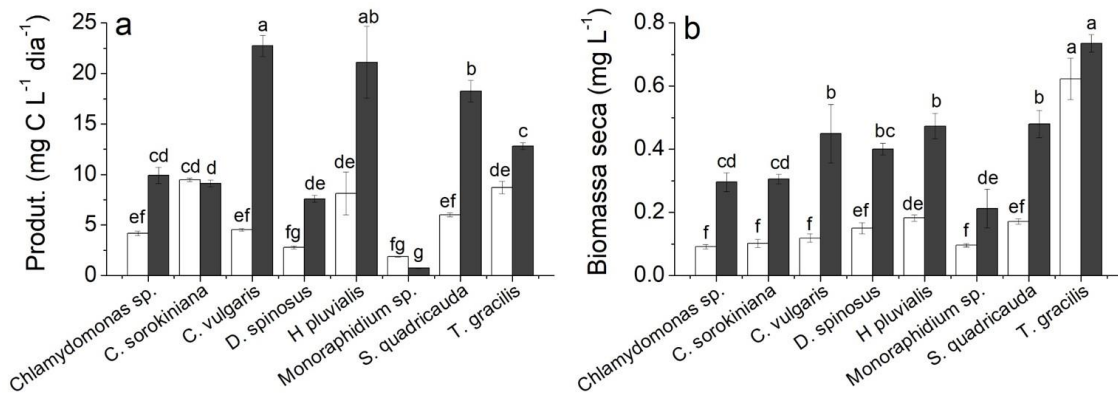
As taxas de crescimento, densidades e biovolumes celulares em 96 h para cada microalga são demonstrados na Tabela 1. Estes parâmetros foram geralmente iguais ou maiores em vinhaça do que nos respectivos controles, exceto para *Monoraphidium sp.*

**Tabela 1. Parâmetros de crescimento algal.** Valores médios (n = 3) das taxas de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ ), densidades celulares em 96 h ( $\text{células } 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ) e biovolumes celulares em 96 h ( $\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1}$ ) nos controles em BG11 e nas culturas em vinhaça. Os desvios padrão estão representados entre parênteses. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro representado.

Espécies	Taxas de crescimento		Densidade celular $10^5$		Biovolumes celulares	
	Controle	Vinhaça	Controle	Vinhaça	Controle	Vinhaça
<i>Chlamydomonas sp.</i>	0,84* <sup>e</sup> (0,06)	0,97* <sup>d</sup> (0,03)	6,62* <sup>f</sup> (0,33)	14,40* <sup>d</sup> (1,15)	231,5 <sup>e</sup> (141,2)	239,9 <sup>e</sup> (120,1)
<i>C. sorokiniana</i>	1,50 <sup>ab</sup> (0,05)	1,54 <sup>a</sup> (0,02)	37,96* <sup>b</sup> (0,71)	29,53* <sup>c</sup> (1,01)	84,1* <sup>f</sup> (26,5)	104,1* <sup>f</sup> (31,3)
<i>C. vulgaris</i>	1,21* <sup>c</sup> (0,03)	1,41* <sup>b</sup> (0,02)	12,23 <sup>d</sup> (0,44)	16,57 <sup>d</sup> (0,76)	101,7* <sup>f</sup> (45,1)	460,2* <sup>de</sup> (208,0)
<i>D. spinosus</i>	1,23 <sup>c</sup> (0,04)	1,20 <sup>c</sup> (0,02)	14,90 <sup>d</sup> (0,70)	14,93 <sup>d</sup> (0,65)	65,6* <sup>f</sup> (15,6)	172,5* <sup>ef</sup> (71,8)
<i>H. pluvialis</i>	0,24 <sup>g</sup> (0,07)	0,34 <sup>g</sup> (0,06)	0,50 <sup>h</sup> (0,02)	0,64 <sup>h</sup> (0,07)	12508,2* <sup>a</sup> (4962,5)	16227,3* <sup>a</sup> (10476,8)
<i>Monoraphidium sp.</i>	1,62* <sup>a</sup> (0,05)	0,79* <sup>e</sup> (0,04)	48,37* <sup>a</sup> (0,67)	10,33* <sup>e</sup> (0,70)	13,1* <sup>f</sup> (3,3)	24,2* <sup>f</sup> (8,1)
<i>S. quadricauda</i>	0,75 <sup>e</sup> (0,04)	0,82 <sup>e</sup> (0,01)	5,02* <sup>f</sup> (0,14)	8,84* <sup>e</sup> (0,49)	450,6* <sup>d</sup> (201,8)	725,8* <sup>b</sup> (369,7)
<i>T. gracilis</i>	0,64 <sup>f</sup> (0,04)	0,63 <sup>f</sup> (0,03)	3,93 <sup>g</sup> (0,19)	3,38 <sup>g</sup> (0,76)	832,3* <sup>b</sup> (217,9)	1373,3* <sup>b</sup> (314,7)

A Figura 3 apresenta as produtividades estimadas a partir dos biovolumes totais e as biomassas secas em 96 h de cultivo. Apesar de algumas microalgas terem taxas de crescimento semelhantes entre controles e tratamentos em vinhaça, as produtividades e biomassas secas quase sempre são maiores no resíduo. A produtividade em vinhaça foi 140% maior do que no controle para *Chlamydomonas sp.*, 400% para *C. vulgaris*, 170% para *D. spinosus*, 160% para *H. pluvialis*, 200% para *S. quadricauda* e 50% para *T.*

*gracilis*. *C. sorokiniana* teve produtividades iguais em vinhaça e nos controles e *Monoraphidium sp.* teve valores 40% menores no resíduo. Já as superioridades das biomassas secas em vinhaça podem chegar à 300%, indicando vantagens produtivas do resíduo em relação ao BG11.

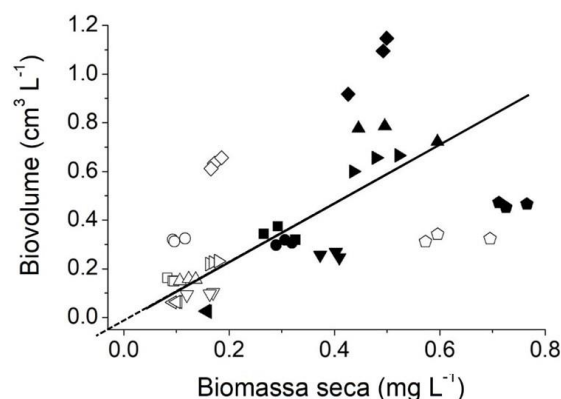


**Figura 3. Produtividades e biomassas secas.** Valores médios (n = 3) de (a) produtividade (mg C L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) e (b) biomassa seca (mg L<sup>-1</sup>) em 96 h de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nas culturas em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Letras diferentes indicam valores que não diferiram significativamente entre si (p < 0,05).

O biovolume total refere-se apenas às microalgas, enquanto a biomassa seca está relacionada à toda comunidade microbiana da vinhaça, incluindo microalgas, fungos e bactérias. Relacionando ambos parâmetros, conforme realizado na Figura 4, é possível inferir a representatividade das microalgas em relação à biomassa total produzida.

A elevada correlação entre biovolumes e biomassas indica que a contribuição algal na comunidade microbiana das culturas é expressiva. Outra maneira de inferir a representatividade algal é comparando as absorvâncias em 570 nm e em 684 nm, que representam o material particulado total e clorofilado, respectivamente (Costa et al., 2003; Rodrigues et al., 2011), como representados na Figura 5.

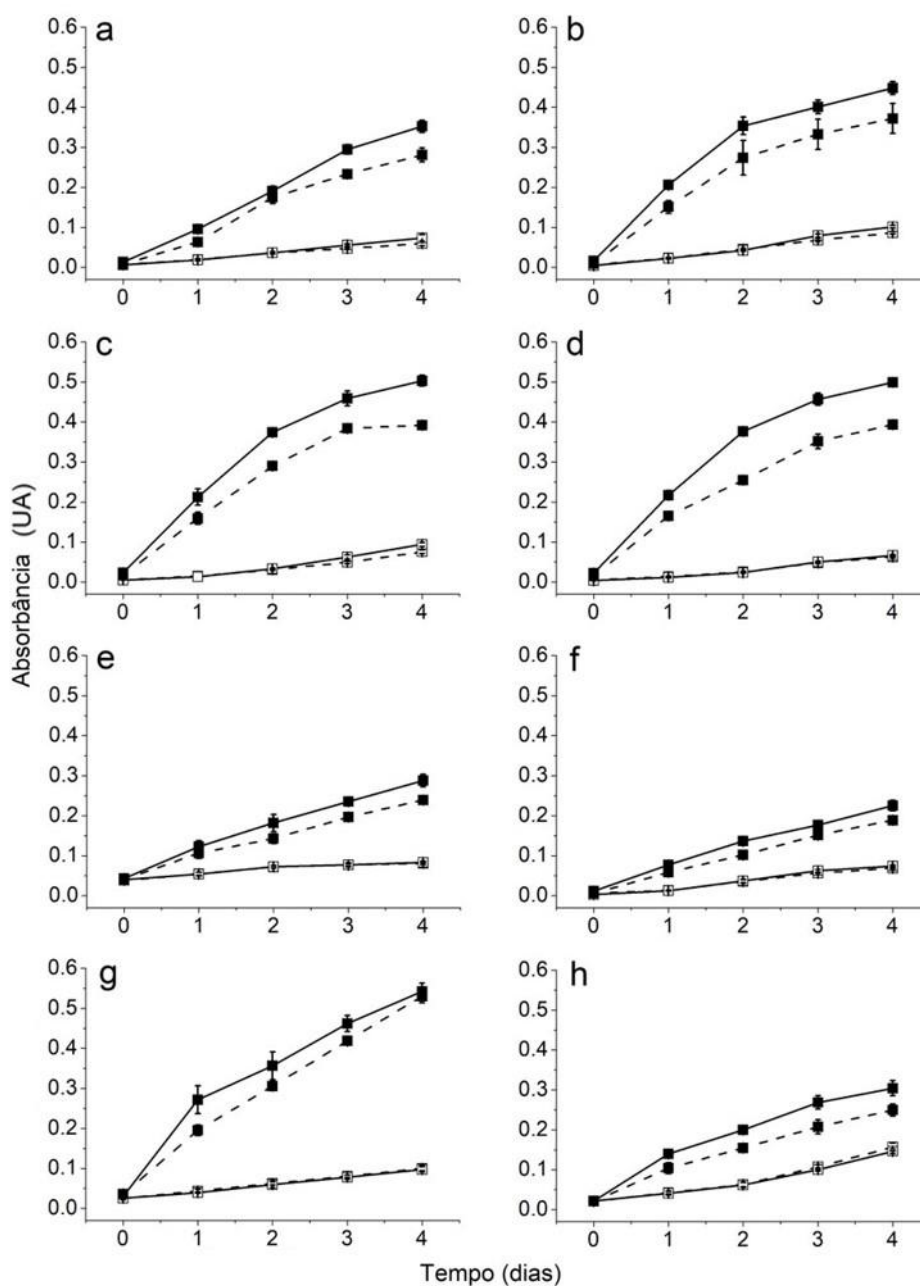




**Figura 4. Correlação entre biovolume total e biomassa seca.** Biovolume total ( $\text{cm}^3 \text{L}^{-1}$ ) em função da biomassa seca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para ( $\square / \blacksquare$ ) *Chlamydomonas sp.*, ( $\circ / \bullet$ ) *C. sorokiniana*, ( $\triangle / \blacktriangle$ ) *C. vulgaris*, ( $\nabla / \blacktriangledown$ ) *D. spinosus*, ( $\diamond / \blacklozenge$ ) *H. pluvisialis*, ( $\triangleleft / \blacktriangleleft$ ) *Monoraphidium sp.*, ( $\triangleright / \blacktriangleright$ ) *S. quadricauda* e ( $\pentagon / \blackpentagon$ ) *T. gracilis*. Os símbolos claros se referem aos controles e os escuros às culturas em vinhaça. A regressão linear entre os pontos tem equação  $y = 1,20x - 0,01$ , com  $R^2 = 0,70$ . *H. pluvisialis* e *T. gracilis* não foram consideradas na regressão devido ao ciclo de vida complexo e habitat marinho, respectivamente.

Pode-se observar que a regressão linear obtida passa próximo ao ponto (0,0) do gráfico, com um coeficiente linear de 0,01. Tendo em vista que se trata de uma correlação entre parâmetros biológicos, podemos constatar a efetividade da correlação estabelecida entre os parâmetros biovolume algal (microalgas) e biomassa seca (comunidade microbiana).

A Figura 5 mostra as absorvâncias em 570 e em 684 nm. Nos controles a absorvância nestes valores são similares, indicando que a biomassa gerada é composta basicamente por microalgas. Entretanto, nos tratamentos em vinhaça há diferenças entre as absorvâncias 570 nm *versus* 684 nm, apontando para a presença de contaminantes nas biomassas produzidas. Porém, estas diferenças são significativamente menores do que as absorvâncias em 684 nm, indicando prevalência das microalgas em detrimento dos fungos e bactérias na biomassa, assim como observado a partir da correlação entre biovolumes totais e biomassas secas finais.



**Figura 5. Absorbâncias.** Valores médios ( $n = 3$ ) de absorbâncias (U.A.) em 570 nm (linhas sólidas) e em 684 nm (linhas tracejadas) nos controles em BG11 (símbolos claros) e culturas em vinhaça (símbolos escuros) para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S. quadricauda* e (h) *T. gracilis*.

A Tabela 2 mostra os resultados das determinações bioquímicas das biomassas produzidas, com as quantias de proteínas e carboidratos totais e as relações entre estes valores (razões P/C).

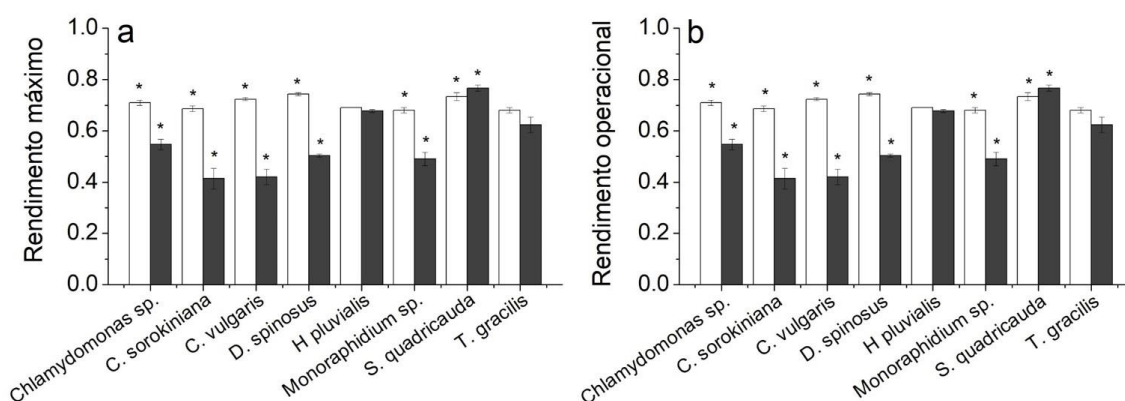
**Tabela 2. Proteínas e carboidratos totais e razões proteínas/carboidratos (P/C).** Valores médios (n = 3) de proteínas totais (mg L<sup>-1</sup>), carboidratos totais (mg L<sup>-1</sup>) e razões entre proteínas e carboidratos (razões P/C) em 96 h nos controles em BG11 e nos tratamentos em vinhaça para cada microalga. O desvio padrão são apresentados entre parênteses. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles (p < 0,05). Letras diferentes indicam valores que diferiram significativamente entre si (p < 0,05) para cada parâmetro representado.

Espécies	Proteínas totais (mg L <sup>-1</sup> )		Carboidratos totais (mg L <sup>-1</sup> )		Razões P/C	
	Controle	Vinhaça	Controle	Vinhaça	Controle	Vinhaça
<i>Chlamydomonas sp.</i>	10,23* <sup>cd</sup> (0,36)	46,85* <sup>ab</sup> (0,94)	10,94 <sup>cd</sup> (0,92)	11,90 <sup>cd</sup> (0,42)	0,94* <sup>f</sup> (0,05)	3,94* <sup>c</sup> (0,21)
<i>C. sorokiniana</i>	5,56* <sup>e</sup> (0,22)	37,42* <sup>b</sup> (1,95)	5,83* <sup>f</sup> (0,63)	7,21* <sup>ef</sup> (0,47)	0,96* <sup>f</sup> (0,10)	5,20* <sup>b</sup> (0,31)
<i>C. vulgaris</i>	5,65* <sup>e</sup> (0,97)	45,98* <sup>ab</sup> (2,09)	5,89 <sup>f</sup> (0,31)	6,67 <sup>f</sup> (0,86)	0,97* <sup>f</sup> (0,21)	6,99* <sup>a</sup> (1,16)
<i>D. spinosus</i>	4,81* <sup>e</sup> (0,67)	49,65* <sup>a</sup> (1,12)	7,37 <sup>ef</sup> (0,76)	7,99 <sup>ef</sup> (0,95)	0,66* <sup>f</sup> (0,15)	6,23* <sup>ab</sup> (0,54)
<i>H. pluvialis</i>	19,24* <sup>c</sup> (4,62)	41,62* <sup>ab</sup> (5,06)	18,64 <sup>a</sup> (1,01)	18,77 <sup>a</sup> (0,82)	1,04* <sup>f</sup> (0,29)	2,22* <sup>de</sup> (0,26)
<i>Monoraphidium sp.</i>	4,14* <sup>e</sup> (0,45)	22,31* <sup>c</sup> (2,39)	5,30* <sup>f</sup> (0,64)	6,47* <sup>f</sup> (0,52)	0,78* <sup>f</sup> (0,06)	3,45* <sup>c</sup> (0,38)
<i>S. quadricauda</i>	4,94* <sup>e</sup> (0,63)	48,13* <sup>ab</sup> (3,57)	12,99* <sup>bc</sup> (0,79)	14,57* <sup>b</sup> (0,28)	0,38* <sup>f</sup> (0,03)	3,30* <sup>cd</sup> (0,26)
<i>T. gracilis</i>	8,07* <sup>d</sup> (1,25)	18,66* <sup>c</sup> (0,40)	9,38 <sup>de</sup> (1,31)	10,11 <sup>de</sup> (0,52)	0,86* <sup>f</sup> (0,09)	1,85* <sup>ef</sup> (0,08)

As quantias de carboidratos totais são praticamente as mesmas comparando-se controles e culturas em vinhaça para cada microalga, variando entre 5 a 20 mg L<sup>-1</sup>. Há um aumento acentuado nas proteínas totais em vinhaça, atingindo concentrações de 20 a 50 mg L<sup>-1</sup> no resíduo. Este aumento proteico na biomassa gerada em vinhaça foi desde

300% para *T. gracilis* até 1000% para *C. vulgaris*. Por consequência, as razões P/C tiveram aumentos significativos na vinhaça em relação ao BG11.

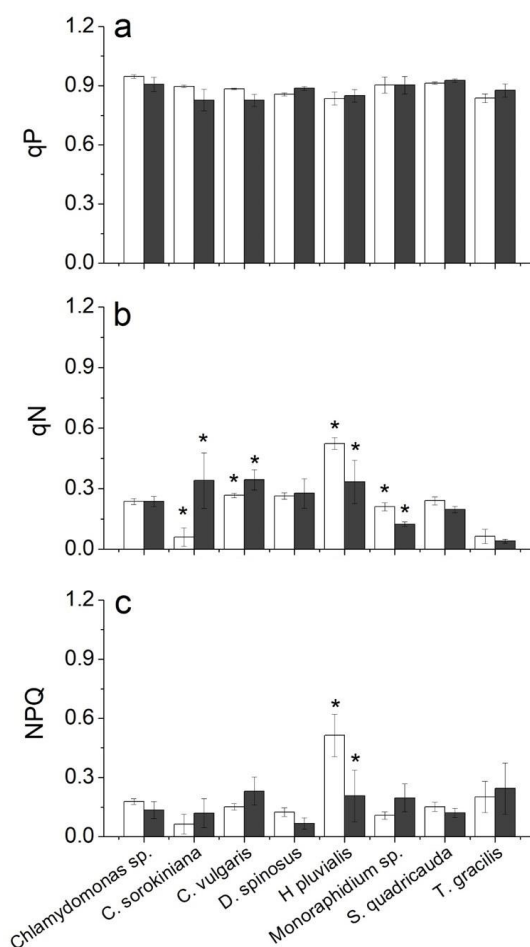
Em relação à fisiologia microalgal, os rendimentos fotossintéticos máximos ( $\phi_M$ ) e operacionais ( $\phi'_M$ ) em 48 h de cultivo estão representados na Figura 6.



**Figura 6. Rendimentos fotossintéticos máximos e operacionais.** Valores médios (n = 3) dos (a) rendimentos fotossintéticos máximos ( $\phi_M$ ) e (b) operacionais ( $\phi'_M$ ) em 48 horas de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nos tratamentos em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ).

Para *S. quadricauda*, os rendimentos fotossintéticos foram maiores em vinhaça do que em BG11, enquanto que para *H. pluvialis* e *T. gracilis* estes valores em vinhaça foram semelhantes aos respectivos controles. Para as outras cinco cepas, os valores de  $\phi_M$  e  $\phi'_M$  foram menores em vinhaça do que em BG11, indicando que diferentes vias metabólicas podem estar operando nas células para manter o crescimento no resíduo. As microalgas foram diferentemente afetadas pela vinhaça, já que as intensidades da luz fornecidas às culturas foram as mesmas para os tratamentos em BG11 ou em vinhaça.

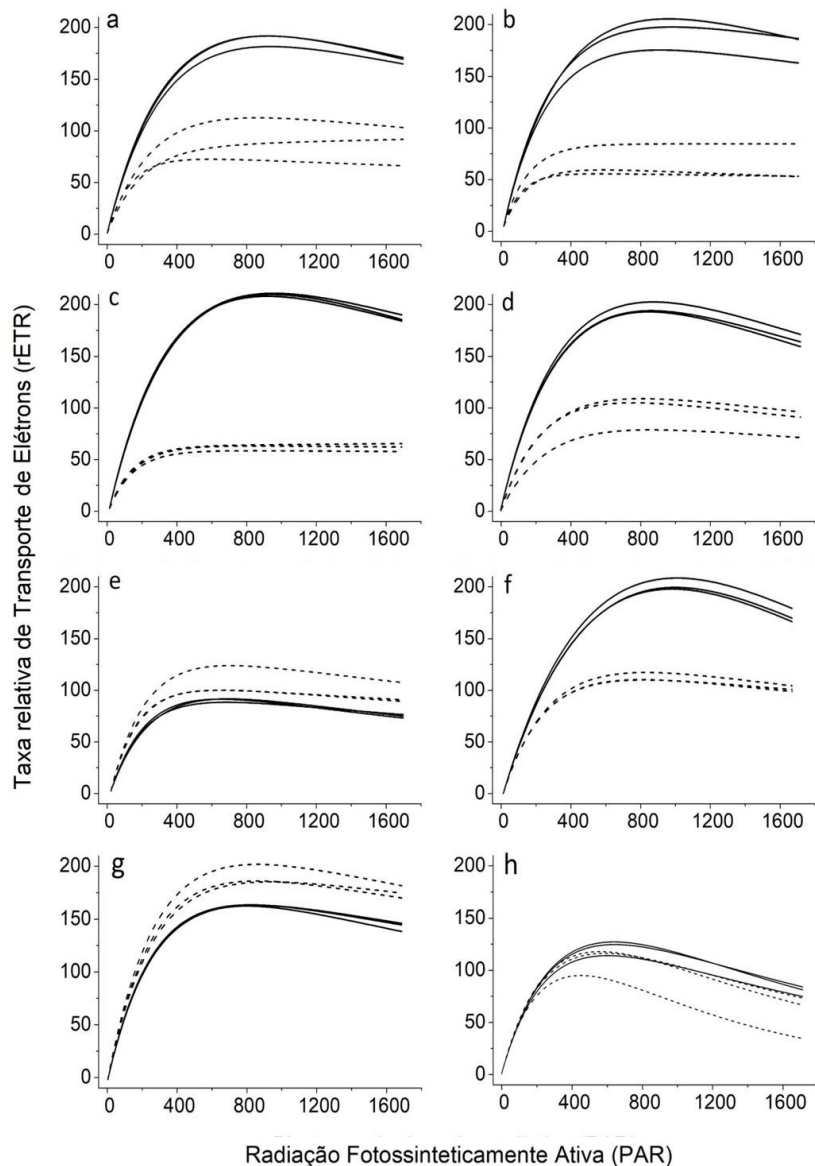
A partir das fluorescências detectadas pelo Phyto PAM, foram calculados os decaimentos fotoquímicos e não fotoquímicos, os quais estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7. Decaimentos fotoquímicos e não fotoquímicos.** Valores médios ( $n = 3$ ) dos decaimentos (a) fotoquímico qP, (b) não fotoquímico qN e (c) não fotoquímico NPQ em 48 horas de cultivo nos controles em BG11 (barras claras) e nos tratamentos em vinhaça (barras escuras) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ).

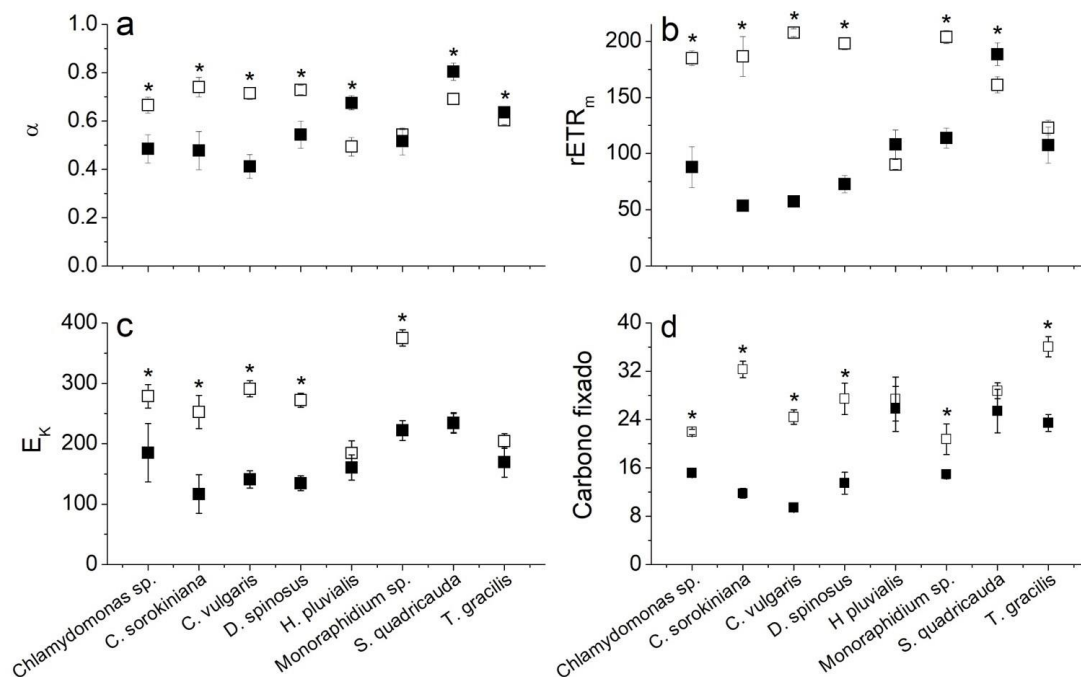
Os valores de qP para todas as microalgas foram entorno de 0,9, não havendo diferenças entre os controles e os tratamentos em vinhaça. Os valores de qN variaram entre 0,1 e 0,3, sem diferenças significativas entre controles e tratamentos em vinhaça para *Chlamydomonas sp.*, *D. spinosus*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*. Os valores de NPQ variaram entre 0,1 a 0,2, sem diferenças significativas entre culturas em BG11 e em vinhaça para sete cepas testadas. Para a microalga *H. pluvialis* em BG11 houveram grandes aumentos nos decaimentos não fotoquímicos qN e NPQ, que chegaram à 0,5.

Ainda se referindo à fisiologia fotossintética algal, a Figura 8 apresenta as curvas rápidas de saturação luminosa para as microalgas.



**Figura 8. Curvas de saturação luminosa.** Taxas relativas de transporte de elétrons (rETR,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em função da intensidade de radiação fotossinteticamente ativa (PAR,  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) nos controles (linhas sólidas) e tratamentos em vinhaça (linhas tracejadas) para (a) *Chlamydomonas sp.*, (b) *C. sorokiniana*, (c) *C. vulgaris*, (d) *D. spinosus*, (e) *H. pluvialis*, (f) *Monoraphidium sp.*, (g) *S quadricauda* e (h) *T. gracilis*.

A partir das curvas de luz construídas e da modelagem matemática proposta por Platt et al. (1980), foram obtidos os parâmetros fotossintéticos  $\alpha$ ,  $rETR_m$  e  $E_K$ , os quais estão representados na Figura 9, juntamente com os valores teóricos de carbono fixado autotroficamente.



**Figura 9. Parâmetros fotossintéticos.** Valores médios ( $n = 3$ ) das (a) inclinações iniciais das curvas de luz ( $\alpha$ ,  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$ ), (b) taxas relativas de transporte de elétrons máximas ( $rETR_m$ ;  $\mu\text{mol elétrons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (c) irradiâncias de saturação ( $E_K$ ;  $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e (d) quantias teóricas de carbono fixado autotróficamente ( $\text{mg C} [\text{mg Chl a}]^{-1} \text{h}^{-1}$ ) nos controles em BG11 (símbolos claros) e em vinhaça (símbolos escuros) para cada microalga. Os asteriscos indicam valores para os quais os tratamentos em vinhaça diferiram dos respectivos controles ( $p < 0,05$ ) para cada parâmetro.

De maneira geral, as microalgas *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* conseguiram manter os parâmetros relacionados às curvas de luz em vinhaça similares aos controles, culminando em fixações teóricas de carbono também semelhantes. Nas demais espécies, a vinhaça causou reduções dos parâmetros fotossintéticos e fixações de carbono que não acarretaram em reduções no crescimento populacional, na produtividade ou na produção de biomassa, como demonstrado anteriormente.

#### 4.0 DISCUSSÃO

As microalgas testadas, com exceção de *Monoraphidium sp.*, se desenvolveram em vinhaça centrifugada tanto quanto ou melhor do que em BG11, indicando que a

toxicidade, osmolaridade, turbidez e contaminação impostas pelo resíduo (Silva et al., 2007; Kadioglu e Algur, 1992; Candido e Lombardi, 2018) foram superadas nas diluições utilizadas. Avaliando diversos meios para o cultivo de *Botryococcus braunii*, Dayananda et al. (2007) observaram as maiores produtividades de biomassa e hidrocarbonetos em BG11. Como este meio é rico em nutrientes minerais (Rippka et al., 1979) e amplamente utilizado em culturas em larga escala (Rodolfi et al., 2008; Johnson et al., 2017), nossos resultados em vinhaça são bastante interessantes. Além disso, o uso da vinhaça diluída em detrimento do meio comercial leva à economia com nutrientes sintéticos, bem como ao uso de um resíduo que precisa ser descartado.

A clorofila *a* é uma molécula bioativa que desperta interesse comercial, assim como carotenoides e outros pigmentos acessórios, devido as suas ações antioxidantes (Borowitzka, 2013). Budyono et al. (2013) demonstraram que concentrações de vinhaça maiores do que 0,8% no meio de cultura reduziram a produção de clorofila *a* em *S. platensis*, diminuindo sua capacidade fotossintética e, conseqüentemente, seu crescimento. Em nossos experimentos, entretanto, a vinhaça centrifugada nas concentrações ótimas não comprometeu a produção de clorofila *a*, indicando que as microalgas permaneceram fisiologicamente ativas e saudáveis e puderam manter suas capacidades fotossintéticas e de fixação de carbono inorgânico (Borges et al., 2007).

O biovolume celular é uma medida de produtividade amplamente utilizada para avaliar comunidades fitoplanctônicas naturais, como realizado por Mandal et al. (2018), que investigaram a influência das formas de nitrogênio na diversidade e produtividade destes microrganismos, e Sutherland et al. (2018), ao analisarem a influência sazonal na dinâmica das lagoas de tratamento de esgoto. Embora não existam trabalhos biotecnológicos com microalgas que utilizem o biovolume, este parâmetro indicou vantagens na produtividade de algas em vinhaça em comparação aos controles, apesar das taxas de crescimento semelhantes. Coca et al. (2014) e Santos et al. (2016) mostraram aumento de proteínas na biomassa da *Spirulina sp.* cultivada em vinhaça, assim como observamos para as microalgas avaliadas. Segundo Marques et al. (2013), a vinhaça ainda estimula o aumento de lipídios na biomassa algal, uma vez que impõe toxicidade (Silva et al. 2007), a qual acarretaria em acúmulo de biomoléculas energéticas. Dentre os lipídios acumulados pelas microalgas estão alguns compostos de alto valor agregado como os ácidos graxos poli-insaturados, utilizados pela indústria farmacêutica para nutrição humana (Chu, 2012), trazendo ainda mais vantagens ao cultivo algal. Portanto, o acúmulo de proteínas e, possivelmente, de lipídios em



microalgas cultivadas em vinhaça seria responsável pelos aumentos observados nos biovolumes celulares e totais e nas produtividades em vinhaça.

Em concordância com os biovolumes, as biomassas secas finais são maiores em vinhaça do que nos controles. Além das produtividades algais superiores, contaminantes como bactérias e fungos também contribuíram para este aumento nas culturas em resíduo (Candido e Lombardi, 2018). Entretanto, a grande maioria dos estudos retratam a produtividade de microalgas em vinhaça, com diferentes diluições e tratamentos, por meio da biomassa (Barrocal et al., 2010; Marques et al., 2013; Coca et al., 2014; Santana et al., 2017), desconsiderando a contribuição de contaminantes típicos de resíduos orgânicos. Não há trabalhos que mensurem, apontem ou discutam a presença desta contaminação nas condições avaliadas, superestimando a produção microalgal.

Embora a biomassa seca não represente a biomassa microalgal real em vinhaça, nosso trabalho mostrou grande correlação entre estes parâmetros. Observaram-se altas correlações entre os biovolumes totais, relacionados apenas às microalgas, e biomassas secas, correspondentes à comunidade microbiana como um todo, incluindo microalgas e contaminantes. Além disso, observaram-se semelhanças entre as absorvâncias em 684 nm, relacionadas às partículas clorofiladas (Rodrigues et al., 2011), e as absorvâncias em 570 nm, que correspondem ao material particulado total (Costa et al., 2003). Em 96 h, a absorvância a 684 nm representa ao menos 78% dos valores em 570 nm, com porcentagem mínima para *C. vulgaris* e *D. spinosus*. Como estas cepas foram cultivadas nas maiores concentrações ótimas de vinhaça centrifugada, pode-se dizer que quanto mais resíduo houver no meio, maior a contaminação (Candido e Lombardi, 2018). Baixas concentrações de vinhaça centrifugada proporcionaram menor disponibilidade de nutrientes orgânicos (Silva et al., 2007), possibilitando o predomínio microalgal na biomassa em detrimento de contaminantes heterotróficos. Portanto, estudos que retratem culturas de microalgas em vinhaça tratada em alta concentração e que representem a produtividade somente por biomassa podem ter conclusões distorcidas.

A microalga marinha *T. gracilis* foi a que teve menor aumento proporcional de absorvância em 570 nm na vinhaça em relação ao controle, o que pode ter ocorrido devido à baixa contaminação fúngica em ambientes salinos (Carney e Lane, 2014). Logo, a produção desta microalga em vinhaça tem como vantagens a geração de biomassa algal menos contaminada, além da grande disponibilidade de água marinha para a diluição do resíduo caso as usinas sucroalcooleiras geradoras da vinhaça estejam próximas ao ambiente marinho.

Em geral, as linhagens que resultaram na maior produção de proteínas e carboidratos totais em vinhaça foram *Chlamydomonas sp.*, *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*, que também apresentaram as menores taxas de crescimento dentre as microalgas testadas. Este contraste pode ser explicado pelos maiores biovolumes celulares e totais que estas espécies apresentaram, indicando novamente que apenas a taxa de crescimento não é um bom parâmetro quando se deseja selecionar espécies com maior produtividade em resíduos como a vinhaça.

A razão entre proteínas e carboidratos (razões P/C) é aproximadamente 1,0 para todos os controles. Razões iguais ou maiores do que 1,0 indicam que as microalgas estão fisiologicamente saudáveis, uma vez que carboidratos são biomoléculas acumuladas sob condições de estresse (Rocha et al., 2015). Para a vinhaça, estes valores foram superiores à 2,0, indicando predominância de proteínas na biomassa. Coca et al. (2014) também observaram prevalência de proteínas na biomassa de *S. platensis* produzida em vinhaça, assim como Santos et al. (2016) para *S. máxima*, que relacionaram este aumento ao metabolismo específico desta espécie. Entretanto, a especificidade apontada pelos autores não proceda, já que observamos quantidade proteica acentuada para todas as espécies aqui testadas em vinhaça. A prevalência de proteínas pode ser explicada pela ocorrência de fungos nesta biomassa, os quais têm composição rica nesta biomolécula (Cochrane, 1958). Além disso, as proteínas estão presentes nas células como componentes estruturais, enzimas, pigmentos e ligantes, de forma que seus aumentos em vinhaça podem estar relacionados aos aumentos de enzimas que contribuem para a superação da toxicidade e da competição (Santos et al., 2016). Em termos produtivos, a riqueza de proteínas e quantidades moderadas de carboidratos na biomassa algal gerada em vinhaça são interessantes para uso em suplementação animal, produção de ração e piscicultura (Borowitzka, 2013).

Os rendimentos fotossintéticos máximos nos controles foram iguais ou superiores a 0,7, indicando fisiologias fotossintéticas microalgais saudáveis (Juneau e Harrison, 2005; Kromkamp e Foster, 2003; Lombardi e Maldonado, 2011). Os rendimentos fotossintéticos operacionais também se mostraram próximas entre os controles, com valores em torno de 0,6, igual ao encontrado por Camargo e Lombardi (2018) para *C. sorokiniana* em meio BG11 com células fisiologicamente saudáveis. *H. pluvialis* foi a única microalga que apresentou menores rendimentos operacionais ( $\phi'_M = 0,50$ ;  $p < 0,05$ ) em relação aos demais controles, o que pode estar associado ao seu ciclo de vida. Segundo Kobayashi et al. (1997), que propôs um ciclo de vida com várias

etapas para esta espécie, o inóculo de *H. pluvialis* utilizado no presente trabalho continha cistos maduros, de maneira que, em 48 h, as células se encontravam em fase vegetativa. Nesta fase, há intensa degradação de carotenoides (Kobayashi et al., 1997), o que pode ter modificado os metabolismos energéticos destes organismos e reduzido os rendimentos fotossintéticos.

Embora a técnica PAM tenha sido usada desde a década de 1980 (Genty et al., 1989), poucos estudos a aplicaram em microalgas cultivadas em meios com compostos orgânicos. Em vinhaça, a maioria das microalgas tiveram redução dos rendimentos fotossintéticos máximos e operacionais em relação aos controles, sem prejuízos aos seus crescimentos, indicando metabolismo mixotrófico (Candido e Lombardi, 2018; Marchello et al., 2018). Neste metabolismo, o organismo produz matéria orgânica a partir de fontes ambientais de energia e usa a matéria orgânica presente no meio (Nelson e Cox, 2014). *Chlorella* e *Desmodesmus* foram os gêneros que apresentaram crescimentos ótimos em maiores concentrações de vinhaça, mas os menores rendimentos fotossintéticos, indicando maiores investimentos na incorporação de componentes orgânicos. *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* utilizaram a energia luminosa em vinhaça de maneira tão eficiente quanto seus controles, apesar da presença de compostos orgânicos no meio de cultivo. Entretanto, o aumento da produtividade para estas espécies indica que houve uso de compostos orgânicos do meio, ainda que altos rendimentos fotossintéticos fossem mantidos.

As semelhanças entre os valores de qP nos tratamentos em vinhaça e nos respectivos controles sugerem que a capacidade do sistema antena em direcionar a energia luminosa para o estágio fotoquímico da fotossíntese foi preservada (Juneau e Harrison, 2005; Lombardi e Maldonado, 2011). O qP está relacionado ao estado redox da plastoquinona A ( $Q_A$ ), o primeiro aceptor de elétrons da cadeia de transporte acíclica entre o PSII e o PSI (Krause e Jahns, 2003). Assim, o uso de vinhaça centrifugada em concentrações ótimas como meio de cultura não afetou a capacidade de transporte de elétrons, embora a  $rETR_m$  tenha sido menor na vinhaça, conforme será discutido posteriormente. Ou seja, embora as capacidades fotossintéticas fossem mantidas em vinhaça, a maioria das espécies não efetuou suas potencialidades plenas.

Para a maioria das espécies, verificamos que os decaimentos não fotoquímicos qN e NPQ não diferem significativamente entre controles e culturas em vinhaça ou mesmo entre as espécies, indicando que as células não estavam sob estresse. Os decaimentos não fotoquímicos indicam a energia de desexcitação de elétrons que é

dissipada de forma geral (qN) ou como calor (NPQ) (Krause e Jahns, 2003). Esta dissipação é uma maneira de proteger os dispositivos fotossintéticos sob condições de toxicidade ou danos promovidos por compostos tóxicos (Dewez et al., 2005). Com isso, a manutenção destes valores similares aos controles demonstra que, nas concentrações de vinhaça testadas, não houve dano ao aparato fotossintético da microalga.

Novamente, é notável o comportamento de *H. pluvialis*, que apresentou altos valores de qN e NPQ no controle (~ 0,5) devido ao seu complexo ciclo de vida (Kobayashi et al., 1997). A intensa degradação dos carotenóides na fase do ciclo de vida avaliada em 48 h (Kobayashi et al., 1997) pode ter interferido no ciclo das xantofilas, o que está diretamente relacionado aos valores do NPQ (Gilmore, 1997). Estes altos qN e NPQ são consistentes com os menores valores de  $E_K$  obtidos para esta microalga, indicando que a saturação luminosa ocorreu em intensidades de luz mais baixas.

Os parâmetros fotossintéticos obtidos a partir das RLC mais baixos em vinhaça e a manutenção do crescimento das microalgas são novos indicativos do metabolismo mixotrófico (Marchello et al., 2018; Candido e Lombardi, 2018), no qual a via fotossintética não é a única adotada (Nelson e Cox, 2014). Vários fatores podem resultar na diminuição dos parâmetros de RLC ( $\alpha$ ,  $rETR_m$  e  $E_K$ ), como estresse nutricional (White et al., 2011), toxicidade química (Camargo e Lombardi, 2018) e alta intensidade luminosa (Serôdio et al. 2006). Entretanto, na presente pesquisa, estes fatores não foram os principais contribuintes para os menores  $\alpha$ ,  $rETR_m$  e  $E_K$ , uma vez que houve aumento na produção de biomassa e manutenção dos valores do qP, qN e NPQ. A diminuição nos parâmetros da curva de luz sem aumento dos decaimentos não fotoquímicos pode indicar que as microalgas direcionaram o excesso de energia para outras formas de dissipação, como a geração de ATP, que pode ser utilizado na incorporação de carbono orgânico. Estes resultados significam que não houve estresse oxidativo nas células e que os compostos da vinhaça não danificaram o maquinário fotossintético.

As luminosidades utilizadas nos experimentos, de 130  $\mu\text{mol}$  de fótons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para todas as microalgas e 90 para *H. pluvialis*, foram iguais ou inferiores aos valores de  $E_K$  obtidos. Considerando que este parâmetro indica a intensidade de luz na qual ocorre a saturação dos processos fotoquímicos, pode-se dizer que nenhuma fotoinibição que comprometa o processo fotossintético, reduzindo os valores de  $rETR_m$ , ocorreu (Dewez et al., 2005). Os menores valores de  $E_K$  em vinhaça em relação aos controles indicam ainda menores necessidades de luz para que as microalgas atinjam o  $rETR_m$ . Em termos

práticos, esta redução resultaria em menor custo energético com iluminação das culturas.

Em geral as células em vinhaça apresentaram menores estimativas de fixação de carbono inorgânico do que os controles, com exceção de *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*. Para as espécies que fixaram menos carbono, o processo no resíduo foi de ~ 70% (*Chlamydomonas sp.* e *Monoraphidium sp.*) a ~ 30% (*C. sorokiniana*) em relação aos respectivos controles. Da mesma forma, Skovgaard et al. (2000) observaram redução de 69% na captação de  $^{14}\text{C}$  via fotossíntese no dinoflagelado *Fragilidium subglobosum* em condições mixotróficas, se comparadas às fotoautotróficas. Segundo Skovgaard et al. (2000), o aparato fotossintético do dinoflagelado foi menos acionado sob condições mixotróficas, já que parte de sua exigência de carbono foi suprida pela fagotrofia. Portanto, a correspondência dos valores de carbono fixo com os demais parâmetros fotossintéticos (rendimentos máximo e operacional,  $r\text{ETR}_m$ ,  $E_K$  e  $\alpha$ ) é evidência de mixotrofia, ainda que com diferentes proporções no uso de fontes de carbono inorgânico ou orgânico. A mixotrofia permite vantagem competitiva para as microalgas, especialmente em condições de baixa irradiância e alta disponibilidade de compostos orgânicos (Schoonhoven, 2000), como na vinhaça. Segundo Neilson e Lewin (1974), estes organismos podem explorar diferentes compostos orgânicos como acetato, glicolato, glicerol e outros açúcares, ácidos graxos, álcoois e aminoácidos. Considerando que a vinhaça é um meio rico em compostos orgânicos (Silva et al., 2007), quantitativa e qualitativamente, pode se dizer que este resíduo é altamente estimulante o metabolismo mixotrófico.

Segundo Perez-Garcia (2011), o crescimento mixotrófico de microalgas resulta em maior produção de biomassa do que cultivos autotróficos, além de menor contaminação em relação à produção heterotrófica. No entanto, este tipo de produção é geralmente limitado a um ciclo de cultivo (sistema *batch*) para evitar a propagação de contaminantes, como ocorreria em um processo semicontínuo (Perez-Garcia, 2011). Considerando que o crescimento de microalgas diminui o potencial eutrófico da vinhaça (Silva et al., 2007; Candido e Lombardi, 2018), sua utilização em cultivos *batch* seria praticável, já que este meio poderia ser posteriormente utilizado na fertirrigação das lavouras de cana, reduzindo a risco de salinização do solo (Silva et al., 2007).

Usando glicerol e peptona, Sforza et al. (2012) observaram maiores crescimentos de *Chlorella protothecoides* e *Nanochloropsis salina* sob condições mixotróficas em relação às condições autotróficas ou heterotróficas, indicando benefício

deste metabolismo energético. Wang et al. (2012) observaram maior produtividade em *Chlorella pyrenoidosa* cultivada mixotroficamente em resíduos diluídos da produção de suínos, em comparação com culturas fotoautotróficas. Da mesma forma, em nossas culturas mixotróficas em vinhaça houve aumento nos biovolumes, nas produtividades e no acúmulo de proteínas. Li et al. (1999) também observaram melhores crescimentos e maiores biovolumes celulares em *Gyrodinium galatheanurn* sob condições mixotróficas do que nas fotoautotróficas, sem crescimento em heterotrofia. Finalmente, Jones (2000) discutiu sobre a vantagem competitiva da mixotrofia em protistas, que podem utilizar luz ou compostos orgânicos e competir melhor com organismos que tenham metabolismos energéticos mais restritos.

*C. sorokiniana* e *C. vulgaris*, seguidas por *D. spinosus*, foram as espécies que apresentaram maior capacidade de absorção de carbono orgânico da vinhaça, o que permitiu menores investimentos em fotossíntese e, conseqüentemente, na fixação de carbono inorgânico. Estas espécies são as que têm menores dimensões celulares e, portanto, maiores relações superfície/volume e maior área disponível para a absorção de compostos orgânicos da vinhaça por osmotrofia (Schoonhoven, 2000). *Monoraphidium sp.* também tem dimensões celulares menores, mas houve redução de seu crescimento em vinhaça devido à elevada toxicidade do resíduo para a cepa. Sustentando este raciocínio, *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*, que são as espécies com maiores dimensões celulares, possuíam menores capacidades de absorção de carbono orgânico a partir da vinhaça e, portanto, foram menos eficazes na via heterotrófica, mantendo suas taxas fotossintéticas mais elevadas. Pela primeira vez, a técnica PAM associada a avaliações de crescimento algal permitiu inferir sobre os diferentes metabolismos energéticos adotados por microalgas em um resíduo complexo como a vinhaça, influenciando na seleção de cepas para uso biotecnológico do resíduo.

## 5.0 CONCLUSÕES

Embora as taxas de crescimento das microalgas em vinhaça fossem semelhantes às das culturas em BG11, as produtividades foram maiores no resíduo, que estimulou aumentos no biovolume total, biomassas secas e proteínas totais, além da manutenção na produção de carboidratos. Os usos isolados das taxas de crescimento ou das

biomassas secas não se mostraram suficientes para seleção das espécies mais produtivas em vinhaça. *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis*, apesar de apresentarem as menores taxas de crescimento, tiveram os maiores parâmetros relacionados à produtividade em vinhaça, indicando necessidade de uso de parâmetros de crescimento variados. *Chlamydomonas sp.*, que também teve alta produtividade, cresceu em vinhaça diluída com menor ajuste de pH. Já *T. gracilis* destacou-se por crescer em vinhaça diluída com água do mar, um recurso abundante, barato e que dificulta contaminação das culturas. Apesar das baixas concentrações de vinhaça utilizadas, este resíduo garante economia na produção de meios de cultura e, resulta em menores contaminações, como demonstrado pelas comparações entre as absorbâncias em 570 nm e em 684 nm e entre os biovolumes totais e biomassas secas.

Todas as microalgas apresentaram metabolismo mixotrófico em vinhaça, pois mantiveram ou aumentaram os crescimentos e produtividades, reduzindo ou mantendo o processo fotossintético, como indicado pelos rendimentos fotossintéticos máximos e operacionais, curvas de saturação luminosa e fixações autotróficas de carbono. A vinhaça não causou danos estruturais aos aparatos fotossintéticos, como indicado pela manutenção na produção de clorofila *a* e nos decaimentos fotoquímicos (qP) e não fotoquímicos (qN e NPQ). A redução dos valores de  $E_K$  em vinhaça indica menor intensidade de saturação luminosa com a mixotrofia, o que é economicamente interessante, pois reduziria os gastos energéticos com a iluminação das culturas. As microalgas dos gêneros *Chlorella* e *D. spinosus* foram as que tiveram maior consumo orgânico e, portanto, são mais promissoras para a remediação e tratamento de resíduos orgânicos. Por outro lado, *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* mantiveram alto metabolismo fotossintético em vinhaça, sendo mais indicadas para fixação de CO<sub>2</sub>. Portanto, independente da estratégia metabólica adotada por cada microalga, a vinhaça é um resíduo promissor, ainda que em baixas concentrações. Para isso, é necessário selecionar espécies com melhores parâmetros produtivos e com metabolismo energético no resíduo condizente com os objetivos biotecnológicos desejados.





## **CAPÍTULO 4: A TEMÁTICA DOS RESÍDUOS NA EDUCAÇÃO AMBIENTAL**

### **Resumo**

As pesquisas referentes aos problemas ambientais nem sempre são tão valorizadas pela população quanto as pesquisas tecnológicas. Muitas vezes, esta realidade deve-se ao desconhecimento da população quanto à real dimensão de impactos ambientais como a geração de resíduos. As crianças e adolescentes em idade escolar refletem ainda mais esta defasagem, além de serem os futuros cidadãos. Neste capítulo, avaliamos as concepções de alunos do oitavo ano do ensino fundamental quanto ao tema **resíduos**, propomos um curso com metodologias diversificadas para abordá-lo e analisamos a viabilidade de aplicar estas propostas em diferentes contextos escolares. Inicialmente foi realizado um questionário com 141 participações anônimas e voluntárias. Constatou-se que temas como resíduos sólidos, esgoto e reciclagem são mais conhecidos pelos alunos, pois são mais próximos do cotidiano e abordados nas escolas. Já a produção de efluentes pelos setores industrial, agropecuário e energético, a fiscalização da destinação dos resíduos e o papel social em medidas mitigadoras foram assuntos menos conhecidos pelos alunos, o que, possivelmente, reduz a atuação popular em problemas relacionados. A partir desta análise, desenvolveu-se o curso “Pensando o Ambiente”, que englobou aspectos variados dos resíduos por meio de atividades em nove encontros presenciais. Os alunos participantes ressaltaram a importância de jogos e visitas para tornarem a aprendizagem mais lúdica, permitindo a construção de opiniões embasadas sobre a problemática. Assim, podemos dizer que, apesar da ação educativa das escolas já ser fundamental, as propostas aqui apresentadas contribuem para formar cidadãos mais críticos e atuantes, que possam impactar positivamente na minimização dos problemas gerados pelos resíduos em nossa sociedade.

**Palavras-chave:** Percepções; Questões ambientais; Diversificação de metodologias; Formação de cidadãos.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Apesar de todos os seres vivos terem capacidade de modificar o ambiente, os humanos o fazem de maneira mais acentuada, já que consumimos recursos naturais e geramos produtos em prol de nossa qualidade de vida. De acordo com o CONAMA (Brasil, 1986), “impacto ambiental é qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente por qualquer forma de matéria ou energia que afete, direta ou indiretamente, a saúde, a segurança e o bem-estar das populações, as atividades sociais e econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais”. Dentre os impactos ambientais, a geração de resíduos é um grave problema e tem sido alvo de diversas pesquisas que buscam produzir resíduos menos impactantes e tratamentos que minimizem os problemas já existentes.

Quando pensamos em resíduos, nos vem à mente o termo “lixo” que, no entanto, se refere apenas aos resíduos sólidos. “Resíduos sólidos são aqueles que resultam de atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. São considerados também lodos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos de água” (ABNT, 2004). Apesar dos resíduos sólidos serem mais próximos de nosso cotidiano, existem ainda os efluentes, que envolvem despejos líquidos ou gasosos produzidos pelos diversos setores industriais. Segundo a ABNT (1987), “efluente líquido industrial é o despejo líquido proveniente do estabelecimento industrial, compreendendo emanções de processo industrial, águas de refrigeração poluídas, águas pluviais poluídas e esgoto doméstico”. Na temática dos resíduos, o esgoto sanitário também é mais próximo de nosso dia-a-dia e, de acordo com a ABNT (1986), “é o despejo líquido constituído de esgotos domésticos, resultantes do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas humanas e industrial, além da água de infiltração e da contribuição pluvial.”

As questões relacionadas aos resíduos sólidos, efluentes e esgoto interferem na qualidade do ambiente e nas condições de vida da população. No Brasil, foram geradas 214.405 toneladas de resíduos sólidos urbanos (RSU), a uma taxa de 1,04 kg hab<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> em 2016, dos quais 91% foram coletados (ABRELPE, 2016). Do resíduo coletado, 58,4% foi disposto em aterros sanitários, 24,2% em aterros controlados e 17,4% em lixões, sendo que, do total de municípios brasileiros, apenas 69,2% tem sistema de

coleta seletiva. Em 2008, 34,8 milhões de brasileiros não tinham acesso à rede coletora de esgoto, sendo que apenas 17% dos municípios têm instrumentos reguladores do manejo com o esgotamento sanitário e águas pluviais (IBGE, 2018).

Os efluentes têm diferentes características físico-químicas e cargas poluidoras e, portanto, diferentes formas de destinação e de tratamentos (CIMM, 2018). A legislação entorno dos efluentes é bastante diversificada entre os estados e municípios brasileiros e quanto ao tipo de poluentes presentes (Almeida, 2011). Ferreira (2013) aponta diversos malefícios à saúde causados pelas poluições atmosférica e hídrica oriundas do despejo de efluentes, bem como das principais formas de tratamento existentes. Portanto, para adequarem-se às normas e reduzirem os custos produtivos, as empresas buscam maneiras de diminuir a geração de efluentes, reutilizá-los parcialmente ou tratá-los (Almeida, 2011) acentuando a relação entre as indústrias e o conhecimento produzido nas universidades.

Apesar da crescente relação entre indústrias e universidades, a sociedade muitas vezes não fica a par destas inovações, seja por meio da educação formal ou das informações veiculada cotidianamente. Nos próprios Parâmetros Curriculares Nacionais (PCNs) de Ciências Naturais (Brasil, 1998), que estavam em vigência como diretrizes para a formação escolar até o ano de 2019, temas como os efluentes industriais e a divulgação de pesquisas da área ambiental não estão incluídos. Neste documento a Educação Ambiental está inserida principalmente como tema transversal, a ser trabalhado de forma conjunta pelas disciplinas (Brasil, 1998). Já na terceira versão da Base Nacional Comum Curricular (BNCC), que vigorará como referencial curricular a partir de 2020, a disciplina Ciências será dividida em três frentes: matéria e energia, vida e evolução e terra e universo (Brasil, 2019). Com isto, assuntos antes trabalhados na Geografia serão abordados em Ciências, haverá um aumento da participação de aspectos químicos e físicos, antes inseridos no Ensino Médio, e a área ambiental será extremamente reduzida, se restringindo basicamente à questão dos impactos ambientais. Fazendo uma análise crítica do documento, Behrend et al. (2018) apontam que há um ocultamento da Educação Ambiental, a qual tem importante caráter emancipatório e transformador das relações sociais. De acordo com as autoras, quando estes conhecimentos se fazem presentes na BNCC, têm um caráter mais naturalista e menos socioambiental, contribuindoem favor da política neoliberal para a formação de cidadãos mais alienados em relação às questões ambientais (Behrend et al., 2018). Além dos problemas que permeiam a educação formal, Castiel e Sanz-Valero (2007)

ressaltam a visão acadêmica de divulgação de ciência unicamente pela publicação de artigos, que são demasiadamente valorizados, não havendo preocupações quanto à divulgação para a sociedade em geral. Como as pesquisas referentes ao tratamento de efluentes não fazem parte do cotidiano das pessoas e não trazem produtos palpáveis, são ignoradas por uma grande porcentagem da sociedade.

Apesar do termo resíduo se referir a diversos componentes, nas escolas é mais abordada a questão do lixo, como pode ser observado a partir da análise dos PCNs (Brasil, 1998), utilizado como referencial curricular até então, e pelo direcionamento de trabalhos de Educação Ambiental referentes aos resíduos para a questão do lixo (Bertolini e Possani, 2005; Sissino e Moreira, 2005; Mota et al., 2009; Souza et al., 2014; Silva et al., 2014; Stangherlin e Specht, 2014; Sidegun et al., 2015). De acordo com Souza et al. (2014), o conhecimento dos problemas ambientais promovido por ações de Educação Ambiental, envolvendo compreender suas causas, consequências e o nosso papel em sua geração e mitigação, é importante para a sensibilização e ação humana em prol da preservação ambiental. Tendo em vista que os efluentes e esgotos também têm alta capacidade impactante e poluidora (Degenhart et al., 2015), suas abordagens nas escolas também são necessárias.

Além dos temas trabalhados, a maneira com que isso é feito também é relevante ao processo de ensino e aprendizagem. De acordo com Zuanon e Diniz (2010), a diversificação metodológica desperta interesse em uma maior variedade de alunos, que apresentam diferentes mecanismos de aprendizagem, ampliando suas redes de significados. Além disso, atividades que proponham trabalhos em grupo, incentivem uma competição saudável e imponham desafios despertam a motivação dos alunos, essencial para uma aprendizagem mais significativa (Coutinho et al., 2018).

Tendo em vista a importância da problemática dos resíduos para a sociedade, buscou-se analisar as concepções de alunos do ensino fundamental a respeito desta temática. A partir deste levantamento, propusemos um curso, denominado “Pensando o ambiente”, para trabalhar com a questão dos resíduos com alunos de ensino fundamental de maneira diversificada temática e metodologicamente. Aplicamos o curso em diferentes contextos escolares a fim de avaliar o papel das atividades propostas na aprendizagem e na sensibilização ambiental e melhorá-las, para que outros professores e educadores possam se embasar e ampliar as discussões sobre o tema e para estimular a melhoria da relação entre Pesquisa e Extensão por meio da divulgação científica.

## 2.0 METODOLOGIA

Para conduzir a pesquisa e a intervenção propostas, foram selecionadas duas escolas da cidade de São Carlos, estado de São Paulo (Brasil): uma da rede pública estadual de ensino e outra da rede privada, com a finalidade de enriquecer o universo de participantes. Trabalhou-se com alunos de 8º ano, os quais já foram expostos à conceitos básicos de ecologia, meio ambiente e seres vivos nos 6º e 7º anos (Brasil, 1998). Foram convidadas quatro salas de aula da rede pública, com 129 alunos, e três da rede privada, com 92 alunos, totalizando 221 alunos convidados. A participação foi optativa e anônima para evitar que respostas mal formuladas ou que não expressassem os pensamentos reais dos alunos fossem dadas. De acordo com Kramer (2002), o anonimato é uma forma de proteger a criança nas pesquisas em educação, permitindo que ela se expresse livremente em temas polêmicos, porém pode levar à perda de identidade dos participantes, importante em avaliações qualitativas. Como nosso estudo retratou um contexto geral e os dados foram trabalhados de maneira quantitativa, optamos por manter este anonimato. Tivemos a participação de 141 alunos, sendo 79 da rede pública e 62 da rede privada, representando 63,8% dos alunos convidados.

Foi projetada uma apresentação contextualizando a pesquisa e exibindo as dez perguntas propostas durante uma aula de cinquenta minutos. Enfatizou-se que respostas como “não sei” ou nas quais os alunos expressassem dúvidas também eram bem-vindas. As imagens apresentadas aos alunos encontram-se na Figura 1. As imagens apresentadas têm caráter ilustrativo, apenas para demonstrar o material que foi utilizado com os alunos. Os enunciados das questões realizadas serão novamente descritos na seção de Resultados e discussão.



Figura 1. Slides apresentados aos alunos. Miniaturas dos slides apresentados aos alunos para contextualização e realização da pesquisa em cada uma das salas de 8º ano abordadas.

As respostas obtidas foram tabuladas em categorias, possibilitando a análise quantitativa dos dados. Para Gatti (2004), apesar da abordagem quantitativa na pesquisa em educação ser menosprezada no Brasil, esta modalidade pode trazer informações valiosas para a orientação de ações pedagógicas, contribuindo para desmistificar

preconceitos e evitar interpretações enviesadas. Para tabulação e análises quantitativas dos dados foi utilizado o programa Excell 2016.

Esta análise permitiu o levantamento de defasagens em relação a temática, que orientaram o planejamento do curso “Pensando o Ambiente”. Dependendo das possibilidades dos participantes, opções por diferentes maneiras de desenvolver o curso foram usadas. Na escola pública, como os alunos têm dificuldades de transporte em horários fora do período de aula, selecionou-se a sala em que os alunos demonstraram maior interesse prévio para participação. Os encontros e visitas foram realizados nesta turma com 35 alunos, durante aulas cedidas semanalmente pela professora de Ciências, com um encontro semanal. Na escola privada, as três salas de oitavo ano foram convidadas a participarem do curso. Os encontros ocorreram aos sábados na própria escola com um total de oito participantes. As duas visitas planejadas foram realizadas pela manhã, no período oposto às aulas, e os pais se responsabilizaram pelo transporte para os locais de visitas e encontros. Apesar dos motivos logísticos que nos levaram a estas escolhas, elas nos permitiram comparar a aplicabilidade e implicações das atividades em turmas com diferentes contextos. Como os contextos de aplicação das atividades foram diferenciados, não se comparou os resultados do curso quanto a questão de as escolas serem públicas ou privadas, mas quanto ao contexto de realização dos encontros.

No do curso “Pensando o Ambiente”, foram propostos nove encontros, os quais estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1. Atividades do curso “Pensando o Ambiente”.** Duração, descrição dos temas abordados e metodologias empregadas em cada um dos nove encontros desenvolvidos ao longo do curso “Pensando o Ambiente”.

	<b>Duração estimada</b>	<b>Temas abordados</b>	<b>Metodologias empregadas</b>
<b>1</b>	50 min a 1h30min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Conceito e tipos de resíduo.</li> <li>- Composições dos resíduos: matéria orgânica, materiais recicláveis, hospitalares, lixo eletrônico e radioativos.</li> <li>- Fontes geradoras: resíduos domésticos, industriais, agrícolas e do setor energético.</li> <li>- Formas de tratar e destinar os diferentes resíduos.</li> <li>- Relação entre o consumismo e os resíduos.</li> </ul>	<i>Brain storm</i> , atividade em grupo, discussão e aula expositiva.
<b>2</b>	50 min a 1h30min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desastres ambientais e impactos dos resíduos.</li> <li>- Legislação ambiental brasileira relacionada a geração, descarte e tratamento dos resíduos.</li> <li>- Órgãos fiscalizadores municipais, estaduais e federais.</li> </ul>	Pesquisa orientada na internet e discussão.
<b>3</b>	50 min a 1h30min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Geração, destinação e tipos de resíduos gerados na escola e em casa.</li> <li>- Nosso papel na mitigação dos problemas relacionados aos resíduos.</li> </ul>	Jogo “Caça ao Tesouro”.
<b>4</b>	1h40min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problemas sociais relacionados aos resíduos: poluição visual, transmissão de doenças e condições de trabalho dos catadores de lixo.</li> <li>- Descarte inadequado do lixo.</li> <li>- Possibilidades de reutilização e reciclagem do lixo.</li> </ul>	Documentário “Lixo Extraordinário”.
<b>5</b>	2h a 4h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possíveis destinos dos resíduos: lixões, aterros sanitários, centros de triagem de lixo reciclável, indústrias de reciclagem, composteiras, oficinas de transformação de materiais, estações de tratamento de esgoto, setores de tratamento de efluentes industriais e corpos d’água que recebem despejo de efluentes.</li> </ul>	Visita a locais da cidade relacionados ao destino os resíduos.
<b>6</b>	2h a 4h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O papel das pesquisas e das informações na melhoria dos problemas causados pelos resíduos: universidades, laboratórios, centros de pesquisa, ONGs ambientais e bibliotecas.</li> <li>- O ambiente natural afetado pelos resíduos: características, importâncias, fauna e flora associadas e impactos ambientais gerados pelos resíduos.</li> </ul>	Visita a locais que gerem e disponibilizem informações científicas e a ecossistemas naturais.
<b>7</b>	50 min a 1h30min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reflexão correlação entre os assuntos abordados.</li> <li>- Impactos da conscientização e das campanhas educativas na qualidade do meio ambiente.</li> </ul>	Jogo de perguntas e respostas e divisão de grupos de trabalho.
<b>8</b>	50 min a 1h30min	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Opiniões sobre os temas abordados e metodologias utilizadas no curso.</li> <li>- Elaboração de campanha de conscientização na escola.</li> </ul>	Questionário com <i>feedback</i> do curso e definição dos trabalhos finais.
<b>9</b>	2h a 3h	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Criatividade, capacidades de síntese, reflexão, organização, trabalho em grupo e sensibilização.</li> </ul>	Apresentação dos trabalhos finais.



As atividades foram desenvolvidas no período de setembro a novembro de 2018 e foram avaliadas de acordo com as percepções da pesquisadora, que atuou como professora no curso, e das reações, comentários e atividades entregues pelos alunos participantes.

### 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Concepções dos alunos

Comparando-se as porcentagens de alunos que não responderam ou não souberam responder e o número médio de citações por questionário e por questionário respondido em cada questão, inferimos sobre as áreas ou tipos de respostas nas quais os alunos tiveram mais dificuldade de expressão, como apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1. Análise geral dos questionários.** Assuntos gerais das questões com respectivas porcentagens de alunos que não responderam ou não souberam e que responderam, número médio de citações por questionário e por questionário respondido.

Questão	Assunto	Não responderam ou não sabem	Responderam	Média por questionário	Média por questionário respondido
1	Impactos ambientais	17%	83%	2,6	2,9
2	Resíduos	26%	74%	1,7	2,3
3	Efluentes	84%	16%	0,2	1,2
4	Esgoto	0%	100%	2,5	2,5
5	Geração de combustíveis	41%	59%	0,9	1,4
6	Formas de lidar	20%	80%	0,7	0,9
7	Fiscalização	38%	62%	0,9	1,4
8	Atuação políticos e governantes	32%	68%	1,4	2
9	Atuação cidadãos	9%	91%	1	1,4
10	Discussão e Curiosidades	4%	96%	0,6	0,6

A análise dos questionários da escola pública e da privada demonstrou que o comportamento, as opiniões e o desconhecimento de temas pelos alunos foi semelhante em ambos contextos. Vale ressaltar que a escola pública avaliada se localiza na região central da cidade, próxima à escola privada consultada, o que pode ter contribuído para esta semelhança. Por isso, optou-se por uma análise geral das respostas dos alunos, sem considerar as escolas em que estavam inseridos.

Complementando este panorama geral e para compreensão dos assuntos questionados, os resultados obtidos a partir da categorização das respostas dadas pelos 141 participantes estão apresentados adiante junto com o respectivo questionamento.

**1) Então nos diga, sobre quais impactos ambientais você já ouviu falar?**

Das 140 respostas obtidas, 11% disseram não saberem nenhum exemplo de impacto ambiental, 19% apresentaram um, 21% dois, 20% três e 28% quatro ou mais impactos ambientais. Foram mencionados 34 impactos além de seis fenômenos naturais, como apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2. Impactos ambientais.** Impactos mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram e categorias nas quais foram classificados, também com as respectivas porcentagens de citações.

<b>Impactos citados</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>	<b>Categorias</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
Desmatamento	45,0		
Queimadas	22,9		
Destruição de habitats	2,1		
Geração de pastos	0,7		
Plantação de cana	0,7	<b>Uso do ambiente</b>	112,1
Poluição	31,4		
Poluição sonora	0,7		
Produção de lixo	7,9		
Produção de resíduos	0,7		
Construção de hidrelétricas	0,7		
Consumo de energia	0,7	<b>Energia</b>	3,6
Radiação nuclear	2,1		

Tráfico de animais	4,3		
Biopirataria	8,6	<b>Espécies</b>	32,1
Caça de animais	7,9		
Extinção de espécies	11,4		
Poluição dos solos	2,9	<b>Uso do solo</b>	10,7
Erosão dos solos	3,6		
Deslizamentos	1,4		
Exploração de minerais	2,9		
Poluição da água	13,6	<b>Água</b>	25,7
Esgoto nos mares	0,7		
Vazamento de petróleo	5,7		
Falta de água	2,1		
Inundações	3,6		
Poluição do ar	12,9	<b>Ar</b>	43,6
Produção de fumaça	2,1		
Produção de CO <sub>2</sub>	2,1		
Chuva ácida	4,3		
Buraco na camada de ozônio	5,7		
Aquecimento global	13,6		
Degelo dos Polos	2,9		
Desastre de Mariana	5,0	<b>Acontecimentos famosos</b>	5,7
Chernobyl	0,7		
Terremotos	2,9	<b>Fenômenos naturais</b>	25,0
Vulcões	1,4		
Tornados	0,7		
Tsunamis	4,3		
Chuvas com raios	0,7		
Efeito estufa	15,0		

Dentre as categorias de impactos, a de uso do ambiente foi a mais citada, bem como questões ligadas às espécies, à água e ao ar. Os impactos menos lembrados são os referentes ao solo, à geração de energia ou aos desastres famosos. Segundo Mucelin e Belline (2008), “o ser humano precisa se compreender como um constituinte da natureza e não como um ser a parte” para a fixação de hábitos culturais mais saudáveis, que efetivamente melhorem as condições ambientais, daí a importância de entendimento deste assunto. Notou-se também que 25% citaram fenômenos naturais como impactos

ambientais, indicando que os alunos não necessariamente compreendem o significado das questões ligadas ao ambiente.

**2) Para você, o que são resíduos? Dê exemplos que você conhece!**

Quanto à definição de resíduos, 63% dos alunos responderam, 20% não e 13% afirmaram não saberem. A maioria mencionou termos relacionados à restos sem utilidade, sujeira, substâncias tóxicas, que fazem mal à saúde e ao meio ambiente, que poluem, afetam o lençol freático, são descartadas em locais inapropriados, são consequências da ação humana ou mesmo sinônimo de lixo. Quanto aos exemplos, apenas um aluno não respondeu, 25% disseram não saberem, 24% mencionaram um, 21% dois, 23% três e 6% quatro ou mais resíduos. Foram mencionados 44 resíduos, que estão listados na Tabela 3.

**Tabela 3. Resíduos.** Exemplos de resíduos mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram e categorias nas quais foram classificados, também com as respectivas porcentagens de citações.

Resíduos citados	Porcentagem de questionários (%)	Classificações	Porcentagem de questionários (%)
Lixo	35,7		
Lixo hospitalar	2,1		
Materiais inorgânicos	0,7		
Embalagens	7,9		
Restos de alimentos	22,9		
Restos orgânicos	0,7		
Fezes	0,7		
Adubo	0,7		
Restos de materiais	2,1	<b>Resíduos sólidos</b>	120,0
Materiais recicláveis	1,4		
Vidro	1,4		
Papel	7,1		
Plástico	7,9		
Sacolas plásticas	1,4		
Metal	2,9		
Latas	5,0		

Garrafas PET	6,4		
Pneus	1,4		
Resíduos de fábricas	2,9		
Resíduos das cidades	0,7		
Cinzas de carvão	0,7		
Entulho	1,4		
Restos de madeira	2,1		
Roupas velhas	1,4		
Sapatos velhos	1,4		
Eletrônicos usados	0,7		
Esgoto	7,9		
Detergente	1,4		
Dejetos líquidos	1,4		
Líquidos	1,4		
Óleos	4,3		
Petróleo	5,0		
Álcool	2,1		
Gasolina	2,9		
Diesel	0,7	<b>Efluentes Líquidos e Gasosos</b>	52,1
Chorume	5,0		
Resíduos da mineração	4,3		
Produtos químicos	4,3		
Ácidos	0,7		
Agrotóxicos	1,4		
Produtos tóxicos	5,7		
Materiais inflamáveis	1,4		
Gases poluentes	2,1		
Materiais radioativos	1,4	<b>Radiação</b>	1,4

Alguns alunos souberam citar exemplos mesmo sem definirem resíduo, algo que está relacionado à própria morfologia da palavra e ao seu significado intuitivo. Diversos questionários definiram resíduo como sinônimo de lixo, o que coincide com boa parte dos exemplos citados, que em sua maioria foram **sobre** resíduos sólidos. As questões abordadas em escolas sobre o destino do lixo e a reciclagem, tornam o conhecimento sobre os resíduos sólidos mais palpável aos alunos, assim como Mucelin e Belline (2008) notaram, avaliando a percepção de moradores de um centro urbano sobre os impactos nestes ambientes. Voltando à questão anterior, 8% dos alunos citaram a produção de lixo como impacto ambiental, mas apenas um aluno mencionou a produção

de resíduos em geral, confirmando a proximidade maior com os resíduos sólidos. A menor citação de resíduos líquidos, gasosos e radioativos implica em menor conhecimento dos alunos sobre os resíduos produzidos pelas indústrias e o setor agropecuário, que são responsáveis por grande parte deste problema ambiental.

### 3) *Você conhece algum efluente residual para nos falar?*

Dos 141 questionários entregues, 117 disseram não conhecerem nenhum efluente (83%). Apesar de se enfatizar o termo “efluente residual”, diversos alunos o definiram como efluentes de rios ou mesmo pessoas influentes. Os questionários que trouxeram apenas estas definições foram considerados dentre os que disseram não conhecerem exemplos de efluentes. Dos 22 questionários respondidos foram obtidas 27 menções de 17 efluentes, como citado na Tabela 4.

**Tabela 4. Efluentes.** Efluentes mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram.

<b>Efluentes citados</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
Esgoto	1,4
Fezes	0,7
Chorume	3,6
Águas contaminadas	0,7
Líquidos tóxicos	0,7
Produtos tóxicos	1,4
Produtos químicos	0,7
Líquidos derramados	0,7
Resíduos industriais	0,7
Gases poluentes	2,2
Petróleo	0,7
Óleo	0,7
Gasolina	0,7
Mercúrio	0,7
Sujeiras	0,7
Sobras	1,4
Produto reciclável	1,4

Embora 52% dos alunos citaram resíduos líquidos e gasosos na segunda questão, apenas 17% deram exemplos de efluentes, mostrando que muitos sabem exemplos, mas não conseguem conectá-los à palavra. A resposta mais citada, em 3,6% dos questionários, foi o chorume. Nas escolas, os aterros sanitários e lixões são bastante trabalhados, mencionando-se o impacto do chorume e a necessidade de impermeabilização do solo para este descarte. Com isso e o aparecimento de palavras como “sujeira”, “sobras”, “fezes” e “esgoto” também nesta questão, observamos novamente que a vivência dos alunos e a escola desempenham papel fundamental no conhecimento da problemática dos resíduos, sendo que questões industriais e agropecuárias ainda são deficientes no conhecimento dos alunos. Fazendo uma análise documental de pesquisas da área de Educação Ambiental, Beltrame et al. (2016) também notam que há maior foco nas questões referentes aos resíduos sólidos, enquanto temas relacionados aos efluentes são pouco abordados. Tendo em vista a grande quantidade e diversidade de recursos consumidos e de resíduos gerados pelos setores agrícola e industrial, este desconhecimento pode afetar a forma com que a sociedade se impõe em relação à problemática ambiental. Considerando-se que os alunos estão inseridos em um ambiente formal de aprendizagem e propício para discutir muitos conteúdos, pode-se inferir que a sociedade também não tenha este tipo de conhecimento, reduzindo as atuações que poderiam melhorar a geração e tratamento de efluentes.

***4) E esgoto, você já ouviu falar? Que imagem vem em sua mente quando lê esta palavra?***

Nesta questão, 139 alunos disseram já terem ouvido sobre esgoto (99%). Foram atribuídas 51 imagens ao esgoto, em um total de 350 citações, apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5. Imagens atribuídas ao esgoto.** Imagens utilizadas para descrever esgoto com as respectivas porcentagens de alunos que as citaram e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações.

<b>Imagens citadas</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>	<b>Categorias</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>		
Lugar sujo	25,5	<b>Imagens do ambiente</b>	115,6		
Lugar escuro	1,4				
Coisas nojentas	2,8				
Lugar feio	1,4				
Água usada	2,8				
Água suja	25,5				
Líquido marrom	0,7				
Líquido esverdeado	3,5				
Água viscosa	0,7				
Correnteza	0,7				
Alagamento	0,7				
Lugar poluído	10,6				
Cheiro ruim	13,5				
Rios sujos	5,0				
Canos do subsolo	14,2				
Bueiros	5,7				
Beira da calçada	0,7				
Banheiro	4,3			<b>Origem</b>	10,6
Vaso sanitário	5,0				
Falta de higiene	0,7				
Falta de saneamento	0,7				
Lixo	30,5	<b>Materiais</b>	80,9		
Lixão	0,7				
Resíduos	2,8				
Restos humanos	3,5				
Restos de comidas	5,7				
Fezes	22,7				
Urina	11,3				
Vômito	0,7				
Óleo de cozinha	0,7				
Gases tóxicos	0,7				
Produtos químicos	1,4	<b>Seres vivos</b>	25,5		
Pedaços de plantas	0,7				
Animais nojentos	2,1				
Micróbios	0,7				



Bactérias	2,1		
Coliformes fecais	0,7		
Ratos	9,2		
Baratas	5,7		
Cobras	0,7		
Sapos	0,7		
Jacaré	0,7		
Aranhas	1,4		
Animais mortos	0,7		
Prejudicial ao meio ambiente	2,1		
Prejudicial à saúde	4,3	<b>Consequências</b>	7,1
Causa doenças	0,7		
Rio Tietê	2,1		
Tartarugas Ninja	1,4	<b>Imagens famosas</b>	5,0
Palhaço	1,4		
Estação de tratamento	3,5	<b>Tratamento</b>	3,5

Os alunos descreveram o esgoto com grande riqueza de imagens, mas apenas 1,4% dos alunos se referiram às Estações de Tratamento de Esgoto, indicando que poucos pensaram em possíveis destinos para este material. Muitos apontaram os produtos químicos como resíduos, efluentes ou componentes do esgoto, indicando que, de acordo com o conhecimento prévio destes alunos, produto químico é algo negativo e ruim ao ambiente.

Nas quatro primeiras questões, foi diagnosticado o conhecimento construído pelo aluno por sua vivência, informações da internet e da mídia em geral, assuntos comentados pelos familiares ou abordados nos conteúdos escolares. Dos quatro temas apresentados, o que foi descrito pela maioria dos alunos foi “esgoto”, presente no dia-a-dia e em noticiários, e o que causou mais estranheza foi “efluente residual”, sendo muitas vezes ignorado ou mesmo confundido. Neste sentido, Fernandes et al. (2004) investigaram as percepções ambientais de alunos e professores de cursos de graduação, indicando diferenças significativas entre estes grupos sociais. Os professores demonstraram maior interesse, preocupação e atuação em questões ligadas ao meio ambiente do que os alunos (Fernandes et al., 2004), indicando que a escolaridade amplia a visão sobre tais questões. De acordo com o IBGE (2015), apenas 13 % da população brasileira tem 15 ou mais anos de estudo e 56 % têm apenas até 10 anos de estudo, o

que equivale ao ensino fundamental completo. Desta forma, ao investigarmos as percepções de alunos do ensino fundamental sobre o meio ambiente estamos focando em um grupo com escolaridade próxima de grande parte da população brasileira.

**5) Você imagina quais resíduos e impactos ambientais são gerados para termos estes produtos (combustíveis)?**

Cinquenta e cinco alunos disseram não saberem exemplos (39%), 27% fizeram uma citação, 20% duas, 8% três e 2% quatro ou mais. Foram feitas 137 menções de 14 impactos ambientais e 3 resíduos, como mostrado na Tabela 6.

**Tabela 6. Impactos ambientais e resíduos gerados na produção dos combustíveis.** Impactos ambientais e resíduos da produção de combustíveis (etanol, gasolina e diesel) mencionados com as respectivas porcentagens de alunos que os citaram.

<b>Impactos citados</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>	<b>Categorias</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
Desequilíbrio ambiental	0,7		
Desmatamento	14,0		
Recurso não renovável	2,2		
Morte de organismos	5,1		
Geração de resíduos	2,9		
Queimadas	2,2		
Poluição do ar	17,6	<b>Impactos ambientais</b>	86,0
Derramamento de petróleo	11,0		
Poluição da água	6,6		
Escavações do solo	7,4		
Infertilidade do solo	11,0		
Grandes plantações de cana	2,9		
Uso de agrotóxicos	1,5		
Explosões de postos	0,7		
Resíduos líquidos	2,2		
Restos de cana	10,3	<b>Resíduos</b>	14,7
Restos de petróleo	2,2		

As indústrias do setor petrolífero geram resíduos sólidos como areia oleosa, antracito, sedimentos dos tanques, emulsão da limpeza dos separadores, sucata metálica,

vasilhames de produtos químicos, parafina das tubulações, catalisadores como aminas, filtros de glicol, resíduos de pintura (lixas, pinceis) e tambores metálicos. Como resíduos líquidos pode-se citar água utilizada, solventes e produtos de limpeza, esgoto sanitário, água de lavagem e pluvial, lubrificantes e óleos usados, água de resfriamento de motor e soda cáustica. Como emissões gasosas temos CO, NO<sub>x</sub>, SO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> e hidrocarbonetos, dentre outros (Souza e Sarmiento, 2006). Já no setor sucroalcooleiro, os principais resíduos são a água de lavagem da cana e das dornas, dos condensadores e evaporadores, bagaço de cana, cinzas do bagaço, torta de filtro, vinhaça, melaço e pontas da cana (Alvarenga e Queiroz, 2009). Poucos alunos mencionaram resíduos gerados na produção de combustíveis, apesar dos diversos exemplos acima, ressaltando que pouco se pensa sobre os resíduos produtivos do setor agroindustrial. A vinhaça, resíduo alvo dos estudos da presente tese, não foi mencionada por nenhum aluno.

Como os impactos são mais trabalhados no conteúdo escolar, muitos alunos conseguiram relacioná-los aos usos da cana-de-açúcar e do petróleo para a geração de etanol, gasolina e diesel. Os combustíveis são insumos muito importantes na sociedade moderna e, apesar de algumas novas fontes de energia existirem, as grandes corporações produtoras dos combustíveis têm interesse em manter a fonte atual. Costa e Prates (2005) ressaltam que, apesar das crises do petróleo em 1973 e em 1979, que provocaram mudanças nas matrizes energéticas mundiais, as inovações tecnológicas no setor petrolífero alongam a prevalência dos combustíveis fósseis no consumo mundial. A falta de conhecimento dos alunos sobre a questão pode indicar um dos motivos pelos quais a pressão popular quanto à matriz energética nacional é praticamente inexistente, havendo mobilizações relacionadas apenas aos preços de tais produtos e não aos seus impactos negativos ao ambiente.

#### ***6) Geração de Resíduos: efluente e esgoto... temos uma boa maneira para lidar com este problema?***

Nesta questão, 18% disseram não saberem. Dos alunos que responderam, 18% disseram que sim, mencionando seis diferentes justificativas citadas ao todo 25 vezes. Dos 88 que responderam não (62%), foram mencionadas 15 diferentes justificativas com 78 citações, como demonstrado na Tabela 7.

**Tabela 7. Justificativas sobre a forma que lidamos com os resíduos.** Justificativas dadas pelos alunos que responderam afirmativa e negativamente à forma que lidamos com os problemas gerados pelos resíduos.

<b>Imagens citadas</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
<b>Sim, sabemos lidar com os resíduos</b>	
Redução da emissão de poluentes	3,6
Chaminés nas fábricas	0,7
Redução da produção de resíduos	4,3
Tratamento de esgotos	6,5
Redução do desmatamento	0,7
Reciclagem	2,2
<b>Não, não sabemos lidar com os resíduos</b>	
Há maneiras, mas não fazemos	5,8
Falta de preocupação	11,6
Soluções atuais geram mais problemas	2,9
Não se respeitam normas	1,4
Falta de saneamento	5,1
Falta de tratamento dos resíduos	5,1
Muitos carros	1,4
Excesso de lixo	3,6
Muita poluição	5,1
Geração de muitos resíduos	2,9
Excesso de indústrias	0,7
Descarte inadequado dos resíduos	5,1
Uso excessivo dos recursos	0,7
Faltam boas maneiras para lidar	4,3
Transferimos a responsabilidade do problema	0,7

Nas justificativas apresentadas notamos dois padrões distintos. Os que disseram que temos boas maneiras de lidar com os resíduos mostraram medidas que existem e podem reduzir os problemas ambientais, comumente abordadas nas escolas. Já quem disse que não temos boas maneiras citou exemplos de como nosso ambiente está atualmente, com falta de saneamento, excesso de lixo e poluição. Esta divergência entre existirem medidas e a forma que estamos não refletir esta melhoria foi apontada pelos próprios alunos, já que 5,8% deles fizeram justamente esta relação e 11,6% disseram que falta preocupação da população com o ambiente, resultando na situação atual

apresentada. Sanches (2000) relaciona a busca de muitas empresas por processos ambientalmente menos degradantes à maior competitividade, o que depende diretamente da consciência dos cidadãos como consumidores. Portanto, este descaso com a questão dos resíduos interfere diretamente na atuação das empresas, contribuindo para a piora do cenário atual.

### **7) E você sabe quem fiscaliza se estamos cuidando dos nossos resíduos?**

Nesta questão, todas as respostas foram consideradas, mesmo que não correspondam à realidade de nosso país. Ao todo foram citadas 19 instituições e organizações em um total de 120 citações, como vemos na Tabela 8.

**Tabela 8. Instituições fiscalizadoras.** Instituições fiscalizadoras das normas referentes ao destino e cuidado com os resíduos com as respectivas porcentagens de menções.

<b>Fiscais dos resíduos</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
Ninguém	2,9
As próprias pessoas	5,7
Governo	2,9
Prefeituras	11,4
Institutos de proteção ambiental	6,4
Fiscais do meio ambiente	2,9
Fiscais de rua	4,3
Vigilância sanitária	8,6
Redes de coleta de lixo	10,7
Coletores de materiais reciclados	0,7
Serviços de tratamento de esgoto	8,6
Polícia	3,6
Polícia ambiental	6,4
Guardas florestais	2,1
ONGs	0,7
Polícia federal	1,4
IBGE	1,4
Bombeiros	2,1
Cientistas	2,1
FBI	0,7

Os alunos atribuíram a responsabilidade da fiscalização sobre o destino dos resíduos a entidades mais próximas de suas vivências, mencionando grupos que lidam com os resíduos e os destinam, como as próprias pessoas, os coletores de lixo, os grupos de reciclagem, as ONGs ambientais ou mesmo os cientistas. Também foram mencionadas organizações que tratam de outras questões ambientais, como a Polícia ambiental e os guardas florestais, ou mesmo que fiscalizam e investigam outros assuntos, como o IBGE, a Polícia Federal e o FBI.

A Lei 12.305 de 2010 (Brasil, 2010), também chamada Política Nacional dos Resíduos Sólidos, estabelece o papel dos governos federal, estadual e municipal em fiscalizar e implementar medidas que sigam a seguinte ordem de prioridade: não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento dos resíduos sólidos e disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos. Já a Resolução CONAMA 430/2011 (Brasil, 2011) dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, sistemas de tratamento e diretrizes para gestão de efluentes. Portanto, cabe ao governo através de seus órgãos colegiados, fiscalizar se esta legislação está sendo vigorada. Apenas 13,6% dos alunos reconheceram este fato, atribuindo ao governo ou a prefeitura a responsabilidade pela fiscalização do destino dos resíduos. Somente 8,6% dos estudantes mencionaram a Vigilância Sanitária (Anvisa), a qual, de acordo com o portal do governo Federal (Brasil, 2018), “deve promover e proteger a saúde da população e ser capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes da produção, da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”, como por exemplo o destino dado aos resíduos dos estabelecimentos fiscalizados. Nenhum aluno mencionou a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), a qual é responsável no estado em que a pesquisa foi realizada “pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, com a preocupação fundamental de preservar e recuperar a qualidade das águas, do ar e do solo” (CETESB, 2018). Este desconhecimento pode estar associado, futuramente, à falta de denúncias e cobranças da população, que contribuiria para melhorar esta questão.

***8) Se você fosse governante ou cientista.... o que faria para resolver os problemas gerados pelos resíduos?***

Nesta questão, 31% disseram que não sabem, 33% deram uma possível solução, 23% duas, 7% três e 5% quatro ou mais ideias. Foram 45 ideias citadas 195 vezes, como descrito na Tabela 9.

**Tabela 9. Ideias de atuação para governantes e cientistas.** Ideias dos alunos para a melhoria ou solução do problema dos resíduos caso fossem governantes ou pesquisadores, com as respectivas porcentagens de citações e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações.

<b>Ideias</b>	<b>Porcentagem questionários (%)</b>	<b>Categorias</b>	<b>Porcentagem questionários (%)</b>
Não faria nada	0,7	<b>Sem ação</b>	0,7
Reduzir consumo	1,4		
Reduzir coleta para obrigar redução na produção	0,7		
Melhorar coleta de resíduos	5,0		
Proibição de descarte de resíduos	1,4		
Aumentar latas de lixo nas ruas	5,0		
Separar uma área para descarte	5,0		
Placas de aviso para descarte proibido	0,7		
Queima dos resíduos	3,6		
Aproveitamento do gás queima	0,7		
Empresas produtoras de adubos	1,4	<b>Maneiras de lidar com os resíduos</b>	58,3
Jogar lixo na lava	0,7		
Investir em reciclagem	9,4		
Investir em saneamento básico	4,3		
Reutilização do lixo	6,5		
Mutirões de limpeza do ambiente	5,0		
Reduzir poluição	2,9		
Chaminés nas fábricas	0,7		
Impermeabilização dos lençóis freáticos	0,7		
Cada um teria que se livrar do resíduo	1,4		
Mandaria lixo para o espaço	0,7		
Mandaria o lixo para os EUA	0,7		

Pesquisas para reduzir resíduos	10,8		
Diminuir geração de resíduos	5,8		
Produtos com menos impactos	4,3	<b>Pesquisas e melhorias</b>	21,6
Pesquisar formas de desintegrar o lixo	0,7		
Conscientização pela educação	4,3		
Campanhas de conscientização	9,4	<b>Conscientização</b>	14,4
Campanhas nas redes sociais	0,7		
Leis de proteção ambiental	9,4		
Multa para excesso de lixo	5,8		
Aumento da fiscalização das leis	6,5		
Criação de instituições de fiscalização	1,4	<b>Leis e fiscalização</b>	29,5
Fiscalização por câmeras nas ruas	2,2		
Taxas para indústrias que poluem	1,4		
Prisão para crimes ambientais	2,9		
Novas fontes de energia	2,9		
Redução do consumo energético	0,7	<b>Energia</b>	4,3
Proibição de energia nuclear	0,7		
Rodízio de carros	0,7		
Investimento em transportes públicos	1,4	<b>Transportes</b>	7,2
Incentivo às bicicletas	2,2		
Investir em carros elétricos	2,9		
Plantio de árvores	2,9	<b>Restauração</b>	4,3
Criação de áreas verdes	1,4		

**9) Você, sua família e amigos têm responsabilidade quanto a geração de resíduos? O que poderiam fazer?**

Dos alunos avaliados, 75% disseram que temos responsabilidade quanto a geração de resíduos, 7% disseram que depende e 9% disseram que não. Nas respostas que disseram que depende ou que não temos responsabilidade, muitos se referiram ao fato de existirem maneiras de contribuirmos para a melhoria do problema, mas não termos responsabilidade em fazê-lo. Dos alunos que responderam à questão, 27% não deram ideias de nossas contribuições para melhoria do problema dos, 45% deram uma



ideia, 22% duas, 6% três e nenhum aluno deu quatro ou mais ideias. Ao todo foram 27 ideias citadas 133 vezes, como apresentado na Tabela 10.

**Tabela 10. Ideias de atuação como cidadãos.** Ideias para a melhoria ou solução do problema dos resíduos que os alunos, suas famílias e amigos podem realizar, com as respectivas porcentagens de citações e categorias nas quais foram classificadas, também com as respectivas porcentagens de citações.

Ideias	Porcentagem de questionários (%)	Categorias	Porcentagem de questionários (%)
Cada um cuidar do seu	0,8		
Papel dos governantes	1,6	<b>Sem ação</b>	3,1
Mudaria de país	0,8		
Consumir menos	3,1		
Reduzir geração de resíduos	11,7		
Não gerar mais lixo	1,6		
Produzir resíduos mais simples	0,8		
Evitar emissão de poluentes	3,1		
Queimar o lixo	0,8		
Fazer adubo	1,6	<b>Maneiras de lidar com os resíduos</b>	78,9
Reduzir gastos de água	1,6		
Reutilizar os resíduos	3,9		
Separar o lixo reciclável	27,3		
Separar lixo orgânico	2,3		
Destinar ao local certo	18,8		
Não jogar óleo na pia	1,6		
Limpar os locais públicos	0,8		
Campanhas de conscientização	10,2		
Alertar pessoas que poluam	3,9	<b>Conscientização</b>	15,6
Criar grupos de debate	1,6		
Seguir melhor as leis	0,8	<b>Leis e fiscalização</b>	0,8
Reduzir o uso de carros a gasolina	4,7		
Usar transportes públicos	0,8	<b>Transportes</b>	6,3
Usar carros a gás	0,8		
Andar de bicicleta	2,3		
Não desmatar	0,8		
Plantar mais árvores	2,3	<b>Restauração</b>	3,1

Comparando-se com a questão anterior, os alunos deram mais ideias de atuação caso fossem governantes ou cientistas do que como cidadãos comuns.

Apesar de uma porcentagem maior de alunos responderem à pergunta 9, como cidadãos, mais ideias foram atribuídas caso eles fossem governantes ou cientistas, como proposto na questão 8, demonstrando um padrão cultural de nossa sociedade em atribuir maior responsabilidade ao governo do que aos cidadãos, os quais poderiam contribuir mais do que o fazem. Fernandes et al. (2004) verificaram que professores e alunos de diferentes cursos do Ensino superior atribuíram responsabilidade em relação ao meio ambiente de, em média, 20% ao governo e 25,6% à sociedade. Porém, apenas 54,4% disseram tomar atitudes em relação ao meio ambiente, confirmando esta questão cultural de falta de ação em questões ambientais. Da mesma maneira, não foram raros nesta pesquisa alunos que deram ideias mas afirmaram que não as colocam em prática.

De acordo com Silva et al. (2015), o consumismo é um pilar do capitalismo moderno, porém contribui para a geração de resíduos e a redução da qualidade de vida das pessoas. Apenas 1,4% dos alunos disseram que poderíamos reduzir o consumo, fator que contribui fortemente para a geração de resíduos agrícolas e industriais. Parte dos estudantes ainda apontaram medidas que se referem à falta de ação, como dizerem que é papel dos governantes agir neste problema, que poderíamos mandar lixo para outro país e para o espaço ou mesmo mudar de país. Estas respostas reforçam que é necessário mostrar que este problema é universal, não só do Brasil, e que todos temos responsabilidade em mitigá-lo.

***10) Você acha importante discutir sobre resíduos e impactos ambientais? O que você tem curiosidade em saber?***

Nesta questão, 92% disseram achar esta discussão importante e 4% que não. Dos alunos que responderam, 57% não mencionaram nenhuma curiosidade específica, 33% levantaram uma questão, 8% duas e 1% três curiosidades. Foram citadas 28 curiosidades, mencionadas 77 vezes, como detalhado na Tabela 11.

**Tabela 11. Curiosidades sobre impactos ambientais e resíduos.** Curiosidades específicas sobre impactos ambientais e resíduos mencionadas pelos alunos com as respectivas porcentagens de citações.

<b>Curiosidades</b>	<b>Porcentagem de questionários (%)</b>
O que são impactos?	3,0
Exemplos de impactos	1,5
Tipos de poluição	0,7
O que é efluente?	2,2
O que são resíduos?	11,1
Dimensão do impacto humano	0,7
Como os resíduos são gerados?	1,5
Como lidamos com resíduos?	5,9
Como funciona a reciclagem?	1,5
Formas de reutilizar	0,7
Indústrias reutilizam?	0,7
Resíduos industriais	3,7
Resíduos dos combustíveis	0,7
Resíduos dos refrigerantes	1,5
Resíduos da pecuária	0,7
Resíduos da produção de ração	0,7
Resíduos radioativos	0,7
Controle mundial	2,2
Principais pesquisas	0,7
Como resolver?	8,1
Como será no futuro?	0,7
Malefícios para a saúde	0,7
Por que falta informação?	0,7
Por que mesmo sabendo poluímos?	3,0
Saber pontos de vista	0,7
Formas alternativas de energia	0,7
Benefícios animais de zoológico	0,7
Papel da fauna no problema	0,7

Almeida et al. (2015) investigaram as abordagens sobre meio ambiente em livros didáticos quanto às dimensões conceitual, procedimental e atitudinal e observaram que os aspectos que envolvem a interdisciplinaridade e a relação do meio ambiente com o social, econômico e político foram abordados de forma insuficiente. Em concordância com esta posição, ao levantarmos as curiosidades, verificamos que boa parte se refere às

próprias questões realizadas, justificando as altas porcentagens de alunos que não as responderam. Houve questionamentos sobre os resíduos gerados pelas agroindústrias na produção de itens específicos e sobre projeções futuras.

### 3.2 Curso “Pensando o ambiente”

Uma semana antes do início do curso, foi entregue uma pergunta sobre opiniões dos alunos a respeito da temática dos resíduos, como descrito a seguir.

“Apesar de estarmos em contato e sermos parte do ambiente, poucas vezes paramos para refletir sobre os problemas que o afetam e a influência do ser humano. Dentre os principais impactos sobre o ambiente está a questão dos resíduos. Escreva, de forma resumida, sua opinião a respeito deste problema na atualidade, envolvendo causas, consequências, dimensões, formas com que lidamos ou qualquer aspecto que ache importante. Traga esta atividade em nosso primeiro encontro, pois será muito importante ao longo do curso.”

Foram recolhidas 12 atividades dos 43 alunos abordados nas duas escolas. Muitos trataram os resíduos como lixo, falando da importância de reciclar, de dar um destino correto para estes materiais e da conscientização para melhoria do problema. Ao desenvolverem atividades sobre os resíduos sólidos com alunos de 4º e 5º ano do ensino fundamental, Stangherlin e Specht (2014) notaram que os alunos passaram a separar o lixo reciclável e a respeitar mais os catadores, reconhecendo suas importâncias para a sociedade. Partindo do princípio que a escola tem um papel social importante na formação de atitudes conscientes, atividades que busquem modificar comportamentos dos adolescentes, como as propostas aqui, são de fundamental importância.

A análise das concepções obtidas na etapa anterior deste trabalho bem como das atividades recolhidas contribuiu para o planejamento do curso “Pensando o ambiente”, cuja descrição e interpretação serão expostas por encontro. Ao longo das atividades, verificaram-se diferentes comportamentos entre as turmas avaliadas. Na turma com encontros fora do período de aulas, as discussões foram mais aprofundadas e prolongadas. Estes alunos traziam mais conhecimentos prévios sobre as questões ambientais, sendo que o curso contribuiu para deixá-los ainda mais engajados, podendo transformá-los em dissipadores de informações e sensibilizadores para atitudes mais ambientalmente saudáveis. Já na turma com os encontros feitos em horário de aula,

apesar de selecionarmos a mais interessada, não houve a mesma participação. Ainda assim, acredita-se que o curso foi importante, acrescentando conhecimentos menos aprofundados, mas fundamentais. Portanto, indicamos que, quando for trabalhado com uma turma inteira, seja desenvolvida uma versão resumida do curso, que já cumpriria o papel pedagógico de conscientização ambiental, modificando a mentalidade de todos de maneira construtiva e despertando valores e novas atitudes que cooperem para a melhoria do ambiente (Reis et al., 2012).

### ✧ *1º Encontro: Brain storm*

Inicialmente, comentou-se sobre os impactos ambientais e a capacidade dos seres vivos em modificarem o ambiente, enfatizando o ser humano como maior causador de impactos ambientais negativos, como a geração de resíduos. Para a discussão e a atividade de “*Brain storm*”, foi colocado no centro da lousa a palavra “resíduo” e os alunos escreverem em torno do termo tudo que julgassem ser resíduos. Foi discutido se as expressões levantadas realmente se tratavam de resíduos. Os próprios alunos concluíram que resíduo não é apenas lixo e que alguns materiais podem ainda ser matéria-prima para produtos, deixando de serem resíduos e aumentando a ecoeficiência de nossa sociedade. A ecoeficiência envolve a redução progressiva da geração de resíduos sólidos, efluentes líquidos e emissões atmosféricas, reduzindo o desperdício de materiais e trazendo benefícios econômicos e ambientais para as empresas (Sisinno e Moreira, 2005), o que poderia ser extrapolado aos domicílios e escolas.

Foi pedido que os alunos propusessem, em duplas ou trios, maneiras de classificar os resíduos apontados. Foram propostos critérios como seus componentes (orgânicos, recicláveis, eletrônicos), tipos de atividades geradoras (residencial, hospitalar, industrial, agrícola, energética) e aspectos (sólidos, líquidos e gasosos). Aproveitou-se para definir os termos lixo ou resíduo sólido (ABNT, 2004), efluente (ABNT, 1987) e esgoto (ABNT, 1986), além de apresentar diferentes maneiras de disposição e tratamentos adequados (Mota et al., 2009; Sisinno e Moreira, 2005). A partir deste panorama, concluiu-se que o consumismo exagerado seria o principal intensificador dos problemas ambientais gerados pelos resíduos e, neste sentido, nosso papel como cidadãos seria fundamental. Para Mota et al. (2009), a melhor maneira para

resolver os problemas constantes gerados pelo lixo é evitar seu surgimento, o que envolve diretamente o consumo consciente.

### ✧ *2º Encontro: Pesquisa orientada*

Os alunos foram convidados a realizarem pesquisas sobre desastres ambientais, legislação brasileira e órgãos fiscalizadores relacionados aos resíduos na sala de informática das escolas. As turmas foram divididas em três grupos, que pesquisaram cada um dos assuntos e anotaram os tópicos pesquisados em diferentes partes da lousa. Nos dois terços finais do encontro foram feitas as discussões dos tópicos levantados.

Quanto aos desastres ambientais, foram relatados casos famosos como o de Mariana e o de Chernobyl, além de situações menos famosas envolvendo efluentes agrícolas, de mineração, de usinas petrolíferas e industriais. Tendo em vista que os alunos inicialmente se referiram aos resíduos apenas como lixo, o desconhecimento e despreocupação com os efluentes podem explicar por que as pessoas não enxergam suas responsabilidades quanto a estes desastres, seja como consumidores, estimuladores destas atividades, ou na falta de pressão para penalidades mais graves para os responsáveis diretos para estes problemas. De acordo com Davies e Martins (2009), o rompimento de barragens de rejeitos, por exemplo, é mais comum em períodos de recessão nos preços dos minérios, quando as mineradoras são estimuladas pelos investidores a manterem suas rentabilidades. Para isso, estas empresas pressionam as agências ambientais para acelerarem o licenciamento, o que pode gerar interpretações incompletas ou inadequadas dos riscos ambientais e impactos, aumentando a ocorrência de desastres (Davies e Martins, 2009). Após a ocorrência de um desastre a tomada de medidas de mitigação ambiental e de garantia de direitos humanos só se torna possível graças à pressão popular e à intercessão judicial (Wanderley et al., 2016). A ação popular poderia ser efetiva também na prevenção destes desastres, mas o desconhecimento geral da população sobre a geração e destino de rejeitos e efluentes industriais impede esta ação.

Os alunos notaram que os resíduos domésticos gerados diretamente pela população, apesar de não estarem relacionados a grandes desastres, também trazem consequências negativas como a contaminação do solo, da água e do ar, enchentes e morte de muitos seres vivos. Os problemas oriundos dos resíduos sólidos, ou também

chamados de lixo, são mais contínuos e dependem de uma série de fatores sobre os quais podemos atuar, como quantidade gerada, destinação adequada, reutilização e separação de materiais recicláveis para coleta seletiva (Mota et al., 2009).

Quanto à legislação ambiental brasileira, os alunos observaram que tais leis estão disponíveis para a população, a qual poderia contribuir mais para suas proposições e para a fiscalização de seus cumprimentos, denunciando e agindo ao presenciarem procedimentos ilegais. De acordo com Zaneti e Sá (2002), o mundo atual se configura em uma ótica capitalista, na qual o modelo liberal de governo exerceria vantagens ao desenvolvimento econômico dos países. Entretanto, este sistema político traz desvantagens sociais e ambientais, já que os interesses socioambientais comuns são soterrados pelos interesses econômicos privados (Zaneti e Sá, 2002). Por esta razão, devemos nos atentar para que o Estado não perca tal função reguladora, importante para a manutenção dos recursos ambientais. Aliado a esta questão, temos o estabelecimento da grade curricular que, de acordo com Arroyo (2014), é um instrumento para limitar a autoria docente, de forma que conteúdos que estão nela devem ser obrigatoriamente trabalhados e soterram os conteúdos que estão fora dela, que não entram no trabalho escolar. Com isto, propositadamente, enfraquece-se o senso crítico e as resistências sociais dos futuros cidadãos, reduzindo a docência a um treinamento para a vida profissional dos educandos (Arroyo, 2014). A Educação Ambiental extracurricular tem, portanto, um papel fundamental na discussão quanto à complexidade das questões socioambientais, permitindo uma gestão mais integrada, envolvendo a sociedade e o setor público (Zaneti e Sá, 2002).

Os alunos puderam ainda discutir defasagens das leis ambientais brasileiras e a importância de entidades como o Ministério do Meio Ambiente (MMA) para existência destas. De acordo com a definição do site do governo (MMA, 2018), “o MMA foi criado em 1992 e visa desenvolver estratégias para o conhecimento, a proteção e a recuperação do meio ambiente, além da inserção do desenvolvimento sustentável nas políticas públicas”. Sabendo que as medidas de preservação ambiental esbarram em interesses econômicos (Zaneti e Sá, 2002), entidades como o MMA ganham importância reguladora ainda maior, sendo resistência ao crescimento econômico descontrolado.

No quesito de órgãos fiscalizadores, os alunos apresentaram mais dificuldades de encontrarem informações. Ainda assim, foi possível discutir sobre agências ligadas ao governo como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB),

responsável pelo controle, fiscalização, monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição que possam afetar a qualidade das águas, do ar e do solo. Nesta aula, as discussões fizeram os alunos notarem que, no Brasil, o Estado apresenta uma função fundamental na criação e na fiscalização das leis ambientais, contribuindo para o desenvolvimento sustentável (Zaneti e Sá, 2002).

A tecnologia da informação criou um espaço de aprendizagem e reflexão para além das escolas, possibilitando a conscientização por meio da percepção ética do meio ambiente (Marchiorato, 2018). O desconhecimento dos cidadãos sobre aspectos ambientais e sobre como procurar informações sobre eles gera falta de embasamento e reflexão, a qual explicaria a baixa atuação popular e a manipulação política da população quanto às questões ambientais. Com isso, a orientação dos professores sobre a utilização de tais tecnologias para a Educação Ambiental é uma abordagem de suma importância, daí a necessidade de atividades como a proposta para este encontro.

### ✧ *3º Encontro: Jogo Caça ao tesouro*

Para rediscutir e sanar dúvidas sobre os pontos trabalhados nos dois encontros anteriores, foram propostas dez questões que fizeram parte do jogo “Caça ao tesouro”. As questões foram escritas em duplicata para os dois times participantes de cada escola, mas numeradas em ordens diferentes. A primeira questão de cada time foi guardada e as outras nove e um tesouro foram escondidos em dez diferentes lugares da escola, que estavam relacionados à geração ou ao destino de resíduos. Foram elaboradas dez pistas para cada grupo chegar a estes lugares, mencionando suas relações com os resíduos. Esta preparação foi feita antes do encontro se iniciar. Algumas ideias de perguntas preparadas para os grupos, respostas possíveis dos alunos e dicas para acharem as pistas encontram-se no anexo 1, ao final deste capítulo.

As turmas foram divididas em dois grupos de cores diferentes. Para identificá-los, os alunos amarraram uma fita com a respectiva cor de seus grupos em seus braços. Foi entregue a primeira questão para cada grupo, que a respondeu em uma folha de respostas e mostrou para a professora. Quando a resposta estava correta, o grupo recebia a pista para ir até o local da escola em que estava escondida a próxima questão, e assim até chegar ao tesouro, que envolveu alguns doces, mas poderiam ser livros ou outros materiais interessantes para os alunos. Na turma que teve os encontros em período de



aula, os alunos apenas adivinharam o local da próxima pergunta, mas não iam até lá buscá-la. Quando acertavam o local, a próxima pergunta era apenas entregue, para não atrapalhar o andamento das atividades escolares.

Em ambas escolas, os alunos mostraram-se bastante interessados, empolgados e motivados pela competição e curiosidade para encontrarem as próximas perguntas e o tesouro. Para Coutinho et al (2018), a motivação é um componente importante para a aprendizagem efetiva. Os professores podem estimulá-la promovendo a competição saudável e equilibrada, atribuindo responsabilidades aos alunos, possibilitando trabalhos em grupo, utilizando vários espaços escolares e recursos que despertem a curiosidade (Coutinho et al., 2018). A presença destes elementos juntos no jogo “Caça ao tesouro” pode ter contribuído para a participação e empenho dos alunos. Com isso, foi possível trabalhar os conteúdos vistos, além de estimular o trabalho em grupo de forma divertida.

#### ✧ *4º Encontro: Documentário “Lixo Extraordinário”.*

Os alunos foram levados às salas de vídeo das escolas para a exibição do documentário “Lixo Extraordinário”, que tem 100 minutos de duração. O encontro se estendeu por duas horas na turma que teve aulas aos sábados e duas aulas consecutivas de 50 minutos para a turma que teve o curso durante a semana.

O documentário, produzido pelo inglês Angus Aynsley e pela empresa O2 filmes, de Fernando Meirelles retrata o trabalho do artista plástico brasileiro Vik Muniz com catadores de material reciclável em um dos maiores aterros controlados do mundo, no Jardim Gramacho, Rio de Janeiro. O documentário conta a história de sete catadores de lixo retratados nas obras de Vik Muniz, bem como a mudança que esta interação causou. Com base no filme foi possível abordar questões como o reuso do lixo, o papel da arte na conscientização das pessoas quanto a problemas ambientais e os impactos sociais relacionados aos resíduos.

As discussões relacionaram o poder aquisitivo e as oportunidades de vida das pessoas com a problemática dos resíduos, envolvendo a responsabilidade de enxergarmos estas realidades e compreendermos a complexidade que as envolve. De acordo com Silva et al. (2014), que trabalharam com comunidades de catadores de um município brasileiro de Pernambuco, estas pessoas não conseguem reconhecer sua importância quanto à melhoria ambiental, principalmente por causa da marginalização

que sofrem por parte da sociedade. Atividades reflexivas, de discussão e exposição, aumentaram a conscientização ambiental dos catadores e a percepção de suas importâncias, estimulando novas fontes de renda, com o artesanato a partir do reuso do lixo e o aumento da variedade de materiais separados para reciclagem (Silva et al., 2014). De forma semelhante, Sidegun et al. (2015), que trabalharam com catadores de três cidades do Rio Grande do Sul, ressaltam que, apesar destas pessoas terem importância ambiental fundamental, passam despercebidos como atores sociais. Novamente, a marginalização dos catadores traz insegurança quanto as suas próprias percepções, limitando suas capacidades de atuação (Sidegun et al., 2015). Por isso, discussões como as possibilitadas pelo documentário “Lixo Extraordinário” neste encontro, contribuem para reduzir os preconceitos dos alunos em relação aos catadores, que passam a ser enxergados com um destaque na problemática ambiental dos resíduos.

#### *✧ 5º Encontro: Para onde vai o lixo?*

Propõe-se a visita a locais da cidade para onde se destine o lixo, como lixões, aterros sanitários, centros de triagem de materiais recicláveis, indústrias de reciclagem, composteiras, oficinas de transformação de materiais, estações de tratamento de esgoto, setores de tratamento de efluentes industriais ou corpos d’água que recebam despejo de efluentes. A seleção destes locais depende das características da cidade, disponibilidade de transporte e possibilidade de visitação. Realizamos visitas temáticas ao Centro de Divulgação Científica e Cultural (CDCC) da Universidade de São Paulo (USP), nas quais os alunos tiveram contato com uma injetora de plástico e um jardim agroecológico. Os alunos puderam entender o processo de reciclagem de plásticos e sua demanda energética, bem como a compostagem e seus benefícios para o ambiente ao mitigar os problemas gerados pelos resíduos orgânicos.

Nesta atividade, os alunos puderam manusear a injetora de plástico, a composteira e um minhocário, tendo um aprendizado prático dos processos. Colombo Junior et al. (2009) analisaram a efetividade de uma visita a um observatório astronômico com crianças de 3º e 4º ano do ensino fundamental, observando que a atividade trouxe motivação, complementou os assuntos vistos de maneira formal em sala de aula e despertou o interesse dos alunos em fazerem novas visitas, incluindo seus familiares. Podemos supor, portanto, que com a visita realizada os alunos se

sensibilizaram mais quanto às suas responsabilidades perante os resíduos gerados, sendo estimulados a adotarem práticas mais conscientes e propagarem estas atitudes aos seus familiares. A Figura 2 retrata os ambientes visitados pelas turmas participantes.



**Figura 2. Espaços visitados no Centro de Divulgação Científica e Cultural (CDCC).** Visita à injetora de plástico e ao quintal agroecológico, abordando as importâncias da reciclagem, da compostagem e da reutilização de resíduos em atividades domésticas.

#### *✧ 6º Encontro: A importância das pesquisas*

Propomos visitas à locais da cidade que gerem e disponibilizem informações e tecnologias para a melhoria dos problemas causados pelos resíduos, como universidades, laboratórios, centros de pesquisa, ONGs ambientais e bibliotecas. Além disso, os alunos ainda podem ser levados a um ecossistema natural típicos da região, o qual seria afetado pelos resíduos. Em nosso trabalho, levamos os alunos com ajuda dos pais e de vans escolares à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), na qual foi visitado o Laboratório de Biotecnologia de Algas, a Biblioteca Comunitária e um fragmento de cerrado. Esta visita, envolvendo os três locais citados, teve duração de entorno de três horas e meia. Além disso, as duas turmas que participaram do curso também realizaram esta atividade separadamente. A Figura 3 retrata os locais visitados neste encontro.



**Figura 3. Espaços visitados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).** Visita ao Laboratório de Biotecnologia de Algas, à Biblioteca Comunitária e a um fragmento de cerrado, retratando locais que geram e disponibilizam conhecimentos científicos, bem como um ambiente natural existente na cidade.

O Laboratório de Biotecnologia de Algas desenvolve pesquisas referentes ao cultivo de microalgas em resíduos como a vinhaça, buscando a biorremediação do resíduo e a geração de biomassa comercialmente valorizada (Candido e Lombardi, 2017). Na visita foram discutidas as importâncias das pesquisas para a criação de novos tratamentos e tecnologias envolvendo o descarte dos resíduos, bem como de materiais menos poluentes e duradouros. A conscientização ambiental gera mudanças de hábitos como o consumo consciente, que considera os resíduos e impactos ambientais gerados por um produto dentre os critérios de compra (Bertolini e Possamai, 2005). Desta maneira, conhecer os desafios no desenvolvimento de novos tratamentos é importante para a conscientização ambiental.

A visita à Biblioteca Comunitária da UFSCar objetivou mostrar aos alunos que eles podem ter acesso aos conhecimentos produzidos por pesquisadores, bem como a conteúdos importantes para a compreensão das questões ambientais. Os alunos puderam conhecer os diversos tipos de materiais e publicações disponíveis em uma biblioteca universitária e a forma de encontrá-los. Com a visita a estes locais, os alunos puderam notar a importância do conhecimento científico para minimizar problemas ambientais como os causados pelos resíduos. A alfabetização científica permite o entendimento prático do dia-a-dia a partir dos conhecimentos científicos, sendo um processo vitalício e que ocorre em diversas esferas de ensino, não apenas na escola (Delizoicov e Lorenzetti, 2001). Neste contexto, as visitas, saídas de campo e atividades práticas permitem a alfabetização científica por meio da interação com os cenários e agentes, ajudando a construir relações entre a experiência prática e o conhecimento científico.

Na terceira etapa, os alunos visitaram um fragmento de cerrado protegido dentro do *campus* da UFSCar para conhecimento da fauna e flora locais e dos serviços ecossistêmicos providos por este ambiente, como proteção e reposição dos lençóis freáticos e nascentes, geração de produtos medicinais e recursos ornamentais, proteção e manutenção da fertilidade do solo e da qualidade do ar, amenização da temperatura, recreação e Educação Ambiental (Andrade e Romeiro, 2009). Os alunos puderam observar a gravidade dos prejuízos ocasionados a este tipo de ambiente pela geração de resíduos de maneira cada vez mais acelerada, envolvendo consequências negativas para o próprio ser humano e para toda a comunidade de nossos ecossistemas naturais.

#### ✧ *7º Encontro: Jogo de perguntas e respostas*

Foram feitas previamente quinze cartas contendo perguntas testes sobre as discussões construídas e assuntos abordados durante as visitas, referentes aos resíduos. Em uma caixinha, colocaram-se números de 1 a 15 e três papeis com a palavra “volta”. Foram feitas ainda cinco cartas maiores com as letras das alternativas das questões, de A até E. A Figura 4 retrata os materiais confeccionados para este jogo.



**Figura 4. Jogo de perguntas e respostas sobre resíduos.** Cartas com perguntas, letras das alternativas, números das questões e medalha entregue aos vencedores do jogo proposto no encontro.

As cinco letras das alternativas de A até E foram colocadas na lousa, distanciadas umas das outras. Um aluno tirou o número de uma questão da caixinha. A pergunta e as alternativas da questão correspondente foram lidas aos alunos, que anotaram em seus cadernos a alternativa que julgaram correta. Em seguida, cada aluno ia em direção a letra da lousa que haviam anotado em seus cadernos. Os alunos que erravam a resposta saíam do jogo e os que acertavam respondiam a próxima pergunta da mesma maneira. Se ao invés de tirar um número da caixinha, fosse retirada a palavra “volta”, os alunos que haviam saído do jogo respondiam à próxima questão. Quem levantasse a mão e respondesse corretamente primeiro, voltava ao jogo. Esta sequência foi repetida até restar apenas o aluno vencedor, que ganhou uma medalha confeccionada em restos de papelão e papel cartão. Novamente, os alunos mostraram-se muito empolgados e motivados. Os jogos didáticos estimulam o interesse do aluno, desenvolvem aspectos sociais dos participantes e possibilitam avaliação da aprendizagem pelo professor, contribuindo para a construção do conhecimento científico (Campos et al., 2003; Domingos e Recena, 2010), daí a importância da realização desta atividade.

No final do encontro, os alunos se organizaram em grupos para o desenvolvimento do trabalho final, no qual criariam uma campanha de conscientização na escola. Assim como já apontado e de acordo com Bertolini e Possamai (2005), a conscientização é fundamental para fazer as pessoas atuarem de maneira menos impactante sobre o ambiente por meio da mudança de hábitos. O objetivo deste

trabalho, portanto, foi possibilitar a reflexão sobre os problemas relacionados aos resíduos não só aos alunos participantes do curso, mas também ao público das escolas. Para isso, houve a separação de seis grupos de trabalho, com três a nove alunos, na sala com 35 alunos. Já a turma com oito alunos permaneceu unida e confeccionou um trabalho único.

### ✧ 8º Encontro: *Feedback sobre o curso*

Os participantes tiveram metade do período para discutirem e planejarem a atividade que desenvolveriam para conscientizar outros alunos a respeito dos resíduos. O intuito era que os grupos adotassem formas de apresentação variadas e abordassem aspectos diferentes do tema, tornando a campanha mais diversificada. Apesar da dificuldade em planejar atividades com metodologias variadas de ensino e aprendizagem, esta diversificação desperta interesse e expectativas nos alunos, possibilitando a geração de autonomia quanto a um conteúdo (Zuanon e Diniz, 2010).

Na segunda parte do encontro foi entregue uma folha com seis perguntas, cujos enunciados estão descritos abaixo, para os alunos relatarem suas opiniões sobre o curso:

- “1) Antes de começarmos o curso, você nos falou sobre sua opinião a respeito da questão dos resíduos, envolvendo pontos como as causas, consequências, dimensões e formas com que lidamos. Após as atividades do curso, houve alguma mudança na sua opinião?
- 2) Você consegue destacar o que aprendeu de mais importante ou interessante durante o curso?
- 3) Você acha que houveram atividades desnecessárias ao longo do curso, devido a forma com que foram realizadas ou aos assuntos abordados? Por que?
- 4) Ao longo do curso foram usadas diferentes metodologias (*brain storm*, discussões, pesquisas na internet, jogos interativos, jogos reflexivos, visitas, aulas expositivas). De quais você mais gostou? Por que?
- 5) Houve alguma metodologia empregada que você não gostou ou acha que não contribuiu para a aprendizagem? Explique.
- 6) Você recomendaria o curso pensando o ambiente para outros colegas? ”

Houve a participação de 41 alunos, dos 43 que compareceram às atividades. Vinte e três alunos disseram que o curso mudou suas opiniões e visões sobre a problemática dos resíduos e seis alunos disseram que não mudou, mas contribuiu para que adquirissem conhecimentos que embasassem ainda mais suas concepções e

aumentassem suas preocupações ambientais. Apenas doze alunos disseram que suas opiniões não foram alteradas pelo curso, todos da turma em que o curso foi oferecido em horário de aula e com presenças em menos de metade dos encontros.

Ao serem questionados sobre o que aprenderam de mais importante, os alunos apontaram a existência de outros resíduos além do lixo, como os efluentes, maneiras corretas de descartar e tratar diferentes tipos de resíduos, a importância e os gastos com a reciclagem, nossa capacidade de ação, a existência de leis e órgãos de fiscalização quanto ao descarte dos resíduos, a política dos 3 Rs (reduzir, reutilizar e reciclar), a geração de conhecimentos científicos e características dos ambientes naturais impactados pelos resíduos. Os alunos julgaram que todos temas abordados e metodologias empregadas foram necessários, contribuindo de diferentes formas para a aprendizagem. Esta visão corrobora as discussões de Zuanon e Diniz (2010), que notaram que a diversificação metodológica e a realização de atividades em que os alunos são mais atuantes são efetivas para a aprendizagem dos conteúdos de Ciências. Alguns alunos destacaram ainda a aplicabilidade destes conhecimentos, que são muito presentes em seus cotidianos.

A maioria dos alunos apontaram as visitas e jogos como atividades que mais gostaram, dizendo contribuírem de forma divertida, dinâmica e prática para a aprendizagem, o que coincide com as visões de Delizoicov e Lorenzetti (2001), Campos et al. (2003), Colombo Júnior et al. (2009) e Coutinho et al. (2018). Os alunos ainda disseram que conheceram locais da cidade que nunca tinham ido e talvez não tivessem oportunidade de estarem. Alguns ressaltaram ainda a importância das discussões, que permitiram que expressassem suas opiniões e vissem como seus colegas pensam sobre o assunto. A argumentação possibilita a reflexão, a construção de novos sentidos, trocas de opiniões e o desenvolvimento do raciocínio, mas, para isso, a mediação do professor é fundamental (Chiaro e Leitão, 2005), como ocorrido em nossos encontros. Por fim, todos alunos indicariam o curso, por se tratar de uma forma divertida para aprender e refletir sobre uma questão ambiental tão importante quanto os resíduos.

### *✧ 9º Encontro: Campanha de conscientização*

Para a apresentação dos trabalhos finais, as turmas de oitavo ano da escola pública foram reunidas no anfiteatro e as da escola particular assistiram à apresentação



individualmente na sala de multimídia. Como nesta turma os alunos trabalharam em um grupo único, foi desenvolvida uma apresentação mista, com interações, áudios, vídeos imagens, canções, dinâmicas, atuações e práticas abordando os resíduos no período de uma aula. Na turma maior, os seis grupos formados apresentaram seus trabalhos durante o período total de uma aula. Tivemos uma apresentação de slides sobre o que são resíduos e seus tipos, um vídeo abordando formas de descarte, um cartaz a respeito das ações de redução, reutilização e reciclagem, uma pesquisa sobre os problemas do lixo hospitalar, uma história em quadrinhos falando de nossas responsabilidades e atuações e um teatro sobre consequências negativas do descarte incorreto dos resíduos.

Nesta campanha, os participantes do curso aprofundaram seus conhecimentos e se expressaram, colocando suas habilidades e criatividade em prática. A confecção e apresentação de trabalhos pelos participantes permitiu que estes se responsabilizassem pelo processo de ensino-aprendizagem, ajudando a desenvolver a coletividade e a reflexão necessárias para a conscientização ambiental (Zuanon e Diniz, 2003). Acredita-se que os ouvintes também puderam refletir e se interessar pelo tema.

Ao final do curso, os participantes foram presenteados com certificados assinados pelas pesquisadoras, formalizando o encerramento das atividades e valorizando a presença dos alunos. A Figura 5 apresenta o momento de sua entrega no encerramento do curso em uma das turmas.



**Figura 5. Entrega do certificado.** Momento da entrega do certificado aos participantes do curso de uma das turmas ao final das apresentações de trabalhos aos outros alunos de 8º ano da escola.

## 4.0 CONCLUSÕES

A análise das concepções dos alunos nos permitiu refletir acerca da visão sobre a problemática dos resíduos pela sociedade. Os alunos têm conhecimentos mais aprofundados sobre impactos ambientais, resíduos sólidos e reciclagem, que estão mais presentes no cotidiano e são mais abordados na grade curricular escolar, demonstrando a importância da vivência e da educação formal para a formação dos cidadãos. Já conceitos relacionados aos efluentes, à produção de resíduos pelos setores industrial, incluindo o agropecuário e o energético e à fiscalização do destino dos resíduos, são menos conhecidos. Este desconhecimento, aliado à visão cultural de que a maior parte da responsabilidade quanto ao problema cabe aos governantes, contribuem para nossa falta de ação, baixa pressão popular sobre as entidades fiscalizadoras e pequeno entendimento e reconhecimento das pesquisas ambientais. Este cenário pode ser ainda mais problemático futuramente com a redução da área da Educação Ambiental na BNCC, que direcionará o currículo do Ensino Fundamental a partir de 2020.

As atividades propostas no curso “Pensando o ambiente” abordaram diferentes aspectos da temática dos resíduos. Ao oferecer o curso como atividade extracurricular, foi possível discussões e reflexões aprofundadas, contribuindo com a formação de indivíduos ambientalmente engajados e que possam atuar como dissipadores de conhecimentos e atitudes. Já em sala de aula, podem ser necessárias algumas modificações no cronograma, mas, ainda assim, há estímulo aos alunos, que refletiram sobre aspectos não abordados no histórico escolar. Propostas como esta, que podem ser aplicadas em outros ambientes de aprendizagem que não apenas o escolar, tendem a ganhar ainda mais importância devido à ausência de discussões referentes à temática ambiental na nova diretriz curricular imposta. Espera-se que esta proposta possa ser adotada, ainda que parcialmente, por professores de Ciências ou em projetos interdisciplinares, contribuindo para complementar os temas ambientais já incorporados na educação escolar brasileira.

**Anexo 1. Jogo “Caça ao tesouro”.** Exemplos de perguntas, respostas e pistas para um dos grupos participantes do jogo “Caça ao tesouro” realizado no 3º encontro. Para o segundo ou demais grupos basta inverter a ordem das perguntas e pistas.

**→ Perguntas para o grupo 1:**

- 1) O que são resíduos sólidos? Onde são produzidos?
- 2) Quais são as três principais maneiras para melhorarmos a questão dos resíduos sólidos?
- 3) Quais as responsabilidades do Governo quanto aos resíduos sólidos?
- 4) Quais são as formas de disposição final dos resíduos sólidos existentes atualmente?
- 5) O que é chorume e biogás?
- 6) Além dos resíduos sólidos, que outros resíduos são gerados pela humanidade? Onde são produzidos?
- 7) Quais os possíveis destinos para os efluentes domésticos?
- 8) Quem fiscaliza se o descarte de efluentes está adequado?
- 9) O tratamento inadequado de resíduos pode gerar grandes desastres como... (falem dois).
- 10) O que nós podemos fazer para melhorar a questão dos efluentes?

**→ Respostas esperadas para o grupo 1:**

- 1) São materiais sólidos resultantes da atividade industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços, de estações de tratamento de água e instalações de controle de poluição que não têm mais utilidade.
- 2) Reduzir a produção com um consumo mais consciente, reutilizar e reciclar o que for possível.
- 3) O governo tem a responsabilidade pela gestão e ações gerenciadoras relativas às diversas etapas relacionadas aos resíduos sólidos, desde a geração até a destinação final.
- 4) Lixão, Aterro controlado, Aterro sanitário, Reciclagem, Compostagem e Incineração.
- 5) Chorume é um líquido produzido a partir da degradação biológica dos resíduos orgânicos presentes no aterro e biogás é um gás gerado no interior dos aterros devido às reações bioquímicas que ali ocorrem.
- 6) Os efluentes líquidos e gasosos, gerados pelos domicílios, indústrias, incluindo o setor energético, mineração e agricultura.
- 7) Fossas sépticas, redes municipais de esgoto, estações de tratamento de esgoto e diretamente nos corpos d'água ou no solo (em locais sem saneamento básico).
- 8) O Ministério Público, a Polícia Federal, órgãos filiados ao governo federal, como o IBAMA, e entidades de proteção ambiental, como a CETESB no estado de São Paulo.

9) O desastre de Mariana, o do Césio 137 em Goiânia, rompimento da barragem de Cataguazes, explosão de Chernobyl.

10) Consumir menos, buscar comprar de empresas mais responsáveis, ajudar a vigiar e denunciar o descarte inadequado de efluentes e pressionar o governo para o cumprimento das leis e penalizações de empresas.

**→ Dicas para encontrar as pistas para o grupo:**

1) Para encontrarem a próxima pista, vão até o local onde a turma deveria depositar os resíduos sólidos que produzem (lixeira da sala de aula).

2) A próxima pista está em um local destinado a uma das medidas que vocês citaram em sua resposta (latas para separação de lixo reciclável).

3) Vão até o local da escola que tem uma posição semelhante à do governo de um país para encontrarem a próxima pista (diretoria).

4) Procurem a próxima pista no local em que os funcionários da escola colocam os resíduos sólidos para serem coletados (lixeira disposta na rua para coleta do lixo).

5) O uso do chorume e do biogás pode gerar um “produto” indispensável para a sociedade moderna. Na escola este “produto” permite que saibamos quando as aulas começam e terminam (dispositivo para tocar o sinal entre as aulas).

6) Na escola também geramos muitos efluentes líquidos. Busquem a próxima pista onde a maior parte destes efluentes é gerado (banheiro).

7) Após o tratamento, parte do esgoto volta aos rios e esta água pode ser coletada novamente para nosso uso. Busquem a próxima pista em um local onde vocês obtêm água na escola (bebedouro de água).

8) Os órgãos fiscalizadores divulgam e executam as leis relacionadas ao descarte de efluentes, assim como os professores o fazem na escola com o conhecimento. Onde podemos encontra-los? (sala dos professores).

9) Procurem a última pista próximo ao local onde os principais acontecimentos escolares são arquivados (secretaria).

10) Achem seu tesouro no local onde se reúnem com seus colegas para assistir vídeos que aumentam seu conhecimento e sua capacidade de decisão e intervenção (sala de multimídia ou de vídeo aulas).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No modo de vida atual, a demanda energética crescente é responsável pelo aumento na produção de resíduos do setor sucroalcooleiro, como a vinhaça. Neste contexto, apresentamos nesta tese uma alternativa de uso para a vinhaça e maneiras de divulgar a problemática dos resíduos para a sociedade. Ambas medidas são importantes para a sociedade. No primeiro caso, temos uma forma de reduzir um problema ambiental com a remediação de um resíduo, enquanto no segundo, estimulamos a conscientização ambiental de alunos, que passam a ser multiplicadores dos conceitos e da necessidade preservação ambiental.

Incrementamos, avaliamos e comparamos as viabilidades de dois processos de tratamento da vinhaça, constatando que a centrifugação se mostrou mais praticável do que a adsorção do resíduo por argila esmectita e carvão ativado. A partir destes resultados, tentamos melhorar o cultivo de microalgas em vinhaça centrifugada pela seleção, aclimação e seleção artificial por re-isolamento de cepas. Foram selecionadas oito espécies algais que apresentaram melhor desempenho no resíduo usado em concentrações de vinhaça centrifugada que permitiram os crescimentos ótimos. A redução do crescimento algal com a aclimação e o re-isolamento mostraram ser necessário o uso de inóculos livre de contaminantes para início dos cultivos em vinhaça. Com inóculos livres de contaminantes biológicos, concluiu-se que a contaminação por fungos e bactérias não foi preponderante nas biomassas produzidas em vinhaça, provavelmente em decorrência das diluições do resíduo, necessárias para o crescimento ótimo das microalgas. As cepas que geraram maior produção de biomassa seca, proteínas e carboidratos foram *H. pluvialis*, *S. quadricauda* e *T. gracilis* em 5% de vinhaça centrifugada, indicando uso promissor para as usinas sucroalcooleiras. Além disso, através de comparações entre fotossíntese e taxas de crescimento, constatou-se que a vinhaça estimulou o metabolismo mixotrófico em todas as microalgas analisadas, que utilizaram as fontes inorgânica e orgânica de carbono em diferentes proporções. Isto sugere aplicações biotecnológicas variadas para as diferentes espécies.

Este trabalho aborda a questão da vinhaça de maneira diferenciada do que encontramos na literatura, possibilitando a comparação das condições experimentais adotadas para diversas microalgas e a seleção de condições mais produtivas de uso do resíduo. Ao mesmo tempo que propomos um uso sustentável para um resíduo altamente

poluente, geramos dados de interesse industrial, que podem contribuir para a geração de mais lucros às usinas sucroalcooleiras, aumentando as chances de o processo ser efetivamente aplicado. Porém, para que a vinhaça possa ser aproveitada de maneira viável e concreta pelas usinas sucroalcooleiras, são necessários mais estudos de prospecção de espécies e de ampliação de escala de cultivo, a fim de aproximar o conhecimento científico das condições de aplicação reais nestas indústrias.

Quanto à parte pedagógica desenvolvida, ao avaliar as concepções dos alunos sobre a temática dos resíduos, observamos maior conhecimento de temas como lixo e reciclagem, ao passo que questões envolvendo efluentes industriais, como a vinhaça, fiscalização ambiental e medidas mitigadoras são menos conhecidas. Este desconhecimento pode ser sugerido como um dos responsáveis pela redução da atuação popular em questões ambientais e prejudicaria o entendimento e a valorização de pesquisas relacionadas. Com base nestas percepções, planejamos, aplicamos e avaliamos as atividades do curso “Pensando o ambiente”, que abordaram diversos aspectos do problema com metodologias variadas, em duas escolas da cidade. Desta forma, pudemos contribuir para formar cidadãos mais engajados ambientalmente, com atitudes e ações mais conscientes. Espera-se ainda que as investigações de concepções e as intervenções propostas no curso possam servir como inspiração para professores e educadores ambientais.

Seja buscando estratégias biotecnológicas para a vinhaça ou estimulando adolescentes a serem mais engajados ambientalmente, este trabalho de doutorado contribuiu para a mitigação de problemas ambientais gerados pela vinhaça, refletindo em um processo de produção do etanol mais sustentável. Grupos de pesquisa que busquem ampliar a escala de aplicação das condições de cultivos aqui selecionadas e educadores que propaguem as propostas pedagógicas aqui desenvolvidas são de extrema importância para que a sociedade possa se beneficiar de nossos achados, contribuindo para um meio ambiente mais saudável e melhoria de nossa qualidade de vida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRELPE - Associação Brasileira de Empresas de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (2016). Panorama dos Resíduos sólidos no Brasil. Disponível em: <http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2016.pdf>. Acessado em 11.03.2018.
- AFNOR – Association Française of Normalization (1980). Essais des eaux. Determination of inhibition of *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme Experimentale T90-304.
- Albalasmeh AA; Berhe AA; Ghezzehei TA (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydrate polymers, 97 (2), 253 – 61.
- Almeida ALM (2011). Leis regulamentam o tratamento para emissão de efluentes. Revista TAE. Disponível em: <http://www.meiofiltrante.com.br/internas.asp?id=11766&link=noticias>. Acessado em: 19.03.2018.
- Almeida OS; Boas IFV; Amaral CLF (2015). Abordagem das dimensões conceitual, procedimental e atitudinal da temática meio ambiente em livros didáticos de ciências com base nos parâmetros curriculares nacionais. Revista Eletrônica de Biologia (REB). ISSN 1983-7682, 8 (1), 29-53.
- Alvarenga RP; Queiroz TR (2009). Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. In International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo: May 20th-22nd–2009.
- Andrade DC; Romeiro AR (2009). Serviços ecossistêmicos e sua importância para o sistema econômico e o bem-estar humano. Campinas: IE/UNICAMP, 44p.
- APHA - American Public Health Association (1995). Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater. 19<sup>th</sup> ed., AWWA, WPCF, Washington, D.C.
- Arroyo, MG (2013). Currículo, território em disputa. Ed. Vozes Limitada, Petrópolis/RJ, 375p.
- Asma VM; Mathew KJ (2001). Uptake of an organochlorine insecticide by a microalga *Tetraselmis gracilis*. Indian Journal of Fisheries, 48, 40-54.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (1986). Estudo de concepções de sistemas de esgoto sanitário, NBR 9648.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (1987). Critérios para o lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público do esgoto sanitário, NBR 9800. Disponível em: <http://www.abnt.org.br/catalogo>. Acessada em: 19.03.2018.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (2004). Classificação de resíduos sólidos, NBR 10004.

- Barrocal VM; García-Cubero MT; González-Benito G; Coca M (2010). Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *New biotechnology*, 27 (6), 851 – 6.
- Bebé FV; Rolim MM; Pedrosa EM; Silva GB; Oliveira VS (2009). Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 13(6), 781-787.
- Behrend DM; da Silva Cousin C; do Carmo Galiuzzi M (2018). Base Nacional Comum Curricular: o que se mostra de referência à educação ambiental? *Ambiente & Educação - Revista de Educação Ambiental*, 23(2), 74-89.
- Beltrame TF; Beltrame AF; Lhamby A; Pires VK (2016). Efluentes, resíduos sólidos e educação ambiental: Uma discussão sobre o tema. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 20(1), 283-294.
- Bertolini GR.; Possamai O (2005). Proposta de instrumento de mensuração do grau de consciência ambiental, do consumo ecológico e dos critérios de compra dos consumidores. *Revista de Ciência e Tecnologia*, 13(25/26): 17-25.
- Bonini MDA (2016). Potencial de utilização de vinhaça como meio para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*: aspectos toxicológicos e microbiológicos. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos/SP.
- Borges LV; Faria BM; Odebrecht C; Abreu PCOV (2007). Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de Desenvolvimento limpo”. *Revista Atlântica*, Rio Grande, 29 (1), 35 – 46.
- Borowitzka MA (2013) High-value products from microalgae — their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 25, 743–756
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (1986). Resolução nº 001 de 23/01/1986. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res0186.html>. Acessado em: 07.dez.2018.
- Brasil. Secretaria de Educação Fundamental (1998). Parâmetros curriculares nacionais: terceiro e quarto ciclos do Ensino fundamental - Ciências Naturais. Brasília: MEC / SEF, 138 p. Disponível em: <http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/ciencias.pdf>. Acessado em: 07.dez.2018.



- Brasil. Secretaria de Educação Média e Tecnológica (2000). Parâmetros curriculares nacionais: Ensino Médio Parte III - Ciências da Natureza e Matemática e suas Tecnologias. Brasília: MEC / SEF, 58 p.
- Brasil. Presidência da República. Casa Civil (2010). Lei 12.305/2010 - Política Nacional de Resíduos Sólidos. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2010/lei/112305.htm). Acessado em: 26.mar.2018.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente (2011). Resolução CONAMA 430/ 2011 – Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acessado em: 26.mar.2018.
- Brasil. Ministério da saúde (2018). Portal ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/vigilancia-sanitaria-no-brasil>. Acessado em: 25.mar.2018.
- Brasil. Ministério da Educação - MEC (2019). Base Nacional Comum Curricular (BNCC) – Ensino Fundamental. Brasília: MEC, 600 p. Disponível em: [http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC\\_EI\\_EF\\_110518\\_versaofinal\\_site.pdf](http://basenacionalcomum.mec.gov.br/images/BNCC_EI_EF_110518_versaofinal_site.pdf). Acessado em: 15.nov.2019.
- Buckler ES; Thornsberry JM.; Kresovich S (2001). Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetics Research*, 77 (3), 213-218.
- Budiyono IS; Sumardiono S; Sasongko SB (2013). Production of *Spirulina platensis* biomass using digested vinasse as cultivation medium. *Trends in Applied Sciences Research*, 9, 93.
- Camargo EC; Lombardi AT (2018). Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. *Journal of Applied Phycology*, 30: 861–871.
- Campos LML; Bortoloto TM; Felício AKC (2003). A produção de jogos didáticos para o ensino de ciências e biologia: uma proposta para favorecer a aprendizagem. *Caderno dos núcleos de Ensino*, 3548: 47-60.
- Campostrini E (2010). Fluorescência da clorofila *a*: considerações teóricas e aplicações práticas. Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro / RJ. Disponível em: [http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO\\_CCTA\\_1629\\_1112121492.pdf](http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf). Acessado em: 28.jan.2018.
- Candido C; Lombardi AT; Lima MIS (2015). Processo de tratamento de vinhaça, vinhaça tratada e uso da mesma. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), BR 10 2015 024100 3.

- Candido C; Lombardi AT (2017). Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. *Journal of Applied Phycology*, 29 (1), 45-53. DOI: 10.1007/s10811-016-0940-2.
- Candido C; Lombardi AT (2018). The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. *Algal Research*, 30, 79-85.
- Carmo JBD; Filoso S; Zotelli LC; de Sousa Neto ER; Pitombo LM; Duarte-Neto PJ; Cantarella H (2013). Infield greenhouse gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *Gcb Bioenergy*, 5(3), 267-280.
- Carney LT; Lane TW (2014). Parasites in algae mass culture. *Frontiers in microbiology*, 5 (1): 278.
- Castiel LD; Sanz-Valero J (2007). Entre fetichismo e sobrevivência: o artigo científico é uma mercadoria acadêmica? *Cadernos de Saúde Pública*, 23, 3041-3050.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018). Portal do Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://cetesb.sp.gov.br/>. Acessado em: 26.mar.2018.
- CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (2006). Vinasse - criteria and procedures for application to agricultural soil. Technical norm P4231. São Paulo.
- Chen R; Blagodatskaya E; Senbayram M; Blagodatsky S; Myachina O; Dittert K; Kuzyakov Y (2012). Decomposition of biogas residues in soil and their effects on microbial growth kinetics and enzyme activities. *biomass and bioenergy*, 45, 221-229.
- Chiaro S; Leitão S (2005). O papel do professor na construção discursiva da argumentação em sala de aula. *Psicologia: reflexão e crítica*, 18(3), 350-357.
- Chu W (2012). Biotechnological applications of microalgae. *IeJSME*, 6.1: S24-S37.
- CIMM - Centro de Informática Metal Mecânica (2018). Efluentes industriais. Disponível em: [https://www.cimm.com.br/portal/material\\_didatico/3669-efluentes-industriais#.Wq-v323wbDc](https://www.cimm.com.br/portal/material_didatico/3669-efluentes-industriais#.Wq-v323wbDc). Acessado em: 19.03.2018.
- Coca M; Barrocal VM; Lucas S; González-Benito G; García-Cubero MT (2014). Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 306-312.
- Cochrane VW (1958). *Physiology of fungi*. John Wiley and Sons Inc.; London, 524p.
- Colombo Junior PD; Aroca SC; Silva CC (2016). Educação em centros de ciências: visitas escolares ao observatório astronômico do CDCC/USP. *Investigações em ensino de ciências*, 14(1): 25-36.
- Cosgrove J; Borowitzka MA (2010). Chlorophyll fluorescence terminology: an introduction. In *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. Springer, Dordrecht, 1-17.

- Costa PHA; Silva JV; Bezerra MA; Enéas Filho J; Prisco JT; Gomes Filho E (2003). Growth and organic and inorganic solute contents in NaCl stressed cultivars of *Vigna unguiculata*. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(3), 289 – 97.
- Costa RCD; Prates CPT (2005). O papel das fontes renováveis de energia no desenvolvimento do setor energético e barreiras à sua penetração no mercado. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, (21), 5-30.
- Coutinho JZSF; Cuconato LCS; Alcantara EFS (2018). Motivação e aprendizagem no contexto escolar. *Episteme Transversallis*, 11 (2): 133-144.
- Cruz JID; Portugal RDS; Lucendo M; Elis VR; Fachin SJDS; Ustra AT; Borges WR (2008). Detecção de contaminação de solo por vinhaça através de análise de dados de eletrorresistividade. *Revista Brasileira de Geofísica*, 26(4), 481-492.
- Darwin C (1880). *On the origin of species by means of natural selection: or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, Albemarle Street.
- Davies M; Martin T (2009). Mining market cycles and tailings dam incidents. In 13th International Conference on Tailings and Mine Waste, Banff, AB.
- Dayananda C; Sarada R; Rani UM; Shamala TR; Ravishankar GA (2007). Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass and Bioenergy*, 31(1), 87-93.
- Delizoicov D; Lorenzetti L (2001). Alfabetização científica no contexto das séries iniciais. *Ensaio Pesquisa em educação em Ciências*, 3(1): 37-50.
- Degenhart L.; Vogt M; Hein N; Rosa FD; Fank OL (2015). Ranking de Evidenciação dos Impactos Ambientais de Empresas Brasileiras: Um Comparativo entre os Métodos Multicritérios T-ODA e TOPSIS. XVII ENGEMA - Encontro Internacional sobre Gestão Empresarial e Meio Ambiente. Disponível em: <http://engemausp.submissao.com.br/17/anais/arquivos/369.pdf>. Acessado em: 19.dez.2018.
- Dewez D; Geoffroy L; Vernet G; Popovic R (2005). Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquatic toxicology*, 74(2), 150-159.
- Domingos DCA; Recena MCP (2010). Jogos didáticos no processo de ensino e aprendizagem de química: a construção do conhecimento. *Ciências & cognição*, 15(1), 272.
- Duarte F; Morais V; Maldonado-Hódar FJ; Madeira LM (2013). Treatment of textile effluents by the heterogeneous Fenton process in a continuous packed-bed reactor using Fe/activated carbon as catalyst. *Chemical engineering journal*, 232, 34-41.
- Ferreira JAM (2013). Tratamento de efluentes. VIII Encontro Nacional sobre Métodos dos Laboratórios da EMBRAPA. Jaguariúna, SP. Disponível em:

<http://www.cnpsa.embrapa.br/portalmet/images/arquivos/08MET/Palestras/tratamentoeffluentes.pdf>. Acessado em 19.03.2018.

- Fernandes RS; Souza VJD; Pelissari VB; Fernandes ST (2004). Uso da percepção ambiental como instrumento de gestão em aplicações ligadas às áreas educacional, social e ambiental. Encontro Nacional de Pós-Graduação e Pesquisa em Ambiente e Sociedade, 2(1), 1-15.
- Flynn KJ; Greenwell HC; Lovitt RW; Shields RJ (2010). Selection for fitness at the individual or population levels: Modelling effects of genetic modifications in microalgae on productivity and environmental safety. *Journal of theoretical biology*, 263(3), 269-280.
- Galvez A; Sinicco T; Cayuela ML; Mingorance MD; Fornasier F; Mondini C (2012). Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 160, 3-14.
- Gatti BA (2004). Estudos quantitativos em educação. *Educação e Pesquisa*, 30 (1).
- Genty B; Briantais JM; Baker NR (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 990(1), 87-92.
- Gilmore AM (1997). Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum*, 99: 197-209.
- Gollo AL; Silva ALL; Lima, KKD; Costa JDL; Camara MC; Biasi LA; Soccol CR (2016). Developing a plant culture medium composed of vinasse originating from *Haematococcus pluvialis* Culture. *Pak. J. Bot*, 48(1), 295-303.
- Haque F; Dutta A; Thimmanagari M; Chiang YW (2017). Integrated *Haematococcus pluvialis* biomass production and nutrient removal using bioethanol plant waste effluent. *Process Safety and Environmental Protection*, 111: 128-137.
- Hedges JI; Keil RG; Benner R (1997). What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic geochemistry*, 27 (5), 195-212.
- Henley WJ (1993). Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J Phycology*, 29, 729–739
- Hillebrand H; Dürselen CD; Kirschtel D; Pollinger U; Zohary T (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of phycology*, 35(2), 403-424.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45351.pdf>. Acessado em: 12.mar.2018.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2018). Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa Nacional por amostra de Domicílios de 2015. Disponível em: <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/educacao/anos-de-estudo-e-sexo.html>. Acessado em 26.mar.2018.

- INMET – Brazilian National Institute of Meteorology (2015). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/page&page=anomaliaTempMediaAnual>. Acessado em: 20.01.2017.
- Jeffrey SW; Humphrey GF (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 167 (2), 191–194.
- Johnson TJ; Jahandideh A; Isaac IC; Baldwin EL; Muthukumarappan K; Zhou R; Gibbons WR (2017). Determining the optimal nitrogen source for large-scale cultivation of filamentous cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 29(1), 1-13.
- Jones RI (2000). Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology*, 45, 19-226.
- Juneau P; Harrison PJ (2005) Comparison by PAM Fluorometry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. *Photochemistry and Photobiology*, 81 (1), 649 – 653.
- Kadioglu A; Algur OF (1992). Tests of Media with Vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for Possible Reduction in Vinasse Pollution. *Bioresource Technology*, 42 (1), 1-5.
- Klopprogge JT; Komarneni S; Amonette JE (1999). Synthesis of smectite clay minerals: a critical review. *Clays and Clay Minerals*, 47, 529-554.
- Kobayashi M; Kurimura Y; Kakizono T; Nishio N; Tsuji Y (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94-97.
- Kramer S (2002). Aatoria e autorização: questões éticas na pesquisa com crianças. *Cadernos de pesquisa*, (116), 41-59.
- Krause GH; Jahns P (2003). Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. *Light-harvesting antennas in photosynthesis*, 373 - 399. Springer Netherlands.
- Kromkamp JC; Forster RM (2003). The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *European Journal of Phycology*, 38 (2), 103–112.
- Lananan F; Jusoh A; Ali NA; Lam SS; Endut A, 2013. Effect of conway medium and f/2 medium on the growth of six genera of South China sea marine microalgae. *Bioresour. Technol.*, 141, 75-82.
- Lee RE (2008). *Phycology*. Cambridge University Press; 4<sup>a</sup> Ed.
- Li A; Stoecker DK; Adolf JE (1999). Feeding, pigmentation, photosynthesis and growth of the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum*. *Aquatic Microbial Ecology*, 19, 163-176.

- Liakos TI; Lazaridis NK (2016). Melanoidin removal from molasses effluents by adsorption. *Journal of water process engineering*, 10, 156-164.
- Lira Junior CA; Silva DS; Costa Filho APD; Lucas EF; Santana SA (2017). Smectite Clay Modified with Quaternary Ammonium as Oil Remover. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(2), 208-216.
- Lombardi AT; Maldonado MT (2011). The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis research*, 108 (1), 77-87.
- Mandal S; Shurin JB; Efrogmson RA; Mathews TJ (2018). Functional divergence in nitrogen uptake rates explains diversity–productivity relationship in microalgal communities. *Ecosphere*, 9(5), e02228.
- Marchello AE; Lombardi AT; Dellamano-Oliveira M.J.; Souza, CWO (2015). Microalgae population dynamics in photobioreactors with secondary sewage effluent as culture medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (1), 75-84.
- Marchello AE; dos Santos AC; Lombardi AT; de Souza CWO; Montanhim GC (2018). Physiological and Ecological aspects of *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *Microbial ecology*, 1-10. DOI: <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00248-018-1170-8>
- Marchiorato HB (2018). Educação Ambiental: a tecnologia a favor da natureza. *Kínesis - Revista de Estudos dos Pós-Graduandos em Filosofia*, 10(23): 85 - 99.
- Marques SSI; Nascimento IA; Almeida PF; Chinalia FA. (2013). Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171 (8), 1933-1943.
- Martins A; Pereira D; Almeida J; Carneiro M (2009). Medidas de fotossíntese - teoria e prática na fisiologia de macroalgas. II Workshop em Novos Bioativos de Macroalgas: Manejo e Cultivo, Conservação, Biotecnologia e Técnicas de Bioatividade, Ilhabela / SP. Disponível em: [www2.iq.usp.br/workshopalgas/WS.minicurso\\_PAM\\_apostila.doc](http://www2.iq.usp.br/workshopalgas/WS.minicurso_PAM_apostila.doc). Acessado em: 28.jan.2018.
- Mattos LFA; Bastos RG (2016). COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus sp.* *Desalination and Water Treatment*, 57(20), 9465-9473.
- Maxwell K, Johnson G (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal Exp Bot*, 51, 659–668
- Mitra D; Van Leeuwen JH; Lamsal B (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1 (1), 40 – 8.
- Moraes BS; Junqueira TL; Pavanello LG; Cavalett O; Mantelatto PE; Bonomi A; Zaiat M (2014). Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy,

- environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, 113, 825-835.
- Mota JC; Almeida MM; Alencar VC; Curi WF (2009). Características e impactos ambientais causados pelos resíduos sólidos: uma visão conceitual. *Águas Subterrâneas*, 1
- Mohana S; Acharya BK; Madamwar D (2009). Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 12-25.
- Moraes-Rocha GJ; Nascimento VM; Goncalves AR; Silva VFN; Martín C (2015). Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 64, 52-58.
- Morris EP; Forster RM, Peene J; Kromkamp JC (2008). Coupling between Photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. *Aquatic Microbial Ecology*, 3.
- Mucelin CA; Bellini M (2008). Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. *Sociedade & natureza*, 20 (1), 111-124.
- Musso TB; Parolo ME; Pettinari G; Francisca FM (2014). Cu (II) and Zn (II) adsorption capacity of three different clay liner materials. *Journal of environmental management*, 146, 50-58.
- Nabil GM; El-Mallah NM; Mahmoud ME (2014). Enhanced decolorization of reactive black 5 dye by active carbon sorbent-immobilized-cationic surfactant (AC-CS). *Journal of industrial and engineering chemistry*, 20(3), 994-1002.
- Neilson AH; Lewin RA (1974). The uptake and utilization of organic carbon by algae: an essay in comparative biochemistry. *Phycologia*, 13: 227-264.
- Nelson DL; Cox MM (2014). *Principles of Biochemistry*. Ed. Artmed S.A, Porto Alegre, Brazil.
- Oliveira, H. T. (1988). Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP – 211 / 11b). Dissertação do Programa em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). São Carlos / SP.
- Okada, T.; Seki, Y.; Ogawa, M. (2014). Designed nanostructures of clay for controlled adsorption of organic compounds. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14, 2121-2134.
- Oxborough K; Baker N (1997). Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm without measuring Fo. *Photosynthesis research*, 55 (1), 135 – 142.
- Patidar SK; Mitra M; George B; Soundarya R; Mishra S (2014). Potential of *Monoraphidium minutum* for carbon sequestration and lipid production in response to varying growth mode. *Bioresource technology*, 17, 32-40.
- Pereira E; Oliveira LC; Vallone A; Sapag K; Pereira M (2008). Preparação de carvão ativado em baixas temperaturas de carbonização a partir de rejeitos de café: utilização de FeCl<sub>3</sub> como agente ativante. *Química Nova*, 31(6), 1296-1300.

- Perez-Garcia O; Escalante FM; de-Bashan LE; Bashan Y (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45, 11-36.
- Platt TGCL; Gallegos CL; Harrison WG (1980). Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.* 38, 687–701.
- Polyorach S; Wanapat M; Wanapat S (2013). Enrichment of protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) by supplementing with yeast for use as animal feed. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(2): 142.
- Reis LCL; Semêdo LTDAS; Gomes RC (2012). Conscientização ambiental: da educação formal a não formal. *Revista Fluminense de Extensão Universitária*, 2(1): 47-60.
- Ralph PJ, Gademann R, Larkum AWD, Kühl M (2002) Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. *Mar Biol* 141: 639–646.
- Ralph PJ; Gademann R (2005). Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic botany*, 82(3), 222-237.
- Ramirez NNV; Farenzena M; Trierweiler JO (2014). Growth of microalgae *Scenedesmus sp* in ethanol vinasse. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 630-635.
- Rausch T (1981). The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, 78 (3), 237 – 251.
- Raven PH (2007). *Vegetal biology*. Guanabara Koogan: 7ª Ed.
- Reynolds CS (2006). *The ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds C (2006) Photosynthesis and carbon acquisition in phytoplankton. In: *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press Ed., New York, 535 p.
- Ricklefs RF; Relyea R (2014). *Ecology: The Economy of Nature*. Macmillan: 17<sup>th</sup> Ed.
- Rippka R; Deruelles J; Waterbury J; Herdman M; Stanier R (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. General Microbiology*, 111(1), 1-61.
- Robles-González V; Galíndez-Mayer J; Rinderknecht-Seijas N; Poggi-Varaldo HM (2012). Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of biotechnology*, 157(4), 524-546.
- Rocha GS; Pinto FHV; Melão MGG; Lombardi AT (2015). Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *Journal of applied phycology*, 27, 171-178.
- Rodrigues LHR; Raya-Rodriguez MT; Fontoura NF (2011). Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 3(8), 225-228.
- Rodolfi L; Chini Zittelli G; Bassi N; Padovani G; Biondi N; Bonini G; Tredici MR (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 100-112.



- Ryan D; Gadd A; Kavanagh J; Zhou M; Barton G (2008). A comparison of coagulant dosing options for the remediation of molasses process water. *Separation and Purification Technology*, 58, 347-352.
- Sales D; Valcárcel MJ; Pérez L; Martínez-Ossa E (1986). Physical-chemical treatments applied to wine-distillery waste. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 37(1), 407-414.
- Sanches CS (2000). Gestão ambiental proativa. *Revista de Administração de Empresas*, 40(1), 76-87.
- Santana H; Cereijo CR; Teles VC; Nascimento RC; Fernandes MS; Brunale P; Siqueira FG (2017). Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresource technology*, 228, 133-140.
- Santos RR; Araújo ODQF; Medeiros JL; Chaloub RM (2016). Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. *Bioresource technology*, 204, 38-48.
- Saros JE; Anderson NJ (2015). The ecology of the planktonic diatom *Cyclotella* and its implications for global environmental change studies. *Biological Reviews*, 90, 522-541.
- Sauze F (1973). Effets de la centrifugation apres floculation sur la charge polluante des vinasses de distillerie. *Indus Aliment Agr.*
- Serôdio J; Vieira S; Cruz S; Coelho H (2006). Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. *Photosynthesis research*, 90: 29-43.
- Schoonhoven E (2000). Ecophysiology of mixotrophs. Hypertext. Disponível em: <http://www.bio.vu.nl/thb/education/Scho2000.Pdf>. Acessado em 05.fev.2018.
- Schreiber U; Schliwa U; Bilger W (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research*, 10, 51-61.
- Sforza E; Cipriani R; Morosinotto T; Bertucco A; Giacometti GM (2012). Excess CO<sub>2</sub> supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *Bioresource technology*, 104: 523-529.
- Sheng G; Johnston CT; Teppen BJ; Boyd SA (2001). Potential contributions of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2899-2907.
- Shoaf WT; Lium BW (1976). Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*, 21(6): 926-928.
- Sidegum J; Silva DQ; Andrade RC; Basso CR (2015). A percepção dos catadores de lixo sobre a centralidade e significado do seu trabalho: Um estudo no Sul do Brasil. *Revista ESPACIOS*, 36(21).

- Silva MAS; Griebeler NP; Borges LC (2007). Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Eng. Agrícola Ambiental*, 11 (1), 108 – 14.
- Silva DN; Vaz NF; Castor PG; Oliveira TF; Guenther M (2014). Diagnóstico Socioambiental da Comunidade de Catadores de Lixo de Paudalho (PE-Brasil). *Iniciação Científica Cesumar, Maringá*, 16(2): 155 - 161.
- Silva E; Oliveira HM; Silva PM (2015). Consumismo, obsolescência programada e a qualidade de vida da sociedade moderna. *Educação Ambiental em Ação*. ISSN 1678-0701, 53 (1). Disponível em: <http://www.revistaaea.org/artigo.php?idartigo=2108>. Acessado em 26.mar.2018.
- Silva MA; Barbosa GH; Codato CB; Mattos LFA; Bastos RG; Kieckbusch TG (2017). Heterotrophic growth of green microalgae *Desmodesmus subspicatus* in ethanol distillation wastewater (vinasse) and lipid extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 573-579.
- Sisinno CLS; Moreira JC (2005). Ecoeficiência: um instrumento para a redução da geração de resíduos e desperdícios em estabelecimentos de saúde. *Cadernos de saúde pública*, 21: 1893-1900.
- Skovgaard A; Hansen PJ; Stoecker DK (2000). Physiology of the mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. I. Effects of phagotrophy and irradiance on photosynthesis and carbon content. *Marine Ecology Progress Series*, 201: 129-136.
- Snustad DP; Simmons MJ (2013). *Principles of Genetics*. Guamabara Koogan: 6<sup>th</sup> ed.
- Sousa SMZL (1997). Avaliação escolar e democratização: o direito de errar. Erro e fracasso na escola: alternativas teóricas e práticas. São Paulo: Summus, 125-139.
- Souza JF; Sarmiento R (2006). Sistema de avaliação do desempenho ambiental de atividades petrolíferas. In II Congresso Brasileiro de P&D em petróleo & gás. Rio de Janeiro.
- Souza GS; Machado PB; Reis VR; Santos AS; Dias VB (2014). Educação ambiental como ferramenta para o manejo de resíduos sólidos no cotidiano escolar. *Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)*, 8(2): 118-130.
- Stangherlin CC; Specht S (2014). Resíduos Sólidos: Percepções de Alunos do Ensino fundamental. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, 18(2): 919-927.
- Sutherland DL; Heubeck S; Park J; Turnbull MH; Craggs RJ (2018). Seasonal performance of a full-scale wastewater treatment enhanced pond system. *Water research*, 136, 150-159.
- Swenson W; Wilson DS; Elias R (2000). Artificial ecosystem selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 9110-9114.
- Sydney ED; Da Silva TE; Tokarski A; Novak AD; De Carvalho JC; Woiciechowski AL; Socol CR (2011). Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, 88(10), 3291-3294.

- UNICA. União da indústria de cana-de-açúcar (2017). Etanol, açúcar e energia. São Paulo. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 10. set. 2017.
- United States Environmental Protection Agency - USEPA (1991). Methods for aquatic toxicity identification evaluations: Phase I toxicity characterization procedures. EPA/600/6-91/003. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Duluth, MN. 87p.
- Wanderley LJ; Mansur MS; Milanez B; Pinto RG (2016). Desastre da Samarco/Vale/BHP no Vale do Rio Doce: aspectos econômicos, políticos e socioambientais. *Ciência e Cultura*, 68(3): 30-35.
- Wang H; Xiong H; Hui Z; Zeng X (2012). Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. *Bioresource Technology*, 104, 215-220.
- Werkneh AA; Habtu NG; Beyene HW (2014). Removal of hexavalent chromium from tannery wastewater using activated carbon primed from sugarcane bagasse: Adsorption/desorption studies. *American Journal of Applied Chemistry*, 2, 128-135.
- White S; Anandraj A; Bux F (2011). PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource technology*, 102: 1675-1682.
- Wright SI; Bi IV; Schroeder SG; Yamasaki M; Doebley JF; McMullen MD; Gaut BS (2005). The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, 308(5726), 1310-1314.
- Wood AM; Eneverroad RC; Wingard LM (2005). Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen RA (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, 577 p.
- Yu X; Zhao P; He C; Li J; Tang X; Zhou J; Huang Z (2012). Isolation of a novel strain of *Monoraphidium sp.* and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource technology*, 121, 256-262.
- Yu JX; Wang LY; Chi RA; Zhang YF; Xu ZG; Guo J (2015). Adsorption of Pb, Cd, Cu, and Zn from aqueous solution by modified sugarcane bagasse. *Research on Chemical Intermediates*, 41(3), 1525-1541.
- Zapata, NJG (2007). Acotinic acid in sugarcane: production and industrial application. Dissertation from the Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 164 p. Available in: [http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11132007-235550/unrestricted/Gil\\_Zapata\\_dis.pdf](http://etd.lsu.edu/docs/available/etd-11132007-235550/unrestricted/Gil_Zapata_dis.pdf). Acessado em 22. mar. 2017.
- Zuanon ACA; Diniz RES (2003). Aulas de biologia e a participação dos alunos: conhecendo como um grupo de estudantes do ensino médio avalia uma experiência. 4º Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências, 3(3): 49-59.

