



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**AGRICULTURA E AMBIENTE**



**TAISNE GONÇALVES VISENTIN**

**PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DO CULTIVO**  
**BATELADA E BATELADA ALIMENTADA DE *Phormidium autumnale***  
**EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Araras - SP**

**2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRICULTURA E AMBIENTE



TAISNE GONÇALVES VISENTIN

PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DO CULTIVO BATELADA E  
BATELADA ALIMENTADA DE *Phormidium autumnale* EM VINHAÇA DE CANA-DE-  
AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente como requisito à obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

Araras - SP

2020

Gonçalves Visentin, Taisne

Produção de bioprodutos a partir do cultivo batelada e batelada alimentada de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar / Taisne Gonçalves Visentin. -- 2020.  
131 f. : 30 cm.

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

Orientador: Reinaldo Gaspar Bastos

Banca examinadora: Erika Cristina Francisco, Claudinei Fonseca Souza

Bibliografia

1. Tratamento de efluentes. 2. Microalgas. 3. Biorrefinaria. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

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

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

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



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Taisne Gonçalves Visentin, realizada em 23/04/2020:

---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
UFSCar

11

---

Prof. Dr. Erika Cristina Francisco  
UNICAMP

11

---

Prof. Dr. Claudinei Fonseca Souza  
UFSCar

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Reinaldo Gaspar Bastos Erika Cristina Francisco, Claudinei Fonseca Souza e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, sou muito grata por Deus ter me guiado até aqui, por ter tido essa bela oportunidade e ter encontrado pessoas maravilhosas para que eu pudesse aprender e compartilhar conhecimento junto delas.

Agradeço ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pelo aprendizado, amizade, paciência, por toda a orientação e por ser gente boa.

Ao meu namorado Ronaldo, por sempre me dar força durante esse tempo, com sua companhia, com suas risadas, seu apoio incondicional e que não mediu esforços quando eu mais precisei.

Agradeço com muito carinho à minha família de Passo Fundo, à minha Mãe, meu Pai, meu Irmão, minha Irmã e minha Vó, que sempre me apoiaram mesmo de longe, com infinitas ligações e com belas palavras de confiança.

À Zenaide e ao Volmir pelas conversas dominicais que nos faziam se sentir mais em casa.

Agradeço muito ao pessoal do LABMAC pelos ensinamentos, pela amizade, pelo auxílio com experimentos, pelas risadas e por tornar tudo mais leve ao decorrer desses anos, obrigada Carol, Felipe, Tina, Laura, Amanda, Cláudia, Catarina, Prof<sup>a</sup>. Mariana e Mauricio.

À Tayla, Beatriz e Luana, pela amizade, pelo aprendizado que tivemos juntas, pela paciência e pelo auxílio nos experimentos.

Agradeço a minha turma do PPGAA que juntos conseguimos fazer um simpósio de se orgulhar.

À banca, pelas sugestões que proporcionaram o enriquecimento deste trabalho.

Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) pela formação profissional.

*"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seus semelhantes."*

*Albert Schweitzer*

# PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS A PARTIR DO CULTIVO BATELADA E BATELADA ALIMENTADA DE *Phormidium autumnale* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

**Autor: TAISNE GONÇALVES VISENTIN**

**Orientador: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS**

## RESUMO

Processos utilizando microalgas e cianobactérias no tratamento de efluentes agroindustriais têm sido atrativos devido à obtenção de biomassa com valor comercial associada à remoção eficiente de alguns contaminantes. O cultivo destes micro-organismos com geração de biomassa e obtenção de bioprodutos como as proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos é conhecida pelo termo "biorrefinaria microalgal". Neste contexto a presente pesquisa objetivou o cultivo heterotrófico da cianobactéria filamentosa *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar, avaliando a remoção de contaminantes com ênfase na obtenção de bioprodutos. Na primeira etapa, as maiores produtividades em biomassa foram obtidas a partir de um delineamento experimental composto central rotacional (DCCR) em agitador orbital, sendo de 127,20 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 107,91 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 31°C e 35°C, respectivamente, em razões C/N iniciais 16 e 23 e pH inicial de 8,4 e 7,5. Nessas condições a 35°C, foram obtidas remoções de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo de 49%, 47% e 28% respectivamente. No cultivo em biorreator de bancada batelada foram obtidas remoções de carbono orgânico (67%) e nitrogênio (70%), com produtividade máxima em termos de biomassa equivalente à melhor condição dos ensaios realizados em agitador orbital (DCCR). A biomassa de *P. autumnale* gerada em biorreator sistema batelada apresentou 21,33% de proteínas, 4,26% de lipídios, com ácidos graxos importantes para produção de biodiesel, 197,53 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> de ficocianina, composição variada de carboidratos (glicose 79,46 mg L<sup>-1</sup>, arabinose 44,53 mg L<sup>-1</sup>, manose 9,84 mg L<sup>-1</sup>, galactose 4,78 mg L<sup>-1</sup> e xilose 14,44 mg L<sup>-1</sup>) e 0,97 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores totais. O cultivo em biorreator sistema batelada alimentada gerou 43,51% de proteínas, 12,6% de lipídios com composição de ácidos graxos para síntese de biodiesel, carboidratos como glicose (48,06 mg L<sup>-1</sup>), arabinose (53,33 mg L<sup>-1</sup>), manose (26,95 mg L<sup>-1</sup>) e galactose (2,76 mg L<sup>-1</sup>), bem como 0,81 g L<sup>-1</sup> de açúcares redutores totais e ficocianina de 99,5 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>. Os resultados indicaram viabilidade técnica do cultivo desta cianobactéria em vinhaça de cana-de-açúcar em batelada e batelada alimentada, com remoções de carbono e nitrogênio. Além disso, sua composição em termos de proteínas, carboidratos e lipídios indicam possíveis aplicações para a biomassa gerada, indicando a possibilidade desta microalga ser integrada em um sistema de biorrefinaria junto ao setor sucroenergético.

**Palavras-chave:** Cianobactéria. Cultivo heterotrófico. Biorrefinaria. Efluente. Microalgas.

# BIOPRODUCTS PRODUCTION IN BATCH AND FED-BATCH CULTIVATIONS OF *Phormidium autumnale* FROM SUGARCANE VINASSE

**Author: TAISNE GONÇALVES VISENTIN**

**Adviser: Prof. Dr. REINALDO GASPAR BASTOS**

## ABSTRACT

Processes using microalgae and cyanobacteria in the treatment of wastewaters have been attractive due to the obtaining of biomass with the commercial value associated and the efficient removal of some contaminants. The cultivation of these microorganisms with biomass generation and obtaining bioproducts such as proteins, lipids, carbohydrates and pigments is known by the term "microalgal biorefinery." In this context, this research aimed the heterotrophic cultivation of filamentous cyanobacteria *Phormidium autumnale* in sugarcane vinasse, evaluating the removal of contaminants with an emphasis on obtaining value added bioproducts. In the first stage, the highest productivity in biomass was obtained from a central composite rotational design (CCRD) in an orbital shaker, being 127.20 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 107.91 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> at 31°C and 35°C, respectively, in initial C/N ratios of 16 and 23 and initial pH of 8.4 and 7.5. In these conditions at 35°C, removals of organic carbon, nitrogen, and phosphorus were 49%, 47%, and 28%, respectively. In the cultivation in a batch bioreactor were obtained the removals of organic carbon (67%) and nitrogen (70%), with maximum productivity in terms of biomass equivalent to the best condition of the tests carried out in an orbital shaker (CCRD). The biomass of *P. autumnale* generated in a batch bioreactor showed 21.33% of proteins, 4.26% of lipids, with important fatty acids for the production of biodiesel, 197.53 mg<sub>phycocyanin</sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> of phycocyanin, varied composition of carbohydrates (glucose 79.46 mg L<sup>-1</sup>, arabinose 44.53 mg L<sup>-1</sup>, mannose 9.84 mg L<sup>-1</sup>, galactose 4.78 mg L<sup>-1</sup>, and xylose 14.44 mg L<sup>-1</sup>) and 0.97 g L<sup>-1</sup> of total reducing sugars. Cultivation in a fed-batch bioreactor generated 43.51% of proteins, 12.6% of lipids with fatty acid composition for biodiesel synthesis, carbohydrates such as glucose (48.06 mg L<sup>-1</sup>), arabinose (53.33 mg L<sup>-1</sup>), mannose (26.95 mg L<sup>-1</sup>) and galactose (2.76 mg L<sup>-1</sup>), as well as 0.81 g L<sup>-1</sup> of total reducing sugars and 99.5 mg<sub>phycocyanin</sub> g<sub>biomass</sub><sup>-1</sup> of phycocyanin. The results indicated the technical feasibility of growing this cyanobacterium in sugarcane vinasse in batch and fed-batch cultivations, with carbon and nitrogen removals. Also, its composition in terms of proteins, carbohydrates, and lipids indicates possible applications for the biomass generated, indicating the possibility of this microalgae being integrated into a biorefinery system with the sugar-energy industry.

**Keywords:** Cyanobacteria. Heterotrophic cultivation. Biorefinery. Wastewater. Microalgae.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visualização de <i>P. autumnale</i> .....	13
Figura 2 - Etapas envolvidas na obtenção de biomassa microalgal e bioprodutos...	20
Figura 3 - Estrutura química da ficocianina.....	31
Figura 4 - Biorreator de bancada operando em sistema batelada .....	37
Figura 5: Ilustração e imagem da montagem proposta para o experimento com biorreator em sistema batelada alimentada com areação (1), rotâmetro (2), tanque de alimentação (3), bomba peristáltica (4), filtros de ar (5), estufa (6) e biorreator (7).	39
Figura 6 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na produtividade em biomassa .....	53
Figura 7 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação à temperatura e pH inicial .....	54
Figura 8 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação a temperatura e razão C/N inicial .....	55
Figura 9 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação a razão C/N e pH iniciais .....	56
Figura 10 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de nitrogênio da vinhaça .....	57
Figura 11 - Gráfico de superfície de resposta relacionando a temperatura e a razão C/N inicial com a remoção de nitrogênio da vinhaça .....	58
Figura 12 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de carbono orgânico da vinhaça .....	59
Figura 13 - Remoções de COT em função da temperatura, com destaque para os maiores valores.....	60
Figura 14 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de fósforo da vinhaça .....	61
Figura 15: Mudança do pH durante o cultivo batelada.....	63
Figura 16 - Perfil do crescimento microalgal em sistema batelada .....	64
Figura 17 - Perfil do conteúdo de nitrogênio total durante o tempo de cultivo .....	66
Figura 18 - Perfil do conteúdo de carbono orgânico total do cultivo pelo tempo.....	67
Figura 19 – Imagem da extração (a) e purificação (b) de ficocianina da biomassa oriunda do cultivo em vinhaça de <i>P. autumnale</i> .....	77

Figura 20 – Imagem da extração (a) e purificação (b) de ficocianina do inóculo de <i>P. autumnale</i> em meio BG 11 .....	77
Figura 21 - Mudança do pH durante o cultivo batelada alimentada .....	85
Figura 22 - Crescimento acumulado (a) e alimentações realizadas (b) de <i>P. autumnale</i> em sistema batelada alimentada.....	86
Figura 23 - Consumo acumulado (a) e o consumo em cada hora (b) de carbono orgânico por <i>P. autumnale</i> .....	88
Figura 24 - Consumo acumulado (a) e consumo em cada hora (b) de nitrogênio por <i>P. autumnale</i> .....	89
Figura 25 - Concentração de ficocianina pela biomassa presente (a) e pelo tempo (b). .....	90
Figura 26 - Micrografias ilustrando filamentos de <i>P. autumnale</i> e ficocianina .....	91
Figura 27 – Imagem da extração de ficocianina da biomassa em sistema batelada alimentada .....	96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média da vinhaça bruta.....	6
Tabela 2 - Composição do meio sintético BG11 .....	34
Tabela 3 - Proposta de delineamento para as variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais .....	35
Tabela 4 - Planejamento experimental com as variáveis codificadas.....	36
Tabela 5 - Caracterização da vinhaça centrifugada empregada nos cultivos .....	47
Tabela 6 - Efeito da temperatura, razão C/N e pH iniciais no cultivo de <i>P. autumnale</i> em vinhaça .....	50
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos do cultivo de <i>P. autumnale</i> em biorreator de bancada sistema batelada .....	62
Tabela 8: Teores de proteínas e lipídios na biomassa após o cultivo em vinhaça e no inóculo (meio BG 11) .....	69
Tabela 9 - Carboidratos e açúcares obtidos no cultivo em vinhaça e em meio BG 1172	
Tabela 10 - Ficocianina obtida no cultivo em vinhaça e em meio BG 11 .....	74
Tabela 11 - Perfil dos ácidos graxos obtidos no cultivo de <i>P. autumnale</i> em sistema batelada com vinhaça .....	78
Tabela 12 - Propriedades do biodiesel obtido no sistema batelada empregando <i>P. autumnale</i> .....	79
Tabela 13 - Perfil lipídico de <i>P. autumnale</i> (inóculo) em meio BG 11 .....	81
Tabela 14 - Propriedades do biodiesel gerado por <i>P. autumnale</i> (inóculo) em meio BG 11.....	82
Tabela 15 - Parâmetros do cultivo em sistema batelada alimentada.....	84
Tabela 16 - Proteínas e lipídios obtidos no cultivo em vinhaça e em meio BG 11 ....	92
Tabela 17 - Açúcares redutores totais e carboidratos presentes no cultivo em vinhaça e em meio BG 11 .....	93
Tabela 18 - Ficocianina obtida no cultivo em vinhaça e em meio BG 11 .....	95
Tabela 19 - Perfil dos ácidos graxos de <i>P. autumnale</i> em sistema batelada alimentada .....	96
Tabela 20 - Propriedades do biodiesel de <i>P. autumnale</i> gerado em sistema batelada alimentada .....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

DCCR: delineamento composto central rotacional

C/N: razão carbono/nitrogênio

COT: carbono orgânico total

NT: nitrogênio total

P: fósforo

PAR: radiação fotossinteticamente ativa

RPM: rotações por minuto

ER: eficiência de remoção

EPS: exopolissacarídeos

SFA: ácidos graxos saturados

MUFA: ácidos graxos monoinsaturados

PUFA: ácidos graxos poliinsaturados

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	5
3.2 MICROALGAS .....	7
3.3 <i>Phormidium autumnale</i> .....	11
3.4 ROTA METABÓLICA HETEROTRÓFICA.....	14
3.5 CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS.....	16
3.6 BIORREFINARIA MICROALGAL .....	18
<b>3.6.1 Proteínas</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6.2 Carboidratos</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6.3 Lipídios</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6.4 Pigmentos e Ficocianina</b> .....	<b>30</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	33
4.2 INÓCULO.....	33
4.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) NO CULTIVO DE <i>P. autumnale</i> EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	34
4.4 CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA .....	36
<b>4.4.1 Cultivo Heterotrófico em Batelada</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4.2 Cultivo Heterotrófico em Batelada Alimentada</b> .....	<b>38</b>
4.5 CONCENTRAÇÃO CELULAR DA BIOMASSA NOS CULTIVOS .....	40
4.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E CONSUMO DE SUBSTRATOS .....	40
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>P. autumnale</i> .....	42
<b>4.7.1 Proteínas Totais</b> .....	<b>42</b>
<b>4.7.2 Carboidratos Totais e Perfil de Açúcares</b> .....	<b>43</b>
<b>4.7.3 Lipídios Totais e Perfil de Ácidos Graxos</b> .....	<b>44</b>
<b>4.7.4 Extração, Purificação e Quantificação de Ficocianina</b> .....	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR	47

5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA, RAZÃO C/N E pH INICIAIS NO CULTIVO DE <i>P. autumnale</i> EM VINHAÇA .....	49
5.3 AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE <i>P. autumnale</i> EM SISTEMA BATELADA .....	62
5.4 AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE <i>P. autumnale</i> EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA .....	84
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo, com safra de 2018/2019 em torno de 620 mil toneladas de cana-de-açúcar produzidas, com conseqüente produção de aproximadamente 33 bilhões de litros de etanol (ÚNICA, 2020).

Diante disso, resíduos são gerados nas indústrias sucroalcooleiras, um deles é a vinhaça de cana-de-açúcar, um efluente gerado nas torres de destilação que se destaca por ser abundante, conter altos teores de nutrientes e matéria orgânica e elevada turbidez. Ressaltando ser a principal água residuária do processamento de cana-de-açúcar atingindo aproximadamente 10 litros a cada 1 litro de etanol produzido de acordo com as condições de fermentação e destilação aplicadas (MORAES et al., 2014; REIS e HU, 2017; SANTANA et al., 2017).

Atualmente a principal finalidade para a vinhaça é a fertirrigação nas lavouras de cana-de-açúcar, sendo irrigada cerca de 1,0 a 1,7 milhões de m<sup>3</sup> por ano e o que define as taxas de aplicação por hectare são as concentrações de potássio, que devem seguir os critérios estipulados pela norma técnica da CETESB P4.231. Entretanto, práticas contínuas de fertirrigação podem provocar impactos no solo, em águas superficiais e subterrâneas como aquífero e lençol freático. (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; DIAS et al., 2015; MORAES et al., 2017).

As conseqüências estão associadas a salinização, sodificação e alta fertilização do solo, causando diversos problemas, incluindo a redução do potencial osmótico e alta toxicidade de íons específicos no solo, redução na captação de água e nutrientes pelas plantas, rompimento da estrutura do solo, lixiviação de sais para as águas subterrâneas, eutrofização de massas de água pelo excesso de fósforo, liberação de óxidos de nitrogênio, lixiviação de amônia com conseqüente toxicidade aos organismos aquáticos (FUSS; RODRIGUES; GARCIA, 2017).

Outros problemas ambientais relacionados ao armazenamento, transporte e aplicação de vinhaça estão associados a produção de metano e óxidos nitrosos que são gases potenciais e contribuem para o aquecimento global, sendo mais nocivos que o dióxido de carbono. O metano é gerado desde o armazenamento até o transporte da vinhaça, podendo corresponder por 98% das emissões totais dos gases do efeito estufa do manejo da vinhaça nesta etapa, em que primeiramente fica

disposta em uma lagoa antes do transporte ou muitas vezes é transportada por canais abertos desde a usina até as lavouras para sua aplicação (MORAES et al., 2017).

Nesse contexto, não se deve ultrapassar os limites impostos pela legislação a respeito da fertirrigação da vinhaça nas lavouras. Nas situações em que a vinhaça contenha altos índices de potássio, as taxas de aplicação permitidas são mais baixas a fim de evitar o acúmulo desse nutriente no solo. Desta maneira, isso leva a necessidade de dispersar a vinhaça em distâncias maiores de forma que não abranja o solo já fertirrigado, o que ocasionalmente se torna economicamente inviável além de um determinado raio de aplicação (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

Neste cenário, as grandes quantidades geradas de vinhaça e a limitação de aplicação faz com que exista um volume excedente que pode ser aproveitado para outros fins (DE MATOS e BASTOS, 2016; SILVA et al., 2017). A alta carga orgânica e nutricional da vinhaça somando à elevada turbidez se tornam parâmetros adequados para o cultivo heterotrófico de microalgas (CANDIDO e LOMBARDI, 2018; KLEIN et al., 2019).

As microalgas são micro-organismos predominantemente aquáticos capazes de utilizar a energia da luz solar para fixar dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) da atmosfera, convertendo-o em biomassa a partir da fotossíntese (BRASIL, SILVA; SIQUEIRA, 2016; LEE, 2008; RICHMOND, 2004; TRENTACOSTE; MARTINEZ; ZENK, 2015).

Porém, algumas microalgas possuem capacidade de usufruir do metabolismo heterotrófico a partir de fontes orgânicas de carbono, como glicose, acetato, glicerol, além de águas residuárias (BRENNAN e OWENDE, 2010; SANTOS et al., 2016).

Cianobactérias ganham destaque em sua versatilidade por serem microalgas mais robustas, capazes de utilizar três vias metabólicas para adquirir energia (QUEIROZ et al., 2013; SANTOS, 2018). Por serem caracterizadas como heterotróficas facultativas, se desenvolvem tanto na existência quanto na inexistência de luminosidade (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014; LEE, 2008).

Nesse sentido, a cianobactéria filamentosa *Phormidium autumnale* vem sendo objetivo de estudo com relação ao cultivo em diferentes efluentes agroindustriais. O seu perfil de crescimento heterotrófico, alinhado ao consumo de substratos, principalmente carbono orgânico e compostos nitrogenados, sugere um



potencial de aplicação no aproveitamento de águas residuárias (BRUNO et al., 2012; FRANCISCO et al., 2015; SANTOS et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2016).

O uso de cianobactérias no tratamento de efluentes agroindustriais pode oferecer uma alternativa barata às formas convencionais de tratamentos, como os secundários e terciários que necessitam de grandes áreas e compostos químicos para precipitação de contaminantes, tais como o carbono, nitrogênio e fósforo, uma vez que são incorporados na biomassa microalgal como fonte de nutrição (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016).

Uma forma de cultivo se dá pelos biorreatores heterotróficos, sendo uma tecnologia em potencial para o tratamento de efluentes agroindustriais, por possibilitarem um controle adequado dos principais parâmetros de cultivo e viabilizarem o uso de efluentes com elevada turbidez. Além de que, moléculas orgânicas exógenas e nutrientes inorgânicos são assimilados pelas cianobactérias e convertidos em biomassa com potencial para produção de diversos bioprodutos, que podem ser usados como matéria-prima na indústria de ração animal, bioenergia, farmacêutica. (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014; QUEIROZ et al., 2013; SANTOS et al., 2016; SMETANA et al., 2017).

Devido à versatilidade de crescimento, as microalgas são consideradas recursos estratégicos, já que não requerem grandes áreas como as culturas agricultáveis, evitando a competição com o uso da terra. Além de que, possuem amplas aplicações que são significativas em vários setores, pois sua biomassa poder ser convertida em vários bioprodutos de alto valor, como proteínas, lipídios (biocombustíveis), carboidratos, pigmentos (ficobiliproteínas) possíveis de utilização nas ramificações industriais, caracterizando uma biorrefinaria (ANDRADE; TELLES; CASTRO, 2020; BUSSA et al., 2019; SANTOS, 2018; SUDHAKAR et al., 2019).

Sendo assim, a integração de biorrefinarias emergentes em conjunto com indústrias consolidadas, como do setor sucroenergético, pode ser um importante passo para minimizar os problemas ambientais, dando suporte às demandas de energia, combustíveis, produtos químicos, fármacos, aditivos alimentares e bioativos (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; SUDHAKAR et al., 2019).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar e a obtenção de bioprodutos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a influência da razão carbono/nitrogênio (C/N), pH inicial e temperatura através do delineamento composto central rotacional (DCCR) no cultivo heterotrófico de *P. autumnale* visando a produção de biomassa e a remoção de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo;

Conduzir ensaios em biorreator de bancada em sistema batelada e batelada alimentada nas condições selecionadas do DCCR, avaliando a cinética de produção de biomassa e remoção de carbono orgânico e nitrogênio;

Caracterizar a biomassa produzida no sistema batelada e batelada alimentada em termos de proteínas, lipídios, carboidratos e ficocianina;

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Entre os principais resíduos gerados da produção de etanol está a vinhaça, sendo o um resíduo líquido resultante do processo de destilação do caldo de cana-de-açúcar, gerado em média 10 a 15 L por litro de etanol produzido a depender as condições de destilação-fermentação (BETTANI et al., 2019; MARIANO et al., 2009; SILVA et al., 2017).

Dentre todos os resíduos gerados pela indústria sucroalcooleira é o que apresenta maior impacto ambiental, por possuir em sua composição, alta concentração de matéria orgânica, elevada turbidez, pH baixo (BETTANI et al., 2019; BONINI, 2012; MONÇÃO et al., 2018). Além disso, a vinhaça é rica em compostos nitrogenados, em fosfatos, minerais como  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  (MORAIS e BASTOS, 2018). A Tabela 1 apresenta a composição média da vinhaça bruta encontrada na literatura (BETTANI et al., 2019; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; REIS e HU, 2017).

Carrilho, Labuto e Kamogaw (2016) mencionam que a vinhaça resultante da destilação do melaço fermentado contém todos os componentes do mosto arrastados pelo fluxo de vapor de água, sendo eles alguns açúcares residuais e componentes voláteis. Em geral, os constituintes são os compostos inorgânicos solúveis, como potássio, cálcio, sulfatos e compostos orgânicos, como células de levedura mortas, álcool, açúcar residual, alguns compostos orgânicos insolúveis e compostos orgânicos voláteis.

Além disso, os autores relatam que os compostos orgânicos compõem a maior parte do mosto e são formados principalmente pelos componentes presentes no melaço que não foram fermentados, como a glicose e frutose, produtos formados na fermentação e que não são extraídos na destilação, como o glicerol e ácidos orgânicos, e restos de levedura que não foram separados no processo industrial.

Pela vinhaça ser composta de nutrientes e minerais, principalmente pela composição de NPK, sua maior aplicação hoje é na fertirrigação das lavouras de cana-de-açúcar, bem como melhorar o desempenho do solo em matéria orgânica (MORAES et al., 2017). Aliado a isso, a fertirrigação no solo é vista como uma

solução simples e uma forma econômica de disposição. Porém, se não for realizada adequadamente dentro dos parâmetros exigidos pela legislação (CETESB, 2015), pode provocar diversos problemas ambientais (MORAES et al., 2014).

Tabela 1 - Composição média da vinhaça bruta

<b>Composição média da vinhaça</b>	<b>Valores</b>
pH	3,9 - 4,5
Carbono orgânico total	7900
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	32000
Nitrogênio total (mg L <sup>-1</sup> )	1404,0
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	823,7
NH <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	23,9
Fósforo (mg L <sup>-1</sup> )	85 - 190
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	380 - 1680
K <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1620 - 4010
Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	680 - 3160
Mg <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	162 - 270
Na <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	8,6
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	0,4 - 1,6
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	3,64 - 4,9
Proteínas (%)	2,92
Carboidratos (%)	3,42
Glicerol (mg L <sup>-1</sup> )	5860

Fonte: Adaptado de BETTANI et al. (2019), CHRISTOFOLETTI et al. (2013), FUESS; RODRIGUES; GARCIA (2017), REIS e HU (2017).

Seu uso indiscriminado pode provocar salinização do solo, afetar a qualidade da cana-de-açúcar, impactar na fertilidade do solo, contaminação de águas subterrâneas, emissão de gases de efeito estufa (BETTANI et al., 2019; MONÇÃO et al., 2018; MORAES et al., 2014).

O fator que define as taxas de aplicação da vinhaça no solo são as concentrações de K presentes que limita o volume adicionado por hectare em vista da proteção do solo e das águas superficiais e subterrâneas (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; MORAES et al., 2017 ). Em vezes que a vinhaça possua concentrações elevadas de K sua dispersão deve ser maior, fator que eleva custos para as usinas e que pode levar a volumes excedentes (BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

Devido ao crescente aumento na produção de etanol, a geração de vinhaça tende a crescer e um viés para essas quantidades remanescentes é a utilização da vinhaça em soluções tecnológicas, como por exemplo, o cultivo de microalgas (DE MATOS e BASTOS, 2016).

De acordo com Carrilho, Labuto e Kamogama (2016) um viés muito atrativo é o aproveitamento da vinhaça como meio de cultivo para micro-organismos. A vinhaça possui características que permitem essa aplicação, como o alto volume gerado, baixo custo e sua composição química favorável contendo micro e macronutrientes, como carbono orgânico, nitrogênio, fósforo.

Reis e Hu (2017) mencionam que a elevada turbidez da vinhaça não afeta os cultivos microalgais uma vez que os regimes de crescimento podem ser sem luminosidade. Se tratando da função que o potássio exerce no metabolismo microalgal, Andrade e Coluzzi (2014) citam que estão relacionadas à manutenção do potencial osmótico, à neutralização de ânions, na participação do transporte por meio das membranas, na ativação de enzimas.

Dessa forma, o aproveitamento de nutrientes provenientes de resíduos industriais configura-se como uma das alternativas encontradas tanto para diminuir o custo de produção de biomassa microalgal, como também para diminuir o potencial risco poluidor de diversos resíduos (ZHANG et al., 2018). Portanto, a vinhaça representa uma alternativa sustentável e econômica para o cultivo de microalgas com consequente tratamento deste efluente, além de ser uma estratégia para a redução de custos de produção e aproveitamento dos nutrientes presentes (CANDIDO et al., 2018).

### 3.2 MICROALGAS

A denominação "microalga", sem valor taxonômico, abrange uma diversidade de micro-organismos fotossintetizantes eucarióticos e procarióticos classificados pelos aspectos citológicos, morfológicos, pelas características dos diversos tipos de pigmentos e da natureza química dos produtos de reserva presentes nas células. Além de serem micro-organismos predominantemente aquáticos, também se encontram em ecossistemas terrestres, representando uma diversidade de espécies

em diversas condições ambientais (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014; LEE, 2008; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; RICHMOND, 2004).

As microalgas podem ser divididas em *Cyanophyta*, *Prochlorophyta*, *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Euglenophyta*, *Dinophyta*, *Cryptophyta*, *Glaueophyta* e *Haptophyta*, englobando diversas classes de microalgas com ampla utilização biotecnológica (Andrade e Colozzi Filho, 2014).

A divisão *Cyanophyta* contempla as cianobactérias, micro-organismos singulares por possuírem organização celular procariótica e pela ausência de flagelos e da maioria das organelas (LOURENÇO, 2006). Por esse motivo estão mais relacionados às bactérias procarióticas do que com as algas eucarióticas (LEE, 2008). São Gram-negativos e exibem ampla diversidade morfológica, englobando seres de formas filamentosas, unicelulares ou agrupados em colônias (BECK et al., 2012; BORBA, 2018; DE REVIERS, 2010).

Cianobactérias receberam esse nome devido à presença de um pigmento azul-esverdeado, chamado de ficocianina que juntamente com ficoeritrina (pigmento avermelhado), tendem a mascarar a pigmentação da clorofila (DE REVIERS, 2010; RICHMOND, 2004). Diferenciam-se das bactérias por possuírem clorofila  $\alpha$  e por apresentarem fotossistemas I e II, possibilitando a realização da fotossíntese oxigênica (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014; LOURENÇO, 2006; SINGH et al., 2011). Possuem um sistema elaborado de membranas internas responsáveis pelo transporte de elétrons da cadeia respiratória e fotossintética (SINGH et al., 2011).

Para a realização da fotossíntese, a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) é captada por vesículas achatadas, denominadas tilacóides (aparato fotossintético). Cada membrana tilacóide ocorre de forma livre no citoplasma das células, e abriga a clorofila  $\alpha$ , carotenoides e ficobiliproteínas, essa última está ligada à superfície externa das membranas dos tilacóides compondo estruturas chamadas de ficobilissomos. A partir da captação do PAR ocorrem as reações do fotossistema I e fotossistema II. (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014; LOURENÇO, 2006; MULLINEAUX, 1999).

Nevo et al. (2007) destacam que os tilacóides possuem uma característica de se habituar às diferentes condições ambientais, e que provavelmente nas cianobactérias, devido às variações que podem ocorrer no ambiente, as interações dos tilacóides sejam amplamente dinâmicas.

Com relação à parede celular das cianofíceas, esta é composta principalmente por peptidoglicano, polímero formado de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e outros aminoácidos, adjacente à membrana celular. Externamente à camada de peptidoglicano tem-se outra de lipopolissacarídeos (LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004). A parede celular também é formada por uma bainha mucilaginosa, constituída de carboidratos, que em alguns casos auxilia a cianobactéria no processo de deslizamento (movimentação) (DE REVIERS, 2010; LOURENÇO, 2006).

Cianobactérias possuem como principal produto de reserva um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, chamado de "amido das cianofíceas", que se difere do amido por ter ramificações maiores quando comparado à cadeia principal de polissacarídeos (LOURENÇO, 2006; RAVEN, 1996; RICHMOND, 2004).

Outro produto de reserva característico são os grânulos de cianoficina, cuja finalidade é o armazenamento de nitrogênio. São constituídos substancialmente por proteínas formadas de dois ácidos aminados, a asparagina e arginina (FRANCESCHINI; PRADO; BURLIGA, 2010; LOURENÇO, 2006).

Todas as cianobactérias são capazes de fixar nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), através das células diazotróficas (LEE, 2008; LOURENÇO, 2006). Porém existem algumas que são especializadas por serem dotadas de células chamadas de heterocistos e acinetos. Essas cianobactérias possuem nitrogenases em altas concentrações (complexo enzimático) que é especialmente sensível ao oxigênio ( $O_2$ ) (RICHMOND, 2004).

A fixação de nitrogênio ( $N_2$ ) é um dos processos mais dispendiosos metabolicamente, sendo realizado em anaerobiose, exigindo 16 ATP para cada molécula de  $N_2$  fixa, pois o amônio fixado é adicionado ao 2-oxoglutarato (ciclo do ácido cítrico) pela enzima glutamato desidrogenase para então formar o glutamato (ácido glutâmico). A adição de um segundo amônio ao glutamato gera a glutamina que é a molécula transferida de uma célula para outra (LEE, 2008; RAVEN, 1996).

As células especializadas denominadas de heterocistos não realizam fotossíntese oxigenada, dependendo das células vegetativas ao lado para suprimento de carbono. São células maiores que não possuem o fotossistema II, por este motivo a fotofosforilação cíclica que ocorre não contribui para a produção de

oxigênio, e quando presente é logo reduzido pelo hidrogênio (subproduto da fixação de  $N_2$ ) ou é eliminado para fora da célula através da parede do heterocisto (RAVEN, 1996).

A adaptabilidade das cianobactérias nos diversos ecossistemas fundamenta-se em sua grande diversidade de gêneros e espécies, e em suas aptidões de sintetizar inúmeros produtos ao longo da evolução que têm sido transferidos à outras espécies por meio dos genes (FRANCESCHINI; PRADO; BURLIGA, 2010).

Além disso, cianobactérias continuam se adaptando a alterações ambientais, tolerando flutuações de salinidade, mudanças de temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes. Essa tolerância provavelmente está associada à condição de ser procarionte, pela simplicidade de sua célula, se tornando uma vantagem se tratando de sua função como organismo pioneiro em ambientes recém-formados (LOURENÇO, 2006).

Algumas espécies de cianobactérias podem ser encontradas em ambientes extremos compreendendo desde regiões desérticas até polares, adaptando-se ao congelamento e à dessecação (STRUNECKÝ; ELSTER; KOMÁREK, 2012), além disso, também habitam em nascentes termais, solos desérticos (GUIRY e GUIRY, 2020), águas salobras, oceanos, águas doces, reservatórios, lagunas, turfeiras, associadas às briófitas (FRANCESCHINI; PRADO; BURLIGA, 2010), locais poluídos, sugerindo por este motivo as baixas exigências nutricionais (FRANCISCO et al. 2014).

Da mesma forma, também atuam no aproveitamento de carbono, nitrogênio e fósforo presentes no meio, realizando a ciclagem desses nutrientes em biomassa, surgindo uma tecnologia promissora pelo equilíbrio de vetores sustentáveis com o aproveitamento de compostos poluentes (ANSARI et al., 2017, RIZWAN et al., 2018; SANTOS et al., 2016).

Também apresenta como vantagem a não competição com culturas alimentícias tradicionais, (SUDHAKAR et al., 2019), capazes de serem cultivadas em terras não aráveis, em águas doces e salgadas, bem como em águas residuárias assimilando os nutrientes presentes (BASTOS e BONINI, 2017; FARROKH et al., 2019). Ademais, nos cultivos não são necessários pesticidas e herbicidas para o desenvolvimento de cianobactérias, reduzindo dessa forma impactos ambientais



quando comparados com as culturas tradicionais (BRENNAN e OWENDE, 2010; BUSSA et al., 2019).

Os cultivos apresentam diversas vantagens, como a duplicação de biomassa em um curto período de tempo, os meios que podem ser inorgânicos ou orgânicos, possibilidade de manipular as condições de cultivo para obtenção de metabólitos de interesse (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014), ainda podem ser produzidas durante o ano todo suportando a demanda crescente por biomassa (BUSSA et al., 2019), que podem ultrapassar as de plantas, sendo cultivadas com elevada produtividade a partir de fotobiorreatores e em sistemas abertos conhecidos como "raceways" (ANSARI et al., 2017).

Oferecem características interessantes como alternativas de matérias-primas para várias aplicações industriais, ambientais e em sistemas de biorrefinarias, pois possuem capacidade de desenvolver bioprodutos como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos, possibilitando sua utilização em biocombustíveis, fertilizantes, cosméticos, alimentos para animais, medicamentos, entre outros. Esse sistema também possibilita a diversificação nas condições de cultivo e permite ampliar e determinar a importância que cada condição exerce sobre o produto final (BRASIL, SILVA e SIQUEIRA, 2016; GALANOPOULOS; KENDEL; ZONDERVAN, 2019; RIZWAN et al., 2018; ZHU, 2015).

A despeito deste interesse nas microalgas, a sua produção em escala comercial ainda apresenta barreiras principalmente com relação ao custo, o que pode ser minimizado a partir do aproveitamento de subprodutos e águas residuárias agroindustriais (NEVES et al., 2016; RIZWAN et al., 2018).

Brennan e Owende (2010) mencionam que a biomassa microalgal oferece um potencial para fechar a lacuna entre oferta e demanda, se tornando uma matéria-prima valiosa no que se diz respeito à transição de uma bioeconomia sustentável.

### 3.3 *Phormidium autumnale*

*Phormidium autumnale* é uma cianobactéria filamentosa que vem demonstrado notoriedade em pesquisas (FRANCISCO et al., 2019; RODRIGUES et al., 2015; SANTOS et al., 2019). Esta cianobactéria apresenta filamentos de 3 a 6 µm de diâmetro, não ramificada, capaz de sobreviver por longos períodos em

ambientes desérticos e ao congelamento, e que após a reidratação, rapidamente se torna metabolicamente ativo (STRUNECKÝ, KOMÁREK E ELSTER, 2012).

Além disso, *P. autumnale* apresenta característica morfológica filamentosa, facilitando a separação da biomassa dos meios de cultivo, o que deve ser levado em consideração, sendo um dos gargalos tecnológicos da produção de biomassa microalgal em larga escala visando a diminuição de custos (BRENNAN e OWENDE, 2010; KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; LOURENÇO, 2006).

Espécies filamentosas são formadas de tricomas (filas de células) que ficam envoltos da bainha mucilagínosa (LEE, 2008). Essas células geralmente são pequenas, mas o filamento pode ser composto por dezenas delas e funciona como uma unidade, indiferente do tamanho de seus componentes (LOURENÇO, 2006).

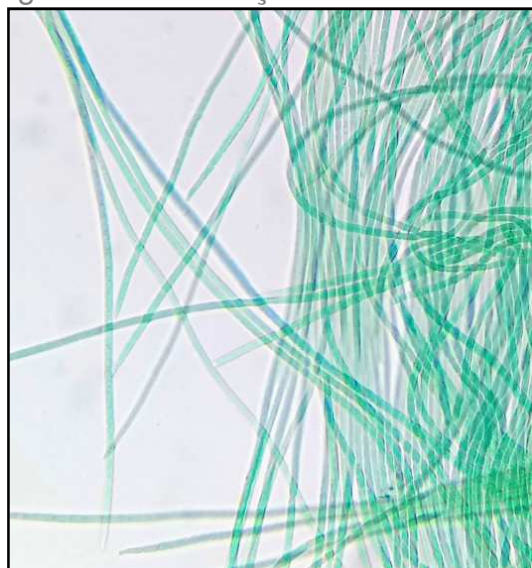
Tiwari e colaboradores (2001) realizaram uma pesquisa com espécies filamentosas desprovidas de heterocistos e acinetos, entre elas estava a *P. autumnale*. Lee (2008) reforça que espécies que apresentam essa característica não fixam nitrogênio na luz sob condições aeróbias, e que no interior dos filamentos, cerca de 10 a 15% das células (denominadas de diazócitas) são responsáveis pela fixação de nitrogênio, e se encontram adjacentes umas às outras contendo uma membrana de tilacóide mais densa, com menos grânulos de cianoficina e vacúolos gasosos. Lourenço (2006) se refere a essas espécies como sendo "fósseis vivos", ou então àquelas que sobreviveram da era anterior à acumulação de oxigênio na atmosfera.

Fay (1992) relata que as cianobactérias diazotróficas aeróbias são capazes de responder ao aumento das concentrações de oxigênio dissolvido, aumentando a taxa de respiração e mantendo os níveis de oxigênio intracelular baixos, protegendo a nitrogenase da inativação.

Franceschini, Prado e Burliga (2010) mencionam que o gênero de cianobactéria do tipo *Phormidium* apresentam em sua constituição apenas células vegetativas, não incluindo células especializadas, ou seja, são homocitadas. Lee (2008), cita o gênero *Phormidium* como cianobactérias que giram durante o deslizamento, também chamado de "*gliding*", por este motivo, é constituída por mais duas camadas adicionais fora da parede celular, sendo uma camada serrilhada e uma externa à essa composta de fibrilas, formada por uma glicoproteína em forma de bastonete, denominada oscilina.

Além disso, *Phormidium* se reproduz assexuadamente através da fragmentação, sendo um processo de ruptura na parte final do filamento, formando uma porção menor chamada de hormogônio (FAY, 1992; LEE, 2008; LOURENÇO, 2006; RAVEN, 1996). A Figura 1 ilustra *P. autumnale* em microscópio com lente objetiva em foco de 40x.

Figura 1: Visualização de *P. autumnale*



Fonte: Elaborado pela autora

Estudos tem demonstrado o potencial dessa cianobactéria para a utilização em processos de biorremediação e para produção de óleos unicelulares, apresentando um teor médio de lipídios de 7% a 15%. Também se adapta em efluentes com altas cargas orgânicas e nutricionais comprovando ser uma tecnologia em potencial aplicação visando a remoção de matéria orgânica, nitrogênio total e fósforo além de gerar biomassa rica em bioprodutos. (MARONEZE et al., 2014; FRANCISCO et al., 2014; NEVES et al., 2016).

O trabalho conduzido por Santos et al. (2019) utilizando efluente cervejeiro como fonte de cultivo heterotrófico empregando *P. autumnale*, apresentou boa produtividade de biomassa e obteve remoções significativas de DQO, N-NTK e  $PO_4$ , mostrando ser uma tecnologia promissora de biorremediação.

Sartori et al. (2016) também empregaram efluente do processamento de cerveja em cultivo heterotrófico de *P. autumnale* e obtiveram maior percentual de ácidos graxos saturados quando comparados com os monoinsaturados e

poliinsaturados, apresentando potencial para produção de biodiesel de acordo com as normas vigentes.

Dellamatrice e colaboradores (2016) avaliaram o cultivo autotrófico de três microalgas, *Anabaena flosaquae*, *P. autumnale* e *Synechococcus* sp. em efluente de indústria têxtil, objetivando a degradação do corante índigo. O estudo demonstrou que a única microalga capaz de realizar a degradação do corante foi a *P. autumnale* e observaram que dois metabólitos foram produzidos durante a degradação, o ácido antranílico e a isatina, mas que a toxicidade não aumentou após o tratamento. Os autores sugerem que, uma vez que o corante penetra nos filamentos aumenta o contato entre o micro-organismo e o composto facilitando a degradação. Dessa maneira a cianobactéria demonstrou a capacidade de degradar o corante e que pode ser utilizada como parte de um tratamento de efluentes contendo compostos recalcitrantes.

*P. autumnale* demonstrou boas remoções de fosfato atuando com dominância em cultivo mixotrófico em forma de biofilme, juntamente com outras cianobactérias, diatomácea e clorofícea em menores concentrações. Atingiram em torno de 92% de remoção de fósforo em maiores incidências solares e cerca de 50% em condições de menores incidências. Mesmo em baixa luminosidade obteve boa eficiência de remoção desse nutriente (SUKAČOVA; TRTÍLEK; RATAJ, 2015).

Apesar de algumas cianobactérias serem autotróficas, uma quantidade significativa possuiu o metabolismo versátil, se tornando capazes de crescerem em sistemas heterotróficos através da assimilação de substratos orgânicos (BASTOS e BONINI, 2017; FAY, 1992; FRANCISCO et al., 2014; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

### 3.4 ROTA METABÓLICA HETEROTRÓFICA

Andrade e Coluzzi Filho (2014) mencionam que em cultivos heterotróficos as principais características se referem à necessidade de fontes orgânicas para aquisição de energia das microalgas, já que nesse regime de crescimento não se realiza fotossíntese. Ainda cita que as principais fontes de carbono para esse sistema são carboidratos, ácidos orgânicos, como o glicerol, glicose e ácido acético.

O cultivo heterotrófico tem sido amplamente aplicado, utilizando fontes orgânicas de carbono e de nutrientes, como efluentes agroindustriais, em que as

moléculas orgânicas são metabolizadas pela respiração para gerar ATP. Nesses casos, após o carbono, o nitrogênio e o fósforo são os componentes indispensáveis para as células microalgais (SANTO et al., 2016).

Bastos et al. (2011) relatam que o metabolismo heterotrófico endógeno em cianobactérias serve majoritariamente para o ajuste do período fotossintético, e que a fonte de carbono orgânica (glicogênio ou glicose) suporta um metabolismo sem luminosidade e é convertido em glicose-6-fosfato e é metabolizado via respiratória. Perez-Garcia et al. (2011) também citam o acetato como fonte de carbono mais frequente utilizado em sistemas heterotróficos, possibilitando o uso de efluentes.

Santos et al. (2016), explicam que a forma de incorporação de nutrientes e das moléculas orgânicas de carbono utilizadas pelas cianobactérias é a respiração. Primeiramente ocorre a assimilação oxidativa da glicose pela fosforilação da hexose, produzindo glicose-6-fosfato, que fica disponível para armazenamento, respiração e síntese celular. Quando a relação ATP/ADP é alta, geralmente as cianobactérias utilizam das vias de fosfato de pentose para gerar NADPH que posteriormente é usado em reações de biossíntese. Caso a relação ATP/ADP for baixa, as moléculas orgânicas de carbono são metabolizadas por meio da glicólise em piruvato que então é convertido em acetato.

Após esse processo, o acetato (transportado pela coenzima A) é oxidado no metabolismo por meio do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) fornecendo moléculas redutoras (NADH e FADH<sub>2</sub>) para a cadeia de transporte respiratório de elétrons pela fosforilação oxidativa, e os elétrons são então transferidos dos doadores de elétrons aos receptores de elétrons. Essas reações liberam energia que é utilizada na formação de ATP (SANTOS et al., 2016).

Fay (1992) menciona que a fixação de nitrogênio em cultivos heterotróficos também é suportada pelas moléculas orgânicas exógenas, sendo a principal via da assimilação do carbono, a redutora da pentose fosfato (ciclo de Calvin), que envolve as duas enzimas principais desse processo, fosforibulocinase e ribulose-1,5-bifosfato carboxilase / oxigenase. A atividade respiratória das cianobactérias mostra pouca resposta à presença de substratos externos, sendo compatíveis com as algas eucarióticas, sendo o glicogênio, o principal produto de reserva e a via de catabolismo do substrato nas cianobactérias é a via oxidativa da pentose fosfato. Além disso, a cadeia de transporte de elétrons respiratórios está alocada tanto na membrana plasmática quanto nas membranas tilacóides, podendo este último

compartilhar os componentes com o sistema de transporte de elétrons fotossintéticos.

Alguns autores apontam que cultivos heterotróficos superam os mixotróficos e fotoautotróficos em termos de densidades celulares, favorecendo a diminuição dos custos de produção referentes à colheita da biomassa, pois quanto mais densa é a produção, mais fácil será a separação do meio. Além disso, como o crescimento celular independe da luminosidade, propicia a utilização de efluentes com elevada turbidez (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; CHEN e CHEN, 2006; SMETANA et al., 2017).

Ademais, caracterizam-se pela maior simplicidade de escalonamento, transferências de gases, maiores produtividades e predominância de culturas axênicas (MORAES, 2018), pelo controle adequado dos principais parâmetros de monitoramento, independentemente das condições do clima (ANDRADE e COLUZZI FILHO, 2014).

### 3.5 CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

Efluentes com altas cargas orgânicas e nutricionais são prósperas para cultivo de microalgas, uma vez que elas realizam a ciclagem desses nutrientes em seu metabolismo e beneficiam os vetores sustentáveis pela reutilização de poluentes, como carbono, fósforo, nitrogênio que se fazem presentes em águas residuárias geradas pelas indústrias (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES 2016; SANTOS et al., 2016).

O tratamento de efluentes por cianobactérias se torna uma potencial alternativa técnico-econômica em comparação com os sistemas convencionais de tratamentos secundários e terciários de efluentes. Essa tecnologia está vinculada às rotas metabólicas de respiração, na qual fontes de carbono orgânico e nutrientes inorgânicos são bioconvertidos em bioprodutos (SANTOS et al., 2016).

Richmond (2014) menciona que o tratamento avançado de efluentes por microalgas recebe muita atenção devido às vantagens desse processo, incluindo a remoção eficiente de fósforo e nitrogênio, economia ecológica, por não ter necessidade do uso de produtos químicos, uma vez que as microalgas aumentam o oxigênio dissolvido no meio e realizam a redução de íons metálicos, se tornando

mais eficientes quando comparados a outros tratamentos tradicionais para efluentes. Além disso, Wang et al. (2017) relata que a biomassa gerada pelos tratamentos apresenta um potencial de utilização na produção de fertilizantes, combustível, ração animal, produtos químicos.

O tratamento de efluentes por microalgas também diminui custos para produção de biomassa em escala comercial a partir da ciclagem de substratos presentes, sendo uma alternativa eficiente ao invés de meios sintéticos (ALVIM et al., 2014; RIZWAN et al., 2018), que representam cerca de 20% do custo total do produto (XU et al., 2019).

Nesse sentido, as microalgas se enquadram perfeitamente neste conceito, uma vez que a sua biomassa tem um alto potencial comercial. Além disso, pode levar a uma menor emissão de CO<sub>2</sub> e minimizar o impacto ambiental de poluentes, ideias que estão atreladas aos modelos de negócios tradicionais de grandes empresas, permitindo o aumento do portfólio de produtos que podem ser comercializados em outros setores industriais ou utilizados na própria indústria (MARIANO, 2015; SANTOS et al., 2016).

Um estudo realizado por Hammed, et al. (2016) apresentou a utilização de vários compostos presentes em águas residuárias, como pesticidas, hidrocarbonetos e cianetos como fontes de carbono e nitrogênio por microalgas, sugerindo que parede celular microalgal é constituída por estruturas de carboidratos capazes de bioconverter agentes químicos tóxicos em efluentes.

Por outro lado, o cultivo de microalgas em efluentes pode apresentar limitações devido à elevada cor e turbidez de algumas águas residuárias, limitando a penetração da luz, o que pode dificultar o crescimento desses micro-organismos. Entretanto, espécies heterotróficas se sobressaem nesse tipo de cultivo, utilizando a matéria orgânica na ausência de luminosidade para a produção de energia (BONINI, 2016).

Bastos et al., (2015) avaliaram o cultivo heterotrófico da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluente de processamento de arroz e reportaram uma concentração celular de aproximadamente 800 mg L<sup>-1</sup>, remoção de 97% de DQO e 78% de nitrogênio do efluente em uma temperatura de 35°C e inóculo de 300 mg L<sup>-1</sup>, concluindo que a microalga demonstrou potencial de remoção destes compostos com produção de biomassa.

Um estudo realizado por Francisco et al., (2015) empregando efluente do processamento de mandioca (manipueira) utilizando *Phormidium sp.* apresentou uma produtividade de biomassa de  $320 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  com remoção de 78,7% de DQO, 49,9% de nitrogênio e 52,3% de fósforo, demonstrando a importância do aproveitamento de compostos e nutrientes de fontes residuais para o cultivo de microalgas, além da redução de custos com esses cultivos.

Um efluente agroindustrial com potencial para o cultivo de microalgas é a vinhaça de cana-de-açúcar, rica em compostos orgânicos como glicerol, açúcares, ácido lático, nitrogênio, fósforo e minerais como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  (SANTANA et al., 2016).

Nesse sentido, De Mattos e Bastos (2015) analisaram a eficiência de remoção de DQO e nitrogênio pela microalga *Desmodesmus sp.* em cultivo heterotrófico com vinhaça, apresentando uma produtividade de biomassa de  $101,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , remoção de 36,2% de carbono orgânico e 52,1% de nitrogênio. Estes autores concluíram que, devido à alta contaminação de bactérias presentes no meio, a microalga ficou em desvantagem biológico, reduzindo seu desenvolvimento. Apesar disto, os resultados foram promissores pois auxiliaram na análise dos principais “gargalos” tecnológicos para produção de biomassa microalgal a partir de efluentes.

A combinação desses processos são as aplicações comerciais mais econômicas em curto prazo, se tornando uma das maneiras mais sustentáveis para a promoção de bioenergia e bioprodutos (BRENNAN e OWENDE, 2010). Portanto esses métodos mostram grande potencial para combinar cianobactérias e o tratamento de efluentes agroindustriais.

### 3.6 BIORREFINARIA MICROALGAL

O aproveitamento de águas residuárias para o desenvolvimento de microalgas com posterior geração de biomassa e extração de bioprodutos de alto valor agregado é conhecido pelo termo “biorrefinaria microalgal” (SANTOS et al., 2016). Sendo assim, entende-se como “biorrefinaria” o bioprocesso que integra equipamentos e tecnologias químicas com baixo impacto ambiental para a conversão de biomassa com o objetivo de gerar energia, combustíveis, químicos renováveis, bioquímicos na área médica, combinando sinergeticamente conversões



químicas e biológicas orientadas à recuperação e purificação de biomassa (RIZWAN et al., 2018).

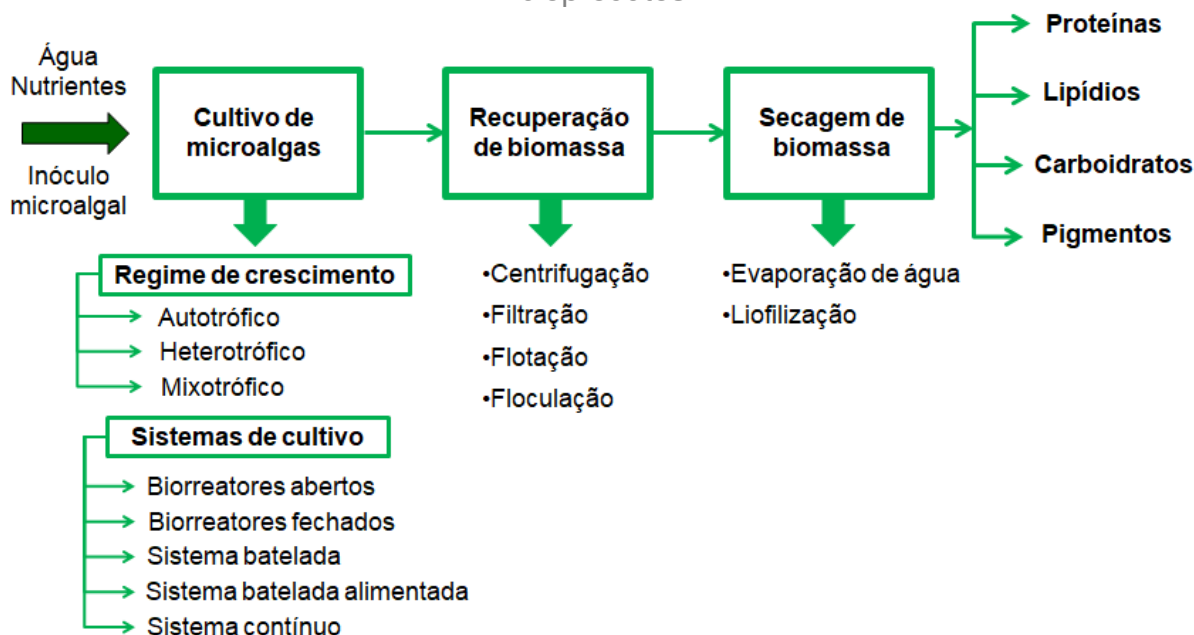
De acordo com Brasil, Silva e Siqueira (2016), biorrefinarias são instalações que integram conversão de biomassa em vários produtos que podem ser comercializados, destacando a importância da otimização do uso de recursos utilizados, como por exemplo, os resíduos. As biorrefinarias têm potencial de atender uma parte significativa da crescente demanda por energia, combustíveis, produtos químicos. Dessa forma, espera-se que as indústrias de base biológica desempenhem um papel fundamental nesses sistemas. Os autores ainda salientam que ao produzir diversos bioprodutos as biorrefinarias podem explorar ao máximo o potencial das biomassas, dessa forma, tem-se valor agregando, aumentando da rentabilidade e redução da emissão dos gases de efeito estufa.

Atualmente os bioprodutos microalgais são utilizados comercialmente como nutrição humana, alimentação animal e aquática, em cosméticos, pigmentos, biofertilizantes, bioquímicos para a síntese de medicamentos antimicrobianos, antivirais, anticâncer, antibacterianos. Além do mais, são capazes de produzir diferentes tipos de antioxidantes, carotenóides, lipídios, corantes, polímeros enzimáticos (RIZWAN et al., 2018).

Nesse contexto, microalgas surgem como alternativa promissora superando as desvantagens de outras matérias primas que necessitem do uso da terra. Elas são capazes de fornecer biodiesel, bioetanol, biogás, e outros bioprodutos, com a maximização do valor agregado proveniente de diferentes componentes (ALVIM et al., 2014; ZHU, 2015).

A Figura 2 ilustra alguns processos de obtenção da biomassa microalgal, contemplando o cultivo de microalgas, os sistemas e regimes de crescimento que podem ser aplicados, alguns procedimentos para a recuperação e secagem de biomassa, por fim alguns bioprodutos de valor agregado que podem ser obtidos.

Figura 2 - Etapas envolvidas na obtenção de biomassa microalgal e bioprodutos



Fonte: Adaptado de KLEIN et al. (2018)

Morais e Bastos (2018) estudaram a produção de ficocianina da microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli empregando meio BG11 suplementado com vinhaça em cultivo mixotrófico e obtiveram uma boa produtividade de 9,86 mg<sub>ficocianina</sub>/mg<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>. Sugerindo a viabilidade do cultivo da microalga no meio BG 11 suplementado com vinhaça.

Francisco et al., (2015) avaliaram a produção de lipídios microalgais utilizando *Phormidium sp.* em cultivo heterotrófico de manipueira, obtendo uma produtividade de biomassa de 320,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e uma produtividade lipídica em cultivo contínuo com composição saturada e monoinsaturada, além de atender as normas nacionais e internacionais para a síntese de biodiesel.

Bastos et al., (2015) estudaram a produção de proteínas unicelulares utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivo heterotrófico de efluente de parboilização de arroz, demonstrando ótima produção de proteína na fase exponencial de crescimento, concluindo que essa cianobactéria pode ser uma fonte potencial de proteína, mas que ainda há pesquisas escassas sobre o teor proteico de biomassas microalgais cultivadas em águas residuárias.

Silva et al., (2017) avaliaram a produção de lipídios através do cultivo heterotrófico em vinhaça da cianobactéria *Desmodesmus subspicatus* e obtiveram uma boa produtividade lipídica de  $1100 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , com perfil de ácidos graxos adequado para síntese de biodiesel. Estes autores concluíram que o cultivo heterotrófico em vinhaça de cana-de-açúcar tem um grande potencial para a produção de lipídios.

Estudos demonstram que proteínas, pigmentos e lipídios são os principais constituintes intracelulares de interesse, seguidos de compostos orgânicos voláteis, lipídios exocelulares de natureza extracelular e exopolissacarídeos (SANTOS, 2018).

Figuerola-Torres et al. (2020) mencionam que a biorrefinaria oferece grandes oportunidades pelo fato da biomassa microalgal ser rica em carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, atuando como precursores de uma vasta diversidade de produtos para a saúde humana, mas que também são viáveis para a síntese de biocombustíveis.

### 3.6.1 Proteínas

Os bioprodutos microalgais são utilizados no consumo humano devido ao elevado teor de proteínas e alto valor nutritivo (PEREZ-GARCIA et al., 2011). As cianobactérias podem apresentar alto teor de proteína na biomassa (proteínas celulares) e são capazes de consumir moléculas orgânicas simples em cultivos heterotróficos (BASTOS et al., 2011).

Vale resaltar que o teor de aminoácidos presentes em algumas microalgas também é comparável ao de fontes com alto teor de proteínas, algumas pesquisas vêm demonstrando que aminoácidos como isoleucina, valina, lisina, triptofano, metionina, treonina e histidina estão presentes em microalgas em quantidades comparáveis ou maiores em comparação com fontes ricas em proteínas, como ovos e soja (KOYANDE et al., 2019).

Em médias, as cianobactérias são compostas por 57% de proteínas, valor este que propiciou com que elas se tornassem uma fonte alternativa de nutrição em relação à carne e à soja. Ademais, essa fonte nutritiva é facilmente digerível e

possui elevado teor de proteínas, mas e baixo em ácidos nucleicos e componentes celulares de alto valor, como a vitamina A, ácidos graxos essenciais e clorofilas. Justamente por isso, o interesse no cultivo e na sua produção em larga escala está aumentando. Atualmente a cianobactéria mais vendida nesse perfil é a *Spirulina*, em forma de comprimidos, barras e constituintes junto com outros produtos (MORANÇAIS; MOUGET; DUMAY, 2018). Geralmente contem cerca de 60-70% de teor proteico, por este caso é utilizada na alimentação humana como suplemento de alto valor nutricional (BORBA et al.,2018).

Além disso, problemas atrelados à fome e diminuição de terras agricultáveis levam a procura de matérias-primas alternativas, e segundo Borba et al. (2018), a produção de proteínas a partir de micro-organismo, como cianobactérias, fungos e bactérias são as principais fontes de proteínas microbianas.

O nutriente mais importante para a síntese de proteínas microalgais é o nitrogênio, por fazer parte dos constituintes estruturais das células, como proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos (clorofila e ficobiliproteínas) (LOURENÇO, 2006). E quando o cultivo sofre depleção desse nutriente, ocorre a conversão de proteínas a compostos de armazenamento de energia, como carboidratos e lipídios (BORBA et al., 2018).

Segundo Morançais, Mouget e Dumay (2018), deve-se considerar que o teor de proteínas também está atrelado às dependências de fatores de cultivo, como temperaturas, pH, salinidade, irradiância, composição do meio de cultura.

Santos (2018) menciona que proteínas microalgais também são utilizadas constantemente na alimentação animal associadas a melhora na resposta imunológica, aumento de fertilidade e ganho de peso. Também é utilizada para refinar os produtos de aquicultura, como a coloração de salmonídeos. Além de que, são usadas principalmente na maricultura por serem fontes essencial na alimentação de larvas de diversas espécies de peixes, crustáceos e moluscos (BORBA et al., 2018).

Um estudo dirigido por Rodrigues et al. (2015) demonstrou a capacidade de *P. autumnale* na produção do antioxidante Trolox em  $274 \mu\text{mol g}^{-1}$ , indicando o potencial como fonte desse bioproduto. Portanto, a biomassa produzida por microalgas é considerada uma fonte superior de antioxidantes nutricionais pela

capacidade de produção em comparação às fontes convencionais de origem vegetal (KOYANDE et al., 2019).

### 3.6.2 Carboidratos

As cianobactérias possuem paredes celulares diferenciadas em comparação com outras bactérias Gram-negativas. Essa diferença está na presença da camada de peptidoglicano que é mais espessa e apresenta um grau maior de reticulação entre as cadeias polissacarídeas. Além disso, diversas cianobactérias caracterizam-se pela presença de camadas polissacarídeas exocelulares (exopolissacarídeos - EPS), como é o caso de *P. autumnale* (DI PIPPO et al., 2013).

As microalgas são consideradas uma fonte promissora para a produção de carboidratos, sendo capazes de acumular cerca de 50% desse composto via intracelular e apresenta como vantagem a facilidade de sacarificação e menos pré-tratamento, sendo muito competitivos em relação à materiais lignocelulósicos como matéria prima para a produção de biocombustíveis e biorrefinarias (CHEN et al., 2013).

Existe um grande interesse por EPS no setor industrial, pelo fato de serem convertidos em produtos nos setores alimentícios, farmacêuticos, biomédicos e de biorremediação, portanto as pesquisas sobre os componentes de EPS podem ter relevância econômica e científica, além disso, os exopolissacarídeos de cianobactérias são mais complexos quando comparados a outros micro-organismos, por possuírem propriedades físico-químicas potencialmente úteis (DI PIPPO et al., 2013).

Um estudo realizado por Trabelsi et al. (2009) revelou que a cianobactéria *Spirulina platensis* apresentou EPS formados por 13% de carboidratos e 55% de proteínas, e após a caracterização por cromatografia gasosa indicou que os EPS de carboidratos eram formados por sete açúcares, a galactose, xilose, glicose, frutose, ramnose, arabinose, manose, ácido galacturônico e ácido glucurônico. Avaliaram que a cianobactéria possui polímeros ricos que apresentam uma variedade de macromoléculas, as tornando valiosas para uso farmacêutico.

A produção de bioetanol por microalgas é facilitada pelo fato de possuírem paredes celulares com amido acumulado como fonte de carboidratos e de acordo

com Chen et al. (2013), tanto o amido quando a maior parte de polissacarídeos da parede celular podem ser convertidos em açúcares passíveis de fermentação para síntese de bioetanol por fermentação microbiana.

Chen et al. (2013) menciona que para maiores produções de carboidratos, devem haver mudanças no tipo de cultivo, como a depleção de nitrogênio, fazendo com que as cianobactérias assimilem mais carbono como componentes de reserva de energia. Rossi et al. (2016) também menciona que a depleção de nitrogênio pode aumentar a síntese de EPS juntamente com o aumento da razão C/N.

### **3.6.3 Lipídios**

Cianobactérias são produtoras de óleos unicelulares, os lipídios, que são vistos como uma ferramenta alternativa à produção de óleo para biocombustíveis (SILVA et al., 2017). Esses biocombustíveis de 3ª geração (assim chamados aqueles provenientes de microalgas) apresentam elevado potencial para se tornarem substitutos sustentáveis para os combustíveis fósseis, que geram gases do efeito estufa (GEE) além da produção requerer menos água, fertilizante e espaço de terra em relação aos combustíveis sintetizados a partir de alimentos (FIGUEROA-TORRES et al., 2020).

São diversas as vantagens e motivos para a aplicação de microalgas para produção de biocombustíveis, entre eles é a produção associada a compostos de alto valor, como proteínas e pigmentos que podem ser recuperados da biomassa restante da extração de carboidratos e lipídios, à alta produtividade de lipídios e carboidratos, muitas vezes ultrapassando a produtividade de culturas convencionais como a soja e a cana-de-açúcar, pelas microalgas obterem sucesso em diferentes meios de cultivo, como efluentes, reduzindo o uso de consumo de água e pela facilidade de alterar o meio de cultivo para produção do bioproduto de interesse (KLEIN ; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

Para minimizar custos de produção e se tornar um processo menos dispendioso, Andrade e Coluzzi Filho (2014) mencionam cultivar as cianobactérias em efluentes com boas cargas nutricionais, como a vinhaça de cana-de-açúcar. Ainda comenta que a produção de biocombustíveis microalgais pode compatibilizar

o potencial de se conseguir altas produtividades aliados à economia e ao baixo impacto ambiental.

Francisco et al., (2015) avaliou a produção de lipídios microalgais utilizando *Phormidium sp.* em cultivo heterotrófico de manipueira, e obteve uma produtividade de biomassa de 320,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, e uma produtividade lipídica de 43,8 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> com composição saturada e monoinsaturada, além de atender as normas nacionais e internacionais para a síntese de biodiesel.

Através dos lipídios microalgais também é possível obter óleos ricos em ácidos graxos poliinsaturados (EPA e DHA -  $\omega$  3) para consumo humano, tendo um alto valor nutricional (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Geralmente são encontrados em composições de ácidos graxos que contenham C18:1 (ácido oleico), C18:2 (ácido linoleico), C18:3 (ácido linolênio) e às vezes conjuntamente com C16:0 (ácido palmítico) (RATLEDGE, 2004).

Os PUFA, assim chamados os ácidos graxos poliinsaturados, são considerados essenciais para o desenvolvimento infantil e importante para a prevenção de doenças crônicas. Muitas organizações nacionais e internacionais de saúde (OMS) recomendam consumir diariamente esses óleos essenciais em paralelo às doses diárias recomendadas de nutrientes essenciais (ROBERTSON et al., 2013).

Se tratando de biocombustíveis possíveis de produção por meio dos lipídeos de microalgas, em grande escala pesquisado tem-se o biodiesel (CHEN et al., 2018; CHISTI, 2007; FARROKH et al., 2019; FIGUEROA-TORRES et al., 2020; KNOTHE; KRAHL; GERPEN, 2010; SIQUEIRA et al., 2016).

Os biocombustíveis produzidos a partir do óleo microalgal são chamados de biocombustíveis de 3ª geração e apresentam potencial de se tornarem substitutos sustentáveis dos combustíveis fósseis que são contribuintes para as emissões de gases do efeito estufa (FIGUEROA-TORRES et al., 2020). Outra vantagem para o biocombustível de 3ª geração é a baixa exigência do uso da terra, água e fertilizantes quando comparados com os biocombustíveis à base de alimentos (FARROKH et al., 2019; FIGUEROA-TORRES et al., 2020).

Farrokh et al. (2019) mencionam que as cianobactérias são consideradas fontes mais promissoras para a produção de biodiesel, devido ao curto tempo de

cultivo atrelado ao alto teor de óleo. Além disso, podem conter uma mistura de alcanos, alcoóis e ácidos graxos semelhantes aos combustíveis fósseis. Os autores ainda descrevem que a utilização de águas residuárias no cultivo microalgal torna a produção de biomassa rica em óleos mais econômica, ou seja, sem gastos com meios sintéticos.

Para a produção de biodiesel o ideal é uma composição de biomassa rica em ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA) em comparação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (FRANCISCO et al., 2019). O que diferencia são as ligações entre os carbonos, em geral, os ácidos graxos incluem os insaturados que contemplam os monoinsaturados (uma ligação dupla de carbonos) e poliinsaturados (mais de uma ligação dupla) e os saturados (sem ligações duplas de carbonos) (CHEN et al., 2018).

Segundo Knothe (2013) duas normas geralmente são utilizadas como diretrizes para o desenvolvimento de outros padrões de biodiesel em todos os países, bem como para avaliar a qualidade combustível do biodiesel produzido, sendo ASTM D6751 proveniente dos Estados Unidos e a EN 14214 da Europa. As especificações contidas nessas normas são atribuídas a vários fatores que influenciam as propriedades do biodiesel, mas principalmente ao perfil de ácidos graxos. Os parâmetros mensurados de acordo com as normas são o número de cetano (CN), o índice de iodo (IV), a estabilização à oxidação (OS) e a viscosidade cinemática ( $\mu$ ).

Outras características importantes para a síntese de biodiesel são, o grau de insaturação (DU), índice de saponificação (SV), fator de cadeia longa saturada (LCSF), ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP), ponto de névoa (CP), posição alílica (APE), posição bis-alílica (BAPE), maior valor de aquecimento (HHV) e densidade ( $\rho$ ) (KNOTHE; KRAHL; GERPEN, 2010).

O número de cetano (NC) é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel, sendo assim, um composto que tem alto número de octanas tende a apresentar um baixo NC e vice-versa. Para a escala de cetanas, o hexadecano ( $C_{16}H_{34}$ , hidrocarboneto linear) é considerado o padrão de alta qualidade com NC de 100, enquanto que o 2,2,4,4,6,8-8-heptametilnonano (HMN, também  $C_{16}H_{34}$ ), é um composto altamente ramificado com péssima qualidade de ignição em motores a diesel tem NC atribuído de 15. Assim, as ramificações e o



comprimento da cadeia influenciam o NC com valor reduzido, com a diminuição da cadeia e o aumento do grau de ramificação.

Geralmente, o número de cetano aumenta com o aumento do comprimento da cadeia e a diminuição da insaturação, (KNOTHE; KRAHL; GERPEN, 2010), bem como, quanto maior o número de cetanos, menor o atraso e melhor a qualidade de ignição (ALLEMAN E MCCORMICK, 2016).

O índice de iodo (IV) é uma medida do teor de insaturações totais de um material graxo, baseando-se na adição formal de iodo nas duplas ligações e determinada em g de iodo por 100 g de amostra. Este parâmetro indica a propensão do óleo ou gordura à oxidação, polimerização e formação de depósitos no motor. Por outro lado, a viscosidade é uma propriedade de resistência ao escoamento do fluido. Assim, quanto maior a viscosidade, maior a tendência do combustível causar problemas, sendo que, a viscosidade dos óleos transesterificados, isto é, do biodiesel é aproximadamente de uma ordem de magnitude inferior ao óleo de origem (KNOTHE; KRAHL; GERPEN, 2010). Sabe-se também que além do número de iodo estar relacionado com a viscosidade, tem relação com o número de cetano (CN) e o ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) (Sakthivel et al., 2018).

A estabilidade à oxidação do biodiesel é um dos principais indicadores do grau de oxidação e reatividade do ar, dependendo principalmente do número de posições bis-álílicas (BAPE) no compostos insaturado. A oxidação se inicia pela formação de radicais nas posições bis-álílicas formando peróxidos, dessa maneira são produzidos compostos orgânicos voláteis, cetonas e aldeídos, destruindo o éster metílico que por fim se polimeriza e pode danificar o sistema de injeção de combustível no motor. Quanto maior o grau de insaturação na cadeia de carbono, menor a estabilidade do biodiesel (Sakthivel et al., 2018).

De acordo com Knothe, Krahl e Gerpen (2010), a estabilidade à oxidação é mensurada pela adição da amostra em um tubo aquecido até a temperatura especificada nas normas (110°C), por meio da qual o ar é varrido. Então, com o aquecimento da amostra na presença de ar, dá-se o início da oxidação. A corrente de ar varre os compostos voláteis, como os ácidos orgânicos, formados pela oxidação em outro recipiente contendo água deionizada. A condutividade da água então é mensurada continuamente na medida que vai se alterando com o aumento da quantidade de compostos voláteis (ácidos orgânicos) varridos para a água.

Dessa maneira, o tempo até a variação máxima da taxa na condutividade é o tempo de indução, o qual deve ser registrado e especificado pelas normas padrões.

Knothe (2013) também menciona que além da presença de ar, outros fatores influenciam significativamente a estabilidade oxidativa, como o tamanho da área de contato com o ar, a temperatura e a presença de luz e que na maioria das vezes se faz necessária a adição de aditivos antioxidantes para atingir essas especificações.

A viscosidade cinemática é uma das principais características de um combustível, desempenhando um papel importante na atomização e penetração do spray. Como o biodiesel possui uma maior estrutura química e massa molecular, sua viscosidade é de 10 a 15 vezes maior que o combustível fóssil convencional. Ou seja, combustíveis mais viscosos tendem a causar atomização insuficiente resultando em menor eficiência térmica. Já uma viscosidade baixa, leva a gotas mais finas de combustível, facilitando o injetor a bombear o combustível para a câmara de combustão. Além disso, o processo de transesterificação é utilizado para reduzir a viscosidade dos ésteres metílicos (Sakthivel et al., 2018).

Chen et al. (2018) também cita que a viscosidade aumenta com ao aumento do comprimento da cadeia e do nível de saturação dos ácidos graxos, ou seja, uma melhor estabilidade à oxidação necessita de um alto nível de saturação de ácidos graxos.

Knothe (2013) menciona que é possível de obter biodiesel de qualidade adequada a partir dos lipídios microalgais. Chisti (2007) também cita essa possibilidade e que existe uma grande oportunidade para esse setor, inclusive para aquelas produzidas heterotroficamente com fontes de carbono exógenas. Chen et al. (2018) menciona alguns fatores para a produção mais econômica de biodiesel microalgal, sendo a utilização de efluentes, uma vez que também ocorre a remoção de contaminantes, cultivo integrado com a produção de outro bioproduto de alto valor agregado, e também no cultivo juntamente com peixes e camarões.

Outro viés na utilização de ácidos graxos microalgais é no setor de aviação. Segundo ANP (2020), se tratando do querosene, também denominado de Jet-A1 ou QAV é produzido por processos de refino e possui cadeias de 11 a 12 carbonos, sendo empregado em motores movidos a turbina. Existem diversos tipos de querosene comercializados, as diferenças são principalmente referentes ao ponto de congelamento e ao ponto de fulgor. Porém existem fontes alternativas desse

combustível, obtido por meio de biomassas, resíduos sólidos, carvão, gases residuais. Biocombustíveis também podem ser incorporados ao querosene de origem fóssil em até 50% devendo atender às normas estabelecidas.

A mistura de biocombustíveis ao querosene, ou seja, o bioquerosene veio como uma proposta para diminuição dos gases de efeito estufa (GEE), já que o setor de aviação é responsável por aproximadamente 2% de emissão de CO<sub>2</sub> todos os anos (YANG et al., 2019) e consome cerca de 8% do petróleo produzido globalmente (CREMONEZ et al., 2015). Visto isso, este setor busca alcançar uma redução de 50% nas emissões dos GEE até 2050, fator este que levam companhias aéreas a desenvolverem alternativas sustentáveis (YANG et al., 2019).

Cremonoz et al. (2015) mencionam que a biomassa microalgal pode ser utilizada para produção de bioquerosene a partir dos ácidos graxos obtidos por processos de transesterificação, além de relatarem uma redução de até 76% nas emissões dos GEE para este caso. Também citam que lipídeos com altas quantidades de ácido láurico (C12:0) são ideais para serem empregados na geração de bioquerosene, não exigindo fases de craqueamento, reduzindo os custos de investimento.

Além disso, ácidos graxos com cadeias curtas ou com alto número de insaturações podem ser utilizados na mistura por diminuírem os problemas do alto ponto de congelamento, como é o caso do ácidos graxos caprílico (C8:0) e linolênico (C18:3). Já a alta concentração de ácidos graxos que apresentam cadeias longas, se torna conveniente a técnica de craqueamento para a obtenção de cadeias mais curtas e simples (CREMONEZ et al., 2015).

Yang et al. (2019) também apresenta alguns parâmetros importantes que o bioquerosene deve possuir para sua utilização, como é o caso do ponto de congelamento e a viscosidade, que devem ser baixos o suficiente para garantir a fluidez adequada do biocombustível no sistema dos motores das turbinas, já que em altas altitudes a temperatura do tanque de combustível é muito baixa. A estabilidade de oxidação térmica deve ser alta, pois está relacionada a resistência do biocombustível à oxidação a uma temperatura de 100 a 106°C na presença de oxigênio

Se tratando das características de combustão do bioquerosene, elas são avaliadas pelos parâmetros, ponto de fumaça, emissões de material particulado,

monóxido (CO) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), número de cetano derivado, caracterizando a propriedade de ignição do bioquerosene que é continuamente vaporizado e inflamado juntamente com o ar quente de flui nos motores das turbinas. Esses parâmetros são de extrema importância no que se refere as emissões dos GEE, pois sua queima incompleta gera partículas e hidrocarbonetos que podem ser potencialmente poluidores.

### **3.6.4 Pigmentos e Ficocianina**

Koyande et al., (2019) menciona que há uma demanda crescente por pigmentos produzidos naturalmente devido a preocupações com a segurança alimentar, devido aos elementos prejudiciais presentes nas fontes sintéticas. Entre as várias fontes, as microalgas são grandes produtoras de pigmentos naturais pela sua capacidade de sintetiza-los em maior concentração em comparação com outras. Além disso, as microalgas podem ser cultivadas em águas salobras ou residuais, consumindo os nutrientes presentes enquanto reduzem a dependência de produtos químicos para o tratamento.

Morançais, Mouget e Dumay (2018) relatam que existem três classes de pigmentos encontrados em microalgas, são eles as clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas. Entretanto, os mais valiosos comercialmente falando são os carotenóides e as ficobiliproteínas, sendo amplamente utilizados em cosméticos, aditivos alimentares, biocompostos, indústrias farmacêuticas, corantes alimentares.

Lourenço (2006) menciona que as cianobactérias possuem ficobiliproteínas, que compõem estruturas granulares denominadas de ficobilissomos que se encontram sobre as membranas externas dos tilacóides (aparatos fotossintéticos). As ficobiliproteínas existentes em cianobactérias são quatro, a ficocianina (cor azul), ficoeritrina (cor vermelha), aloficocianina (cor azul) e a ficoeritrocianina (cor vermelha). Geralmente são produzidas em cultivo autotrófico, mas algumas espécies também desempenham boas produtividades em cultivo heterotrófico (MORAIS e BASTOS, 2018).

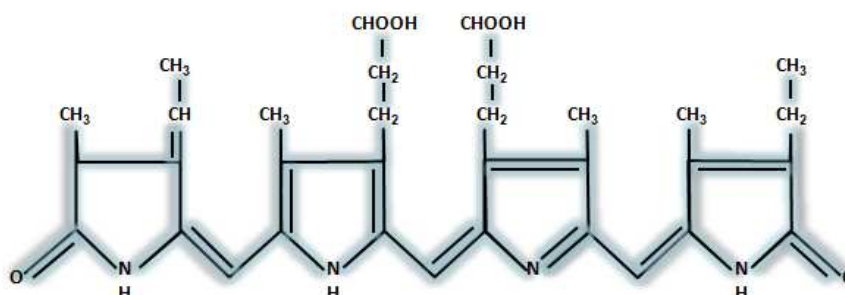
Os ficobilissomos das cianobactérias se dispõem sobre os centros de reação da fotossíntese e então desempenham o papel de transferir energia para os fotossistemas, a partir disso, as ficobiliproteínas aumentam o espectro de captação

de luz pela fotossíntese, ou atuam como reserva de nitrogênio. Se ocorrer situação em que a cianobactéria sinta carência de nitrogênio, as proteínas que constituem as ficobiliproteínas são degradadas e os ficobilissomos são eliminados, ocorrendo a liberação de nitrogênio para os processos metabólicos mais essenciais. E caso ocorra a inserção de nitrogênio no meio, os ficobilissomos podem ser reconstituídos (LOURENÇO, 2006).

A concentração de ficobiliproteínas em cianobactérias pode alcançar até 40% do conteúdo total de proteínas solúveis. Cabe ressaltar que a presença de uma fonte de carbono no meio em cultivo fotoautotrófico pode ocasionar na inibição de outras proteínas, favorecendo a síntese de ficobiliproteínas. Além disso, a ficocianina apenas é estável em pH de 5,5 - 6 e sob temperaturas abaixo de 47°C, fora desses valores pode ocorrer degradação do pigmento por desnaturação (MORAES, 2018).

A aplicação primária da ficocianina é como corante natural, porém também é utilizada no setor farmacêutico como agentes antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores. Atualmente a aplicação mais importante da ficocianina é como pigmento alimentar em chicletes, doces, refrigerantes e laticínios. Devido às suas propriedades espectrais e alto rendimento de fluorescência, também é muito usado como agente fluorescente. Além disso, também é usado em cosméticos de vários setores (MORANÇAS; MOUGET; DUMAY, 2018). A Figura 3 ilustra a estrutura química da ficocianina.

Figura 3 - Estrutura química da ficocianina



Fonte: Adaptado de LOURENÇO (2006)

Por fim, a utilização de produtos derivados de microalgas vem crescendo exponencialmente visto que são capazes de produzir múltiplos componentes em

uma única espécie. Possuem um elevado potencial para desacelerar a taxa de desnutrição nos países em desenvolvimento, por possuírem altos teores proteicos e outros nutrientes essenciais, como aminoácidos, antioxidantes, anti-hipertensivos, hepatoprotetores. Além de que, sua biomassa pode ser utilizada na alimentação animal e para produção de biocombustíveis (KOYANDE et al., 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A vinhaça utilizada nos experimentos foi coletada em uma usina sucroalcooleira da região de Araras/SP durante a safra 2018 e 2019, sendo prontamente congeladas em recipientes fechados até a sua utilização no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos. A vinhaça foi caracterizada de acordo com a metodologia proposta por APHA (2012).

Os parâmetros analisados foram o pH em pHmetro, turbidez (NTU) por meio do turbidímetro, sólidos suspensos (SS) por gravimetria, carbono orgânico total (COT) e nitrogênio total (NT) em Analisador TOC - LCPN SIMADZU<sup>®1</sup>, fósforo (P) através de kit reagente colorimétrico LABORAB<sup>®1</sup>, sendo calculada a razão carbono/nitrogênio (C/N) pela relação entre COT e NT. As análises para a caracterização da vinhaça foram realizadas em triplicata, verificando os valores médios e respectivos desvios padrões. Para utilização nos cultivos, a vinhaça descongelada foi previamente centrifugada por 15 min a 2500 rpm (1281 *g*) e esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos.

### 4.2 INÓCULO

A cianobactéria *P. autumnale*, originalmente isolada do Deserto Cuatro Cienegas no México (26° 59' N 102° 03W), foi mantida e propagada em meio líquido sintético BG11 (Tabela 2, RIPKA et al., 1979), previamente esterilizado por 20 minutos a 121°C em autoclave e com pH ajustado em 7,5.

As culturas estoques foram acondicionadas de forma estéril em capela de fluxo laminar nos balões de 6 L com aeração constante de 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e fotoperíodo de 12 horas (claro-escuro), até a concentração celular atingir aproximadamente 1g L<sup>-1</sup> para posteriormente ser utilizada nos cultivos. As concentrações foram verificadas através de gravimetria.

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Tabela 2 - Composição do meio sintético BG11

Componentes	Solução Estoque	Quantidade para 1 L de meio
$K_2HPO_4$	3 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,5 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,6 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
Citrato de amônio férrico	0,6 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
$Na_2$ EDTA	0,1 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
Ácido cítrico	0,6 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
$Na_2CO_3$	2,0 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
$NaNO_3$	15 g 100 mL <sup>-1</sup>	10 mL
$NaCl$	7,2 g 100 mL <sup>-1</sup>	1 mL
<u>Metais traço</u>		1 mL
$H_3BO_3$	286 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	181 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	39 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	7,9 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4,0 mg 100 mL <sup>-1</sup>	
pH 7,4 - 7,6		

Fonte: RIPKA et al., 1979

#### 4.3 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) NO CULTIVO DE *P. autumnale* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

O planejamento experimental objetivou o estudo das diferentes condições de cultivo, apresentando como variáveis independentes a temperatura, a razão C/N e pH do meio iniciais, bem como as respostas, concentração celular e a remoção de carbono orgânico, nitrogênio e fósforo da vinhaça (variáveis dependentes). Nesse sentido, a Tabela 3 e a Tabela 4 apresentam as condições utilizadas.

Os cultivos foram conduzidos em agitador orbital a 100 rpm (rotações por minuto), por meio de Frascos Erlenmeyers de 125 mL de volume útil, cobertos com papel alumínio para evitar incidência luminosa, contendo 25 mL de vinhaça e inóculo de aproximadamente 1 g L<sup>-1</sup> de biomassa microalgal. Para as maiores razões C/N, foram adicionadas quantidades de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), enquanto que a redução da razão C/N foi obtida a partir da adição de quantidades de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>).



As correções de pH foram realizadas por meio da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol L<sup>-1</sup> e ácido clorídrico (HCl) 1 mol L<sup>-1</sup>. Assim, para razão C/N de 4 e de 9 foram incorporados na vinhaça cerca de 8,9 g L<sup>-1</sup> e 2,3 g L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (NaNO<sub>3</sub>) respectivamente. Já para a correção das razões C/N de 23 e 28 foram adicionados aproximadamente 9,1 g L<sup>-1</sup> e 15,3 g L<sup>-1</sup> de glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) nesta mesma ordem. Não foi necessário corrigir a razão C/N de 16 por ser o valor original da vinhaça.

Ao final dos experimentos foram coletados 5 mL de cada amostra para a análise da concentração celular através de gravimetria. As análises de COT e NT foram feitas em Analisador TOC - LCPN SIMADZU<sup>®1</sup>. As concentrações de P foram mensuradas primeiramente por meio de kit reagente colorimétrico LABORLAB<sup>®1</sup> e em seguida pela leitura em espectrofotômetro a 340nm. A razão C/N foi obtida através do cálculo da relação entre COT e NT.

Os resultados dos ensaios foram avaliados pelo teste de variância (Anova), verificando quais variáveis foram ou não significativas (p<0,05). Além disso, a influência dos parâmetros temperatura, pH e razão C/N foram avaliados mediante Gráficos de Pareto e superfície de respostas por meio do Software STATISTICA 10 (StatSoft, OK, USA).

Tabela 3 - Proposta de delineamento para as variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais

<b>Variáveis/Níveis</b>	<b>-1,68</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>	<b>+1,68</b>
Temperatura (X <sub>1</sub> )	15	19	25	31	35
Razão C/N inicial (X <sub>2</sub> )	4	9	16	23	28
pH inicial (X <sub>3</sub> )	6,0	6,6	7,5	8,4	9,0

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Tabela 4 - Planejamento experimental com as variáveis codificadas

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

X<sub>1</sub>: temperatura; X<sub>2</sub>: razão C/N inicial; X<sub>3</sub>: pH inicial

#### 4.4 CULTIVOS EM BIORREATOR DE BANCADA

##### 4.4.1 Cultivo Heterotrófico em Batelada

Após seleção da melhor condição através do DCCR proposto, o cultivo heterotrófico de *P. autumnale* em vinhaça foi escalonado para biorreator de bancada atuando no sistema batelada.

O cultivo batelada ocorreu em biorreator de bancada Allbiom AllMic SCR05<sup>®1</sup> com vaso de vidro borossilicato de 5 L de volume útil, tampa em aço inox com conexão para adição de inóculo, interface de operação possibilitando o controle da agitação e temperatura, composto pelo sistema de termostatização (camisa), com dispositivo de aeração integrando filtro de membrana 0,2 µm.

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Os experimentos foram conduzidos em 3 L de volume de trabalho com vinhaça previamente centrifugada, com pH ajustado e esterilizada juntamente com o vaso, posteriormente foi envolto de papel alumínio para impedir a incidência luminosa, garantindo o cultivo heterotrófico (Figura 4).

Figura 4 - Biorreator de bancada operando em sistema batelada



Fonte: Elaborado pela autora

Cerca de  $605 \text{ mg L}^{-1}$  foram utilizados como inóculo no biorreator e inseridos via de bomba peristáltica, após ligou-se a aeração por 1VVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e agitação de 300 rpm. A concentração de inóculo está baseada na correção de acordo com os sólidos suspensos presentes na vinhaça. O cultivo foi conduzido por 48 horas e as condições foram razão C/N 16, pH inicial de 7,5 ajustado por meio de hidróxido de sódio (NaOH)  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , e temperatura de  $35^\circ\text{C}$  que foi mantida durante todo o experimento.

As amostragens foram realizadas de forma asséptica por meio de 10 mL para avaliação da concentração celular (gravimetria), remoção de COT e NT em Analisador TOC - LCPN SIMADZU<sup>®1</sup>. Ao final do cultivo a biomassa foi separada da vinhaça por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos (1281 g), foi lavada solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85 e em seguida foi congelada até sua utilização. A biomassa de *P. autumnale* foi mensurada em termos de proteínas, carboidratos, lipídios e ficocianina.

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Vale ressaltar que foram realizadas análises do inóculo em meio BG 11 como forma de branco e tempo zero do experimento. Dessa maneira, cerca de 20 mL da biomassa do inóculo foram amostradas de forma asséptica, prosseguindo de lavagem com solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85 seguida de centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos (1281 g). A biomassa foi congelada até sua utilização para fins de mensuração de proteínas, carboidratos, lipídeos e ficocianina.

#### **4.4.2 Cultivo Heterotrófico em Batelada Alimentada**

O cultivo em batelada alimentada também seguiu na melhor condição do DCCR. Foi realizado em biorreator de mistura com configuração de coluna de bolhas, composto de vidro borossilicato de 6 L de volume útil, com diâmetro externo de 23,9 cm e uma altura de 33,5 cm, resultando na relação altura/diâmetro (h/D) igual a 1,4.

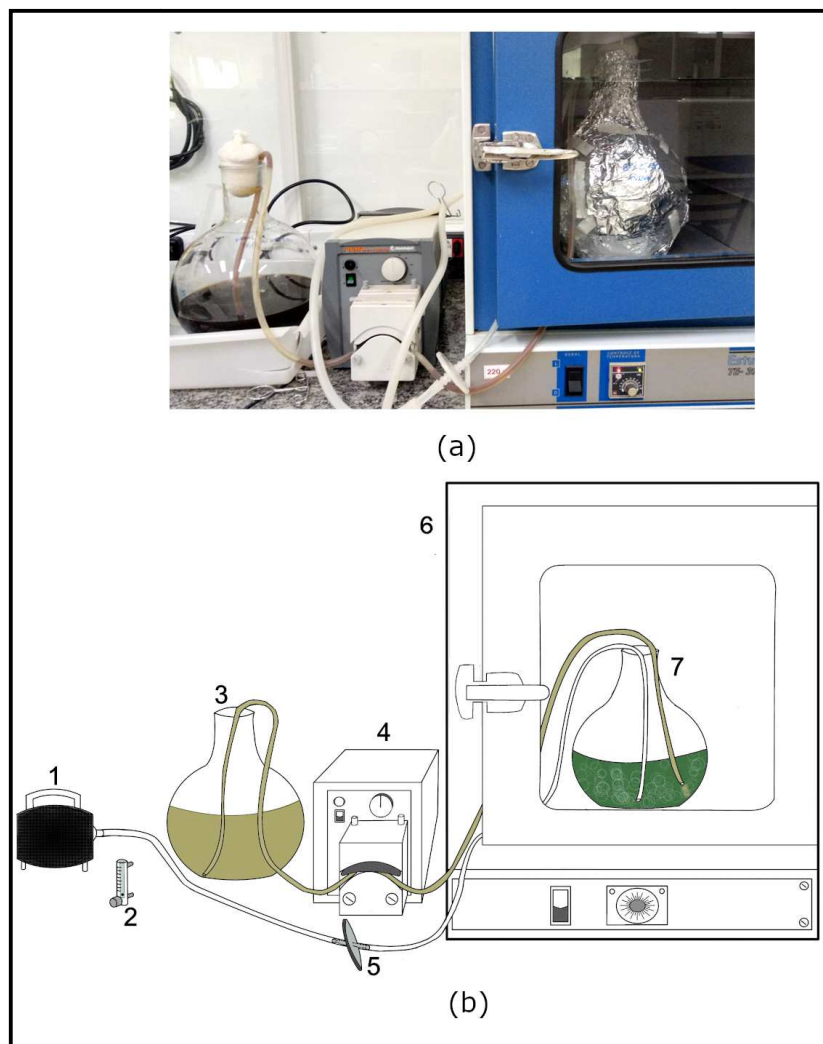
O volume de trabalho iniciou-se em 500 mL com vinhaça previamente centrifugada, pH ajustado e esterilizada juntamente com o biorreator, sendo envolvido em papel alumínio evitando incidência luminosa e inóculo de aproximadamente 860 mg L<sup>-1</sup>, sendo considerada essa concentração na correção de acordo com os sólidos suspensos presentes na vinhaça. O sistema de aeração foi constituído por um compressor seguido de um difusor de ar de 2,5 cm de diâmetro localizado no interior do biorreator, o qual apresentava um filtro de membrana 0,2 µm, a vazão era ajustada por um rotâmetro em 1 VVM. Assim, como a aeração mantinha as condições de mistura homogênea, neste sistema não houve agitação mecânica.

O cultivo ocorreu por 48 horas e as condições iniciais foram razão C/N 16, pH inicial de 7,5 e temperatura de 35°C, mantida durante todo o ensaio em estufa. As alimentações foram realizadas por frações de 1,1 L de vinhaça centrifugada, corrigida e estéril (COT 10237,0 mg L<sup>-1</sup> e NT 639,3 mg L<sup>-1</sup>) projetadas a partir do tempo de batelada ideal aproximando ao tempo de residência (vazão), por meio de uma bomba peristáltica durante 15 minutos cada alimentação. No total foram feitas cinco alimentações.

Amostragens assépticas de aproximadamente 10 mL foram realizadas a fim de avaliar a concentração celular (gravimentria), remoção de COT e NT. Além disso,

uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi retirada para leitura em espectrofotômetro pelas absorvâncias de 620 e 652 nm visando a quantificação de ficocianina (Bennet e Bogorad, 1973). Ao fim do experimento, a biomassa foi separada da vinhaça por centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos (1281 g), foi lavada com solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85 e em seguida foi congelada até sua utilização. A biomassa de *P. autumnale* em sistema batelada alimentada também foi mensurada em termos de proteínas, carboidratos, lipídios e ficocianina. A Figura 5 ilustra o cultivo em sistema batelada alimentada (a) e de forma ilustrativa o mesmo cultivo com as etapas desenvolvidas (b).

Figura 5: Ilustração e imagem da montagem proposta para o experimento com biorreator em sistema batelada alimentada com areação (1), rotâmetro (2), tanque de alimentação (3), bomba peristáltica (4), filtros de ar (5), estufa (6) e biorreator (7).



Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 5 (b) ilustra as etapas do cultivo em sistema batelada alimentada desenvolvidas, em que 1 é a bomba de aeração, 2 é o rotâmetro utilizado para medir a vazão de ar conforme o volume de vinhaça no biorreator aumentava. O número 3 demonstra o balão em que a vinhaça corrigida ficava armazenada para alimentação do biorreator, 4 é a bomba peristáltica, 5 o filtro membrana agregado à mangueira de aeração, para evitar contaminação, 6 a estufa que se mantinha em 35°C e por fim o biorreator que recebia a aeração e a alimentação heterotroficamente (7).

Destacando que foram realizadas análises do inóculo em meio BG 11 como forma de branco e tempo zero do experimento como descrito no item 4.4.2.

#### 4.5 CONCENTRAÇÃO CELULAR DA BIOMASSA NOS CULTIVOS

A concentração celular foi monitorada por gravimetria sendo determinado o teor de massa seca pela filtração a vácuo de 5 mL de amostra, utilizando o equipamento de filtração Milipore<sup>®1</sup>, através de membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de diâmetro, que já estavam previamente secas a 105°C por 60 minutos, esfriadas em dessecador e pesadas, posteriormente, foi feita a secagem da membrana com o filtrado por 105°C em estufa até atingir massa constante.

#### 4.6 CINÉTICA DE CRESCIMENTO E CONSUMO DE SUBSTRATOS

O monitoramento da concentração celular foi estimado por gravimetria, as concentrações dos substratos carbono orgânico total e nitrogênio total foram obtidos em Analisador TOC - LCPN SIMADZU, o fósforo foi mensurado pelo kit reagente colorimétrico LABORLAB e leitura em espectrofotômetro pela absorvância de 340 nm. Os dados obtidos foram utilizados para calcular os parâmetros cinéticos dos cultivos em sistemas batelada e batelada alimentada.

Para calcular a eficiência de remoção global (*ER*) dos substratos, ou seja, do COT, NT e P, foi utilizada a equação 1.

$$ER = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (1)$$

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Onde:  $S$  = concentração final de substratos na vinhaça

$S_0$  = concentração inicial de substratos na vinhaça

A produtividade global em biomassa ( $P_x$ ) foi calculada para os sistemas em batelada e em batelada alimentada pela equação 2.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t} \quad (2)$$

Onde:  $X$  = biomassa final

$X_0$  = biomassa inicial

$t$  = intervalo de tempo

As velocidades específicas de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e respectivos tempos de geração foram calculados pela interação da equação 3 na fase exponencial de crescimento microbiano (Ahmad e Holland, 1995). Sendo que para batelada alimentada foi multiplicado o valor da biomassa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) pelo volume de meio adicionado a cada tempo, após seguiu-se o cálculo normal.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{d(X)}{dt} \quad (3)$$

Onde:  $X$  = concentração de biomassa

$t$  = tempo

A conversão do carbono e nitrogênio (substratos) da vinhaça em biomassa (rendimento) foi estimada pela Equação 4 para os diferentes sistemas empregados.

$$\text{Rendimento } Y_{X/S} = d(x)/d(S) \quad (4)$$

## 4.7 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *P. autumnale*

### 4.7.1 Proteínas Totais

Após os ensaios, o meio de cultivo foi centrifugado para recuperar a biomassa que foi lavada com solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85. No sistema batelada a amostra foi depositada em uma placa de Petri para secagem em estufa a 105°C por 24 h. Já a amostra do sistema batelada alimentada foi utilizada úmida e convertido o valor final considerando o teor de massa seca.

Ambas as biomassas passaram por digestão, cerca de 0,1 g de biomassa seca macerada do sistema batelada e 1 g de biomassa úmida (teor seco foi igual a 0,1 g) do sistema batelada alimentada foram transferidas para um tubo de ensaio juntamente com 5 ml de solução digestora constituída de: 6,8 g de selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), 10 g de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 53,45 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e 500 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

No bloco digestor seguiram-se as seguintes temperaturas e intervalos de tempo para ocorrer a reação: 50°C por 30 minutos, 100°C por 120 minutos, 150°C por 30 minutos, 200°C por 30 minutos, 250°C por 30 minutos, 300°C por 30 minutos e 330°C por 30 minutos. Esperou-se o resfriamento das amostras e logo o conteúdo digerido foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL onde adicionou-se água MiliQ até atingir o menisco.

Por fim, o nitrogênio total (NT) das amostras foi mensurado em analisador TOC – LCPN SHIMADZU, sendo que o conteúdo em proteínas da cianobactéria *P. autumnale* foi obtido usando do fator geral proposto por Lourenço et al. (2004) de 4,78 recomendado para microalgas. A equação 5 foi utilizada para calcular o teor de proteínas totais.

$$\text{Proteínas}(\%) = \frac{(\text{NT} \times 4,78)}{\text{Biomassa seca}} \times 100 \quad (5)$$



#### 4.7.2 Carboidratos Totais e Perfil de Açúcares

O teor de carboidratos totais foi determinado pelo método proposto por Templeton et al. (2012), com quantificação dos principais carboidratos estruturais lignocelulósicos terrestres, sendo os açúcares neutros: glicose, xilose, galactose, arabinose e manose, representando mais de 95% do total de carboidratos e até 65% do peso seco de biomassa microalgal.

O método se iniciou primeiramente pela hidrólise ácida por meio da adição de 250 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% à biomassa liofilizada em um tubo de 10 mL, levado ao aquecimento por 1 hora à 30°C em banho termostático. Em seguida foram adicionados 7 mL de água MiliQ ao tubo, levando a concentração do ácido à 4%. Continuamente foram autoclavados por 1 hora à 121 °C.

Após resfriados à temperatura ambiente, foram retiradas alíquotas entre 1 e 3 mL das amostras para a neutralização no mesmo dia por meio da adição de carbonato de cálcio, alcançando pH entre 6 e 8. Em seguida, as amostras foram filtradas através do filtro Nylon PVDF/L de 0,22 µm com auxílio de uma seringa descartável, obtendo em torno de 0,7 mL que foi adicionado ao vial do cromatógrafo.

A determinação dos carboidratos totais ocorreu em Cromatógrafo com coluna de troca iônica DIONEX, o qual operou com as curvas padrões de glicose, xilose, galactose, arabinose e manose. Através de injeções, a amostra foi transportada para a coluna cromatográfica juntamente com NaOH em diferentes concentrações, de 5 e 250mM.

A amostra ficou na coluna por 25 min em contato com NaOH 5mM, em seguida fica por 5 min com a concentração de 250 mM e por fim mais 5 min à 5 mM, totalizando 35 minutos cada amostra. Os picos dos carboidratos foram identificados pelo tempo de retenção e pelas curvas padrões em mg/L.

A determinação ocorreu pelo método colorimétrico do reagente ácido dinitrosalicílico (ADNS) em que as biomassas foram hidrolisadas e neutralizadas pelo mesmo método proposto no item 4.7.2. Após a obtenção das amostras hidrolisadas, elas foram submetidas ao banho térmico por 5 minutos, após foram adicionados 5 mL de água MiliQ aos tubos que em seguida foram agitados.

Posteriormente foram realizadas leituras das amostras em espectrofotômetro a 540 nm.

#### 4.7.3 Lipídios Totais e Perfil de Ácidos Graxos

O teor de lipídios na biomassa microalgal foi determinado pelo método de extração proposto por Bligh e Dyer (1959). O meio de cultivo foi centrifugado para recuperar a biomassa que foi posteriormente lavada com solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85.

Para o sistema batelada aproximadamente 1 g de biomassa seca (macerada) foi utilizada, já para o sistema batelada alimentada foi usado 1 g de biomassa úmida sendo calculado o teor de massa seca ao final. Ambas foram transferidas para um tubo Falcon<sup>®1</sup> sendo adicionados 10 mL de metanol, em seguida foram adicionados 4 mL de água MiliQ e por último 5 ml de clorofórmio. A amostra foi deixada em contato com a solução extratora "*overnight*" e depois foi centrifugada por 10 min a 2500 rpm (1281 *g*).

O sobrenadante foi coletado e a extração foi realizada mais duas vezes, seguida de uma mistura de clorofórmio, metanol e água MiliQ nas proporções de 1:2:0,8. Obteve-se três sobrenadantes que foram agrupados, nas amostras foi adicionada água MiliQ para promover a separação de fases e obter a fase orgânica que fica depositada no fundo do tubo. A fase orgânica foi coletada em placa de Petri previamente tarada que foi colocada em capela para secar com intuito de não haver mais solvente na amostra.

Por fim, a placa foi colocada em dessecador para remoção da umidade restante e foi pesada para determinação do teor lipídico da amostra. Dessa forma a fração lipídica foi calculada de acordo com a equação 6:

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{M_o \times 100}{(\text{Biomassa seca})} \quad (6)$$

Onde: *M<sub>o</sub>*: Massa de óleo extraída

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Após a extração lipídica, o material obtido foi transesterificado. O procedimento foi adaptado do método proposto por Van Wychen, Ramirez e Laurens (2015). Primeiramente foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio a 100 mg das amostras em um tubo de ensaio com rosca. O tubo foi levado para bloco de aquecimento à 80 °C por 2 minutos, em seguida foram adicionados 3 mL do catalisador (ácido sulfúrico 1% (m/v) em metanol e aquecidos novamente por 2 minutos.

Após foram incorporados 1 mL de hexano e 3 mL de água MiliQ ao tubo até ocorrer a separação da fase orgânica, que logo após foi pipetada para um Eppendorf e adicionado 1 mL de água MiliQ para novamente coletar a fase orgânica, garantido a coleta de todo material. A amostra final foi transferida para um vial de GC -FID Shimadzu Modelo GC-2010 Plus<sup>®1</sup> em que foi analisada.

O equipamento opera com um auto injetor e com uma coluna RTX-Wax de 30 m com diâmetro interno de 0,25mm e espessura de filme de 25  $\mu$ m. Uma alíquota de 1  $\mu$ L da amostra foi injetada em modo *splitless*, com a porta de injeção a 250 °C e o detector a 300 °C. A temperatura do forno utilizada seguiu-se em: 50°C por 1 minuto, 25°C por minuto até 200°C, e por fim 3°C por minuto até 230°C (SUN, 2014). Utilizou-se o padrão Supelco 37 component FAME mix (CRM-47885) para identificar os picos. A área relativa de cada pico de interesse (metil-ésteres) foi empregada como medida indireta para a quantificação de cada ácido graxo.

A partir dos dados de ácidos graxos, foi utilizado o Software Biodiesel Analyzer para caracterização do óleo produzido para avaliação da síntese de biodiesel (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

#### **4.7.4 Extração, Purificação e Quantificação de Ficocianina**

Primeiramente, o meio de cultivo foi centrifugado para recuperar a biomassa que foi lavada com solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,85 e foi utilizada em estado úmido.

A determinação da umidade ocorreu pela secagem de 1g de biomassa em uma placa de Petri previamente seca e tarada, o material ficou na estufa a 105°C por 24 horas, após foi colocado em dessecador para atingir peso constante. O

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

cálculo do teor de massa seca ocorreu pela massa perdida após a secagem de acordo com a Equação 7.

$$\text{Teor de massa seca} = BMU \times MS \quad (7)$$

Onde: *BMU*: biomassa úmida

*MS*: % massa seca (biomassa após secagem / biomassa úmida)

Para a extração de ficocianina, aproximadamente 1g de biomassa úmida foi homogeneizada em um almofariz e pilão juntamente com 2 g de areia que foi previamente purificada em solução de ácido. Ficou-se por 10 minutos homogeneizando a mistura, após esse tempo foi adicionado aos poucos 100 mL da solução tampão fosfato 0,2 M pH 6,87 (SARADA, PILLAI, RAVISHANKAR, 1998).

Em seguida, foi realizada a filtração da amostra em filtro qualitativo. O filtrado passou pelas leituras em espectrofotômetro HACH DR 5000<sup>®1</sup> nos comprimentos de ondas de 620 e 652 nm. A concentração em ficocianina foi calculada através da Equação 8 (BENNET e BOGORAD, 1973) e o rendimento através da Equação 9.

$$FC = \frac{A_{620} - 0,474 (A_{652})}{5,34} \quad (8)$$

Onde: *FC* = concentração de ficocianina (mg mL<sup>-1</sup>)

*A*<sub>620</sub> = absorbância a 620 nm

*A*<sub>652</sub> = absorbância a 652 nm

$$Y = \frac{(FC) V}{BM} \quad (9)$$

Onde: *Y* = Rendimento de biomassa em ficocianina (mg mg<sup>-1</sup>)

*FC* = Concentração de ficocianina (mg mL<sup>-1</sup>)

*V* = volume do solvente (mL)

*BM* = biomassa (mg)

<sup>1</sup> Referências à marca registrada não constitui endosso por parte dos autores.

Para a purificação, foram medidos 100 mL da extração e adicionados 40% de sulfato de amônio (40g a cada 100 mL do conteúdo extraído). Em seguida, o recipiente foi coberto com papel laminado e mantido “*overnight*” a 4°C. Após a solução foi centrifugada por 20 min a 3000 rpm (1844 *g*) para separação do sobrenadante, que logo foi lido em espectrofotômetro nos mesmos comprimentos de onda definidos para a extração, sendo calculada a concentração e os rendimentos pelas equações já mencionadas (8 e 9).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A vinhaça, sendo um efluente proveniente do setor sucroenergético, apresenta em sua composição elevadas concentrações de matéria orgânica e nutrientes, muito variável a depender da variedade de cana-de-açúcar, período de colheita e processo industrial empregado na produção de etanol (DE MATOS E BASTOS, 2015; OLGUÍN, 2015; REIS e HU, 2017).

Diante disso, foram realizadas as caracterizações das amostras de vinhaça coletadas, do lote de 2018 que foi utilizado no DCCR e no sistema batelada e outro lote de 2019 empregado no sistema batelada alimentada. Como a vinhaça utilizada nos cultivos foi previamente centrifugada (DE MATOS E BASTOS, 2015), os parâmetros analisados partiram desse princípio. A Tabela 5 apresenta a caracterização das amostras de vinhaça do lote de 2018 e de 2019.

Tabela 5 - Caracterização da vinhaça centrifugada empregada nos cultivos

<b>Parâmetros</b>	<b>Lote 2018</b>	<b>Lote 2019</b>
pH	4,37 ± 0,10	4,34 ± 0,03
Turbidez (NTU)	111,3 ± 0,47	192 ± 0,5
Sólidos suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	720 ± 70	1606,67 ± 80
COT (mg L <sup>-1</sup> )	7854 ± 4,0	7501 ± 37
NT (mg L <sup>-1</sup> )	499,2 ± 3,85	639,87 ± 7,1
P (mg L <sup>-1</sup> )	34,5 ± 4,13	45,28 ± 2,51
Razão C/N calculada	16 ± 0,18	12 ± 0,18

Os resultados apresentados na Tabela 5 indicam que, mesmo com a centrifugação, a concentração de sólidos suspensos permaneceu em  $720 \text{ mg L}^{-1}$  para a vinhaça de 2018 e de  $1606,67 \text{ mg L}^{-1}$  para a de 2019. Desta maneira, para todas as concentrações de biomassa realizadas, os valores de sólidos suspensos foram descontados.

Os resultados de turbidez estão atrelados à quantidade de sólidos suspensos, carga orgânica e nutricional presente na vinhaça (CHRISTOFOLETTI et al., 2013; FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017; MARIANO et al., 2009). Neste sentido, os dados da Tabela 5 apresentam valores de sólidos e turbidez mais elevados do lote de 2019 quando comparado com o lote de 2018.

Considerando os cultivos heterotróficos de microalgas, a turbidez elevada pode ser um fator importante, limitando a incidência de luz e promovendo o consumo de fontes orgânicas de carbono. Por outro lado, a alta turbidez da vinhaça, indicada pela quantidade de sólidos suspensos se torna um obstáculo para os cultivos autotróficos e mixotróficos, portanto a remoção destes compostos inclui outros processos de clarificação como a eletrocoagulação a fim de facilitar esses sistemas fotossintetizantes. Portanto, sem tratamento prévio, o crescimento das microalgas neste efluente se dá por via heterotrófica, às expensas de matéria orgânica. Assim, o aproveitamento de carbono e nitrogênio (responsável pela constituição de enzimas e proteínas) da vinhaça poderia representar uma parcela importante dos custos operacionais dos cultivos microalgais (BETTANI et al., 2018; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2016; SAAVEDRA et al., 2018; KLEIN, 2018). Sendo assim, de forma a manter a homogeneidade dos ensaios, os frascos e biorreatores serão cobertos para limitar a luminosidade independente da turbidez do meio de cultivo.

As concentrações de COT, NT e P foram de  $7501 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $639,87 \text{ mg L}^{-1}$  e  $45,28 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente para a vinhaça de 2019 e se percebe uma leve diminuição do COT, e incremento do NT e P em relação à vinhaça de 2018 (COT:  $7854 \text{ mg L}^{-1}$ , NT:  $499,2 \text{ mg L}^{-1}$  e P:  $34,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) o que levou na mudança da razão C/N, calculada a partir da relação entre COT e NT, em que foi trabalhado com 16 no DCCR e no sistema batelada, mas que para o sistema batelada alimentada a razão C/N de 12 necessitou de correção com cerca de  $6,84 \text{ g}$  de glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ). A razão C/N de 16 está discretamente abaixo do ótimo para cultivo de microorganismos (em torno de 20) de acordo com Queiroz et al. (2007).

Os elevados teores de matéria orgânica da vinhaça estão relacionados às altas concentrações de glicerol (fonte de carbono solúvel), ácidos orgânicos e nitrogenados, além dos minerais, potássio, cálcio e magnésio (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

O pH de ambas as caracterizações ficou na faixa ácida com 4,37 e 4,34, valores estes geralmente encontrados para vinhaça (MARIANO et al., 2009), carecendo de neutralização prévia para os cultivos, pois nesta faixa pode causar inibição celular (FUESS; RODRIGUES; GARCIA, 2017).

Os resultados indicam que a vinhaça é água residuária rica em nutrientes como nitrogênio e fósforo, o que indica o seu potencial como meio de cultivo para microalgas. Além disso, a elevada concentração de carbono orgânico favorece o desenvolvimento heterotrófico de algumas linhagens microalgais, uma vez que é responsável pela fonte de energia nos cultivos limitados pela luminosidade (PEREZ-GARCÍA et al., 2015).

## 5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA, RAZÃO C/N E pH INICIAIS NO CULTIVO DE *P. autumnale* EM VINHAÇA

A Tabela 6 apresenta os resultados do delineamento composto central rotacional a partir das variáveis independentes temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), razão C/N inicial, pH inicial e as variáveis dependentes (respostas) produtividade de biomassa ( $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), remoção de COT (%), remoção de NT (%) e remoção de P (%). São apresentados os valores reais das variáveis independentes, sendo o ponto central do delineamento os ensaios 15, 16 e 17.

As melhores produtividades em biomassa ( $127,20$  e  $107,91 \text{ mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) foram obtidas em altas temperaturas ( $31$  e  $35^{\circ}\text{C}$ ), nas relações C/N de 23 e 16, bem como em pH de 8,4 e 7,5, respectivamente. As concentrações celulares mais elevadas de microalgas tendem a ocorrer na faixa de pH mais próximo da neutralidade ou alcalino para maiores razões C/N (FRANCISCO et al., 2015; XU et al., 2019). Destacando a razão C/N 16 sendo própria da vinhaça que não necessitou de correção prévia.

Em razões C/N 16, nos ensaios 13, 14, 15, 16 e 17 percebe-se que o nitrogênio se torna o substrato limitante pela maior remoção em relação à remoção de COT. Essa condição também se destaca onde foi realizado o acréscimo de carbono por meio da glicose em razões C/N maiores de 23 e 28, nos ensaios 3, 4, 7, 8 e 12. Autores mencionam essas condições para cultivos em que se objetiva o acúmulo de lipídios unicelulares, pois com a rápida assimilação do nitrogênio, o carbono orgânico fica em excesso, e a cianobactéria continua assimilando-o pela sua disponibilidade, induzindo ao armazenamento deste composto em suas células (AUSSANT; GUIHÉNEUF; STENGEL, 2018; FRANCISCO et al., 2019; RICHMOUND, 2004). Já em razões C/N menores de 9 e 4 em que houve incremento de nitrato de sódio, ocorreram maiores remoções de COT em relação ao NT, nesses casos houve uma assimilação maior de carbono pela cianobactéria.

Tabela 6 - Efeito da temperatura, razão C/N e pH iniciais no cultivo de *P. autumnale* em vinhaça

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão C/N	pH	Produtividade de Biomassa (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Remoção COT (%)	Remoção NT (%)	Remoção P (%)
1	19	9	6,6	24,72 ± 1,71	29 ± 1,67	16 ± 3,08	35 ± 1,51
2	31	9	6,6	86,11 ± 4,92	45 ± 0,75	28 ± 0,14	31 ± 3,03
3	19	23	6,6	41,25 ± 5,00	28 ± 1,92	30 ± 0,03	25 ± 12,28
4	31	23	6,6	91,11 ± 4,16	31 ± 2,08	48 ± 0,42	33 ± 6,44
5	19	9	8,4	39,17 ± 0,83	33 ± 1,09	22 ± 0,39	14 ± 14,30
6	31	9	8,4	95,00 ± 6,67	49 ± 0,47	34 ± 2,11	25 ± 0,34
7	19	23	8,4	58,13 ± 3,96	35 ± 2,40	36 ± 3,22	23 ± 1,01
8	31	23	8,4	127,22 ± 5,79	30 ± 6,04	39 ± 4,44	14 ± 0,34
9	15	16	7,5	9,17 ± 1,18	32 ± 0,66	30 ± 0,13	12 ± 0
10	35	16	7,5	107,92 ± 1,25	49 ± 1,36	47 ± 2,12	28 ± 1,01
11	25	4	7,5	61,67 ± 2,50	35 ± 5,43	26 ± 5,81	30 ± 1,35
12	25	28	7,5	67,50 ± 0,39	38 ± 0,04	41 ± 3,05	27 ± 3,70
13	25	16	6	27,50 ± 2,45	32 ± 1,56	38 ± 2,94	5 ± 0,67
14	25	16	9	56,88 ± 1,87	39 ± 2,71	50 ± 1,98	29 ± 11,10
15	25	16	7,5	55,42 ± 4,34	37 ± 0,18	41 ± 5,31	24 ± 7,21
16	25	16	7,5	62,08 ± 4,74	30 ± 3,61	38 ± 4,81	41 ± 0
17	25	16	7,5	56,25 ± 4,25	33 ± 3,20	43 ± 4,41	34 ± 0

COT: Carbono orgânico total; NT: Nitrogênio total; P: Fósforo



Maiores remoções de fósforo foram encontradas em temperaturas de 19 à 31°C, Martínez et al. (2000) também reporta melhores remoções de P em temperaturas de 20 à 30°C. No ensaio 1, a remoção de P foi de 35% sendo superior às remoções de COT (29%) e NT (16%) para o mesmo ensaio. Em outros ensaios se observa que essas remoções também estão atreladas ao menor consumo de carbono e maior de nitrogênio. Arora et al. (2016) menciona que maiores remoções de nutrientes (NT e P) também se tornam um fator limitante para o acúmulo de biodiesel, uma vez que a sinergia de NT e P é fundamental para alcançar altas produtividades lipídicas, juntamente com a redução de 50% dos nutrientes presentes.

Segundo Santos et al. (2016) o fósforo é um fator-chave no metabolismo energético das microalgas, sendo encontrado em ácidos nucleicos, lipídios, proteínas e carboidratos. Principalmente os fosfatos inorgânicos, que desempenham um papel significativo no crescimento e metabolismo das células de cianobactérias. Explica que o fósforo nas formas de  $\text{PO}_4^{-3}$  é assimilado em compostos orgânicos por meio da fosforilação, envolvendo a geração de ATP, acompanhada de uma forma de entrada de energia. Sendo então os fosfatos transferidos por transporte energizado através da membrana plasmática da célula da cianobactéria. De acordo com Reis e Hu (2017) a concentração média de  $\text{PO}_4^{-3}$  encontrados na vinhaça são de 560 mg  $\text{L}^{-1}$ .

Os ensaios extremos do delineamento, 9 e 10, condicionados às temperaturas discrepantes (15 e 35°C respectivamente), porém na mesma razão C/N de 16 e pH de 7,5, obtiveram remoções de carbono levemente maiores quando comparados com nitrogênio. Referente aos ensaios do ponto central (15, 16 e 17) em temperaturas de 25°C ocorrendo nas mesmas condições de razão C/N e pH dos pontos extremos, se observa maiores produtividades de biomassa e remoções de COT, NT e P em relação ao ensaio 9 de menor temperatura. Já o ensaio 10 se sobressai ao ponto central na produtividade de biomassa e remoções de COT e NT, evidenciando a importância de temperaturas mais altas para o metabolismo microalgal.

A temperatura dos processos é um dos fatores chave para o crescimento e desenvolvimento microalgal, influenciando principalmente nas atividades do metabolismo, no consumo de energia, nas estruturas macromoleculares (XU et al.,

2019), tal como na produção de lipídios e outros bioprodutos (AUSSANT; GUIHÉNEUF; STENGEL, 2018; CHEN e CHEN, 2006).

A condição que obteve melhor desempenho frente às demais foi o ensaio 10, com temperatura inicial de 35°C, relação C/N de 16 e pH 7,5, obtendo alta produtividade de biomassa, atingindo 107,91 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, com remoção de 48% para COT, 46% para NT e 28% para P. Além disso, cabe ressaltar que esta condição representa a própria relação C/N de vinhaça, ou seja, não havendo a necessidade de custos para correção do meio de cultivo.

O desempenho com menor eficiência em termos de produtividade de biomassa ocorreu no ensaio 9 em temperatura mais baixa (15°C), porém em pH de 7,5 e condição C/N de 16, obtendo-se uma produtividade de biomassa 9,17 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e um remoção de P baixa de 12%. De fato, a temperatura exerce uma grande influência no crescimento, porém, cultivos abaixo de 20°C são sugeridos visando um acúmulo maior de ácidos graxos poliinsaturados na tentativa de obtenção de óleos ricos em ômega 3 e 6 para alimentação, pelo fato da microalga se aclimatar para manter a fluidez das membranas (AUSSANT; GUIHÉNEUF; STENGEL, 2018; ROBERTSON et al., 2013). Neste caso específico, em função do baixo crescimento, o acúmulo de lipídios (PUFA) não compensaria a baixa produtividade celular. Em contrapartida as remoções de COT (32%) e NT (30%) não foram as mais baixas neste ensaio, sugerindo consumo de substratos com baixo rendimento em biomassa, o que é tecnicamente interessante em termos de tratamento de efluentes.

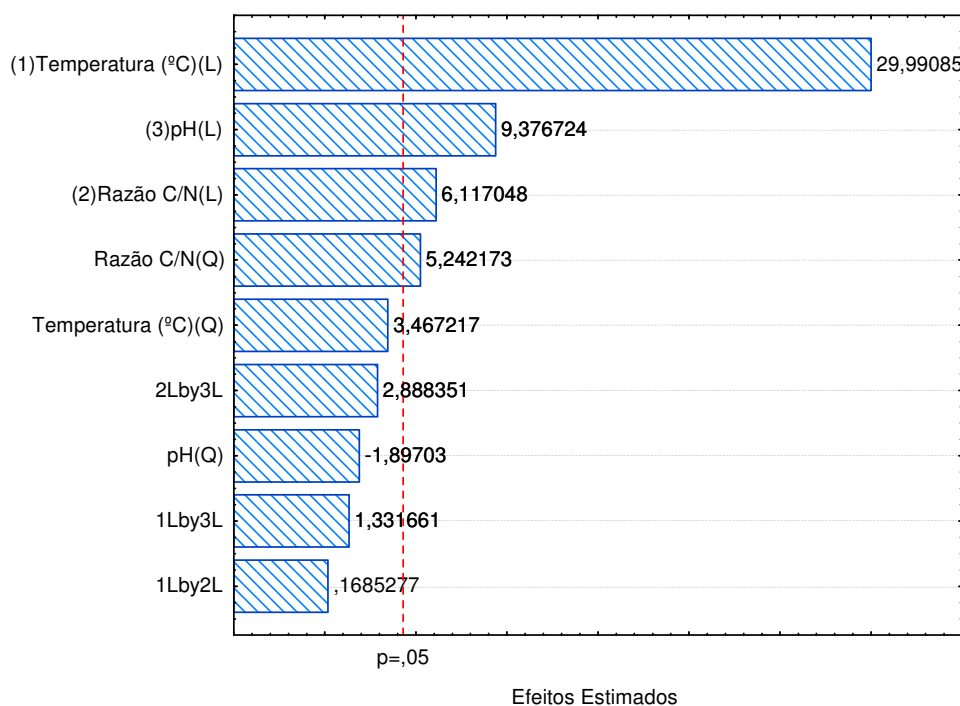
As produtividades de biomassa menores ocorreram em temperaturas baixas (15 e 19°C) e em pH de 6 a 6,6. As menores remoções de COT e NT também ocorreram nessas mesmas condições. Xu et al. (2019) mencionam que em temperaturas baixas a respiração celular diminui, havendo decréscimo do consumo de nutrientes e em altas temperaturas o consumo é maior. Sabendo que as faixas de pH também influenciam na remoção desses compostos, ou seja, em pH ácidos ocorre um decréscimo de remoção de alguns nutrientes, sendo a faixa ótima entre 7,5 - 10 (TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015).

As produtividades em biomassa, remoções de matéria orgânica e nitrogênio estiveram na mesma faixa dos obtidos para outras microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar (COCA et al., 2015; ENGIN et al., 2018; MATTOS e BASTOS, 2015; SANTANA et al., 2016).

Dessa forma, se ressalta que as diferentes condições de cultivo influenciam na composição e na concentração de compostos celulares de microalgas (ZEPKA et al., 2008) e devem ser levados em consideração na decisão do bioproduto de interesse.

Após definidos os fatores significativos ( $p < 0,05$ ) pelos testes de Variância (Anova), foram realizados os Gráficos de Pareto e Superfície de Resposta para cada variável dependente (produtividade de biomassa, remoção de carbono orgânico e remoção de nitrogênio). O Gráfico de Pareto para produtividade em biomassa pode ser verificado na Figura 6.

Figura 6 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na produtividade em biomassa

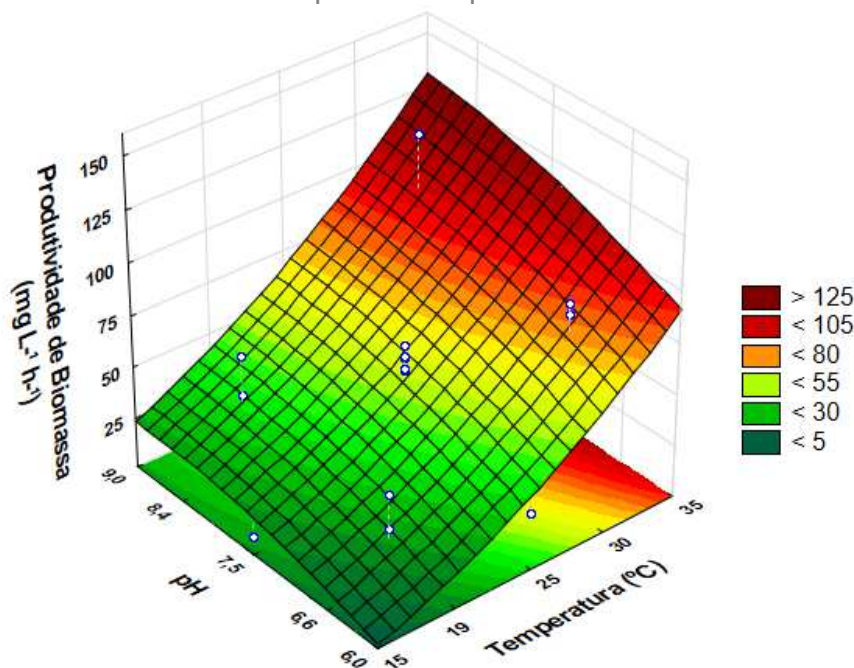


A Figura 6 apresenta a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para as variáveis temperatura, pH e razão C/N iniciais. Porém a variável mais significativa para a produtividade de biomassa foi a temperatura em índices mais elevados, seguido do pH e da razão C/N (linear e quadrática).

Comparando o Gráfico de Pareto com o gráfico de superfície de resposta para pH e temperatura relacionados à produtividade de biomassa apresentado na Figura 7, percebe-se que maiores produtividades de biomassa ocorrem em

temperaturas mais elevadas (30 e 35°C) e em pH próximo da neutralidade e alcalino (7,5 e 8,4).

Figura 7 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação à temperatura e pH inicial



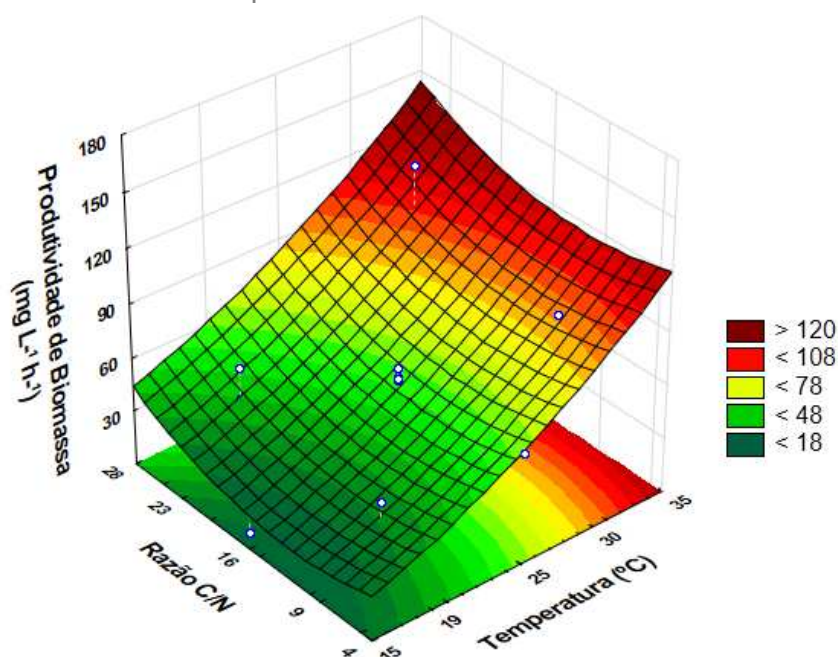
Santos et al. (2019) estudaram o cultivo heterotrófico de *P. autumnale* em efluente cervejeiro e utilizaram uma temperatura de 30°C em pH de 7,6 e obtiveram boas remoções de contaminantes (63% de carbono, 66% de nitrogênio e 50% de fósforo). Pouliot et al. (1989) utilizaram a cianobactéria *Phormidium* sp. para tratamento de amônia em efluente de suinocultura em pH de 8,1 e temperatura de 24 °C e verificaram uma remoção de amônia de 95%. Portanto esses estudos apontam um bom desempenho de *Phormidium* em pH básicos e altos e em temperaturas mais elevadas.

A Figura 8 apresenta o gráfico de superfície de resposta para razão C/N e temperatura referentes à produtividade de biomassa. Nota-se que para as razões C/N estudadas não obteve uma diferença discrepante, mas que melhores produtividades de biomassa ocorrem nas razões C/N de 16, 23 e 28 e em temperaturas mais elevadas.

Os resultados indicam que o efeito da temperatura foi significativo no crescimento microalgal. Considerando que a vinhaça é a água residuária oriunda do processo de destilação e disponível em temperaturas superiores a 80°C (NOVA

CANA, 2020), a aplicação desta microalga poderia ocorrer em torno de 35°C, necessário apenas de um tanque de resfriamento onde poderia ocorrer simultaneamente o ajuste de pH, minimizando os gastos energéticos.

Figura 8 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação a temperatura e razão C/N inicial

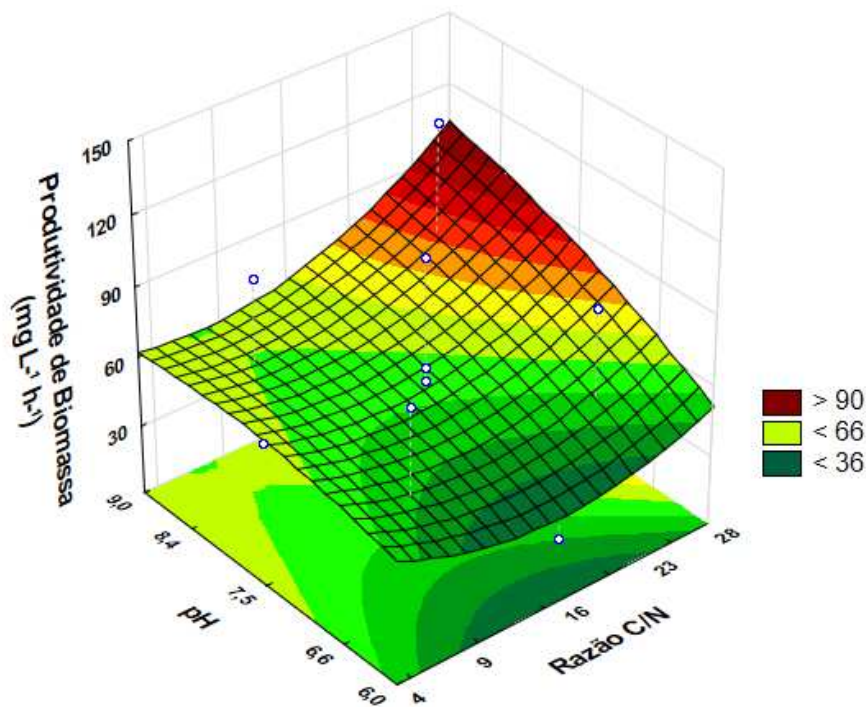


Francisco et al. (2019) pesquisaram o efeito de diferentes razões C/N para distintas fontes de nitrogênio em cultivo heterotrófico de *P. autumnale*, empregando temperatura de 26°C e pH 7,6. Obtiveram produtividade de biomassa por 62 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em razão C/N de 20 aplicando molibdato de amônio. Silva et al. (2017) estudaram as diferenças de temperatura para o cultivo heterotrófico de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça sob razão C/N 23, pH de 7,5 e alcançaram uma máxima concentração celular em temperaturas de 30 e 35°C e velocidade máxima específica de crescimento de 0,045 h<sup>-1</sup>. Dessa maneira, pesquisas demonstram potencial em razões C/N próximas de 16, com temperaturas e pH semelhantes ao do presente estudo.

A Figura 9 mostra o gráfico de superfície de resposta para as variáveis pH e razão C/N relacionado à produtividade de biomassa. Verifica-se produtividades maiores mais direcionadas para razões C/N de 16, 23 e 28 e em pH 7,5, 8,4 e 9, ou seja, uma ampla faixa, o que é interessante se tratando de efluente agroindustrial

muito variável, dependente das condições de destilação e fermentação aplicadas, da variedade de cana utilizada (MONÇÃO et al., 2018). Porém, a faixa de pH indica a necessidade de neutralização, comum nos processos de tratamento biológico de efluentes e que poderia ocorrer no próprio tanque de resfriamento.

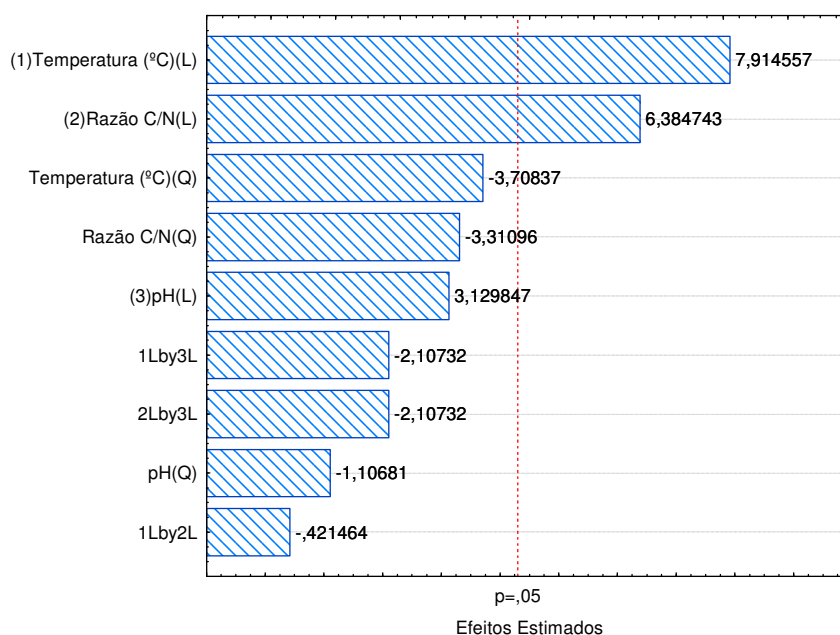
Figura 9 - Superfície de resposta da produtividade em biomassa com relação a razão C/N e pH iniciais



Para a análise da variável produtividade de biomassa em relação às variáveis independentes tem-se que os maiores valores ocorrem nas temperaturas de 31°C e 35°C, em relações C/N de 16, 23 e 28 e em pH 7,5, 8,4 e 9. Resultados semelhantes foram encontrados por Xu et al. (2019) que avaliou o cultivo mixotrófico de *Chlorella vulgaris* empregando efluente municipal doméstico de pH inicial 7, em diferentes temperaturas, e obteve as melhores produtividades em temperaturas mais elevadas de 35°C com produtividade de biomassa de 77,79 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Em relação ao presente estudo, foram encontrados valores maiores para 31°C e 35°C (127,22 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e 107,92 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> respectivamente).

A Figura 10 ilustra o Gráfico de Pareto de causa e efeito referente à remoção de nitrogênio na vinhaça. Verifica-se a influência significativa da temperatura elevada seguido de razões C/N maiores ( $p < 0,05$ ).

Figura 10 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de nitrogênio da vinhaça

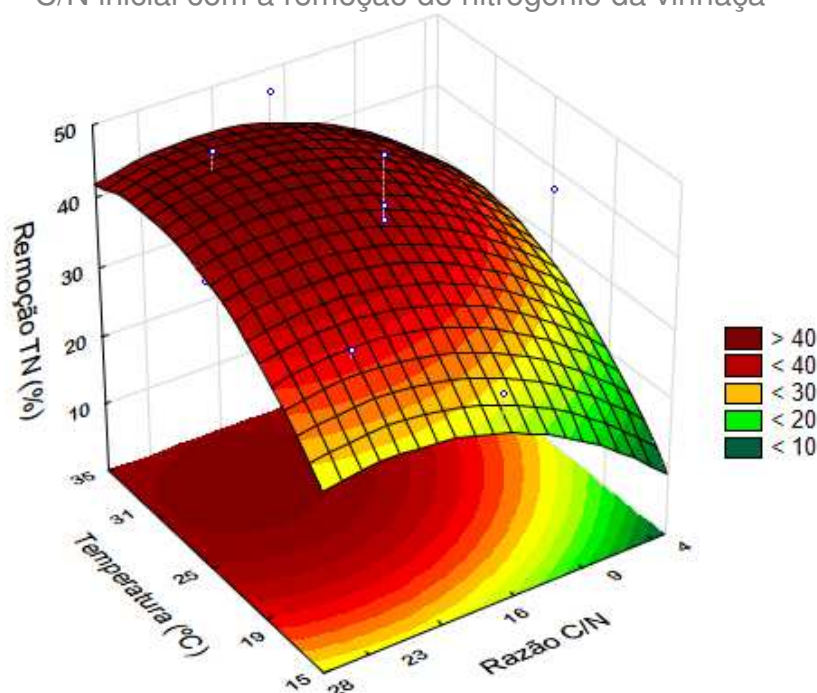


De acordo com o estudo feito por Da Fontoura et al. (2017), no cultivo mixotrófico de *Scenedesmus sp.* contendo 60% de efluente proveniente de curtume a uma razão C/N 4 em 25°C e a pH 7,5, foram obtidas produtividade de biomassa de 96,67 mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, remoções de nitrogênio e de carbono em torno de 60% e 57% respectivamente, destacando a viabilidade de outras espécies de microalgas para o tratamento de efluentes. Um fator interessante foram as maiores remoções de nitrogênio em comparação com carbono encontradas pelo autor, o mesmo ocorreu na presente pesquisa. O fato do nitrogênio estar em menores concentrações sugere a conversão desse nutriente pela microalga em sua biomassa quando comparado ao carbono que se encontra mais disponível.

A Figura 11 ilustra o gráfico de superfície de resposta para a temperatura e razão C/N relacionadas à remoção de NT. Observa-se que as variáveis mais significativas foram a razão C/N de 16, 23 e 28 em temperaturas de 25, 31 e 35°C.



Figura 11 - Gráfico de superfície de resposta relacionando a temperatura e a razão C/N inicial com a remoção de nitrogênio da vinhaça

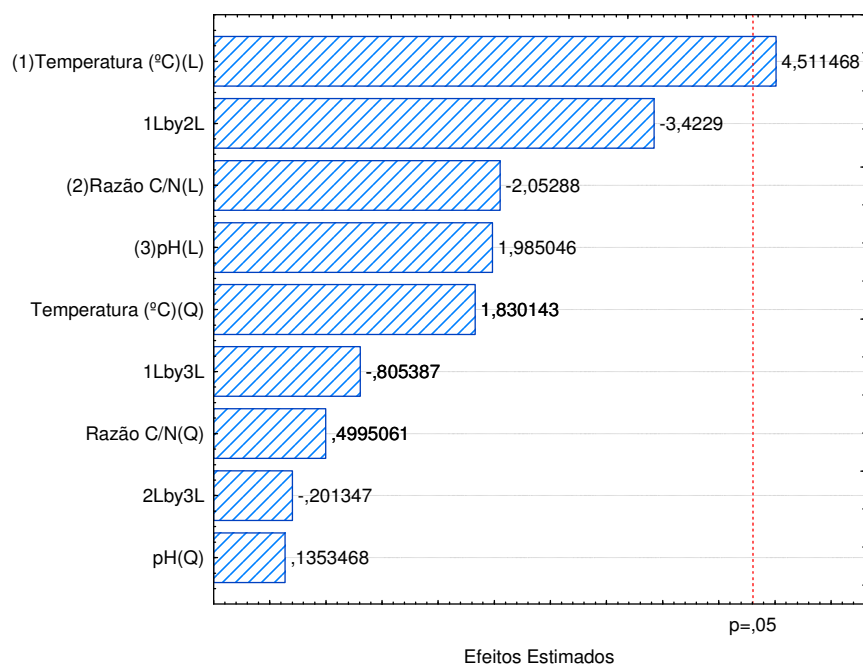


De Matos e Bastos (2015) estudaram o cultivo heterotrófico de *Desmodesmus* sp. em vinhaça de cana-de-açúcar (COT: 27100 mg L<sup>-1</sup>, NT: 1420 mg L<sup>-1</sup>, C/N 20) a um pH 7, temperatura de 25°C. O cultivo atingiu remoções de carbono e nitrogênio de 36,2 e 52,1% nesta mesma ordem. As remoções alcançadas para as mesmas condições de pH, temperatura e C/N deste estudo foram semelhantes se tratando do COT e levemente maiores ao N. Os autores também obtiveram maiores remoções de nitrogênio, evidenciando que menores concentrações de N acabam se tornando um fator limitante em cultivos onde há uma grande disponibilidade de carbono.

A Figura 12 demonstra o Gráfico de Pareto de causa e efeito relacionando as variáveis independentes com a remoção de carbono orgânico. Nota-se que a remoção de carbono teve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na variável temperatura, não sendo significativo para as variáveis pH e razão C/N.



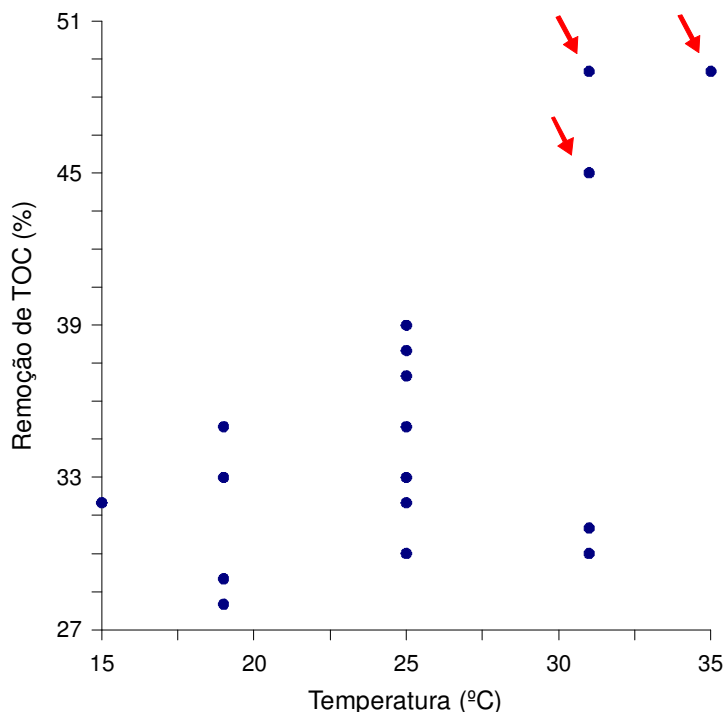
Figura 12 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de carbono orgânico da vinhaça



Um estudo realizado por Maroneze et al. (2014) avaliaram o cultivo heterotrófico com *Phormidium* sp. empregando meio BG 11 suplementado com maltodextrina a 26°C e pH de 7,6 e obtiveram uma remoção de carbono de 96%. Este valor foi mais elevado quando comparados com os ensaios do presente estudo na temperatura de 25°C e pH de 7,5, obtendo um máximo de remoção de carbono de 37%. A vinhaça apresenta em sua constituição cerca de 3,42% de carboidratos em sua maioria a glicose, bem como o composto orgânico glicerol (5,86 g L<sup>-1</sup>) (REIS e HU, 2017). Já a maltodextrina é um polissacarídeo gerado na conversão da fécula de mandioca (amido) é composto pelos carboidratos maltose e dextrina (MARONEZE et al., 2014). A diferença na composição dos efluentes influencia diretamente na assimilação de compostos orgânicos pela microalga e exercem diferentes taxas no crescimento microalgal (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016).

A Figura 13 ilustra as remoções de COT de acordo com as temperaturas dos ensaios. Verifica-se pelas setas vermelhas que maiores remoções de COT ocorrem nas temperaturas de 31 e 35°C. Em relação às maiores remoções de carbono, diversos autores também encontraram boas remoções para este composto em temperaturas próximas dos 30°C (BASTOS et al., 2015; FRANCISCO et al. 2015; SILVA et al., 2017; XU, et al., 2019).

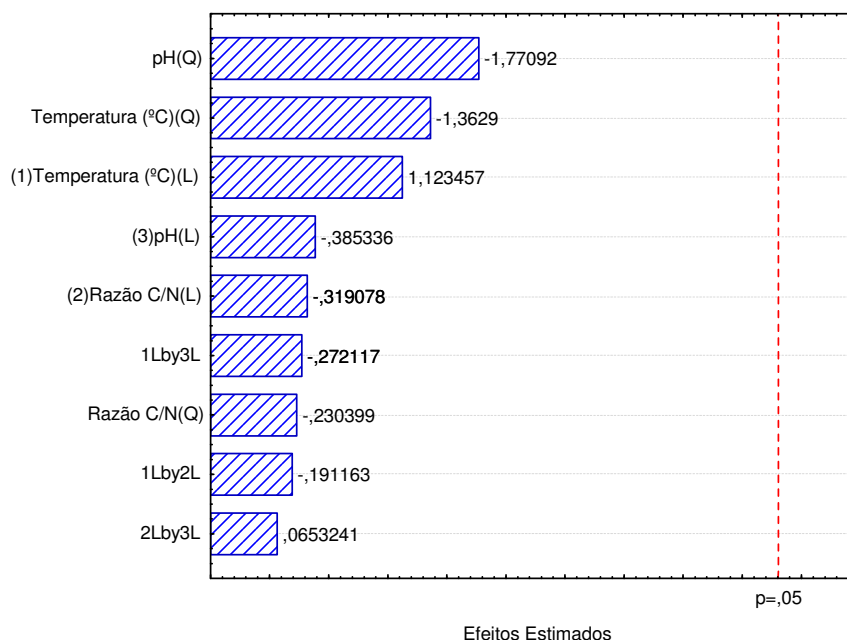
Figura 13 - Remoções de COT em função da temperatura, com destaque para os maiores valores



Um estudo realizado por Bastos et al. (2010) empregando *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivo heterotrófico em efluente de parboilização do arroz sob as condições: pH 7,6, temperatura de 25°C, DQO 4206,8 mg L<sup>-1</sup>, NTK 78,1 mg L<sup>-1</sup> e C/N 53, alcançaram remoções de carbono de 85% e 80% de nitrogênio e produtividade de biomassa de 36 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Neste caso a remoção de carga orgânica e nutricional foram maiores daquelas alcançadas do presente DDCR, porém para essa mesma temperatura e pH as produtividades de biomassa foram mais elevadas. Se percebe que a concentração de nitrogênio é inferior à carga orgânica, sugerindo que a cianobactéria tenha incorporado grande parte em sua biomassa juntamente com o carbono disponível. Os autores citam que em metabolismo heterotrófico a bioconversão de N é decorrente da síntese intracelular de pigmentos proteicos.

A Figura 14 ilustra o Gráfico de Pareto de causa e efeito relacionando as variáveis independentes com a remoção fósforo. Para essa variável, não foi verificado influência significativa de temperatura, pH e razão C/N ou seja,  $p > 0,05$ .

Figura 14 - Gráfico de Pareto para efeito das variáveis temperatura, razão C/N e pH iniciais na remoção de fósforo da vinhaça



Apesar dos valores máximos de remoção de fósforo ficarem em torno de 35%, sendo um pouco abaixo em relação ao trabalho de Santos et al. (2019) que encontraram 50% de remoção utilizando efluente de cervejaria (P: 9,98 mg L<sup>-1</sup>) em cultivo heterotrófico de *P. autumnale* sob razão N/P 1,74. Porém um pouco maior ao do obtido por Francisco et al. (2015) utilizando efluente de manipueira (P: 166,4 mg L<sup>-1</sup>) sob razão N/P 1,5 em cultivo heterotrófico de *P. autumnale*. Resultados que demonstram a diferença da concentração de fósforo nos distintos efluentes e a influência da disponibilidade desse nutriente pela razão N/P. Santos et al. (2017) explica que a remoção desse nutriente depende da fosforilação que ocorre no cultivo.

Mas o fato dessa variável indicar que não houve diferença significativa das outras variáveis testadas indica uma possível estabilidade no consumo deste nutriente para uma ampla faixa de pH, temperatura e razão C/N, sendo interessante em termos de escalonamento de bioprocessos.

Sendo assim, considerando os resultados obtidos no planejamento experimental e as variáveis significativas nas respostas, a melhor condição para o

cultivo de *P. autumnale* foi estabelecida em 35°C, pH inicial de 7,5 e razão C/N inicial em 16.

### 5.3 AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE *P. autumnale* EM SISTEMA BATELADA

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cinéticos do cultivo microalgal em biorreator de bancada no sistema batelada em 48 horas.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos do cultivo de *P. autumnale* em biorreator de bancada sistema batelada

$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	tg (h)	Px ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$X_{\text{máx}}$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$\frac{Y_X}{S}(\text{C})$ ( $\text{mg mg}^{-1}$ )	$\frac{Y_X}{S}(\text{N})$ ( $\text{mg mg}^{-1}$ )	ER COT (%)	ER NT (%)
0,0927	7,48	58,02	4360	0,79	12,95	67	70
$\pm 0,01$	$\pm 1,1$	$\pm 9,4$	$\pm 190$	$\pm 0,16$	$\pm 2,4$	$\pm 4,1$	$\pm 2,4$

$\mu_{\text{máx}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ): velocidade máxima específica de crescimento, tg (h): tempo de geração, Px ( $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ): produtividade de biomassa,  $X_{\text{máx}}$  ( $\text{mg L}^{-1}$ ): concentração celular máxima,  $Y_{X/S}(\text{C})$  ( $\text{mg}_{\text{células}}\text{mg}^{-1}$ ): coeficiente de conversão de substrato carbono em células,  $Y_{X/S}(\text{N})$  ( $\text{mg}_{\text{células}}\text{mg}^{-1}$ ): coeficiente de conversão de substrato nitrogênio em células, ER COT (%): remoção de carbono orgânico, ER NT (%): remoção de nitrogênio.

Os resultados apresentam uma concentração celular máxima de 4360  $\text{mg L}^{-1}$ , atrelados a uma produtividade de biomassa de 58,02  $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$  em um tempo de geração de 7,48 h, com uma velocidade específica de crescimento máxima de 0,0927  $\text{h}^{-1}$ . Em relação à assimilação de carbono e nitrogênio pelo cianobactéria, obteve-se 0,79  $\text{mg mg}^{-1}$  em conversão de substrato carbono em células e 12,95  $\text{mg mg}^{-1}$  em conversão de substrato nitrogênio, juntamente com uma eficiente remoção de 67% de carbono e 70% de nitrogênio da vinhaça.

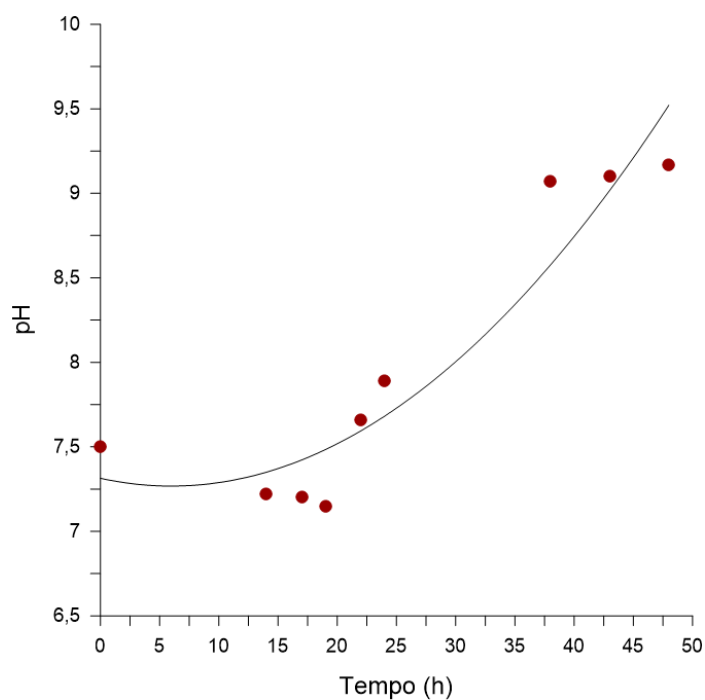
Francisco et al. (2014) estudaram o cultivo heterotrófico de *Phormidium* sp. em meio BG 11 suplementado com glicose (12,5 g L de carbono orgânico) e obtiveram uma produtividade de biomassa de 404,1  $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$  juntamente com uma remoção de 46,5% de carbono e conversão de substrato carbono em células em 0,23  $\text{mg mg}^{-1}$ , esses parâmetros foram um pouco menores aos apresentados para vinhaça bruta como meio de cultivo deste presente estudo. Gois (2017) obteve 12,93 g  $\text{L}^{-1}$  de glicose mensuradas para a vinhaça em estado bruto, quantidade semelhante à aplicada por pelos autores como suplementação, dados interessantes que demonstram uma melhor eficiência pela microalga em efluente com composição de nutrição mais abrangente.

Nota-se que o coeficiente de conversão de substrato em células referente ao nitrogênio é superior a 1 indicando a elevada produção de biomassa. Como o nitrogênio perfaz cerca de 10% da biomassa microalgal (LOURENÇO et al. 2004), os resultados sugerem que, partindo da remoção de 70% do nitrogênio da vinhaça, praticamente toda esta quantidade foi convertida em biomassa microalgal (BASTOS et al., 2010).

A análise dos rendimentos sugere que o nitrogênio é o substrato limitante em comparação ao carbono, ainda mais considerando a sua remoção praticamente equivalente (70% de NT e 67% de COT). Cabe salientar que foram obtidas remoções superiores no biorreator de bancada em sistema batelada quando comparado com os ensaios do DCCR em agitador orbital, o que pode ser atribuído a melhor homogeneidade do meio resultante da aeração forçada de 1 VVM e agitação de 300 rpm.

Em relação ao pH do cultivo, iniciou-se em 7,5 e finalizou em 9,1, ocorrendo alcalinização do meio, como pode-se observar na Figura 15.

Figura 15: Mudança do pH durante o cultivo batelada

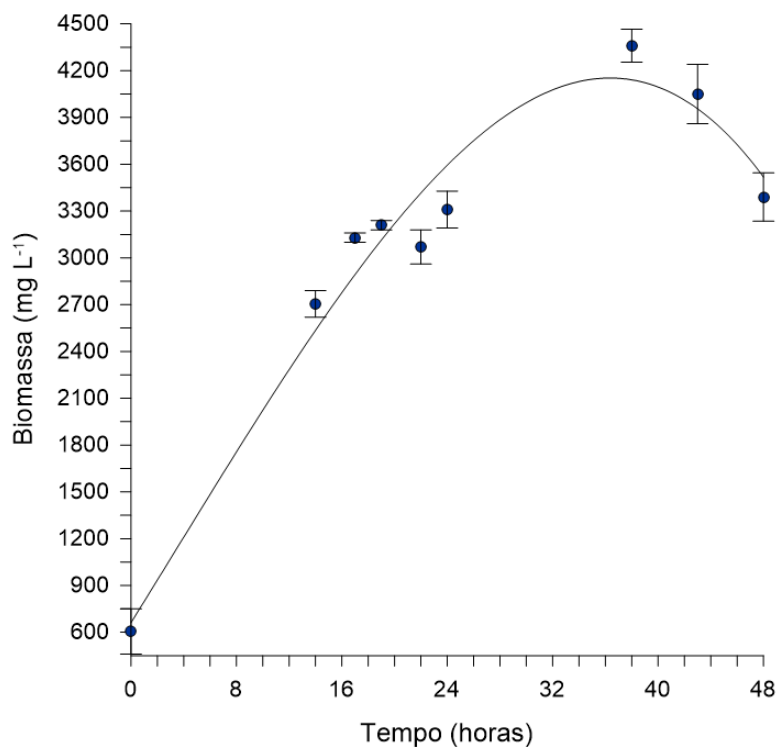


Segundo Siqueira et al., (2016) o aumento do pH em cultivo heterotrófico está associado ao sistema de carboidratos ativos responsáveis pela captação de

moléculas de açúcar no meio de cultivo. Explica que em geral, nos cultivos com concentração de alguns açúcares específicos, o sistema é induzido a promover a alcalinização do meio por um movimento de prótons acompanhados pela absorção de açúcar. Além disso, a sacarose é utilizada nas vias pentose fosfato, após uma hidrólise que o transforma em monossacarídeos, especialmente em frutose e glicose.

A Figura 16 apresenta o perfil de crescimento de *P. autumnale* em sistema batelada. Se observa o crescimento da cianobactéria com uma fase log prolongada em que a microalga teve o seu ápice em aproximadamente 35 horas de cultivo, seguida de uma fase de decaimento. Como apresentado na Tabela 7, verifica-se que a concentração celular máxima foi de  $4360 \text{ mg L}^{-1}$ , com um tempo de geração de  $7,48 \text{ h}$ , levando a produtividade média de biomassa de  $58,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  nas 48 horas. Porém, considerando as primeiras 40 horas, a produtividade máxima ficou em torno de  $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , valor similar ao obtido nos experimentos anteriores em agitador orbital, sugerindo que não houve limitação no escalonamento para o biorreator de bancada em sistema batelada.

Figura 16 - Perfil do crescimento microalgal em sistema batelada



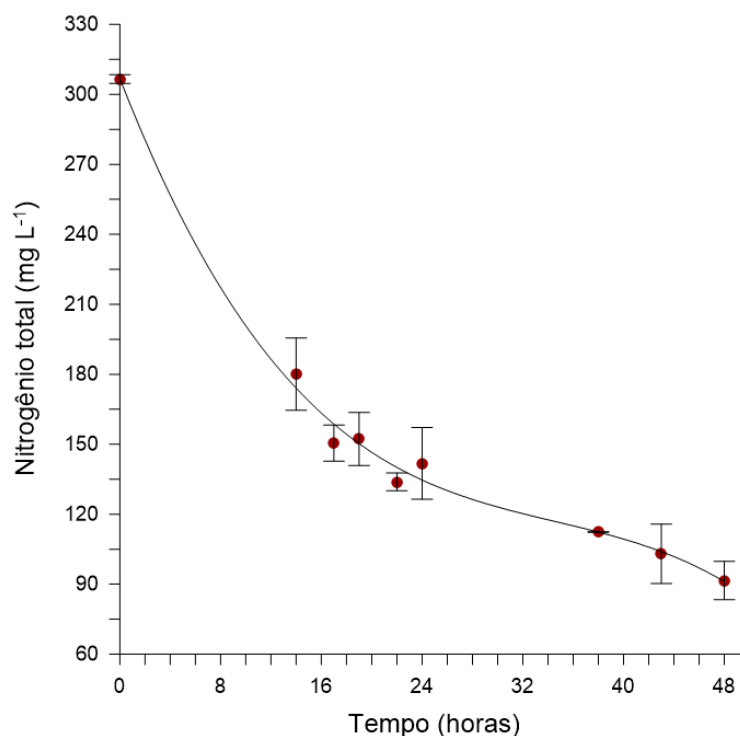
Santos et al. (2019) estudaram o cultivo heterotrófico de *P. autumnale* em efluente de cervejaria (DQO 1430 mg L<sup>-1</sup>, nitrogênio 17,38 mg L<sup>-1</sup> e fósforo 9,98 mg L<sup>-1</sup>), 30°C, pH de 7,6. Na razão C/N de 20 os autores obtiveram uma produtividade de biomassa de 7 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, um tempo de geração de 48h, uma velocidade máxima específica de crescimento de 0,0308 h<sup>-1</sup>, remoção de carbono e nitrogênio de 63% e 66% respectivamente. O presente estudo avaliou em razão C/N de 16 e obteve parâmetros cinéticos mais elevados, ou seja, velocidade máxima específica de crescimento de 0,0927 h<sup>-1</sup> e remoções de 67% para carbono e 70% para nitrogênio, sugerindo que a vinhaça possuiu em sua constituição uma composição e disponibilização melhor em termos de nutrientes e matéria orgânica.

O estudo conduzido por Siqueira et al. (2016) empregou meio BG 11 suplementado com sacarose (11,9 g L<sup>-1</sup>) em cultivo heterotrófico de *P. autumnale*. Nas condições de razão C/N 20, temperatura de 30 °C e pH 7,6, os autores demonstraram uma produtividade de biomassa de 14,7 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em um tempo de geração de 51,3 h com velocidade específica máxima de crescimento de 0,013 h<sup>-1</sup> e 0,47 mg mg<sup>-1</sup> de conversão de substrato sacarose em biomassa. Porém em razão C/N 40, os autores apresentam melhores performances da cianobactéria, alcançando uma produtividade de biomassa de 40,7 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, em um tempo de geração de 32 h e velocidade específica máxima de crescimento de 0,021 h<sup>-1</sup>. Siqueira e colaboradores salientam que em razões C/N de 20 ou maiores expressam melhores condições para o metabolismo de cianobactérias. As condições iniciais apresentadas são semelhantes a este estudo, que obteve maiores parâmetros cinéticos de *P. autumnale* a uma razão C/N de 16. Cabe salientar que, a vinhaça sendo uma água residuária, apresenta variação na sua composição química em termos de matéria orgânica e nutrientes, tornando fundamental sua caracterização em termos de razão C/N para uso como potencial meio de cultivo de cianobactérias.

A Figura 17 ilustra o perfil de nitrogênio durante o cultivo. Observa-se o consumo de nitrogênio ao decorrer do tempo e percebe-se que no início do cultivo até 24 h o consumo é crescente e partir desse tempo vai se tornando mais constante. Em 24h de cultivo o consumo de nitrogênio já tinha passado da metade. Um fator a ser considerado é que o nitrogênio foi fator limitante para este cultivo, houve uma considerável remoção de 70%.

Segundo Chandra et al. (2014) o nitrogênio é o principal macronutriente exigido por cianobactérias, pois apresenta elevada influência para a formação de proteínas, ácidos nucleicos e tem papel fundamental no crescimento e na divisão celular.

Figura 17 - Perfil do conteúdo de nitrogênio total durante o tempo de cultivo



Francisco et al. (2015) avaliaram o cultivo heterotrófico de *P. autumnale* em efluente de manipueira em condições experimentais de razão C/N 68, temperatura de 30° C, pH de 7,6, atingindo produtividade de biomassa de 53,1 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, coeficiente de conversão de substrato carbono em células de 0,52 mg mg<sup>-1</sup>, e remoção 66% para carbono e 17% para nitrogênio.

O presente estudo obteve parâmetros cinéticos discretamente superiores aos obtidos por Francisco e colaboradores (2015) em sistema batelada no que se refere à produtividade de biomassa de 58,02 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, coeficiente de conversão de substrato carbono em células de 0,79 mg mg<sup>-1</sup> e remoções de 67% para carbono. Por outro lado, a remoção de nitrogênio alcançou 70% em contrapartida de 17% para o efluente de manipueira, sendo que isso pode estar vinculado com a diferente razão C/N de 68 proposta pelos autores e pelas concentrações maiores de carbono

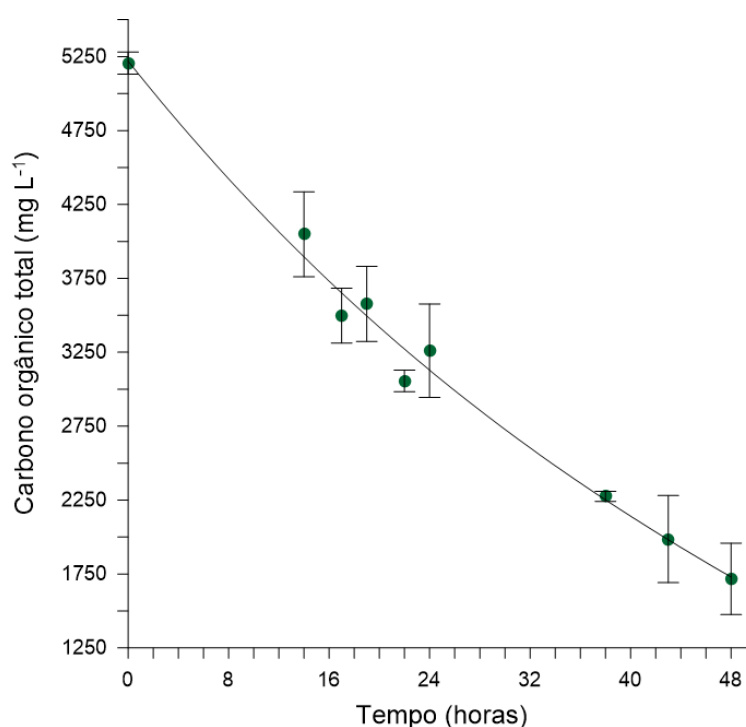


no efluente de manipueira na ordem de  $24000 \text{ mg L}^{-1}$ , tornando esse composto mais abundante e preferível de assimilação pela cianobactéria.

Outro fator interessante elucidado por Francisco et al. (2015) é a composição do efluente de manipueira, contendo glicose, frutose e amido como principais compostos orgânicos, excedendo um total de  $2,3 \text{ g L}^{-1}$  e que esse fator potencializa seu uso como meio de cultivo, sendo estes carboidratos adequados para cultura heterotrófica. Para a vinhaça, os açúcares em maiores concentrações encontrados por Carrilho, Labuto e Kamogama (2016) foram glicose e frutose, totalizando 1,3%. Portanto, esses estudos demonstram a capacidade de uso desses efluentes ricos em carboidratos como meio de cultivo microalgal para geração de biomassa.

A Figura 18 apresenta o perfil de carbono orgânico durante o cultivo. De acordo com o gráfico a concentração de carbono orgânico atinge metade do valor original a partir 35 horas de cultivo, proporcional ao crescimento máximo da microalga observado (Figura 16), que também ocorre neste período. Já o consumo de nitrogênio é mais intenso nas primeiras 24 horas de cultivo, ou seja, é consumida a uma velocidade superior. Em ambos os casos, percebe-se uma cinética de consumo que pode ser aproximada a 1ª ordem, ou seja, a velocidade de consumo depende dos teores de COT e NT, embora mais limitante para o nitrogênio.

Figura 18 - Perfil do conteúdo de carbono orgânico total do cultivo pelo tempo



Queiroz e autores (2013) obtiveram remoções de carbono (100% praticamente) e nitrogênio (93%) ao pesquisarem o cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluente de processamento de peixe (DQO: 1518 mg L<sup>-1</sup> NT: 112 mg L<sup>-1</sup>) nas condições de pH 7,6, C/N de 20 e temperatura de 20°C. As remoções tanto de carbono quanto de nitrogênio foram maiores em relação a este estudo (COT 63% e NT 70%), porém os parâmetros cinéticos foram menores, compreendendo uma produtividade de biomassa de 0,36 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> em um tempo e de geração de 0,86 d com uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,72 d<sup>-1</sup>. Mesmo que as condições iniciais de pH e razão C/N sejam semelhantes, fica evidente a diferença das características do efluente, bem como das cianobactérias empregadas, o que se destaca é a remoção de ambos os estudos para carbono e nitrogênio.

Desta maneira, os mesmos autores mencionam que o metabolismo de cultivos heterotróficos é capaz de converter simultaneamente os contaminantes em uma única etapa, em escala industrial é uma vantagem para tratamento dos efluentes em que a remoção de ambos os poluentes poderia ser realizadas em um único reator, diminuindo custos operacionais.

Com o intuito de avaliar os possíveis bioprodutos obtidos a partir de *P. autumnale* cultivada em vinhaça visando sistema de biorrefinarias, a composição da biomassa obtida em biorreator sistema batelada foi quantificada em termos de proteínas totais, lipídios totais, açúcares redutores totais (ART), carboidratos, ficocianina extraída e ficocianina purificada.

Também foram realizadas as mesmas análises para a biomassa de *P. autumnale* cultivada em meio BG 11 em temperatura de aproximadamente 25°C, proveniente do inóculo reserva utilizado nos experimentos, ressaltando que essas análises foram quantificadas como um propósito de branco do experimento.

A Tabela 8 apresenta a composição da biomassa gerada em termos de proteínas e lipídios no inóculo (Meio BG11) e após o cultivo em vinhaça. Tal composição pode levar a bioprodutos importantes a partir da biomassa microalgal.

Tabela 8: Teores de proteínas e lipídios na biomassa após o cultivo em vinhaça e no inóculo (meio BG 11)

Bioprodutos	Biorreator Sistema Batelada em vinhaça	Inóculo (meio BG 11)
Proteínas (%)	21,33 ± 0,0045	31,7 ± 7,78
Lipídios (%)	4,26 ± 4,2	16,58 ± 4,1

Nesse sentido, a biomassa de *P. autumnale* no biorreator batelada apresentam 21,33% de proteínas, 4,26% de lipídios, já em meio BG 11 foram 31,7% e 16,58 % de proteínas e lipídios respectivamente. Os teores e qualidade das proteínas e lipídios podem levar a aplicação da biomassa microalgal em diversas esferas industriais. Assim, as proteínas podem ser utilizadas para ração animal, lipídios para alimentação e também na síntese de biodiesel (CAMILOS NETO e PINOTTI, 2004).

*P. autumnale* possuiu células diazotróficas que perfaz cerca de 10 a 15% de suas células no total, responsáveis pela assimilação de nitrogênio, e essa incorporação aumenta no cultivo heterotrófico pelo metabolismo de nitrogênio que tem um efeito elevado no crescimento, mas negativo quando se trata no acúmulo de lipídios, principalmente quando se faz presente no cultivo fonte de amônia (NH<sub>4</sub>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), aminoácidos (PEREZ-GARCIA, 2011).

Na vinhaça bruta são encontradas concentrações altas de nitrato, cerca de 823 mg L<sup>-1</sup> e 23,9 mg L<sup>-1</sup> de amônia (REIS e HU, 2017). Tornando este um fato pela preferência da assimilação de nitrogênio pela microalga, já que *P. autumnale* não contém células especializadas para fixação de N (heterocistos) e têm preferência em assimilações que gastam pouca energia.

Outro fator que influencia é a alta temperatura de 35°C, sendo importante para a síntese de proteínas, mas que causa diminuição nas concentrações de carboidratos e dos teores lipídicos das células, embora auxilie no processo de síntese de ácidos graxos saturados (ANDRADE E COLUZZI FILHO, 2014).

O teor de proteínas obtido para o cultivo heterotrófico em vinhaça (21,33%) foi inferior ao estudo realizado por Santana et al. (2017) no cultivo mixotrófico de *Micractinium* sp. em vinhaça diluída (50%) a 37°C, onde foi obtido 39% de proteínas. Isto pode estar relacionado a uma limitação maior de nitrogênio em comparação ao

carbono no meio de cultivo. Cabe ressaltar que os autores citados também utilizaram o fator de conversão proposto por Lourenço et al. (2004) de 4,78 para cálculo final do teor de proteína, descontando as possíveis formas nitrogenadas não proteicas, ou seja, nitrogênio orgânico e amoniacal.

Outro estudo realizado por Neves et al., (2016) utilizando efluente de manipueira (DQO 24000 mg L<sup>-1</sup>, N 250 mg L<sup>-1</sup>, C/N 96) em cultivo heterotrófico por *P. autumnale* à 30°C e razão C/N ajustada para 68 obtiveram 14% de produção lipídica, maior do que a encontrada do presente trabalho de 4,26% com razão C/N 16. Resultados esses que demonstram o acúmulo de carbono nas células da cianobactéria através da conversão de glicose-6-fosfato metabolizado via respiratória, garantindo o transporte de elétrons, levando a formação de ATP heterotroficamente (PEREZ-GARCIA et al., 2011), conduzindo assim, uma maior fração lipídica.

Como a vinhaça é composta de quantidades consideráveis de amônia (NH<sub>4</sub>) (REIS e HU, 2017), a cianobactéria tende a assimilar esses compostos para gastos menores de energia. Bastos et al. (2010) menciona que a bioconversão de compostos nitrogenados pelo metabolismo sem luminosidade procede da síntese intracelular de proteínas, pigmentos. Além disso, Chen e Chen (2006) mencionam que as microalgas tendem a acumular mais nitrogênio em cultivo heterotrófico para manter os fatores de crescimento, promover síntese de aminoácidos e vitaminas, explicando a maior concentração proteica (21,33%) do que a lipídica deste estudo.

O presente estudo obteve 4,26% para o cultivo em vinhaça, na razão C/N 16, obtendo uma produtividade de biomassa de 58,02 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e conversão de substrato carbono e nitrogênio em biomassa de 0,79 mg mg<sup>-1</sup> e 12,95 mg mg<sup>-1</sup> respectivamente, relacionando com Dos Santos et al. (2017) em que foi realizado cultivo heterotrófico sob razão C/N 20 de *Aphanothece microscopica* Nägeli em meio BG 11 suplementado com amido de manipueira, os autores apresentam 18,15% de lipídios vinculados a produtividade de biomassa de 36,66 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e conversão de substrato carbono em biomassa de 0,98 mg mg<sup>-1</sup>. O resultado de lipídios foi elevado em relação a este estudo, o que pode estar vinculado com a melhor assimilação do substrato carbono pela *Aphanothece microscopica* Nägeli, os autores explicam que o amido de manipueira tem concentrações altas de amilopectina que desempenha

melhor função no metabolismo as cianobactérias, já que um dos produtos de reserva é conhecido como amido das cianofíceas, semelhante ao glicogênio.

Portanto, evidencia-se a importância de quantidades absolutas de nutrientes para promover produtividades de biomassa concomitante à produção de lipídios. O controle das razões C/N leva a uma composição em biomassa que pode guiar a obtenção dos bioprodutos desejados juntamente com uma significativa base nutricional. Assim, a elevada produtividades em biomassa ( $58,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) indica que a vinhaça apresenta condições nutricionais para ser utilizada como meio de cultivo em batelada para a cianobactéria *P. autumnale*.

Dos Santos et al. (2017) também explicam a relação da agitação nos cultivos heterotróficos pela melhor dispersão de oxigênio, sendo um dos principais suprimentos para esse tipo de cultivo, fornecendo energia para a biossíntese e manutenção de energia das cianobactérias, portanto o aumento da velocidade de agitação tende a melhorar a transferência de oxigênio do ar para o meio líquido. Porém, a turbulência excessiva aumenta o consumo de energia que pode afetar a produção de óleos pelas cianobactérias, pois durante a respiração, o oxigênio é consumido simultaneamente à produção de  $\text{CO}_2$  e vinculado ao crescimento celular, alterando o acúmulo de lipídios. Nesse sentido esses autores demonstraram que em 300 rpm a produção lipídica foi baixa de  $2,90 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , enquanto que em 200 rpm a produção cresceu para  $3,44 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . No presente estudo foi utilizada a agitação de 300 rpm, esse fato pode ter influenciado na produção lipídica de 4,26%.

Observa-se que em meio BG 11 a cianobactéria obteve por volta de 31,7% de proteínas e 16,58% de lipídios, valores maiores aos obtidos no cultivo heterotrófico com vinhaça (21,33% de proteínas e 4,26% de lipídios). A diminuição de proteínas pode estar relacionada a menor concentração de nitrogênio na vinhaça quando comparado com o meio BG 11, ou seja, meio padrão.

Os teores de lipídios mais elevados no inóculo podem estar associados a manutenção da biomassa por intervalos de tempo mais elevados em meio BG11. Assim, em meio padrão contendo todos os nutrientes em quantidades necessárias e sistema de fotoperíodo, a biomassa apresenta uma velocidade de crescimento controlada e inferior, tendendo a um teor de lipídios superior. O mais importante é salientar a variação para o cultivo em vinhaça, onde, em velocidades de crescimento

maiores, foram obtidos teores menores de lipídios. Além disso, como o desvio padrão é relativamente elevado, os dados valores podem não ser tal diferentes.

Com relação aos teores de carboidratos e açúcares, a Tabela 9 apresenta os valores obtidos para o cultivo em vinhaça e no inóculo (Meio BG 11).

Tabela 9 - Carboidratos e açúcares obtidos no cultivo em vinhaça e em meio BG 11

Bioprodutos	Biorreator Sistema Batelada em vinhaça	Inóculo (meio BG 11)	
ART (mg L <sup>-1</sup> )	970	1020	
Arabinose	44,53 ± 6,7	49,29 ± 5,0	
Galactose	4,78 ± 0,7	21,54 ± 2,2	
Carboidratos (mg L <sup>-1</sup> )	Glicose	79,46 ± 1,6	69,53 ± 3,0
	Xilose	14,33 ± 1,7	32,16 ± 4,4
	Manose	9,84 ± 0,6	—

ART: açúcares redutores totais

Para o cultivo em vinhaça obteve-se açúcares redutores totais de 970 mg L<sup>-1</sup>, carboidratos representados por concentrações de arabinose (44,53 mg L<sup>-1</sup>), galactose (4,78 mg L<sup>-1</sup>), glicose em sua maioria (79,46 mg L<sup>-1</sup>), xilose (14,33 mg L<sup>-1</sup>) e manose (9,84 mg L<sup>-1</sup>).

Já para o cultivo em meio BG 11, a concentração de arabinose foi levemente maior ao de vinhaça (49,29 mg L<sup>-1</sup>), já galactose e xilose obtiveram um aumento significativo (21,54 mg L<sup>-1</sup> e 32,16 mg L<sup>-1</sup>), e a glicose (69,53 mg L<sup>-1</sup>) foi o açúcar em maiores quantidades encontrado em ambos os cultivos, porém em vinhaça foi maior (79,46 mg L<sup>-1</sup>). Já o carboidrato manose não foi obtido para *P. autumnale* em meio BG 11.

A análise de ART demonstrou uma concentração de 1020 mg L<sup>-1</sup> para meio BG 11. Somando-se os carboidratos presentes para este meio tem-se em torno de 170 mg L<sup>-1</sup>, ou seja, a análise de açúcares redutores totais demonstra que existem outros monossacarídeos não mensurados e que podem ser viabilizadores para a

síntese de EPS. De qualquer forma, os resultados indicam que o teor de carboidratos praticamente se manteve do inóculo para o cultivo em vinhaça, indicando uma estabilidade no teor destas macromoléculas na biomassa, independente do modelo de crescimento fotossintético (Meio BG11) ou heterotrófico (vinhaça).

Um fator interessante demonstrado por Nicolaus et al. (1999) avaliando a biomassa de *Phormidium* sp são maiores produções de EPS em condição de cultivo em meio BG 11 perante iluminação e aeração contínuas, ressaltando que mudanças como regime mixotrófico, corte de aeração e sem nutrição de fosfatos alteraram a composição abaixando de forma significativa o rendimento em EPS. Em contrapartida, Camilos Neto e Pinotti (2004) mencionam que fatores de estresse como a deleção de nitrogênio pode aumentar o acúmulo de EPS em cianobactérias como forma de sobrevivência para manter o funcionamento do metabolismo.

Carboidratos são passíveis de conversão em bioetanol e polimerização a exopolissacarídeos, com potencial de aplicação como gelificantes, emulsificantes, floculantes na área médica (CAMILOS NETO e PINOTTI, 2004). Nesse sentido, os monossacarídeos analisados neste trabalho são denominados pelas literaturas como àqueles que fazem parte dos exopolissacarídeos (EPS) possuindo diversas aplicações. A cianobactéria *Phormidium* sp é citada em sua utilização por gerar esses compostos desde 1989 nos EUA onde tem patentes registradas como "Bioemulsificantes para dispersão de hidrocarbonetos líquidos em um segundo líquido" e em 1993 por "Recuperação secundárias de petróleo de formações subterrâneas". Este mesmo autor também cita a *Phormidium* sp como sendo a melhor cianobactéria produtor de EPS sem heterocistos (célula especializada na fixação de N).

Nicolaus et al. (1999) menciona que os açúcares encontrados em sua maioria em EPS de cianobactérias são glicose em mais de 90%, galactose, manose e ramnose (80 - 85% dos EPS). Além desses são encontrados também galactose, manose, xilose, arabinose, ribose, frutose, ramnose, ácido glicurônico e galacturônico. No presente estudo para sistema batelada foram analisados os açúcares glicose como dominante em 76,46 mg L<sup>-1</sup>, seguido de arabinose 44,53 mg L<sup>-1</sup>, xilose 14,33 mg L<sup>-1</sup>, manose 9,84 mg L<sup>-1</sup>, e por fim galactose em menores concentrações de 4,78 mg L<sup>-1</sup>, obtendo um somatório de 0,142 g L<sup>-1</sup> entre todos

estes citados. Também foram analisados os açúcares redutores totais da biomassa, representando  $0,97 \text{ g L}^{-1}$ . Possivelmente esses valores demonstram que ainda há alguns açúcares presentes na biomassa de *P. autumnale* que não foram analisados e podem fazer parte dos formadores de EPS.

Visando a produção de bioetanol a partir dos carboidratos mensurados para ambos os cultivos, Chen et al. (2013) citam que cianobactérias com carboidratos a base de glicose são matérias-primas mais viáveis para a produção desse biocombustível. Além disso, microlagas que contém parede celular constituída de lipopolissacarídeos e produtos de reserva como a cianoficina e o amido das cianofíceas auxiliam no processo, como é o caso de *P. autumnale*, sendo uma cianobactéria.

Referente ao pigmento ficocianina, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10 para o sistema batelada em vinhaça e para o meio BG 11.

Tabela 10 - Ficocianina obtida no cultivo em vinhaça e em meio BG 11

Bioprodutos	Biorreator Sistema Batelada em vinhaça	Inóculo (meio BG 11)
Ficocianina extraída ( $\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ )	197,53	165,62
Ficocianina purificada ( $\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ )	5,59	5,8

Para o cultivo em vinhaça foram obtidas concentrações de ficocianina extraída e purificada de  $197,53 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  e  $5,59 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  respectivamente. Já para *P. autumnale* em meio BG 11 obteve-se cerca de  $165 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  para extração e de  $5,80 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  para purificação.

Verificando os resultados obtidos de *P. autumnale* em meio BG 11, tem-se concentração menor de ficocianina extraída quando comprado com o cultivo em vinhaça. Porém para as análises em meio BG 11 foram utilizadas biomassas úmidas e não liofilizadas como em cultivo na vinhaça, o que pudesse manter de forma mais segura as características da biomassa e obter resultados mais promissores. Em contrapartida, observa-se que para concentração após purificação o inóculo obteve



maiores valores, fato que pode estar relacionado com a fotossíntese pelo regime mixotrófico do inóculo, mas que não descarta a ideia de que melhores preparos da biomassa podem levar a melhores desempenhos, como ciclos de congelamento e descongelamento, como realizado no estudo de Rodrigues et al. (2015).

O estudo realizado por Queiroz et al. (2013) aplicando condições iniciais semelhantes ao presente estudo sob cultivo heterotrófico com a cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli em efluente de processamento de peixe (DQO: 1518 mg L<sup>-1</sup>, NT: 112 mg L<sup>-1</sup>), demonstraram cerca de 52,5 % de conteúdo proteico, 13,8% de produção lipídica, e teor de ficocianina extraída de 7,15 g 100g<sup>-1</sup>. Salientando que os autores atingiram remoções de 100% (praticamente) para carbono e 93% para nitrogênio, um pouco maiores que os encontrados neste estudo. Para a *P. autumnale* em vinhaça foram encontrados 21,33% de proteínas e 4,26% de produção lipídica, resultados menores, porém a concentração de ficocianina extraída foi maior, sendo de 197,5 mg g<sup>-1</sup>.

Os efluentes utilizados apresentam marcantes diferenças na sua composição, o que leva a eventuais compostos nitrogenados a serem contabilizados como proteicos, elevando o teor de proteína na biomassa. Nesses casos se observa que o conteúdo lipídico elevado corresponde à assimilação de maiores concentrações de carbono enquanto maiores incorporações de nitrogênio pela cianobactéria representam proteínas, bem como as ficobiliproteínas, como a ficocianina, uma vez que em vinhaça, *P. autumnale* removeu maiores quantidades de nitrogênio.

Em vista do acúmulo de ficocianina, os autores Sloth, Wiebe e Eriksen (2006) estudaram o cultivo heterotrófico pela microalga vermelha *Galdieria sulphuraria*, e confirmaram a produção dessa ficobiliproteína em culturas mais limitadas de carbono, mas suficientes em nitrogênio. Obtiveram cerca de 2 a 4 mg g<sup>-1</sup> de concentração de ficocianina na fase exponencial em cultivos sem modificações, mas alterando a constituição do meio para depleção de carbono e disponibilidade de nitrogênio a microalga vermelha produziu cerca de 8 a 12 mg g<sup>-1</sup> de ficocianina na fase estacionária.

O presente estudo obteve bons teores de extração de ficocianina (197 mg g<sup>-1</sup>) demonstrando juntamente com a literatura que cultivos heterotróficos são capazes de gerar boas produtividades de pigmentos a depender das condições de crescimento, de nutrientes e abre uma lacuna para exploração desse viés.

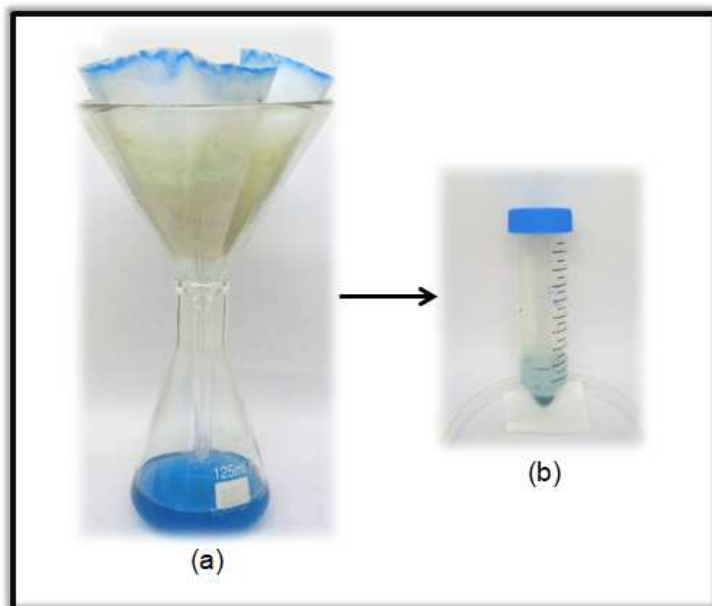
Os teores de ficocianina alcançados no final do cultivo em vinhaça foram de 197,53 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> para volumes extraídos e de 5,59 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> após a purificação pelo método de homogeneização com pistilo e almofariz. Já o estudo realizado por Morais e Bastos (2018) utilizando meio BG 11 suplementado com vinhaça em cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli demonstrou uma taxa específica de produção de ficocianina de 49,18 mg<sub>ficocianina</sub> mg<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, sendo que o método utilizado para extração foi de congelamento, diferentemente do utilizado no presente trabalho. Vale ressaltar que o método utilizado no trabalho está alcançando melhores resultados em comparação com os outros, mas que também está sendo modificado.

Rodrigues et al. (2015) utilizaram meio BG 11 em cultivo fotoautotrófico de *P. autumnale* à 25°C e obtiveram em torno de 205 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> através da liofilização preliminar da biomassa seguida de extração pelo mesmo método (almofariz e pistilo). Ainda realizaram ciclos de congelamento e descongelamento da biomassa restante em tampão fosfato para garantir uma completa extração, além disso, também fizeram a purificação da biomassa com sulfato de amônia.

No presente estudo empregando vinhaça em cultivo heterotrófico e biomassa liofilizada preliminarmente à extração, foi encontrado em torno de 197,53 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> para concentração proveniente de extração e 5,59 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> para ficocianina purificada com sulfato de amônia. Rodrigues et al. (2015) encontram valores elevados em relação ao presente estudo, porém os regimes e o meio de cultivo foram diferenciados, mas que sugerem maiores remoções por congelamento e descongelamento.

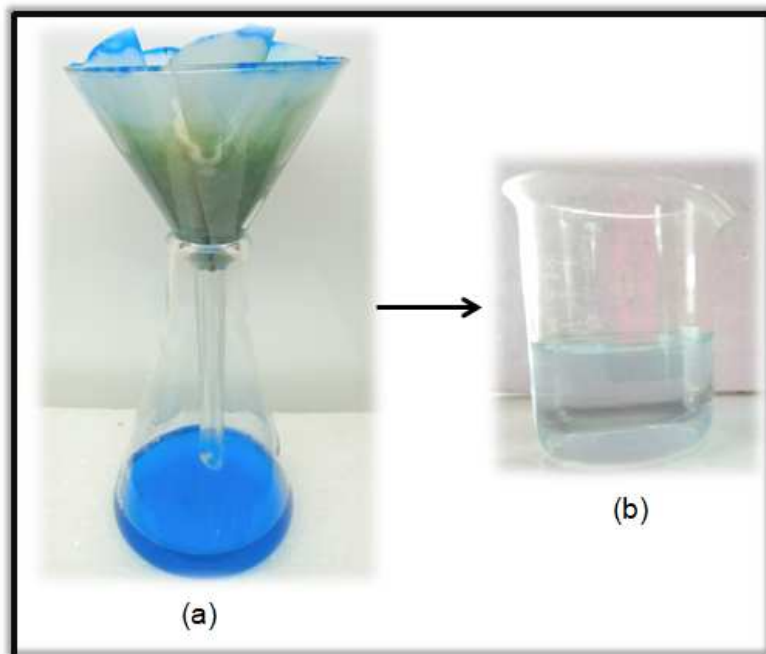
A Figura 19 e a Figura 20 ilustram a extração (a) e purificação (b) de ficocianina de *P. autumnale* em cultivo com vinhaça sob o sistema batelada e em meio BG 11, respectivamente.

Figura 19 – Imagem da extração (a) e purificação (b) de ficocianina da biomassa oriunda do cultivo em vinhaça de *P. autumnale*



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 20 – Imagem da extração (a) e purificação (b) de ficocianina do inóculo de *P. autumnale* em meio BG 11



Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos lipídios gerados por *P. autumnale* pelo cultivo em biorreator sistema batelada com vinhaça, obteve-se o seguinte perfil de ácidos graxos (Tabela 11).

Tabela 11 - Perfil dos ácidos graxos obtidos no cultivo de *P. autumnale* em sistema batelada com vinhaça

<b>Ácidos graxos</b>		<b>(% em massa)</b>
C6:0	ácido-hexanóico	1,08
C12:0	ácido -láurico	0,05
C14:0	ácido-mistérico	3,06
C15:0	ácido-pentadecanóico	0,10
C16:0	ácido-palmítico	50,15
C16:1	ácido-palmitoleico	7,32
C17:0	ácido-margárico	1,13
C18:0	ácido-esteárico	9,42
C18:1	ácido-oleico	3,55
C18:2	ácido-linoléico	7,88
C18:3	ácido-linolênico	7,57
C20:1	ácido-araquidônico	8,68
SFA	65,0%	
MUFA	19,55%	
PUFA	15,45%	

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados.

O sistema batelada obteve maiores porcentagem de ácidos graxos saturados (SFA) com 65% seguido de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) de 19,55% e menores porcentagens de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de 15,45%. Para síntese de biodiesel é necessário que ocorra uma maior concentração de ácidos SFA e MUFA. Sendo que em maiores concentrações obteve-se o ácido palmítico (C16:0) atingindo 50% do total de ácidos graxos do cultivo.

Outros ácidos de grande importância também se destacaram, sendo o ácido esteárico (C18:0) em 9,42%, linoleico (C18:2) em 7,88% e linolênico (C18:3) em 7,57%, bem como o ácido oleico (C18:1) de 3,55%. Segundo Figueroa-Torres (2020) os ácidos C:16 e C18:1-3 são considerados os mais importantes para um biodiesel de qualidade.

Francisco et al. (2019) mencionam que os ácidos graxos saturados (SFA) com cadeia de C10 até C18 influenciam no aumento no número de cetano (CN) e causam um declínio na viscosidade, mas também auxiliam em uma menor emissão de poluentes sendo considerados para a produção de biodiesel.

Andrade e Coluzzi Filho (2014) também citam a importância da temperatura nos processos de formação de ácidos graxos saturados, sendo sintetizados em temperaturas mais altas, como foi o caso do cultivo em 35°C. Explicam que o grau

de insaturação está associado à fluidez da camada fosfolipídica da membrana celular, que se torna menos fluida com a diminuição do número de insaturações na cadeia de ácidos graxos.

As propriedades do biodiesel são apresentadas na Tabela 12 e foram mensuradas pelo Software de acesso livre Biodiesel Analyzer (TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014) e comparadas com os parâmetros dispostos pelas normas ANP 45 (norma do Brasil), ASTM 6751 (norma dos Estados Unidos) e pela EN 14214 da União Europeia. Ressalta-se que a resolução ANP 45, DE 25.8.2014, é a última atualização da norma brasileira e é complementar à resolução ANP 798, DE 1.8.2019. A norma padrão ASTM 6751 se refere ao ano de 2015, e a normativa EN 14214 se refere ao ano de 2012, portanto essas duas não são as últimas atualizações disponíveis, mas auxiliam como forma de comparação.

Tabela 12 - Propriedades do biodiesel obtido no sistema batelada empregando *P. autumnale*

Propriedades	<i>P. autumnale</i>	ANP 45	ASTM 6751	EN 14214
CN	60,06	mín. 45	mín. 47	mín. 51
IV $\text{gl}_2 \text{ 100g}^{-1}$	52,59			máx. 120
DU (%)	50,45			
SV	213,28			
LCSF (%)	9,73			
CFPP (°C)	14,09	máx. 19 <sup>1</sup>	máx. 5	
CP (°C)	21,39		-3 à -12	
APE	34,45			
BAPE	23,02			
OS (h)	10,22	mín.12	mín. 3	mín. 8
HHV	39,24			
$\mu$ ( $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	1,32	3,0 - 6,0	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
$\rho$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )	0,87	0,85 à 0,90	máx. 0,88	0,86 à 0,90

Parâmetros = CN: número de cetano; IV: índice de iodo; DU: grau de instauração; SV: índice de saponificação; LCSF: fator de cadeia longa saturada; CFPP: ponto de entupimento de filtro a frio; CP: ponto de névoa; APE: posição alílica; BAPE: Posição bis-alílica; OS: estabilidade à oxidação; HHV: maior valor de aquecimento;  $\mu$ : viscosidade cinemática;  $\rho$ : densidade. **Normas: ANP 45: Brasil; US ASTM 6751: Estados Unidos; Europa 14214: União Européia.** <sup>1</sup> Varia de acordo com o estado e com as estações.

Observa-se que o óleo produzido ficou em conformidade com o número de cetano (CN 60,06), sendo o mínimo de 45 pela ANP 45, mínimo de 47 pela ASTM 6751 e mínimo de 51 para EN 14214. Outro fator em conformidade foi o índice de iodo obtido ( $52,59 \text{ gl}_2 \text{ 100g}^{-1}$ ) perante a norma EN 14214 (máx. 120).

Por outro lado, é possível concluir que o óleo produzido por *P. autumnale* não se encaixa plenamente nas faixas ideais de alguns parâmetros, como foi o caso do ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP), sendo o máximo de 5°C pela ASTM 6751 e o obtido foi de 14,09°C, mas que ficou dentro da norma brasileira ANP para alguns estados brasileiros. O ponto de névoa (CP) não ficou dentro do estabelecido pela ASTM 6751 (-3 à -12°C) sendo de 21,39°C, mas está de acordo com as outras normas descritas (ANP 45 e EN 14214).

De acordo com Knothe, Krahl, Gerpen (2010), o ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) é definido como a menor temperatura em que 20 mL da amostra de biodiesel passa através de uma malha metálica de 45 µm sob vácuo de 0,0194 atm em 60 s. Estas “propriedades a baixas temperaturas” estão ligadas a formação de cristais. Em temperaturas mais baixas, noturnas por exemplo, ésteres metílicos saturados presentes nos óleos sofrem nucleação e formam cristais de cera suspensos em uma fase líquida, composta por n-alcanos de cadeia curta e compostos aromáticos, causando problemas de partida e de desempenho na manhã seguinte.

Assim, isto é muito ligado à presença de ácidos graxos saturados por possuírem pontos de fusão significativamente mais altos que os compostos graxos insaturados, e geralmente os pontos de fusão aumentam com o comprimento da cadeia, dessa forma, os ésteres saturados cristalizam em temperaturas mais altas que os ésteres insaturados e, a tendência de um combustível solidificar, altamente indesejável, pode ser quantificada por propriedades como ponto de névoa e CFPP (KNOTHE, 2013).

De acordo com Alleman e McCormick (2016) alguns aditivos podem ser misturados ao biodiesel a fim de diminuir a temperatura de operacionalidade do óleo, mencionam que a maioria dos aditivos reduz o tamanho dos cristais ou até inibe a sua formação em temperaturas frias. Citam que outra solução é diminuir o teor de biodiesel na mistura durante os meses mais frios.

Knothe, Krahl, Gerpen (2010) também mencionam que esses aditivos atuam em uma ou mais fases do processo de cristalização, nucleação, crescimento ou aglomeração, promovendo a formação de um número maior de cristais com tamanhos reduzidos e mais compactos, diminuindo as chances de ocorrer problema.

Para o parâmetro estabilidade de oxidação (OS), foi obtido 10,22h, ficando na faixa ideal proposta pelas normas internacionais, mas não para a norma nacional ANP 45 (mín. 12). Segundo essa norma deve ser adicionado aditivo antioxidante na produção de biodiesel para que se torne possível atingir o limite mínimo da oxidação.

Em relação à viscosidade cinemática ( $\mu$ ) o óleo produzido não ficou de acordo com nenhuma norma ( $1,32 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) por ser de baixo valor, sendo o mínimo de  $1,9 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$  para ASMT 6751. Em relação à densidade obtida ( $0,87 \text{ g cm}^{-3}$ ), ficou compreendida entre os valores designados das normas nacionais e internacionais.

Portanto se conclui que para a síntese de biodiesel seria necessária a correção de algumas não conformidades, que podem ser contornadas pela adição de antioxidantes e aditivos ou pela mistura de biodiesel com petrodiesel, o que melhora as propriedades de qualidade do biocombustível obtido (NEVES et al., 2016).

Por meio do teor lipídico obtido de *P. autumnale* em cultivo mixotrófico em meio BG 11 foi possível obter o seguinte perfil de ácidos graxos, apresentado na Tabela 13 e as seguintes propriedades do biodiesel demonstradas na Tabela 14.

Tabela 13 - Perfil lipídico de *P. autumnale* (inóculo) em meio BG 11

<b>Ácidos Graxos</b>		<b>(% em massa)</b>
C6:0	ácido-hexanóico	0,10
C14:0	ácido-mistérico	8,46
C16:0	ácido-palmítico	21,39
C18:0	ácido-esteárico	3,87
C18:1	ácido-oleico	11,13
C18:2	ácido-linoléico	51,01
SFA	33,81%	
MUFA	11,13%	
PUFA	51,01%	

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados

Tabela 14 - Propriedades do biodiesel gerado por *P. autumnale* (inóculo) em meio BG 11

Propriedades	<i>P. autumnale</i> (inóculo)	ANP 255	ASTM 6751	EN 14214
CN	50,62	mín. 45	mín. 47	mín. 51
IV $\text{gl}_2$ $100\text{g}^{-1}$	102,41			máx. 120
DU (%)	113,15			
SV	119,46			
LCSF (%)	4,07			
CFPP ( $^{\circ}\text{C}$ )	3,69	máx. 19 <sup>1</sup>	máx. 5	
CP ( $^{\circ}\text{C}$ )	6,26		-3 à -12	
APE	113,15			
BAPE	51,01			
OS (h)	0	mín.12	mín. 3	mín. 8
HHV	37,69			
$\mu$ ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ )	1,21	3,0 - 6,0	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
$\rho$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )	0,84	0,85 à 0,90	máx. 0,88	0,86 à 0,90

Parâmetros = CN: número de cetano; IV: índice de iodo; DU: grau de instauração; SV: índice de saponificação; LCSF: fator de cadeia longa saturada; CFPP: ponto de entupimento de filtro a frio; CP: ponto de névoa; APE: posição alílica; BAPE: Posição bis-alílica; OS: estabilidade à oxidação; HHV: maior valor de aquecimento;  $\mu$ : viscosidade cinemática;  $\rho$ : densidade. **Normas: ANP 45: Brasil; US ASTM 6751: Estados Unidos; Europa 14214: União Européia.** <sup>1</sup> Varia de acordo com o estado e com as estações.

Verificando o perfil lipídico de *P. autumnale* obtido em meio BG 11 nota-se uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de 51,01%, seguido dos ácidos graxos saturados (SFA) de 33,81% e em menores porcentagens os ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) de 11,13%. Portanto, obteve-se maiores concentrações de PUFA, óleos ricos em ômegas, comportamento este obtido pela alta porcentagem do ácido linoleico produzido (C18:2) gerando mais de 50% do total dos ácidos graxos (51.01%), sabendo que os PUFA são sintetizados por meio do C18:2 (ômega 6) e pelo C18:3 (ômega 3) (ROBERTSON et al., 2013).

Aussant, Guihéneuf e Stengel (2018) mencionam que em temperaturas mais baixas as microalgas tendem a produzir ácidos graxos poliinsaturados da família dos ômegas, fato este está associado à aclimação da microalga para manter a fluidez das membranas. Salientando que o inóculo de *P. autumnale* se manteve em temperaturas ambientes durante o seu crescimento e que na maioria das vezes houve influência de temperaturas mais baixas por processos de aclimatização do ambiente onde ela se encontrava.

Observando a composição do biodiesel gerado se percebe que este também não ficou em conformidade com alguns parâmetros, como foi o caso do ponto de



névoa (6,26 °C) pela ASTM (-3 à -12°C), da estabilidade de oxidação (0 °C) ficando abaixo do valor proposto pelas normas apresentadas, sendo o mínimo de 3°C para ASTM. Outro fator que ficou abaixo foi a viscosidade cinemática (1,29 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) para a norma nacional e internacionais apresentadas, bem como a densidade obtida de 0,84 g cm<sup>-3</sup> ficando levemente abaixo do predito para ANP (0,85 g cm<sup>-3</sup>).

Por outro lado o número de cetano obtido (50,62) está dentro das faixas ideais perante a ANP 45 (45) e ASTM (48), e de acordo também com o índice de iodo (102,4 gl<sub>2</sub> 100g<sup>-1</sup>) descrito pela EM 14214 (máx. 120). Outro parâmetro em conformidade foi o ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) de 3,69°C, em que o máximo pela ANP é de 19°C e de 5°C pela ASTM. Ressalta-se que os parâmetros podem ser corrigidos pela adição de antioxidantes (aumento da estabilidade de oxidação) e aditivos no biodiesel obtido, para melhorar a qualidade das características e tornar óleo passível dessa síntese (NEVES et al., 2016).

Em comparação com as características do biodiesel gerado por *P. autumnale* em vinhaça, o número de cetano foi menor (50) devido às baixas concentrações de ácidos com cadeias entre C10 e C18, observado em grande parte pelo cultivo em sistema batelada, fator que explica o menor CN para *P. autumnale* em meio BG 11. Para as outras normas, os parâmetros do biodiesel produzido não ficaram dentro dos valores vigentes, se tratando da estabilidade de oxidação (O) em tempo 0h (min 3 e min 6), pelo número de cetano (CN) de 50 (mínimo de 51 para EN 14214) e novamente pelo menor valor da viscosidade em 1,21 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> para ambas as normas internacionais.

Importante comparar os parâmetros de qualidade do biodiesel para o inóculo e biomassa gerada em vinhaça. Assim, o número de cetano (CN) é um indicativo adimensional da qualidade de ignição de um combustível diesel, influenciado pelas ramificações e o comprimento da cadeia de carbono (KNOTHE, 2013). Nesse sentido, os valores são muito similares, com CN de 60,06 para o biodiesel gerado por biomassa em vinhaça. Por outro lado, como o índice de Iodo é uma medida do teor de insaturações totais de um material graxo, indicando a propensão do óleo à oxidação, verifica-se que a qualidade do biodiesel formado pela biomassa em vinhaça é superior ao biodiesel formado diretamente do inóculo (52,59 contra 102,41 g 100g<sup>-1</sup>) mesmo que os valores estejam dentro da faixa indicada pelas normas (máximo 120 g 100g<sup>-1</sup>). Portanto, com relação a este parâmetro de qualidade, o

cultivo de *P. autumnale* em vinhaça justifica-se pela geração de um biodiesel mais estável em termos de oxidação.

Por outro lado, a viscosidade cinemática apresenta valores muito próximos (1,32 para vinhaça e 1,21 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> para BG11), ou seja, dentro das faixas indicadas, não indicando maiores problemas relacionados ao escoamento do combustível.

Em relação à constituição dos PUFA, Robertson et al. (2013) relata que há preferência de ácidos graxos microalgais para consumo humano aos biocombustíveis, uma vez que a produção se torna mais econômica em termos de ganhos. Menciona também que os PUFA têm papéis muito importantes na saúde humana, atuando nos tecidos, na regulação da fluidez e sinalização celular.

Ratledge (2004) menciona que somente em alguns fungos e microalgas os PUFAS aparecem em níveis superiores à 20% do total de ácidos graxos, justamente o que foi encontrado por *P. autumnale* em meio BG 11 (inóculo), justificando essa ideia do aproveitamento de ácidos graxos essenciais à saúde humana.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE *P. autumnale* EM SISTEMA BATELADA ALIMENTADA

O modo de cultivo em sistema batelada alimentada é caracterizado por fornecer uma concentração de nutrientes durante o tempo de cultivo, esse processo foi analisado por apresentar vantagens para o regime heterotrófico, como alta densidade celular e pela baixa inibição que o substrato pode causar nas microalgas (CHEN e CHEN, 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

A Tabela 15 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos por *P. autumnale* em cultivo batelada alimentada com vinhaça.

Tabela 15 - Parâmetros do cultivo em sistema batelada alimentada

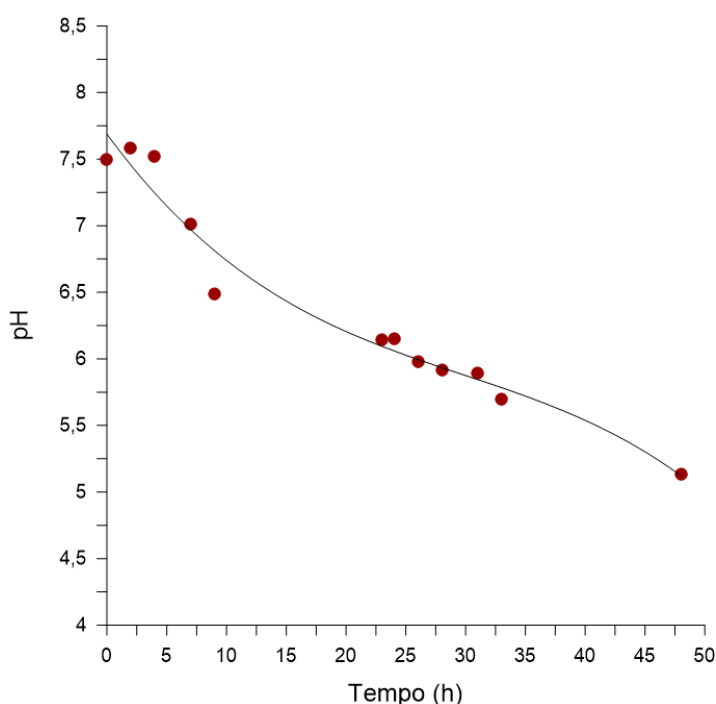
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	tg (h)	Px (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	X <sub>máx</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	$\frac{Y_X}{S} (C)$ (mg células mg <sup>-1</sup> )	$\frac{Y_X}{S} (N)$ (mg células mg <sup>-1</sup> )	ER COT (%)	ER NT (%)
0,079	8,77	12,29	1450	0,88	16,03	16	14
± 0,01	± 1,8	± 5,0	± 180	± 0,12	± 0,07	± 0,82	± 1,13

$\mu_{\text{máx}}$  (h<sup>-1</sup>): velocidade máxima específica de crescimento, tg (h): tempo de geração, Px (mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>): produtividade de biomassa, X<sub>máx</sub> (mg L<sup>-1</sup>): concentração celular máxima, Y<sub>x/s</sub> (C) (mg células mg<sup>-1</sup> COT): coeficiente de conversão de substrato carbono em células, Y<sub>x/s</sub> (N) (mg células mg<sup>-1</sup> NT): coeficiente de conversão de substrato nitrogênio em células, ER COT (%): remoção de carbono orgânico, ER NT (%): remoção de nitrogênio.

Esse cultivo apresentou uma produtividade de biomassa de  $12,29 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$  em um tempo de geração de 8,77 h e uma velocidade máxima específica de crescimento de  $0,079 \text{ h}^{-1}$ . Obteve-se um coeficiente de conversão de substrato carbono em células de  $0,88 \text{ mg mg}^{-1}$  e de nitrogênio em  $16,03 \text{ mg mg}^{-1}$ , além disso, remoção de 16% de carbono e 14% de nitrogênio.

Com exceção da produtividade e remoções, os quais dependem do volume variável característico da batelada alimentada, todos os parâmetros cinéticos foram similares àqueles obtidos em biorreator batelada. Apesar disto, a menor produtividade ( $12,29 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) também se deve ao baixo pH que foi característico nesse cultivo, iniciou-se em 7,5 e ao final estava em 5,1, ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Mudança do pH durante o cultivo batelada alimentada



Segundo Wojciechowski (2013), o pH pode modificar o estado químico de várias substâncias no cultivo, como fosfatos, amônia, metais-traço, bem como afeta diretamente no metabolismo da cianobactéria, atuando no transporte iônico, na velocidade das reações enzimáticas e na permeabilidade da membrana, interferindo também na assimilação de alguns nutrientes. E em cultivos heterotróficos o pH tende a baixar devido à produção de  $\text{CO}_2$  a partir da oxidação das moléculas orgânica como fonte de energia (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Nesse

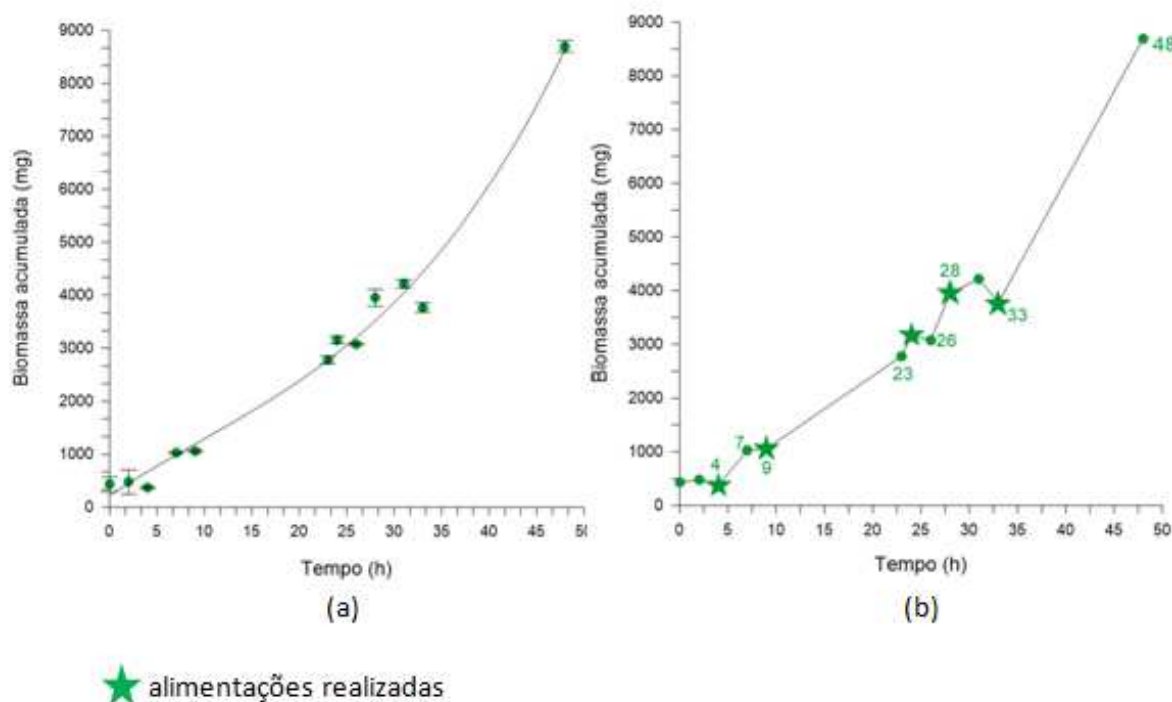
sentido, os parâmetros cinéticos foram influenciados negativamente devido a diminuição do pH do cultivo.

Cabe salientar que para este cultivo foi necessário alterar a razão C/N de 12 para 16, uma vez que as características da vinhaça se deram diferentes daquela utilizada no DCCR e no biorreator sistema batelada, sendo adicionados cerca de  $2736 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono orgânico (40% de 6840 mg de glicose).

Os parâmetros cinéticos foram menores quando comparados com o cultivo em sistema batelada, apenas os coeficientes de conversão de substrato em células foram superiores, fator que pode estar relacionado com as alimentações realizadas, possuindo maiores quantidades de substratos para assimilação.

Para melhor explicação, a Figura 22 mostra o crescimento celular de *P. autumnale* (biomassa acumulada no decorrer do cultivo), sendo o gráfico (a) aquele com consumo acumulado de forma geral e o (b) demonstrando os principais pontos do cultivo, ou seja, as horas em que obteve crescimento representativo e as alimentações realizadas.

Figura 22 - Crescimento acumulado (a) e alimentações realizadas (b) de *P. autumnale* em sistema batelada alimentada



Na Figura 22 se percebe que houve um crescimento de *P. autumnale* cresceu acumulando cerca de 8700 mg totais de biomassa em 6 L de vinhaça. A Figura 22b destaca em verde os tempos de maior produtividade de biomassa, atrelada ao crescimento exponencial. As estrelas indicam as 5 alimentações realizadas.

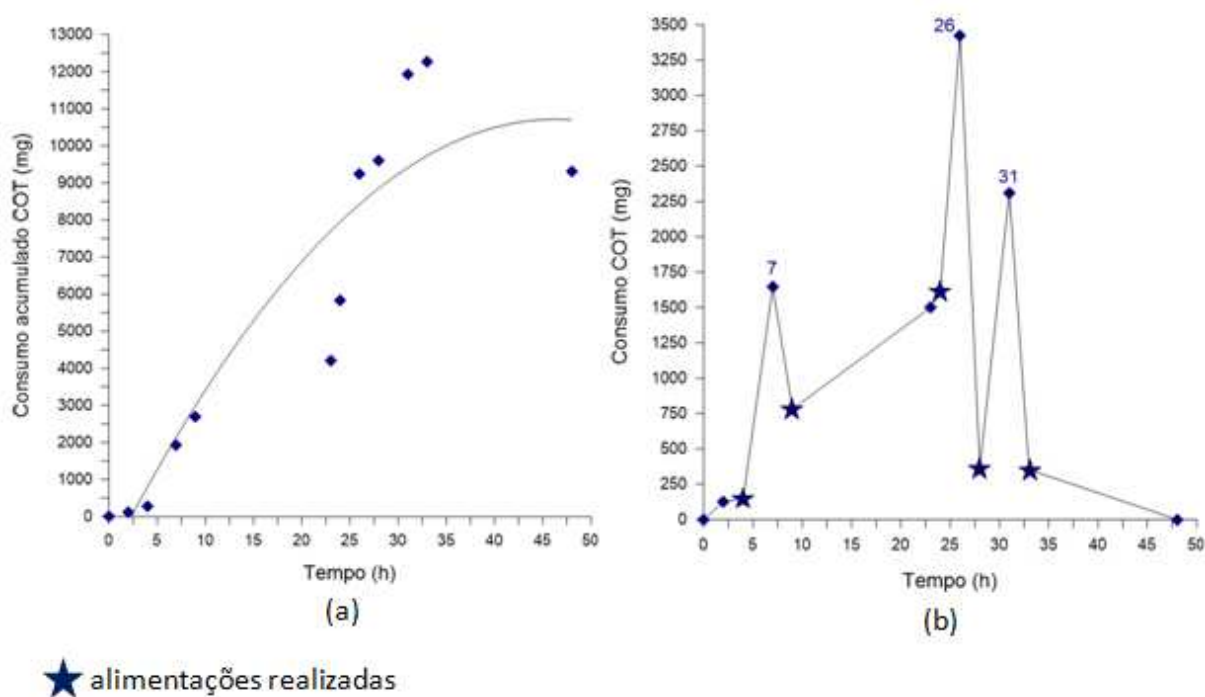
Apesar da concentração máxima final ( $1450 \text{ mg L}^{-1}$ ) ser inferior ao obtido no cultivo em batelada ( $4360 \text{ mg L}^{-1}$ ), deve-se considerar que houve um acúmulo de biomassa pela variação do volume. Assim, a biomassa acumulada foi superior a 8000 mg, ou seja, valores em massa da mesma magnitude daqueles obtidos no biorreator batelada. Sendo assim, quando temos cultivos em batelada, é mais importante a comparação em termos de massa do que concentração, considerando a diluição do meio devido às alimentações.

Se percebe que depois da 1ª alimentação, entre as horas 4 e 7 obteve-se um bom crescimento, representando 654 mg de biomassa. Após a 2ª alimentação, entre os pontos 9 e 23 horas também obteve um crescimento significativo de 1725 mg de biomassa. Já na 3ª alimentação que foram entre as 24 e 26h o crescimento se estabilizou, mas que aumentou em 874 mg das horas 26 e 28.

Na 4ª alimentação nota-se um leve crescimento seguido de decaimento e na 5ª alimentação, entre as 33 e 48h a cianobactéria obtêm um ápice de crescimento, representando 4927 mg de biomassa. Outro ponto a se considerar é que em 31h a biomassa já tinha alcançado a metade do valor final de biomassa em massa (mg).

A Figura 23 apresenta os gráficos de consumo de substrato carbono, sendo o gráfico (a) o consumo acumulado e o gráfico (b) o consumo em cada tempo, demonstrando os pontos mais interessantes.

Figura 23 - Consumo acumulado (a) e o consumo em cada hora (b) de carbono orgânico por *P. autumnale*

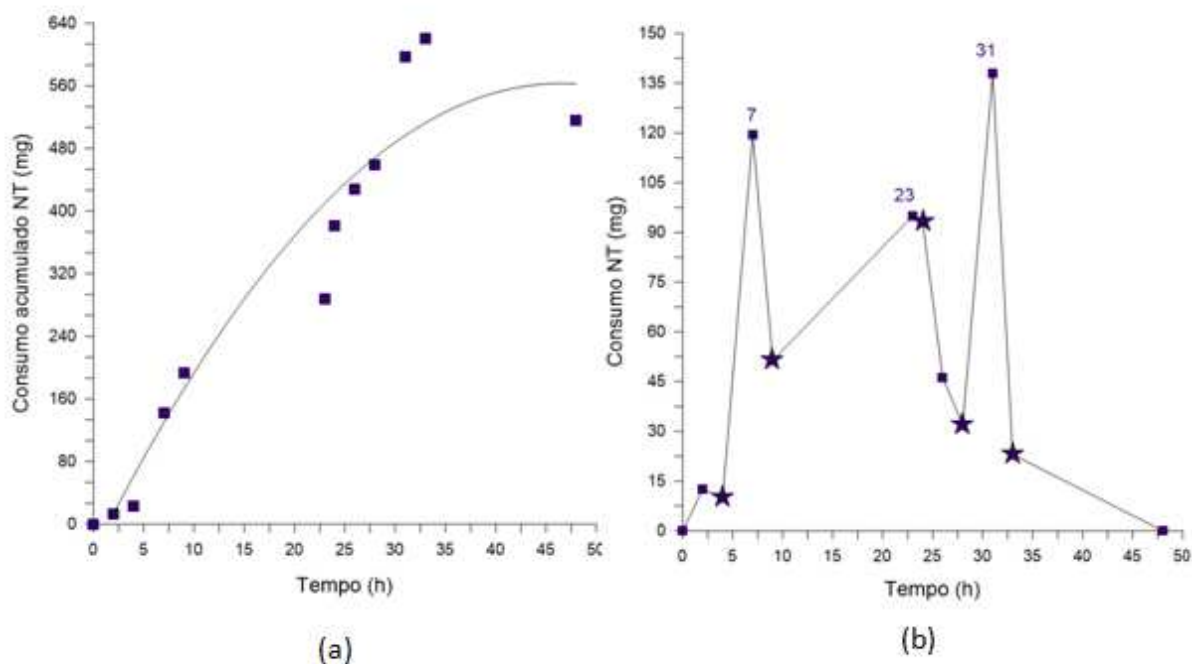


No gráfico (a) nota-se o maior consumo de carbono orgânico por *P. autumnale* de 12200 mg em 33 h de cultivo, e em 48 h houve uma diminuição de consumo (aumento de COT). Sabendo que o total de carbono orgânico inserido na vinhaça durante todo o cultivo, com as alimentações e as correções de razão C/N foi cerca de 59500 mg, e o total remanescente foi de 50200 mg, portanto o total consumido foi aproximadamente de 9304 mg. Tem-se que a cianobactéria consumiu cerca de  $193 \text{ mg h}^{-1}$  de carbono orgânico, corroborando para uma remoção de COT de 16%, valor baixo com comparado com outros autores que utilizaram o mesmo sistema de cultivo e mesma cianobactéria (FRANCISCO et al., 2015).

No gráfico (b) observa-se que após a 1ª alimentação houve um consumo de 1644 mg em 7 h de cultivo, após o consumo decaiu e foi realizada a 2ª alimentação em que o consumo aumentou e se elevou após a 3ª alimentação, com um consumo de 3424 mg em 26 h de cultivo, em seguida nota-se um decaimento brusco em que se realiza a 4ª alimentação e novamente a cianobactéria eleva o consumo em 31 h de cultivo com 2312 mg e por fim na 5ª alimentação não houve consumo algum.

Para comparar o consumo de nitrogênio a Figura 24 ilustra os gráficos de consumo de nitrogênio acumulado (a) e o consumo por cada ponto, apresentando os pontos relevantes (b).

Figura 24 - Consumo acumulado (a) e consumo em cada hora (b) de nitrogênio por *P. autumnale*



★ alimentações realizadas

No gráfico (a), tem-se o consumo acumulado de nitrogênio, demonstrando que em 31 h houve um consumo de 620 mg, e em 48 h também houve uma diminuição de consumo (aumento de NT), como no gráfico de carbono orgânico. Sabe-se que a quantidade total incorporada na vinhaça de nitrogênio orgânico foi de 3737 mg e o total remanescente foi de 3221 mg, portanto o total consumido pela cianobactéria foi cerca de 516 mg e aproximadamente  $10,7 \text{ mg h}^{-1}$  de nitrogênio consumido, com uma remoção de 14% desse composto.

Nesse caso se percebe que houve maior remoção de carbono orgânico do que nitrogênio, comportamento diferente dos outros cultivos realizados em DCCR e cultivo em sistema batelada em que o nitrogênio era majoritariamente consumido. Além disso, esse valor de remoção de N foi abaixo ao encontrado por Francisco et

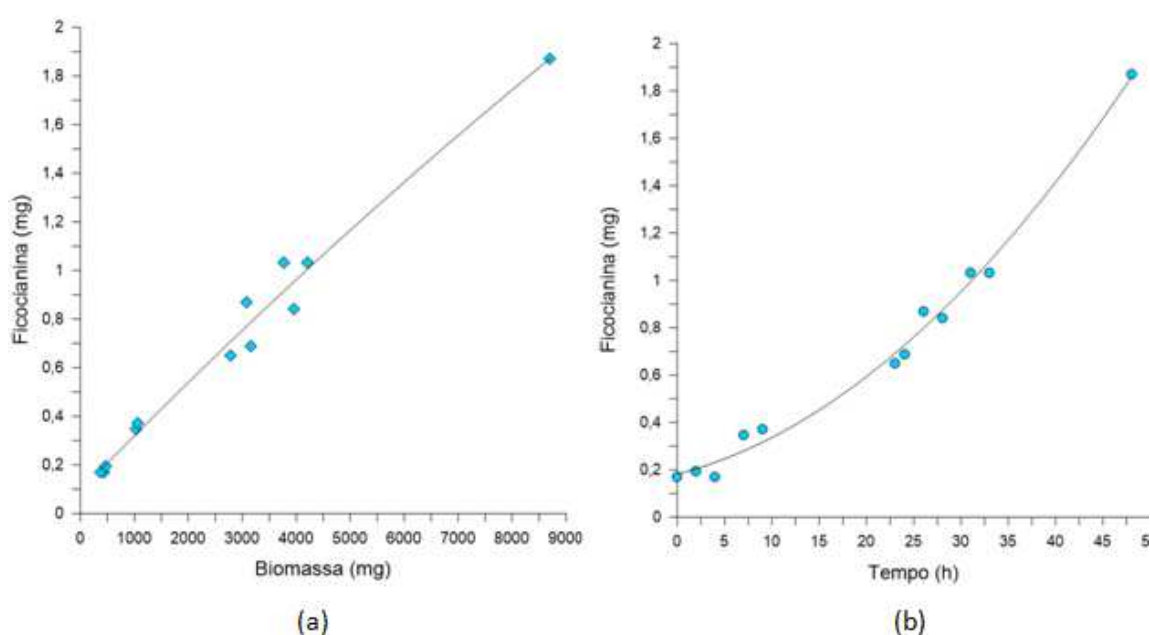
al. (2015) de 49% para *P. autumnale* em cultivo heterotrófico sob batelada alimentada.

O gráfico (b) demonstra que a partir da 1ª alimentação há um consumo de 119 mg de nitrogênio em 7 h. Após o consumo diminui e com a 2ª alimentação aumenta novamente em 23 h com 94 mg consumidos, se observa no gráfico que em 24 h (3ª alimentação) o consumo se manteve e em seguida houve um decaimento, diferentemente do consumo de carbono que se elevou nesse mesmo tempo, pode-se concluir que essa diferença tenha causado um maior consumo de carbono e diminuição de nitrogênio paralelamente, ocorrendo neste tempo maiores remoções de carbono orgânico.

Na 4ª alimentação *P. autumnale* apresenta em 31 h, 131 mg consumidos, sendo o ponto mais alto, comportamento também observado para consumo de carbono orgânico em 31h. Após a 5ª alimentação não houve mais consumo.

Para fins de conhecimento sobre a pureza do cultivo foram realizadas medições de ficocianina para relacionar com a biomassa gerada, portanto, na Figura 25 se apresenta a massa de ficocianina por biomassa (a) e a massa de ficocianina pelo tempo (b).

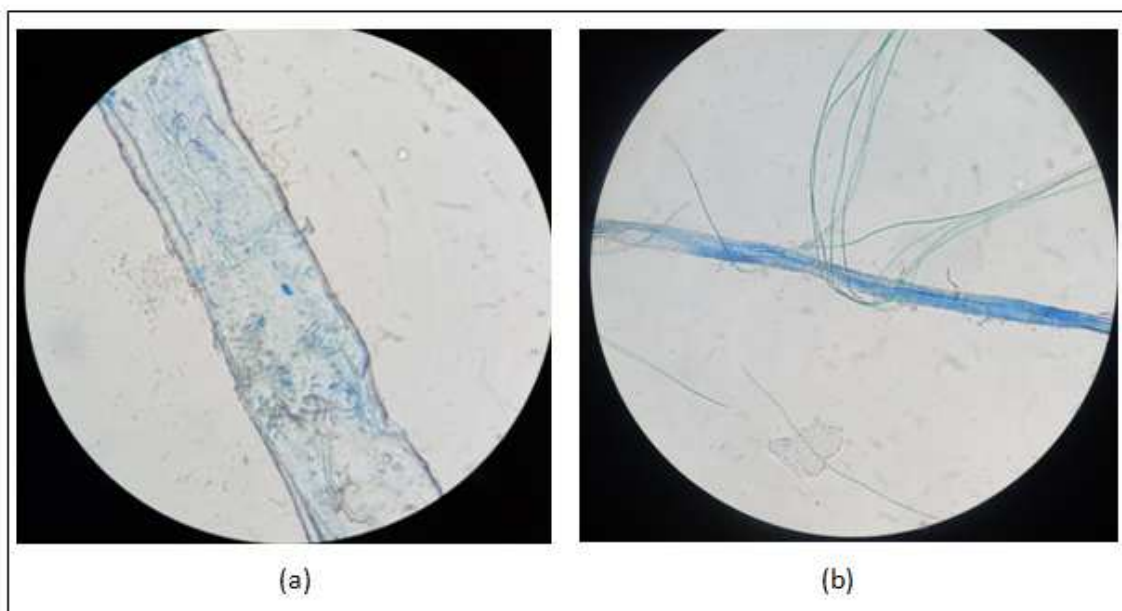
Figura 25 - Concentração de ficocianina pela biomassa presente (a) e pelo tempo (b).





Na Figura 25a verifica-se que a massa de ficocianina aumenta de acordo com o crescimento de biomassa, enquanto que na Figura 25b, se observa que a ficocianina aumenta ao decorrer do cultivo, dessa forma se constata a pureza no experimento visto que a ficocianina aumenta de acordo com a biomassa e com o tempo. Na Figura 26 é possível ver os filamentos de *P. autumnale* desestruturados, com liberação do pigmento azul ficocianina no meio. A imagem (a) está em lente de aumento 100x e corresponde a 24 h de cultivo e a imagem (b) em lente de aumento por 40x correspondendo a 48 h de cultivo.

Figura 26 - Micrografias ilustrando filamentos de *P. autumnale* e ficocianina



Fonte: Elaborado pela autora

Se tratando dos bioprodutos obtidos a partir de *P. autumnale* cultivada sob o sistema batelada alimentada em vinhaça, a composição da biomassa foi analisada em termos de proteínas totais, lipídios totais, açúcares redutores totais (ART), carboidratos, ficocianina extraída e ficocianina purificada.

Serão apresentados os bioprodutos obtidos do biorreator sistema batelada alimentada em vinhaça juntamente com os bioprodutos do inóculo em meio BG 11. As proteínas e os lipídios estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Proteínas e lipídios obtidos no cultivo em vinhaça e em meio BG 11

Bioprodutos	Biorreator Sistema Batelada Alimentada em vinhaça	Inóculo (meio BG 11)
Proteínas (%)	43,51 ± 1,33	31,7 ± 7,78
Lipídios (%)	12,6 ± 0,83	16,58 ± 4,1

O cultivo em sistema batelada alimentada obteve 43% de proteínas e 12,6% de lipídios, apesar da remoção ter sido ligeiramente maior para carbono (16%) do que de nitrogênio (14%). Porém o coeficiente de conversão de substrato em células para nitrogênio foi de 16,03 mg mg<sup>-1</sup>, elevado ao comparar com a conversão de substrato em células para carbono de 0,88 mg mg<sup>-1</sup>.

Desta forma o coeficiente de conversão de N foi maior que 1,0 e Lourenço et al. (2004) cita que o nitrogênio perfaz em torno de 10% da biomassa microalgal, por esse motivo os teores proteicos foram mais elevados. Os autores Fields, Ostrand e Myfield (2018) utilizaram esse sistema de cultivo como forma de obter maiores concentrações de proteínas microalgais e obtiveram um aumento de 2,5x a mais quando comparado com cultivo em sistema batelada.

Bastos et al., (2015) estudaram a produção de proteínas unicelulares utilizando *Aphanothece microscopica* Nägeli em cultivo heterotrófico (sistema batelada) pelo efluente de parboilização de arroz, com inóculo de 300 mg L<sup>-1</sup> e 35°C, demonstrando 37,7% de proteína na fase exponencial de crescimento, concluindo que essa cianobactéria pode ser uma fonte potencial de proteína, mas que ainda há pesquisas escassas sobre o teor proteico de biomassas microalgais cultivadas em águas residuárias. A presente pesquisa encontrou valores um pouco maiores em sistema batelada alimentada de 43%. Portanto demonstra que efluentes com cargas nutricionais adequadas, como a vinhaça podem ser utilizados na produção de proteínas, obtendo altos valores.

A produção lipídica foi de 12,6%, maior ao encontrado em biorreator sistema batelada (4,2%). Vale resaltar que nessa condição foi alterada a razão C/N de 12 para 16 com adição de carbono (glicose) e foram realizadas alimentações, o que possibilitou o aumento do consumo de moléculas de carbono, por ficarem mais disponíveis pela cianobactéria. Já em relação ao meio BG 11, foi obtido cerca de

16,5% de lipídios, maior ao do sistema batelada alimentada, que pode ser explicado pelo sistema mixotrófico desse cultivo.

Santo et al., (2017) obtiveram 15% de lipídios pesquisando o cultivo heterotrófico de *P. autumnale* em sistema batelada, em cultivo de efluente proveniente da suinocultura, resultados um pouco maiores que o presente estudo, além disso, o efluente de suinocultura tem composição diferente da vinhaça, mas que ambos se mostraram eficientes para produção lipídica.

A partir dos lipídios e proteínas obtidos, identifica-se que esse cultivo não obteve inibição pelos substratos presentes na vinhaça, estando ligado às alimentações realizadas a cada tempo, ou seja, não limitou a assimilação de nitrogênio e carbono pela cianobactéria, como citam os autores Chen e Chen (2006).

Se tratando de carboidratos e açúcares, a Tabela 17 apresenta esses bioprodutos obtidos no sistema batelada alimentada em vinhaça e em meio BG 11.

Tabela 17 - Açúcares redutores totais e carboidratos presentes no cultivo em vinhaça e em meio BG 11

<b>Bioprodutos</b>	<b>Biorreator Sistema Batelada Alimentada em vinhaça</b>	<b>Inóculo (meio BG 11)</b>
ART (mg L <sup>-1</sup> )	810	1020
Arabinose	53,33 ± 0,3	49,29 ± 5,0
Galactose	2,76 ± 0,2	21,54 ± 2,2
Carboidratos (mg L <sup>-1</sup> )	Glicose	48,06 ± 1,4
	Xilose	—
	Manose	26,94 ± 1,4

ART: açúcares redutores totais

Os carboidratos presentes em sistema batelada alimentada foram, em maior concentração, a arabinose (53,33 mg L<sup>-1</sup>), seguido de glicose (48,06 mg L<sup>-1</sup>), de manose (26,94 mg L<sup>-1</sup>), em menores concentrações, a galactose (2,76 mg L<sup>-1</sup>), e por fim não obteve quantidades de xilose. Os açúcares redutores totais foram obtidos em torno de 810 mg L<sup>-1</sup>, dessa forma existem mais açúcares na biomassa da cianobactéria que não foram mensurados, porém esses quantificados são os mais

importantes para a produção de EPS. Lourenço (2006) indica que a glicose é o açúcar predominante nas microlagas, variando de 21 a 87% do total de carboidratos, e que também são encontradas concentrações significativas de galactose (1-20%) e manose (2-46%), e os outros açúcares somados como arabinose, fucose, ranose, ribose e xilose variam entre 0 e 17%.

No presente estudo em sistema batelada alimentada *P. autumnale* apresentou majoritariamente arabinose, seguido de glicose, manose, galactose e ausência de xilose. Os autores Rossi e Philippis (2016) mencionam que na maioria dos casos glicose, galactose e fucose são detectados como constituintes principais, mas que em algumas vezes são encontrados os açúcares arabinose, ramnose, xilose, fucose, manose e ácidos urônicos como dominantes, como foi o caso desse presente estudo, que encontrou arabinose como dominante. Os mesmos autores citam que alterações nos cultivos podem provocar tais mudanças de carboidratos na biomassa microalgal.

Rossi e Philippis (2016) explicam que os EPS das cianobactérias geralmente são moléculas complexas compostas por um número maior de constituintes em comparação com as outras microalgas, e que seu principal papel é manter a integridade e as funções das membranas biológicas das células, impedindo que ocorram danos em caso de dessecação.

Di pippo (2013) estudou os açúcares presentes em *P. autumnale* a partir do cultivo em meio BG 11 em regime mixotrófico e obteve em maiores quantidades glicose (44,79%), manose (11,41%), galactose (10,15%), arabinose (9,11%), fucose (9,01%), ramnose (5,90%), ribose (4,18%), ácido galacturônico (3,34%), ácido glucurônico (1,64%) e frutose (0,64%). E comparação com o presente estudo em meio BG 11 em que foram avaliados apenas cinco dos açúcares em que Di pippo (2013) mensurou em sua pesquisa, demonstra que existem outros carboidratos presentes em *P. autumnale*, também pelo fato do ART constituir no total 1,02 g L<sup>-1</sup> e que apenas 0,17 g L<sup>-1</sup> foram mensurados, demonstrando a viabilidade de cultivo dessa cianobactéria para obtenção de açúcares, consequentemente exopolissacarídeos.

Em relação ao pigmento ficocianina obtido, a Tabela 18 apresenta as concentrações obtidas para os cultivos estudados.

Tabela 18 - Ficocianina obtida no cultivo em vinhaça e em meio BG 11

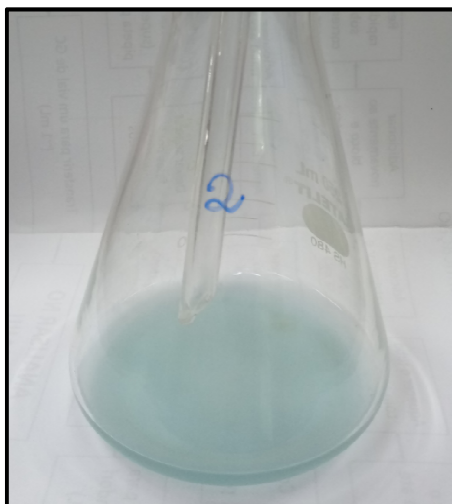
Bioprodutos	Biorreator Sistema Batelada Alimentada em vinhaça	Inóculo (meio BG 11)
Ficocianina extraída ( $\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ )	99,5	165,62
Ficocianina purificada ( $\text{mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ )	4,06	5,8

Se tratando da produção de pigmentos, Morais e Bastos (2018) estudaram a produção de ficocianina da microalga *Aphanothece microscopica* Nägeli empregando meio BG11 suplementado com vinhaça em cultivo mixotrófico e obtiveram uma boa produtividade de ficocianina de  $49,18 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{mg}_{\text{biomassa}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . O presente estudo obteve  $99,5 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ , para ficocianina extraída e  $4,06 \text{ mg}_{\text{ficocianina}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$  para ficocianina purificada, valores menores quando comparados com o sistema batelada e com o cultivo em meio BG 11, isso pode ter ocorrido devido ao pH baixar ao decorrer do experimento.

Morais (2018) através de um delineamento experimental em diferentes pH para produção de ficocianina, obteve melhores concentrações em pH próximos da neutralidade. Menciona ainda que o pH do meio de cultivo possuiu influência sobre o aparato fotossintético das cianobactérias que geralmente são alcalófilas, ou seja, a produção de ficocianina é dependente do pH, e sua produção pode aumentar em condições alcalinas. Mesmo o valor do presente estudo sendo abaixo dos outros cultivos em batelada e em meio BG 11, se torna uma concentração atrativa por demonstrar quantidades em cultivo heterotrófico sem luminosidade, sugerindo a viabilidade do cultivo da microalga em vinhaça.

A ficocianina extraída obtida nesse estudo está ilustrada na Figura 27. e percebe-se que sua pigmentação é mais clara quando comparadas com os outros cultivos apresentados anteriormente.

Figura 27 – Imagem da extração de ficocianina da biomassa em sistema batelada alimentada



Fonte: Elaborado pela autora

A Tabela 19 apresenta a composição dos ácidos graxos presente na biomassa de *P. autumnale* em sistema batelada alimentada e a Tabela 20 descreve a composição do óleo produzido.

Tabela 19 - Perfil dos ácidos graxos de *P. autumnale* em sistema batelada alimentada

<b>Ácidos Graxos</b>		<b>(% em massa)</b>
C4:0	ácido-butanoico	0,44
C6:0	ácido-hexanóico	0,67
C12:0	ácido-láurico	0,37
C14:0	ácido-mistérico	2,11
C15:0	ácido-pentadecanóico	0,58
C16:0	ácido-palmítico	37,53
C16:1	ácido-palmitoleico	1,06
C18:0	ácido-esteárico	11,06
C18:1	ácido-oleico	6,47
C18:2	ácido-linoléico	25,97
C18:3	ácido-linolênico	7,12
SFA	52,71 %	
MUFA	7,51 %	
PUFA	33,08 %	

SFA: ácidos graxos saturados; MUFA: ácidos graxos monoinsaturados; PUFA: ácidos graxos poliinsaturados

Os ácidos graxos encontrados em sua maioria foram os SFA (52,71%), seguido dos PUFA (33,08%) e dos MUFA (7,51%). A composição dos ácidos graxos saturados está de acordo com as maiores quantidades do ácido palmítico mensuradas (C16:0 - 37,53%), e para os ácidos graxos insaturados maiores quantidades de C18:1-3 foram encontradas (C18:1 - 6,47%, C18:2 - 25,97%, C18:3 - 7,2%). Como apresentou maior porcentagem de SFA, favorece o uso deste óleo para biodiesel.

Tabela 20 - Propriedades do biodiesel de *P. autumnale* gerado em sistema batelada alimentada

Propriedades	<i>P. autumnale</i>	ANP 255	ASTM 6751	EN 14214
CN	57,3	mín. 45	mín. 47	mín. 51
IV $\text{gl}_2 \text{ 100g}^{-1}$	75,36			máx. 120
DU (%)	73,67			
SV	198,41			
LCSF (%)	9,28			
CFPP (°C)	12,68	máx. 19 <sup>1</sup>	máx. 5	
CP (°C)	14,74		-3 à -12	
APE	75,62			
BAPE	40,19			
OS (h)	6,16	mín.12	mín. 3	mín. 8
HHV	36,57			
$\mu$ ( $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	1,19	3,0 - 6,0	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
$\rho$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )	0,81	0,85 à 0,90	máx. 0,88	0,86 à 0,90

Parâmetros = CN: número de cetano; IV: índice de iodo; DU: grau de instauração; SV: índice de saponificação; LCSF: fator de cadeia longa saturada; CFPP: ponto de entupimento de filtro a frio; CP: ponto de névoa; APE: posição alílica; BAPE: Posição bis-alílica; OS: estabilidade à oxidação; HHV: maior valor de aquecimento;  $\mu$ : viscosidade cinemática;  $\rho$ : densidade. **Normas: ANP 255: Brasil; US ASTM 675: Estados Unidos; Europa 14214: União Européia.**

Analisando as propriedades do óleo obtido, verifica-se que o número de cetano (57,3) está de acordo com as normas descritas, sendo acima dos valores preditos. Bem como o índice de iodo ( $75,36 \text{ gl}_2 \text{ 100g}^{-1}$ ), sendo o máximo exigido de  $120 \text{ gl}_2 \text{ 100g}^{-1}$  pela EN 14214.

Por outro lado, o ponto de entupimento de filtro a frio apresentou  $12,68^\circ\text{C}$ , correspondendo à máxima de  $19^\circ\text{C}$  pela ANP, mas ultrapassando do limite pela ASTM (máx.  $5^\circ\text{C}$ ). O ponto de névoa apenas não ficou de acordo com a ASTM ( $-3$  à  $-12^\circ\text{C}$ ) sendo de  $14,74^\circ\text{C}$ . Já a estabilidade à oxidação obtida (6,16h) apenas ficou

em conformidade com a ASTM (mín. 3h), estando abaixo do valor para as outras normas (12h para ANP e 8h para EN).

Os autores Alleman e McCormick (2016) mencionam que adicionar aditivos na mistura de biodiesel auxilia na diminuição da temperatura de operação do óleo, reduzindo a formação de cristais com o frio, e que diminuir o teor de biodiesel no diesel em meses mais frios também é uma solução. Em relação à estabilidade de oxidação (OS), estes mesmos autores citam que a adição de antioxidantes aumenta esse parâmetro e também amplia a vida útil do biodiesel.

Se tratando da viscosidade cinemática obtida ( $1,19 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), não ficou em conformidade com nenhuma norma, estando abaixo dos valores exigidos. Por esse fator, os ácidos graxos que influenciaram são aqueles provenientes de cadeia C10 até C18:0 por diminuir a viscosidade de aumentar o número de cetano (FRANCISCO et al., 2019). Outro parâmetro que não se encaixou é a densidade, ficando levemente abaixo dos valores descritos pela ANP (0,85 a 0,90  $\text{g cm}^{-3}$ ) para ASTM (máx. 0,88) e EN (0,86 a 0,90  $\text{g cm}^{-3}$ ).

Knothe, Krahl e Gerpen (2010) citam que o biodiesel com baixos níveis de gordura poliinsaturada, principalmente o ácido graxo C18:3 (ácido-linolênico) emite níveis mais baixos de óxidos de nitrogênio, decorrente da correlação linear entre o nível de insaturação do biodiesel e a densidade, dessa forma quanto menor for a insaturação de ácidos graxos, menores densidades e emissões de óxidos de nitrogênio. Nesse caso o presente estudo demonstrou maiores valores de ácidos graxos saturados (52,73%) em maioria pelo ácido-palmitico (C16:0 em 37,53%).

Silva et al., (2017) avaliaram a produção de lipídios através do cultivo heterotrófico em sistema batelada em vinhaça da cianobactéria *Desmodesmus subspicatus* com inóculo inicial de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e obtiveram a  $35^\circ\text{C}$  uma concentração lipídica de  $0,17 \text{ g g}^{-1}$ , com perfil de ácidos graxos adequado para síntese de biodiesel. Concluindo que o cultivo heterotrófico de cianobactérias em vinhaça de cana-de-açúcar tem um grande potencial para a produção de lipídios passíveis de síntese para biodiesel.

Em relação aos resultados dos ácidos graxos obtidos, o sistema de produção de biomassa em batelada apresentou um óleo mais viável tecnicamente para a síntese de biodiesel quando comparado ao sistema batelada alimentada, pelo fato de possuir maiores saturações na cadeia de carbonos de 65% contra 52,71%, por apresentar maior número de cetanos (60,06), maior estabilidade à oxidação (10,22



h), viscosidade cinemática ( $1,32 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) e densidade ( $0,87 \text{ g cm}^{-3}$ ) superiores, tendo apenas dois parâmetros com ajuste necessário para adequação com a norma brasileira ANP 45. Nesse sentido, a estabilidade de oxidação pode ser normalizada pela adição de antioxidante, elevando de 10 para 12 h, conforme recomendado por essa normativa.

Diante disso, mesmo considerando estas adequações, o cultivo em batelada da cianobactéria *P. autumnale* apresenta um potencial técnico de aplicação para a obtenção de biodiesel.

## 6 CONCLUSÕES

Nas diferentes condições experimentais, foi possível concluir que:

I) Nos ensaios em agitador orbital propostos pelo delineamento experimental foi selecionada a condição de 35°C, razão inicial C/N 16 e pH inicial 7,5, que levou a uma produtividade de 107 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, com remoção de 49% de carbono, 47% de nitrogênio e 28% de fósforo;

II) Em biorreator sistema batelada foram obtidos 58,02 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> de produtividade de biomassa, 4360 mg L<sup>-1</sup> de concentração máxima celular, 0,0927 h<sup>-1</sup> de velocidade específica máximo de crescimento e remoções de 67 e 70% de carbono orgânico total e nitrogênio total respectivamente. Além disso, foi possível obter por meio da biomassa gerada 21,33 % de proteínas, 4,26% de lipídios com composição variada em ácidos graxos, predominado em maior parte os saturados (65%), carboidratos mensurados em glicose (79,46 mg L<sup>-1</sup>), arabinose (44,53 mg L<sup>-1</sup>), xilose (14,33 mg L<sup>-1</sup>), manose (9,84 mg L<sup>-1</sup>) e galactose (4,78 mg L<sup>-1</sup>), açúcares redutores totais de 970 mg L<sup>-1</sup>, ficocianina extraída de 197,53 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> e ficocianina purificada de 5,59 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>.

III) No cultivo em biorreator sistema batelada alimentada a cianobactéria demonstrou uma produtividade de biomassa de 12,29 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, com concentração celular máxima correspondente a 1450 mg L<sup>-1</sup>, uma velocidade específica máxima de crescimento de 0,079 h<sup>-1</sup> com remoções de 16 e 14% de carbono orgânico total e nitrogênio total respectivamente. A biomassa gerada possibilitou a obtenção de 43,51% de proteínas, 12,6% de lipídios constituídos em maior parte por ácidos graxos saturados (52,71%), com composição de carboidratos mensurados em arabinose (53,33 mg L<sup>-1</sup>), glicose (48,06 mg L<sup>-1</sup>), manose (26,94 mg L<sup>-1</sup>) e galactose (2,76 mg L<sup>-1</sup>), açúcares redutores totais em torno de 810 mg L<sup>-1</sup>, ficocianina extraída de 99,5 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>, e ficocianina purificada de 4,06 mg<sub>ficocianina</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup>.

IV) Diante disso, os resultados indicaram a viabilidade técnica do cultivo de *P. autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar em sistemas batelada e batelada alimentada, com remoções de carbono orgânico total e nitrogênio total, além da biomassa gerada sugerir possíveis aplicações, indicando a possibilidade desta cianobactéria ser integrada em um sistema de biorrefinaria juntamente com o setor sucroenergético.

## 7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- I) Devido à produção de proteínas, avaliar o perfil de aminoácidos na biomassa gerada nos cultivos;
  
- II) Testar métodos diferentes para melhor extração e purificação de ficocianina;
  
- IV) Avaliar cultivo heterotrófico em diferentes condições de agitação e mistura de forma a potencializar o acúmulo de lipídios;
  
- V) Avaliar métodos de separação e recuperação da biomassa microalgal em vinhaça.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M. N.; HOLLAND, C. R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. **Journal of Food Engineering**, v. 26, n. 4, p. 443–452, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP) . **Combustíveis de aviação**. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/petroleo-derivados/155-combustiveis/1856-combustiveis-de-aviacao>>. Acesso em: 5 de maio.

ALLEMAN, Teresa L.; MCCORMICK, Robert L. **Biodiesel handling and use guide**. 5. ed. U.S. Department of Energy: energy efficiency and renewable energy. 2016.

ALVIM, Jonas Chaves; ALVIM, Fernanda Aparecida Lima Silva; SALES, Victor Hugo Gomes; et al. Biorefineries: concepts, classification, raw materials and products. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 1, n. 3, p. 61–77, 2014.

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: IAPAR, v.1, 2014.

ANDRADE, Diva Souza; TELLES, Tiago Santos; LEITE CASTRO, Gustavo Henrique. The Brazilian microalgae production chain and alternatives for its consolidation. **Journal of Cleaner Production**, v. 250, p. 119526, 2020.

ANSARI, Faiz Ahmad; SINGH, Poonam; GULDHE, Abhishek; *et al.* Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Research**, v. 21, p. 169–177, 2017.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22th. ed. Washington, DC, New York: American Public Health Association, 2012.

ASTMD6751, **Standard Specification for biodiesel Fuel (B100)**. Blend Stock for Distillate Fuels. In: ASTM International West Conshohocken. P.A. 2002.

AUSSANT, Justine; GUIHÉNEUF, Freddy; STENGEL, Dagmar B. Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 12, p. 5279–5297, 2018.

BASTOS, Reinaldo Gaspar; BONINI, Monica de Albuquerque. Produção de biomassa de microalgas a partir de cultivo mixotrófico em acetato. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 4, n. 1, p. 38–44, 2016.

BASTOS, Reinaldo Gaspar; BONINI, Monica A.; ZEPKA, Leila Queiroz; *et al.* Treatment of rice parboiling wastewater by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli with potential for biomass products. **Desalination and Water Treatment**, v. 56, n. 3, p. 608–614, 2015.

BASTOS, Reinaldo Gaspar; DE PAIVA, Paola Rizzo; RIGO, Mauricio; *et al.* Cultivo de *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de açúcares. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 1, p. 156–161, 2011.

BASTOS, Reinaldo Gaspar; SEVERO, Márcio; VOLPATO, Giandra; *et al.* Bioconversão do nitrogênio do efluente da parboilização do arroz por incorporação em biomassa da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Revista Ambiente e Água**, v. 5, n. 3, p. 258–264, 2010.

BENNETT, Allen; BOGOBAD, Lawrence. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1973.

BETTANI, Silvia Raquel; DE OLIVEIRA RAGAZZO, Gabriel; LEAL SANTOS, Nathalia; *et al.* Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 322–330, 2019.

BLIGH, E.G. AND DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p.911-917, 1959.

BONINI, Monica de Albuquerque. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

BORBA, Vivian Ipaves de Almeida; FERREIRA, Lívia Seno Camargo. Cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis*: biotecnologia e aplicações. **Revista acadêmica Oswaldo Cruz**, n.19, 2018.

BRASIL, B. S.A.F.; SILVA, F. C.P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 2017.

BRENNAN, Liam; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BRUNO, L.; DI PIPPO, F.; ANTONAROLI, S.; et al. Characterization of biofilm-forming cyanobacteria for biomass and lipid production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1052–1064, 2012.

BUSSA, Maresa; EISEN, Anna; ZOLLFRANK, Cordt; et al. Life cycle assessment of microalgae products: State of the art and their potential for the production of polylactid acid. **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 1299–1312, 2019.

CAMILOS NETO, Doumit ; PINOTTI, Maria Helena. Cyanobacterial Exopolysaccharides. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 43–52, 2004.

CANDIDO, Camila; LOMBARDI, Ana Teresa. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, v. 30, p. 79–85, 2018.

CARRILHO, E. N.V.M.; LABUTO, G.; KAMOGAWA, M. Y. Destination of Vinasse, a Residue From Alcohol Industry: Resource Recovery and Prevention of Pollution. In: **Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention**. Elsevier Inc., 2016, p. 21–43.

CETESB. Norma Técnica: **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, p. 1–12, 2015. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4\\_231.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf)>. Acesso em 12 de mar. 2020.

CHANDRA, Rashmi; ROHIT, M. V.; SWAMY, Y. V.; et al. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v.165, p.279-287, 2014.

CHEN, Chun Yen; ZHAO, Xin Qing; YEN, Hong Wei; et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

CHEN, Guan Qun; CHEN, Feng. Growing phototrophic cells without light. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 9, p. 607–616, 2006.

CHEN, Jiaxin; LI, Ji; DONG, Wenyi; et al. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336–346, 2018.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHOJNACKA, Katarzyna; MARQUES-ROCHA, Facundo-Joaquin. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.

CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida; ESCHER, Janaína Pedro; CORREIA, Jorge Evangelista; et al. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

COCA, Mónica; BARROCAL, Víctor M.; LUCAS, Susana; et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306–312, 2015.

CREMONEZ, Paulo André; FEROLDI, Michael; DE ARAÚJO, Amanda Viana; et al. Biofuels in Brazilian aviation: Current scenario and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1063–1072, 2015.

DA FONTOURA, Juliana Tolfo. Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

DELLAMATRICE, Priscila Maria; SILVA-STENICO, Maria Estela; MORAES, Luiz Alberto Beraldo; et al. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 25–31, 2017.

DE MATTOS, Luiz Felipe Arjonilla; BASTOS, Reinaldo Gaspar. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465–9473, 2016.



DE REVIERS, Bruno. Natureza e posição das "algas" na árvore filogenética do mundo vivo. In: FRANCESCHINI, I. M. (Org.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, cap. 1, p. 19-58. 2010.

DIAS, Marina Oliveira de Souza; MACIEL FILHO, Rubens; MANTELATTO, Paulo Eduardo; et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DI PIPPO, Francesca; ELLWOOD, Neil T.W.; GISMONDI, Alessandra; et al. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1697–1708, 2013.

DOS SANTOS, Aline Meireles; VIEIRA, Karem Rodrigues; SARTORI, Rafaela Basso; et al. Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: Study of effect of exogenous sources of organic carbon, absolute amount of nutrients, and stirring speed on biomass and lipid productivity. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 1–7, 2017.

European Committee for Standardization. **European Standard EN 14214: 2012+A1**; European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, 2014; p. 1–21.

FARROKH, Parisa; SHEIKHPOUR, Mojgan; KASAEIAN, Alibakhsh; et al. Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 5, p. 1–16, 2019.

FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 340–373, 1992.

FIGUEROA -TORRES, Gonzalo M.; WAN MAHMOOD, Wan M.Asyraf; PITTMAN, Jon K.; et al. Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 153, n. October 2019, p. 107396, 2020.

FIELDS, Francis J.; OSTRAND, Joseph T.; MAYFIELD, Stephen P. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for high-density cultures. **Algal Research**, v. 33, n. May, p. 109–117, 2018.

FRANCESCHINI, Iara Maria.; PRADO, João Fernando.; BURLIGA, Ana.Luiza. Diversidade. In: FRANCESCHINI, I. M. (Org.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 1, p. 73-213.

FRANCISCO, Érika Cristina; FRANCO, Telma Teixeira; WAGNER, Roger; et al. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, p. 1497–1505, 2014.

FRANCISCO, Érika Cristina; FRANCO, Telma Teixeira; ZEPKA, Leila Queiroz; et al. From waste-to-energy: The process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 482–487, 2015.

FRANCISCO, Erika Cristina; JACOB-LOPES, Eduardo; VIEIRA, Karem Rodrigues; et al. Nitrogen Starvation of Assessment in the Production of Single Cell Oils and Biodiesel Quality in Heterotrophic Cultures of Cyanobacteria *Phormidium autumnale*. **Journal of Advanced Chemical Engineering**, v. 9, n.192, p.1-7, 2019

FUESS, Lucas T.; RODRIGUES, Isabella J.; GARCIA, Marcelo L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 11, p. 1063–1072, 2017.

GALANOPOULOS, Christos; KENKEL, Philipp; ZONDERVAN, E. Superstructure optimization of an integrated algae biorefinery. **Computers and Chemical Engineering**, v. 130, 2019.

GOIS, Georgia Nayane Silva Belo. **Produção de hidrogênio e metano a partir da vinhaça de cana-de-açúcar em reatores anaeróbios de leito fluidizado**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

GONÇALVES, Ana L.; PIRES, José C.M.; SIMÕES, Manuel. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403–415, 2017.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em 04 de mar. 2020.

HAMMED, Ademola Monsur; PRAJAPATI, Sanjeev Kumar; SIMSEK, Senay; *et al.* Growth regime and environmental remediation of microalgae. **Algae**, v. 31, n. 3, p. 189–204, 2016.

IEA BIOENERGY. Task 42 BIOREFINING. **Sustainable and synergetic processing of biomass into marketable food & feed ingredients, products (chemicals, materials) and energy (fuels, power, heat)**. Wageningen, Netherlands, 2014. Disponível em: < [www.IEA-Bioenergy.Task42-Biorefineries.com](http://www.IEA-Bioenergy.Task42-Biorefineries.com)>. Acesso em 15 de mar.

KLEIN, Bruno Colling; BONOMI, Antonio; MACIEL FILHO, Rubens. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. June 2017, p. 1376–1392, 2018.

KLEIN, Bruno Colling; CHAGAS, Mateus Ferreira; WATANABE, Marcos Djun Barbosa; *et al.* Low carbon biofuels and the New Brazilian National Biofuel Policy (RenovaBio): A case study for sugarcane mills and integrated sugarcane-microalgae biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, 2019.

KNOTHE, Gerhard; KRAHL, Jürgen; GERPEN, Jon Van. **The Biodiesel Handbook**. 2. ed. Aocs Press, 2010. ISBN: 978-1-893997-62-2.

KNOTHE, Gerhard. Production and properties of biodiesel from algal oils. In: Borowitzka, M. A.; Moheimani, N. R. (eds.). **Algae for biofuels and energy**. Springer, Dordrecht. 2013, p. 207–221.

KOYANDE, Apurav Krishna; CHEW, Kit Wayne; RAMBABU, Krishnamoorthy; *et al.* Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16–24, 2019.

LEE, R.E. **Phycology**. 4 ed. New York: Cambridge University Press. 2008. ISBN-13 978-0-511-38669-5.

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

LOURENÇO, Sergio O.; BARBARINO, Elisabete; LAVÍN, Paris L.; *et al.* Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17–32, 2004.

MARIANO, Adriano Pinto. How Brazilian pulp mills will look like in the future? **O Papel**, v. 76, n. 6, p. 55–61, 2015.

MARIANO, Adriano Pinto; CRIVELARO, Sérgio Henrique Rezende; DE ANGELIS, Dejanira de Franceschi; et al. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1043–1055, 2009.

MARONEZE, M. M.; FRANCISCO, E. C.; ZEPKA, L. Q.; et al. **Avaliação do cultivo heterotrófico de cianobactérias para produção de biodiesel de 3ª geração empregando maltodextrina como fonte de carbono**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 2014.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 263–272, 2000.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MONÇÃO, F. S.; SARTORI, M. L.; VELOSO, R. V. S.; et al. Microalgas e Biocombustíveis: Integração de Cadeias Produtivas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, 2018.

MORAES, Bruna S.; JUNQUEIRA, Tassia L.; PAVANELLO, Lucas G.; et al. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? **Applied Energy**, v. 113, p. 825–835, 2014.

MORAES, Bruna S.; PETERSEN, Søren O.; ZAIAT, Marcelo; et al. Reduction in greenhouse gas emissions from vinasse through anaerobic digestion. **Applied Energy**, v. 189, n. 2017, p. 21–30, 2017.

MORAIS, Dayane Vanessa. **Produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de vinhaça de cana-de-açúcar**. 2018. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018.

MORAIS, Dayane V.; BASTOS, Reinaldo G. Phycocyanin Production by *Aphanothece microscopica* Nägeli in Synthetic Medium Supplemented with Sugarcane Vinasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, n. 1, p. 129–139, 2018.

MORANÇAIS, Michèle; MOUGET, Jean-Luc; DUMAY, Justine. Proteins and Pigments. In: **Microalgae in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc. p. 145–175, 2018.

MULLINEAUX, Conrad W. The thylakoid membranes of cyanobacteria: Structure, dynamics and function. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 26, n. 7, p. 671–677, 1999.

NEVES, Cristina; SANTOS, Mariana Manzoni Maroneze Aline Meireles dos; FRANCISCO, Erika Cristina; et al. Cassava processing wastewater as a platform for third generation biodiesel production. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 5, p. 397–487, 2016.

NEVO, Reinat; CHARUVI, Dana; SHIMONI, Eyal; et al. Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. **EMBO Journal**, v. 26, n. 5, p. 1467–1473, 2007.

NICOLAUS, Barbara; PANICO, Adriana; LAMA, Licia; et al. Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. **Phytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 639–647, 1999.

NOVA CANA. **Uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar**. Problemas identificados na utilização da vinhaça, 2020. Disponível em: <<https://www.novacana.com/cana/uso-vinhaca-cultura>>. Acesso em: 4 mar.

OLGUÍN, Eugenia J.; DORANTES, Efraín; CASTILLO, Omar S.; et al. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* Cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1813–1822, 2015.

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

PEREZ-GARCIA, Octavio; ESCALANTE, Froylan M.E.; DE-BASHAN, Luz E.; et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.

POULIOT, Y.; BUELNA, G.; RACINE, C.; et al. Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production. **Biological Wastes**, v. 29, n. 2, p. 81–91, 1989.

QUEIROZ, Maria Isabel; HORNES, Márcio Oliveira; GONÇALVES DA SILVA MANETTI, Adriana; et al. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. **Biosystems Engineering**, v. 115, n. 2, p. 195–202, 2013.

QUEIROZ, Maria Isabel; LOPES, Eduardo Jacob; ZEPKA, Leila Queiroz; et al. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2163–2169, 2007.

RATLEDGE, Colin. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 807–815, 2004.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.728, 1996.

REIS, Cristiano E. Rodrigues; HU, Bo. Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization? **Frontiers in Energy Research**, v. 5, p. 1–7, 2017.

RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014 - DOU 26.8.2014. **Norma Nacional Provisória do Biodiesel da ANP** (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). 2014. Disponível em: <  
[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes\\_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp%2045%20-%202014.xml)>. Acesso em: 8 de abr.

RESOLUÇÃO ANP Nº 798, DE 1.8.2019 - DOU 2.8.2019. **Norma Nacional Provisória do Biodiesel da ANP** (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis). 2019. Disponível em: <  
<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2019/agosto&item=ranp-798-2019>>. Acesso em: 8 de abr.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture**: biotechnology and applied phycolgy. Ames: Blackwell Science Ltda 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

RIZWAN, Muhammad; MUJTABA, Ghulam; MEMON, Sheraz Ahmed; et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. November 2017, p. 394–404, 2018.

ROBERTSON, Ruairi; GUIHÉNEUF, Freddy; STENGEL, Dagmar B; et al. Algae-derived polyunsaturated fatty acids : implications for human health. **Polyunsaturated fatty acids sources, antioxidant properties and health Benefits**, p. 45–99, 2013.

RODRIGUES, Daniele B.; MENEZES, Cristiano R.; MERCADANTE, Adriana Z.; et al. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273–279, 2015.

ROSSI, Federico; PHILIPPIS, Roberto De. Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis. In: **The Physiology of Microalgae, Developments in Applied Phycology**. Springer International Publishing Switzerland, p. 565–590, 2016.

SAAVEDRA, Mauricio Daniel Montaña; BISSOTO, Flávia Paschino; SOUZA, Roniel Augusto; CONCHA, Viktor Oswaldo Cárdenas Concha; BASTOS, Reinaldo Gaspar. **Produção de biomassa microalgal em efluente sucroalcooleiro clarificado por coagulação eletroquímica**. 29<sup>o</sup> Congresso Nacional de Saneamento e Meio Ambiente (AESABESP) - FENASAN. 2018.

SAKTHIVEL, R.; RAMESH, K.; PURNACHANDRAN, R.; et al. A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. May 2018, p. 2970–2992, 2018.

SARTORI, Rafaela Basso; SANTOS, Aline Meireles dos; KLEIN, Bruna; et al. Tratamento de efluente cervejeiro e reuso da biomassa para produção de biodiesel em biorreatores heterotróficos microalgais. **Revista Mundi Engenharia, Tecnologia e Gestão**, v. 1, n. 2, p. 1–15, 2016.

SANTANA, Hugo; CEREIJO, Carolina R.; TELES, Valérya C.; et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017.

SANTOS, Alberto Meireles. **Ciclagem de nutrientes e energia por processos baseados em microalgas a partir das águas residuais do abate e processamento de aves e suínos**. 2018. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018.

SANTOS, Alberto Meireles ; SANTOS, Aline Meireles dos; SARTORI, Rafaela Basso; et al. Biorremediação de efluente cervejeiro por *Phormidium autumnale* em biorreatores multifuncionais. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 3, p. 1010–1019, 2019.

SANTOS, Alberto. M.; DOS SANTOS, Aline. M.; SEVERO, Ihana. A.; et al. **Nutrient cycling in wastewater treatment plants by microalgae-based processes**. In: Industrial Waste: Management, Assessment and Environmental Issues. Nova Science Publishers, Inc., Chapter 2 pp. 41-64, 2016.

SANTOS, Alberto Meireles; DOS SANTOS, Aline Meireles; SARTORI, Rafaela Basso; et al. Nutrient cycling in meat processing industry by microalgae-based processes. **Desalination and Water Treatment**, v. 100, p. 91–99, 2017.

SARADA, R.; PILLAI, Manoj G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 795–801, 1999.

SILVA, Mariana Altenhofen; BARBOSA, Gabriel Henrique; CODATO, Carolina Brito; et al. 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**, v. 92, n. 3, p. 573–579, 2017.

SINGH, Rahul Kunwar; TIWARI, Shree Prakash; RAI, Ashwani K.; et al. Cyanobacteria: An emerging source for drug discovery. **Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 401–412, 2011.

SIQUEIRA, S. F.; FRANCISCO, E. C.; QUEIROZ, M. I.; et al. Third generation biodiesel production from microalgae *phormidium autumnale*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 427–433, 2016.

SLOTH, Jenni K.; WIEBE, Marilyn G.; ERIKSEN, Niels T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga



*Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 168–175, 2006.

SMETANA, Sergiy; SANDMANN, Michael; ROHN, Sascha; et al. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170, 2017.

STATSOFT INC., STATISTICA for windows [computer program manual]. [online], StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma. <http://www.statsoftinc.com>, 2004.

STRUNECKÝ, Otakar; ELSTER, Josef; KOMÁREK, Jiří. Molecular clock evidence for survival of Antarctic cyanobacteria (*Oscillatoriales*, *Phormidium autumnale*) from Paleozoic times. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 482–490, 2012.

SUDHAKAR, M. P.; KUMAR, B. Ramesh; MATHIMANI, Thangavel; et al. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 1320–1333, 2019.

SUKAČOVÁ, Kateřina; TRTÍLEK, Martin; RATAJ, Tomáš. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water Research**, v. 71, p. 55–63, 2015.

TALEBI, A.F., TABATABAEI M., CHISTI, Y. Biodiesel analyzer: a user friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel, *Biofuel Res. J.*, v.1, p.55–57, 2014. Disponível em: <<http://www.brteam.ir/analysis/>>. Acesso em: 10 de mar.

TEMPLETON, David W.; QUINN, Matthew; VAN WYCHEN, Stefanie; et al. Separation and quantification of microalgal carbohydrates. **Journal of Chromatography A**, v. 1270, p. 225–234, 2012.

TIWARI, O.; PRASANNA, R.; YADAV, A.; et al. Growth potential and biocide tolerance of non-heterocystous filamentous cyanobacterial isolates from rice fields of Uttar Pradesh, India. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, n. 4, p. 291–295, 2001.

TRABELSI, Lamia; M'SAKNI, Nour Houda; OUADA, Hatem Ben; et al. Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 1, p. 27–31, 2009.

TRENTACOSTE, Emily M.; MARTINEZ, Alice M.; ZENK, Tim. The place of algae in agriculture: Policies for algal biomass production. **Photosynthesis Research**, v. 123, n. 3, p. 305–315, 2015.

TRIPATHI, Ritu; SINGH, Jyoti; THAKUR, Indu Shekhar. Characterization of microalga *Scenedesmus sp.* ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774–781, 2015.

União da indústria de cana-de-açúcar (UNICA). 2019. **Histórico de produção e moagem da safra 2017/2018**. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>>. Acesso em: 10 de mar.

U.S. Department of Energy: Energy efficiency and renewable energy. ASTM Biodiesel Specifications 2015. Disponível em: <[https://afdc.energy.gov/fuels/biodiesel\\_specifications.html](https://afdc.energy.gov/fuels/biodiesel_specifications.html)>. Acesso em: 8 de abr.

VAN WYCHEN, Stefanie; RAMIREZ, Kelsey; LAURENS, Lieve M. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. **NREL – Laboratory Analytical Procedure**, v.303, 2015.

XU, Kaiwei; ZOU, Xiaotong; WEN, Hao; et al. Effects of multi-temperature regimes on cultivation of microalgae in municipal wastewater to simultaneously remove nutrients and produce biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p.1-11, 2019.

WANG, Jing Han; ZHANG, Tian Yuan; DAO, Guo Hua; et al. Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2659–2675, 2017.

WOJCIECHOWSKI, Juliana; STRAUBE, Arielli; CAVALCANTE, Kaoli Pereira; et al. **Isolamento e cultivo de Microalgas**, p.85, 2013.

YANG, Jie; XIN, Zhong; HE, Quan (Sophia); et al. An overview on performance characteristics of bio-jet fuels. **Fuel**, v. 237, p. 916–936, 2019.

ZEPKA, Leila Queiroz; JACOB-LOPES, Eduardo; GOLDBECK, Rosana; et al. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 8, p. 1305–1310, 2008.

ZHANG, Lijie; CHENG, Juan; PEI, Haiyan; et al. Cultivation of microalgae using anaerobically digested effluent from kitchen waste as a nutrient source for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 115, p. 276–287, 2018.

ZHU, Liandong. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376–1384, 2015.