



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

**EFEITO DA TEMPERATURA NO CULTIVO E PRODUÇÃO  
DE LIPÍDIOS MICROALGAIS POR *Phormidium autumnale*  
EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**ALINE SOTTA RÉCO**

**ARARAS**

**2023**



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

**EFEITO DA TEMPERATURA NO CULTIVO E PRODUÇÃO  
DE LIPÍDIOS MICROALGAIS POR *Phormidium autumnale*  
EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**ALINE SOTTA RÉCO**

ORIENTADOR: PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS

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

Araras

2023

Sotta Réco, Aline

Efeito da temperatura no cultivo e produção de lipídios microalgais por *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar / Aline Sotta Réco -- 2023.  
71f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras  
Orientador (a): Reinaldo Gaspar Bastos  
Banca Examinadora: Reinaldo Gaspar Bastos, Carolina Brito Codato-Zumpano, Catarina Amorim Oliveira Bibliografia

1. Microalgas. 2. Biodiesel . 3. Biorrefinaria. I. SottaRéco, Aline. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/87083



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Aline Sotta Réco, realizada em 28/08/2023.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (UFSCar)

Profa. Dra. Carolina Brito Codato-Zumpano (Nanobioplus)

Profa. Dra. Catarina Amorim Oliveira (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os que estiveram em algum momento envolvidos, obrigada

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1 Microalgas.....	5
3.2 Metabolismo heterotrófico.....	6
3.3 Tratamento de águas residuárias por microalgas.....	8
3.4 Vinhaça de cana-de-açúcar.....	9
3.5 Biodiesel microalgal.....	15
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>22</b>
4.1 Inóculo.....	22
4.2. Vinhaça de cana-de-açúcar.....	23
4.3 Efeito da temperatura no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça e BG11.....	23
4.4 Cinética de crescimento microalgal e consumo de substratos da vinhaça .....	23
4.5 Caracterização da biomassa .....	26
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1 Caracterização da vinhaça .....	28
5.2 Cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça submetida a diferentes temperaturas.....	30
5.3 Cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça e meio BG11 submetido a resfriamento progressivo .....	41
5.4 Perfil de ácidos graxos e estimativa das propriedades do biodiesel microalgal a partir do cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça.....	54
5.5 Proposta de biorrefinaria microalgal a partir do cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça .....	57
5.6 Sugestões para trabalhos futuros .....	60
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>63</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físicos e químicos da vinhaça de cana-de-açúcar .....	12
Tabela 2 Caracterização da amostra de vinhaça utilizada nos ensaios .....	29
Tabela 3- Parâmetros cinéticos de crescimento para <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar submetida a diferentes temperaturas .....	35
Tabela 4 - Produtividade máxima de biomassa, tempo de batelada ótimo experimental e teórico no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar submetida a diferentes temperaturas .....	36
Tabela 5 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 25°C.....	38
Tabela 6 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 35°C.....	39
Tabela 7- Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 45°C.....	40
Tabela 8 - Produtividade máxima de biomassa, tempo de batelada ótimo experimental e teórico no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar e meio BG11 com resfriamento progressivo .....	45
Tabela 9- Produtividades em biomassa nas diferentes temperaturas.....	46
Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de crescimento, remoção de carbono e nitrogênio e teor de lipídios na biomassa final .....	52
Tabela 11 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> no meio BG11 com resfriamento progressivo .....	53
Tabela 12- Perfil dos ácidos graxos de <i>P. autumnale</i> cultivada em vinhaça .....	54
Tabela 13 - Propriedades estimadas do biodiesel obtido da fração lipídica da biomassa de <i>P. autumnale</i> .....	56
Tabela 14 - Balanço de massa da proposta de aproveitamento da vinhaça a partir do cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> .....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Etapas da obtenção de biomassa microalgal e bioprodutos .....	6
Figura 2- Metabolismo de carbono em cianobactérias para períodos de escuro (reações indicadas pelas setas escuras) e no escuro .....	7
Figura 3 -Microscopia da cianobactéria <i>Phormidium autumnale</i> em meio de cultivo padrão com aumento de 100 (a) e 40 (b) vezes.....	9
Figura 4- Reação global de transesterificação dos triglicerídeos resultando no biodiesel .....	15
Figura 5- Perfil da velocidade específica de crescimento máxima de microalgas em diferentes temperaturas.....	20
Figura 6- Imagens da manutenção de microalgas com destaque para o inóculo de <i>Phormidium autumnale</i> em meio BG11 a 25°C e fotoperíodo de 12 horas .....	22
Figura 7 - Curva de crescimento de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25°C .....	30
Figura 8 - Perfil de produtividade em biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25°C .....	31
Figura 9 - Curva de crescimento de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 35°C .....	32
Figura 10 - Perfil de produtividade de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 35°C .....	33
Figura 11 - Curva de crescimento de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 45°C .....	33
Figura 12- Perfil de produtividade de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 45°C .....	34
Figura 13 - Tempos de batelada calculados para o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25, 35 e 45°C .....	35

Figura 14 - Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 25°C.....	37
Figura 15 - Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 35°C.....	38
Figura 16 - Perfis de Carbono (□) e Nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar a 45°C.....	39
Figura 17 - Curva de resfriamento da vinhaça utilizada como meio de cultivo nos experimentos.....	41
Figura 18 - Perfil da biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar com resfriamento progressivo.....	42
Figura 19 - Perfil da produtividade em biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça de cana-de-açúcar com resfriamento progressivo .....	43
Figura 20 - Perfil da biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em meio BG11 com resfriamento progressivo .....	44
Figura 21 - Perfil da produtividade em biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em meio BG11 com resfriamento progressivo. ....	44
Figura 22 - Perfil da biomassa de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça com destaque para a variação de temperatura .....	46
Figura 23 - Perfil do pH da vinhaça durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo .....	47
Figura 24 - Perfil de remoção de carbono orgânico total da vinhaça no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo.....	48
Figura 25 - Perfil e taxas de consumo de carbono orgânico total da vinhaça no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo.....	48
Figura 26 - Perfil de remoção de nitrogênio total da vinhaça no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo.....	49
Figura 27 - Perfil e taxas de consumo de nitrogênio total da vinhaça no cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo.....	50

Figura 28 - Perfil da razão C/N da vinhaça durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo. ....	51
Figura 29- Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) no meio BG11 durante o cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> com resfriamento progressivo.....	53
Figura 30 - Proposta de biorrefinaria microalgal integrada ao processamento de cana-de-açúcar no Brasil (Cultivo de <i>Phormidium autumnale</i> em vinhaça com resfriamento progressivo).....	58

# EFEITO DA TEMPERATURA NO CULTIVO E PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS MICROALGAIS POR *Phormidium autumnale* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

**Autor: ALINE SOTTA RÉCO**

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

## RESUMO

Os óleos microbianos, conhecidos como "lipídios unicelulares", vêm se tornando uma opção mais ambientalmente correta para produção de biodiesel, uma vez que apresentam vantagens tecnológicas quando comparados aos óleos vegetais. A obtenção de biodiesel com propriedades adequadas a partir de microalgas poderia ser viabilizada a partir da utilização de fontes de carbono orgânico de baixo custo, preferencialmente vinculando o aproveitamento de subprodutos agroindustriais, nos moldes de uma biorrefinaria. A vinhaça é a principal água residuária do setor sucroenergético, gerada pela destilação da solução alcoólica obtida pela fermentação. Nos atuais métodos utilizados para produção de álcool, para cada litro de etanol produzido são gerados aproximadamente 10 litros de vinhaça. Como trata-se de um subproduto com elevado impacto poluidor e gerado em elevada temperatura, o seu resfriamento é fundamental para qualquer aproveitamento, embora acelere reações de degradação por meio de microrganismos promissores na degradação das moléculas deste poluente, pela sua capacidade degradadora de substâncias recalcitrantes presentes no resíduo, em virtude da produção de enzimas que promovem alto potencial redox dos compostos orgânicos. Neste contexto, a presente proposta pretende avaliar o efeito da temperatura no crescimento e produção de lipídios por *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar, com avaliação do perfil de ácidos graxos no óleo microalgal. A maior produtividade em biomassa (90 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) foi obtida para o período inicial do cultivo em vinhaça com resfriamento progressivo, com remoções em torno de 30 a 40% de carbono e nitrogênio do meio em torno de 72 horas. O óleo obtido na biomassa gerada apresentou 59% de ácidos graxos saturados, 4% de mono-insaturados e 29% de poli-insaturados (PUFAs), sendo que grande parte das propriedades do biodiesel ficou dentro dos padrões internacionais. Os resultados sugerem um potencial de obtenção de lipídios

microalgais por *Phormidium autumnale* cultivada em vinhaça de cana-de-açúcar em um sistema de biorrefinaria.

**Palavras-chave:** microalgas, biodiesel, vinhaça, biorrefinaria

# EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CULTIVATION AND PRODUCTION OF MICROALGAL OILS BY *Phormidium autumnale* IN SUGARCANE VINASSE

**Author: ALINE SOTTA RÉCO**

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

## ABSTRACT

Microbial oils, known as "unicellular lipids", are becoming a more environmentally friendly option for biodiesel production, since they have technological advantages when compared to vegetable oils. Obtaining biodiesel with adequate properties from microalgae could be made possible through the use of low-cost organic carbon sources, preferably linking the use of agro-industrial by-products, along the lines of a "biorefinery". Vinasse is the main wastewater from sugarcane processing, generated by the distillation of the solution balanced by fermentation. In the current methods used for alcohol production, for each liter of ethanol produced, approximately 10 liters of vinasse are generated. As it is a byproduct with a high polluting impact and generated at high temperature, its cooling is essential for any use, although it accelerates degradation reactions, degradation through promising microorganisms in the degradation of the molecules of this pollutant, due to their ability to degrade recalcitrant substances present in the residue, due to the production of enzymes that promote high redox potential of organic compound. In this context, the present proposal intends to evaluate the effect of temperature on growth and lipid production by *Phormidium autumnale* in sugarcane vinasse, with evaluation of the fatty acid profile in microalgal oil. The highest biomass productivity ( $90 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) was maintained for the initial period of cultivation in vinasse with progressive cooling, with removals of around 30 to 40% of carbon and evolved from the medium around 72 hours. The oil obtained from the biomass generated showed 59% extraction of saturated fats, 4% of monounsaturated fats and 29% of polyunsaturated fats (PUFAs), and most of the properties of biodiesel were within international standards. The results suggested a potential for obtaining microalgal lipid by *Phormidium autumnale* grown in sugarcane vinasse in a biorefinery system.

**Key words:** micoalgae, biodiesel, vinasse, biorefinery

## 1 INTRODUÇÃO

A diversificação das matrizes energéticas é de vital importância para a desaceleração dos efeitos ambientais relacionados com o excessivo uso de combustíveis fósseis. Neste contexto, a demanda por biocombustíveis aumenta a cada ano, com destaque para o etanol e biodiesel. Enquanto o primeiro é obtido no Brasil majoritariamente a partir da cana-de-açúcar, o biodiesel pode ser definido como ésteres alquílicos combustíveis de ácidos carboxílicos de cadeia longa obtidos pela transesterificação de óleos vegetais, animais e microbianos. Os óleos microbianos, conhecidos como “lipídios unicelulares”, vem sendo objeto de diversas pesquisas por representarem uma opção mais ambientalmente correta, mais produtiva e com menos efeitos sazonais ou de clima, passíveis da utilização de diversas fontes de carbono, além da maior facilidade no escalonamento. Estes óleos apresentam usualmente um perfil semelhante aos óleos vegetais, com destaque para composição em ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oléico (C18:1) (RIZWAN et al., 2018).

Em termos de produção de lipídios microbianos, as microalgas se destacam em termos de produtividade, com potencial de 40 mil quilogramas de óleo por hectare por ano. Porém, um dos problemas tecnológicos que precisariam ser contornados diz respeito a separação da biomassa ao final dos cultivos, operação que normalmente envolve elevados gastos energéticos. Tais limitações podem ser minimizadas quando são atingidas concentrações celulares superiores a 1,5 gramas por litro, o que apenas ocorre quando os cultivos são conduzidos em sistemas heterotróficos, ou seja, com o fornecimento de fontes exógenas de carbono orgânico. Como muitas linhagens de microalgas são passíveis de crescimento desta forma e, em muitos casos, a partir de águas residuárias ou subprodutos, esta alternativa tecnológica apresenta um grande potencial e, na geração de bioprodutos, são plataformas conhecidas como: biorrefinarias microalgais (RIZWAN et al., 2018).

O conceito de biorrefinaria considera bioprocessos que integrem 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 sinergicamente conversões químicas e biológicas orientadas à recuperação e purificação de biomassa (RIZWAN et al., 2018).

De acordo com Brasil et al (2017), 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).

Espécies da cianobactéria *Phormidium* são reconhecidamente robustas e tolerantes a variações de nutrientes e temperatura, requisitos fundamentais no escalonamento para produção de biomassa microalgal. Além disso, sua morfologia filamentosa facilita as etapas de recuperação da biomassa, conhecidas como operações unitárias de “downstream” (RIZWAN et al., 2018).

Apesar do processamento da cana-de-açúcar minimizar as emissões de gases de efeito estufa pela redução no consumo de combustíveis fósseis, é importante considerar que as operações de lavoura e colheita dependem de um elevado consumo de diesel, entre 200 a 300 litros por hectare por ano (RECK; et al, 2016). Sendo assim, a possibilidade de obtenção de biodiesel na mesma plataforma industrial de geração de etanol e açúcar elevaria ainda mais a sustentabilidade do setor sucroenergético (RECK; et al, 2016). Em termos ambientais, a vinhaça é a principal água residuária, deste setor, gerada pela destilação da solução alcoólica obtida pela fermentação na razão de aproximadamente 10 litros por litro de etanol produzido (RECK; et al, 2016). Apesar do potencial da vinhaça devido a sua composição em matéria orgânica de elevada massa molar e nutrientes, são poucos os estudos que abordam a utilização

desta água residuária como substrato para o cultivo de micro-organismos (RECK; *et al*, 2016). Por ser a água residuária presente no fundo da coluna de destilação, a vinhaça é gerada com elevada temperatura, em torno de 105°C, sendo obrigatório o seu resfriamento tanto para o seu aproveitamento na fertirrigação como em meios de cultivos microbianos (RECK; *et al*, 2016).

O presente trabalho apresenta um caráter acadêmico inovador, considerando que são escassos os relatos na literatura comparando os teores de lipídios e perfil de ácidos graxos por *Phormidium* a partir de águas residuárias. Além disso, o caráter regional da proposta pode ser destacado considerando o uso de vinhaça, a principal água residuária do setor sucroenergético amplamente presente no interior de São Paulo. Desta forma, a separação e aproveitamento posterior desta microalga filamentosa gerada a partir de um subproduto na obtenção de um biodiesel que poderia ser utilizado no próprio ambiente de processamento da cana-de-açúcar poderia viabilizar tecnicamente a proposta seguindo o modelo de biorrefinaria.

Neste contexto, a presente pesquisa buscou avaliar o efeito da temperatura no crescimento e produção de lipídios pela cianobactéria *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar, visando o aproveitamento desta água residuária e obtenção de biodiesel microalgal.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo geral

O objetivo desta dissertação é avaliar o efeito da temperatura no crescimento e produção de lipídios pela cianobactéria *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar e meio padrão BG11, visando o aproveitamento desta água residuária e obtenção de biodiesel microalgal.

### Objetivos específicos

- Coletar e caracterizar amostras de vinhaça coletada diretamente de uma unidade industrial de processamento de cana-de-açúcar;
- Manter e propagar inóculo de *Phormidium autumnale* em meio padrão;
- Montar um sistema de cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale* em diferentes condições de temperatura e resfriamento da vinhaça e em meio padrão;
- Avaliar a remoção de carbono e nitrogênio da vinhaça por *Phormidium autumnale* nas diferentes condições de cultivo;
- Separar a biomassa gerada e caracterizar em termos de proteínas e lipídios;
- Determinar o perfil dos ácidos graxos obtidos e estimar as propriedades do biodiesel gerado;
- O mesmo roteiro foi seguido para o experimento usando meio padrão BG11 adicionado de glicose como meio de cultivo.
- Avaliar a proposta em termos de biorrefinaria microalgal, estimando o rendimento de vinhaça e microalgas em biodiesel.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Microalgas

O setor agroindustrial tende a gerar grandes volumes de águas residuárias inerentes ao processamento das matérias-primas, devido às inúmeras atividades que necessitam de água durante as etapas de produção. A resolução nº 357 presente na Norma Brasileira estabelece certos padrões que invalidam o descarte impróprio destas águas residuárias no meio ambiente (RECK; *et al*, 2016). Diante do cenário mundial, se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias de tratamento que integrem o reuso e a valoração de efluentes, de modo que esses tratamentos sejam eficientes e de baixo custo de produção.

Nesse sentido, o conceito de biorrefinaria emprega métodos de reuso de efluentes e/ou resíduos na cadeia produtiva, minimizando o desperdício dos mesmos através de sua valoração como matéria prima (RECK; *et al*, 2016). Segundo Visentin (2020), entende-se como biorrefinaria um bioprocesso capaz de integrar equipamentos e tecnologias de baixo impacto ambiental visando a conversão de biomassa para a geração de energia, combustíveis e até mesmo químicos renováveis. Uma das vertentes da biorrefinaria é a chamada “biorrefinaria microalgal”, através do aproveitamento de efluentes no cultivo de microalgas e/ou cianobactérias na obtenção de biomassa rica em produtos intracelulares. A Figura 1 ilustra as etapas envolvidas na obtenção de biomassa microalgal e bioprodutos.

As microalgas são organismos fotossintetizantes o que permite a síntese de ácidos graxos (lipídios) no meio intracelular através de fontes de carbono, são eucarióticas, como algas clorofíceas (*Chlorophyta*), ou organismos procariotos, como cianobactérias (*Cyanophyceae*) (MATA *et al.*, 2010; BARBOSA, 2019). Segundo Reck e colaboradores (2016), as cianobactérias são facilmente encontradas na natureza, fotossintetizantes em sua maioria e capazes de obter energia na ausência de luminosidade.

As cianobactérias têm sido utilizadas na remoção de nitrogênio e fósforo de águas residuárias agroindustriais. Algumas linhagens destes micro-organismos, são passíveis de desenvolverem-se no escuro a partir do consumo de moléculas orgânicas simples, conhecido como cultivo heterotrófico, com o intuito de remover ou

reduzir os níveis de matéria orgânica e nutrientes de efluentes provenientes da agroindústria, No entanto, são raros os trabalhos na literatura que abordam a estimativa ou determinação de parâmetros de engenharia, tais como consumo de oxigênio ou transferência de massa gás-líquido, úteis no caso da aplicação destes micro-organismos.

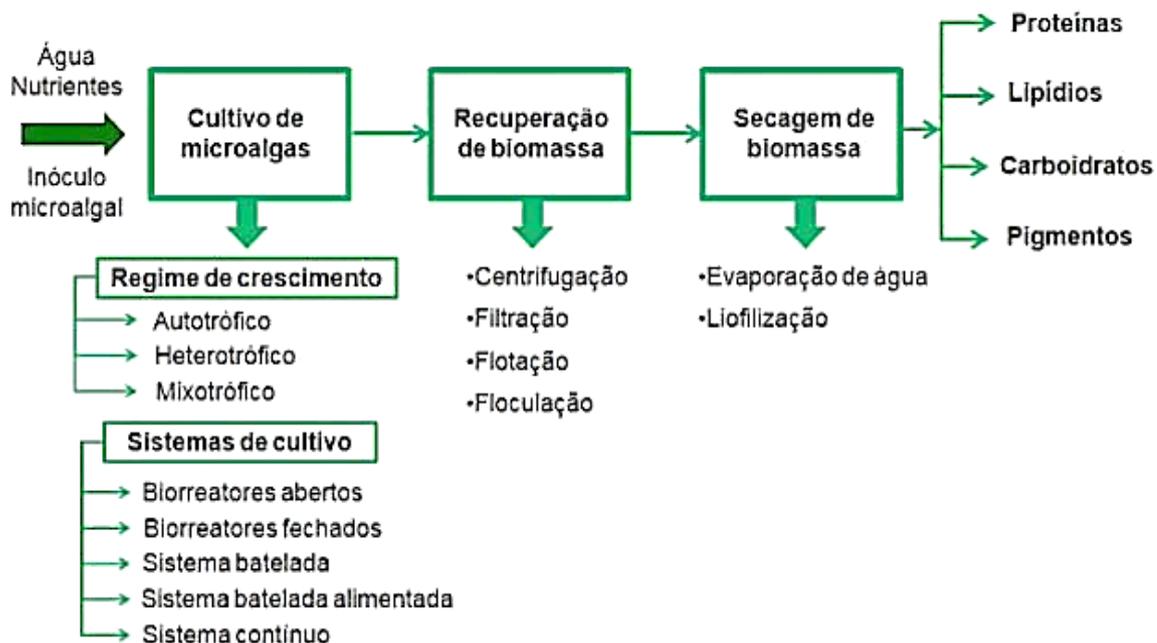


Figura 1- Etapas da obtenção de biomassa microalgal e bioprodutos (Adaptado de Klein et al., 2018)

### 3.2 Metabolismo heterotrófico

O estudo das microalgas para o tratamento de efluentes tem se tornado uma opção alternativa e econômica, pois além do tratamento de águas residuárias, também há possibilidade de se acumular lipídios no meio intracelular, o qual pode ser utilizado para produção de biocombustíveis (BARBOSA, 2019).

Apesar das cianobactérias apresentarem a fotossíntese como modelo metabólico preferencial, muitas linhagens usufruem do metabolismo heterotrófico no escuro, consumindo moléculas orgânicas solúveis através de fontes externas, tais como açúcares, ácidos orgânicos e acetato, conforme esquematizado na Figura 2

(FAY, 1983; DUMAS et al., 1998; QUEIROZ et al., 2002; BASTOS et al., 2004; JACOB-LOPES et al., 2006). Estas propriedades sugerem possíveis aplicações destes micro-organismos na remoção de matéria orgânica e nitrogênio de águas residuárias agroindustriais, o que vem ocorrendo com o gênero *Aphanothece* no sul do Brasil (QUEIROZ et al., 2007; MANETTI, 2008).

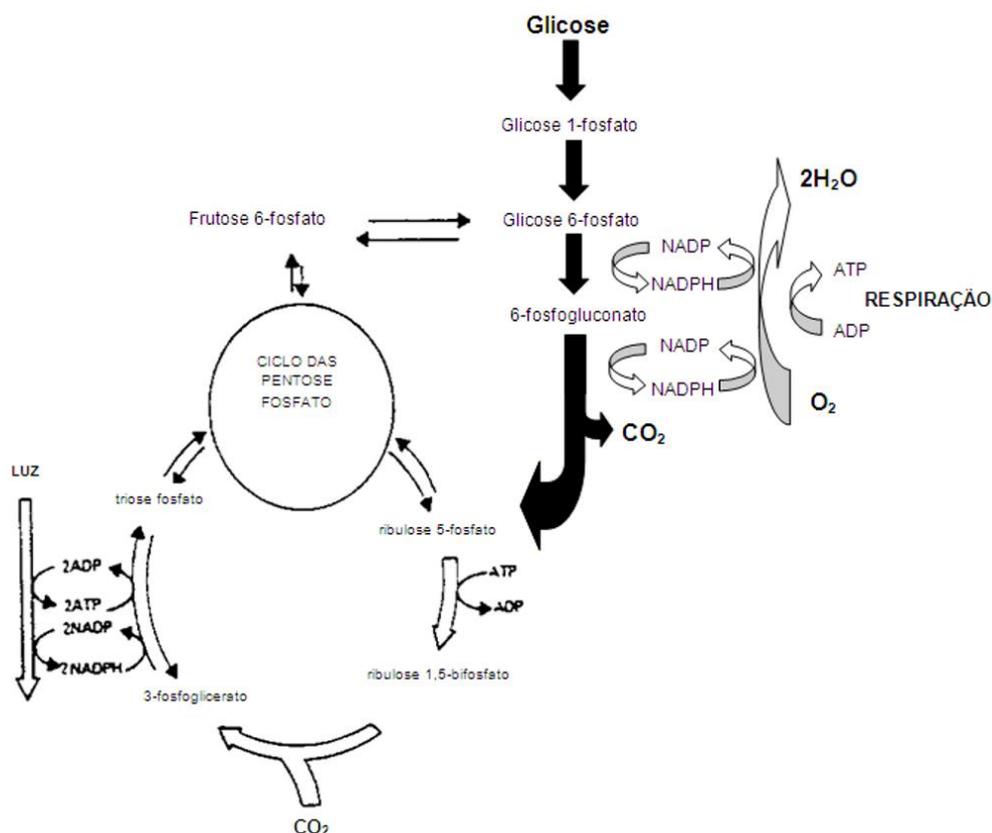


Figura 2- Metabolismo de carbono em cianobactérias para períodos de escuro (reações indicadas pelas setas escuras) e no escuro (Adaptado de FAY, 1983)

A maioria dos estudos citam que a função da respiração nas cianobactérias é somente a geração da quantidade mínima de energia necessária para o seu sustento no escuro (FAY, 1983; SCHMETTERER, 1994; ANAND, 1998). No entanto, esta habilidade de assimilar moléculas orgânicas poderia ser estudada e desenvolvida para remoção de nutrientes e despoluição de águas residuárias agroindustriais.

### 3.3 Tratamento de águas residuárias por microalgas

O uso de cianobactérias e microalgas na remoção de matéria orgânica e nutrientes inorgânicos de águas residuárias industriais vêm sendo estudado devido aos baixos custos envolvidos, eficiência, valorização dos resíduos e obtenção de uma biomassa gerada no processo de tratamento do efluente, a qual pode ser utilizada para a obtenção de subprodutos de interesse econômico, como por exemplo na fertilização dos solos, na forma de proteínas unicelulares ou na obtenção de biocombustíveis (TAM e WONG, 2000; VASCONCELOS e PEREIRA, 2001; BASTOS *et al*, 2004; RICHMOND, 2004, QUEIROZ *et al*, 2007; BASTOS *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2012, BASTOS *et al*, 2015, BARBOSA, 2019; JESUS *et al.*, 2019).

Dentre as espécies que estão ganhando notoriedade em pesquisas, está a cianobactéria *Phormidium* sp., filamentosa não ramificada e com uma coloração azulada ou esverdeada, que é reconhecida como uma espécie robusta encontrada normalmente em ambientes extremos em razão da sua tolerância a certas condições, como elevadas concentrações de nutrientes, altas temperaturas, além da capacidade de cultivá-la em efluentes (VIEIRA, 2016). Conforme pode ser visualizado na Figura 3, a cianobactéria *P. autumnale* possui filamentos com diâmetros de 3 a 6  $\mu\text{m}$ , e pode ser uma alternativa para processos de biorremediação e para produção de óleos, devido ao seu teor lipídios entre 7 a 15%, além de apresentar uma produtividade significativa de biomassa (VISENTIN, 2020).

De acordo com Francisco *et al.*, 2015, a cianobactéria *Phormidium* sp apresentou a partir de manipueira (água residuária do processamento de mandioca) produtividade lipídica de  $43.8 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ , de composição predominantemente saturada (50,72%) e monoinsaturada (69,27%), o que seria adequado para a obtenção de biodiesel (99,98% de cetano, 57,28% de número de cetano, 45,22% de índice de iodo, grau de instauração de 49,72% e ponto de fulgor de  $61,43^{\circ}\text{C}$ ).

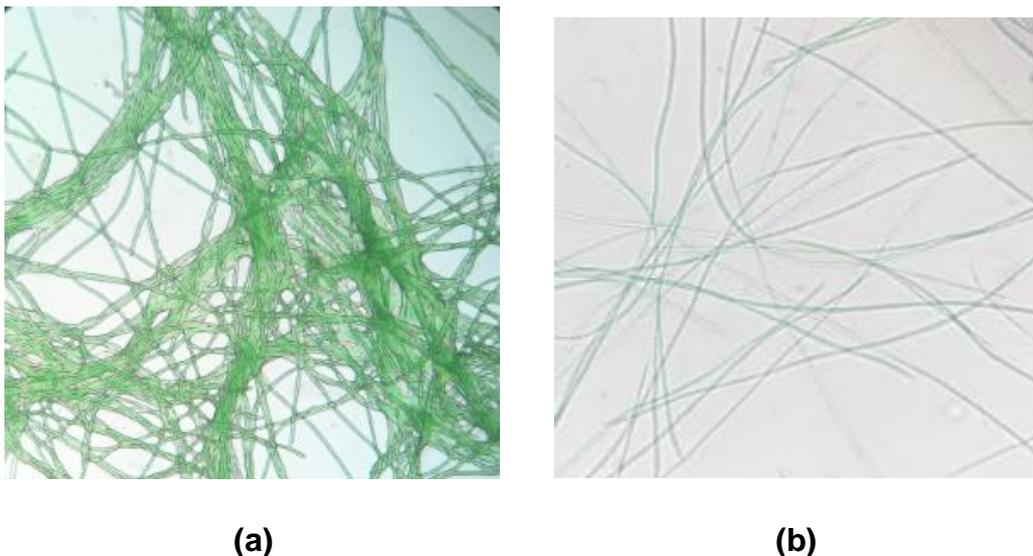


Figura 3 -Microscopia da cianobactéria *Phormidium autumnale* em meio de cultivo padrão (Acervo do LABMAC/UFSCar) com aumento de 100 (a) e 40 (b) vezes

As microalgas têm sido frequentemente reportadas como micro-organismos potenciais para remoção de íons metálicos e metais pesados de águas residuárias (TAM *et al.*, 2001; HARUN *et al.*, 2010). Estes sistemas são eficientes especialmente a baixas concentrações de metais, apresentam baixo custo e são ambientalmente corretos. O mecanismo de remoção de íons metálicos de soluções aquosas por microalgas baseia-se na bioadsorção, a qual ocorre em dois estágios: adsorção rápida e passiva na superfície seguida de um lento consumo metabólico dos íons no interior das células. A grande vantagem do estudo de células viáveis para remoção de íons metálicos é justamente o contínuo consumo metabólico após a adsorção física. Tam *et al.* (2001) estudaram a remoção de níquel a partir de duas espécies de *Chlorella* em dez sucessivos ciclos, com 70% de remoção ao final do décimo ciclo. O conteúdo total de níquel acumulado correspondeu a mais que 0,9% da massa seca das células e a formação de clorofila “a” foi inibida pela contínua adsorção dos metais.

### 3.4 Vinhaça de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, com um volume em torno de 30 bilhões de litros ao ano, na safra 2022/23 a fabricação do biocombustível totalizou 28,91 bilhões de litros (UNICA, 2023). Na produção do etanol

podem ser utilizados mostos de melaço, caldo ou misto. O mosto é submetido à fermentação etanólica, principalmente por leveduras do gênero *Saccharomyces*, obtendo-se o vinho. Após separação das leveduras, o vinho é submetido ao processo de destilação para obtenção do etanol. Durante o processo de destilação, a corrente de fundo da coluna recebe o nome de vinhaça. A vinhaça possui pH na faixa de 3,5 a 5, tem uma coloração escura, um odor forte e rica em matéria orgânica, a qual a demanda química de oxigênio é de 50 a 150g L<sup>-1</sup> (MORAES, 2018.)

Com o avanço das indústrias sucroalcooleiras, haverá também um aumento na produção dos resíduos, como a vinhaça, sendo a água residuária principal do processo de produção de etanol. Em razão da sua composição, a vinhaça é o resíduo que mais impacta negativamente o meio ambiente, possibilitando a salinização do solo, afetando a fertilidade, pode contaminar os cursos de água subterrânea, auxilia na emissão de gases do efeito estufa e aumento na concentração de potássio (VISENTIN, 2020).

Tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo, a vinhaça representa a principal água residuária do setor sucroenergético, uma vez que é produzida na proporção de 10 a 18 L de vinhaça por litro de etanol produzido, dependendo das condições tecnológicas da destilaria, pelos processos convencionais de fermentação utilizados no Brasil (NOVACANA, s.d.). Em 2015, o Brasil entrou para COP21 com o objetivo de reduzir as emissões de gases de efeito estufa até 2030, Portanto estima-se que a produção de etanol irá aumentar para 45 bilhões de litros produzidos, com consequente aumento da produção da vinhaça.

A composição química da vinhaça é bastante variável, dependendo da natureza e composição da matéria-prima, do sistema usado no preparo do mosto, do sistema de condução da fermentação e da composição do vinho. Entretanto, conforme apresentado na Tabela 1, a vinhaça apresenta elevados teores de matéria orgânica e de potássio, seguido do cálcio, sulfatos, nitrogênio, fósforo e magnésio (FREIRE; CORTEZ, 2000; CAZETTA e CELLIGOI, 2005; SAAVEDRA, 2019).

Em virtude dos elevados teores de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, teores elevados de compostos nitrogenados e em fosfato, altos índices de DBO e DQO, além da elevada temperatura com que sai dos destiladores, a vinhaça caracteriza-se pelo seu alto poder poluente (FREIRE; CORTEZ, 2000).

Após proibição do despejo de vinhaça diretamente nos cursos d'água (Decreto Lei 303/1967), este efluente passou a ser aplicado nas chamadas “áreas de sacrifício”, locais próximos às destilarias que se tornavam praticamente inutilizáveis para a agricultura, principalmente pelo efeito de salinidade do solo. Com o surgimento do PROÁLCOOL e a consequente expansão da indústria sucroalcooleira no país, com aumento significativo da produção de etanol e vinhaça, surgiu a necessidade de se dar um destino adequado ao efluente, que encontrou seu lugar como fonte de nutrientes para a própria cultura da cana-de-açúcar através da fertirrigação, processo de aplicação da vinhaça no solo (FREIRE; CORTEZ, 2000).

A aplicação de vinhaça no solo fornece uma série de benefícios de natureza química, física e biológica, como aumento da disponibilidade de alguns elementos, aumento da CTC (capacidade de troca catiônica), pH e teor de matéria orgânica no solo, com consequente melhoria no seu estado de agregação e aumento da capacidade de infiltração de água (FREIRE; CORTEZ, 2000).

Apesar dos efeitos benéficos, é necessário que se tenha prévio conhecimento do volume adequado de vinhaça a ser aplicada no solo, já que seu excesso pode acarretar efeitos nocivos e queda na produtividade da cultura. Em 2014, a CETESB pela normativa P4.231/2005 (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) regulamenta o uso da vinhaça de cana-de-açúcar nos solos agrícolas, considerando o relevo destes solos, quais são as necessidades e deficiência da cultura e a composição química do solo a fim de evitar a contaminação dos cursos de água, liberação de odores, proliferação de vetores e também a anaerobiose radicular. (MORAES, 2018; SAAVEDRA, 2019). Atualmente, a disposição de vinhaça no solo é regulada pelo seu teor de potássio, uma vez que altas concentrações deste íon contribuem para a saturação do solo (CETESB, 2015).

*Tabela 1 - Parâmetros físicos e químicos da vinhaça de cana-de-açúcar (Adaptado de Bastos et al, 2022)*

<b>Parâmetro</b>	<b>Faixa</b>
Carbono orgânico total (TOC), g L <sup>-1</sup>	5,8 – 14,1
Demanda química de oxigênio (DQO), g L <sup>-1</sup>	22,9 – 35,8
Demanda biológica de oxigênio (DBO), g L <sup>-1</sup>	14,4 – 21,9
Nitrogênio total (TN), mg L <sup>-1</sup>	500 – 1500
Razão carbono:nitrogênio	3,87 – 28,2
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), mg L <sup>-1</sup>	630 – 1405
Nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ), mg L <sup>-1</sup>	85 - 165
Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), mg L <sup>-1</sup>	45 – 75
Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), mg L <sup>-1</sup>	1,6 – 4,2
Fósforo total (TP), mg L <sup>-1</sup>	2,66 – 155
Potássio (K), mg L <sup>-1</sup>	1330 - 4010
Sódio (Na), mg L <sup>-1</sup>	10 – 65
Cálcio (Ca), mg L <sup>-1</sup>	460 – 2240
Magnésio (Mg), mg L <sup>-1</sup>	145 – 235
Sulfato (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ), mg L <sup>-1</sup>	2060 – 7000
Alumínio (Al) mg L <sup>-1</sup>	2,5 – 11,8
Ferro (Fe) mg L <sup>-1</sup>	8,8 – 15,3
Sólidos suspensos (SS), g L <sup>-1</sup>	2,4 – 3,4
Sólidos dissolvidos (DS), g L <sup>-1</sup>	4,3 – 5,6
Condutividade elétrica (EC), mS cm <sup>-1</sup>	6,7 – 8,7
pH	4,3 – 4,6
Turbidez, NTU	1314 - 9550

Mesmo considerando o seu potencial como meio nutritivo, há poucos estudos na literatura acerca da utilização de vinhaça como substrato para o cultivo de micro-organismos, principalmente com o objetivo de despoluição desta água residuária. Navarro et al. (2000) utilizaram vinhaça concentrada como complemento do meio de cultivo para fermentação etanólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Cazetta e Celligoi (2005 e 2009) utilizaram melaço e vinhaça para o cultivo de leveduras e bactérias visando à produção de proteínas e lipídios pelos micro-organismos, com resultados promissores.

Com relação a microalgas, Oliveira e Cáceres (1986), em trabalho pioneiro na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), utilizaram vinhaça diluída para o cultivo de oito espécies de algas de água doce. Durante 30 dias, os autores compararam o crescimento das microalgas cultivadas em solução de vinhaça com as cultivadas em meio sintético e observaram que, das oito espécies estudadas, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus* foram capazes de desenvolver-se melhor em solução de vinhaça do que no meio sintético, atingindo uma maior concentração celular. Para as outras espécies, o crescimento em solução de vinhaça e em meio sintético foi semelhante ou levemente inferior. Dando sequência a este trabalho, um dos autores, em sua dissertação de mestrado, aprofundou os estudos com *Chlorella vulgaris*, avaliando parâmetros de adequação da vinhaça para o crescimento heterotrófico e mixotrófico desta microalga. Nas condições ideais (1 g L<sup>-1</sup> de vinhaça, 800 µM de uréia, 10<sup>5</sup> células por mL e pH 7) o autor verificou crescimento mixotrófico equivalente ao cultivo fotossintético, além do acúmulo de carboidratos pelas células em condições heterotróficas (OLIVEIRA, 1988). Ainda segundo este trabalho, o cultivo de microalgas especialmente em resíduos líquidos ricos em nutrientes constitui uma possibilidade promissora de obtenção de uma fonte considerável de compostos e elementos essenciais à nutrição humana, ao mesmo tempo em que possibilita uma forma de combate à poluição dos recursos hídricos.

Segundo Visentin (2020), Reis e Hu (2017) o cultivo de microalgas não é afetado pela turbidez elevada da vinhaça devido o metabolismo heterotrófico destes micro-organismos favorecem o crescimento de biomassa na ausência de luz. Sendo assim, a utilização de microalgas tem sido atrativa, pois a mesma pode ter um aumento da produção de biomassa através do consumo de nutrientes da vinhaça,

diminuindo seu custo de produção bem como a redução do potencial poluente (VISENTIN, 2020).

Embora sejam organismos naturalmente fotossintetizantes, algumas linhagens de microalgas são capazes de se desenvolver na ausência de luz a partir do consumo de moléculas orgânicas simples, tais como açúcares, acetato e ácidos orgânicos (FAY, 1983; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Nestes tipos de cultivo, denominados mixotróficos ou heterotróficos, dependendo da disponibilidade de luz, substitui-se a fixação do CO<sub>2</sub> atmosférico que ocorre nas culturas autotróficas por uma fonte de carbono orgânico dissolvida no meio de cultura (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Nesse sentido, o cultivo heterotrófico de microalgas tem sido proposto como uma alternativa para a obtenção de elevadas concentrações de biomassa, uma vez que elimina deficiências dos sistemas de cultivo convencionais fotoautotróficos, reduzindo os custos de produção da biomassa e possibilitando a utilização de qualquer reator de mistura para o cultivo (CHEN, 2006; O`GRADY E MORGAN, 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Entretanto, o crescimento heterotrófico está limitado somente a algumas espécies de microalgas e, apesar da redução dos gastos energéticos, há o custo de adição do substrato orgânico, essencial para manutenção do metabolismo microalgal nessas condições (CHEN, 2006; CERÓN-GARCIA et al., 2000; O`GRADY e MORGAN, 2011; PEREZ GARCIA et al., 2011).

Glicose, acetato e glicerol são as fontes de carbono mais frequentemente utilizadas em sistemas de cultivo mixotróficos e heterotróficos, havendo também a possibilidade de se utilizar águas residuárias (JACOB-LOPES et al., 2006; de-BASHAN e BASHAN, 2010; BASTOS et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Por tratar-se de um substrato abundante e de baixo custo, oriundo do processo de produção de biodiesel, o glicerol tem sido proposto como alternativa interessante para o cultivo heterotrófico de microalgas (O`GRADY e MORGAN, 2011). Por outro lado, elevadas concentrações da fonte de carbono podem inibir o crescimento heterotrófico microalgal (CHEN, 2006; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Apesar da diversidade de possíveis fontes de carbono, a literatura ainda é pouco conclusiva no que diz respeito a faixa de concentração ideal que permita desenvolvimento satisfatório das microalgas heterotróficas, assim como a relação entre carbono e nitrogênio.

### 3.5 Biodiesel microalgal

A ASTM (Sociedade Americana para Teste de Materiais) define biodiesel como um combustível líquido sintético, originário de matéria-prima renovável e constituído pela mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeias longas, derivados de óleos, principalmente de origem vegetal e animal (KNOTHE, 2013). O biodiesel é resultado da transesterificação dos triglicerídeos com álcoois de cadeia curta resultando em monoálquil ésteres de ácido graxos de cadeia longa, cuja rota metílica e mais comum pode ser ilustrada na Figura 4.

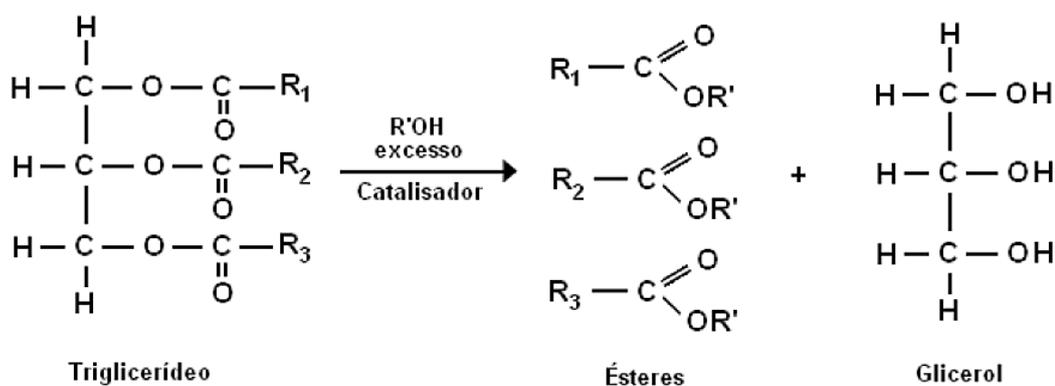


Figura 4- Reação global de transesterificação dos triglicerídeos resultando no biodiesel (Adaptado de Girardi, 2019)

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 3<sup>a</sup> 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).

Dentre as diversas 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 et al., 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 que favorecem seu crescimento, 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) 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 de 43,8 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, com composição predominantemente em saturados e monoinsaturados, 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 lipídios 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 cetanos, 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 de o 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 dos graus de oxidação e reatividade do ar, dependendo principalmente do número de posições bis-alílicas (BAPE) nos compostos insaturados. A oxidação se inicia pela formação de radicais nas posições bis-alílicas 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 et al. (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 o 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.

A temperatura influencia significativamente a composição de ácidos graxos de certas espécies de microalgas, sendo que o seu efeito no crescimento pode ser ilustrado na Figura 5 (Nalley et al., 2018). De acordo com esses autores, as cianobactérias apresentam um alto teor relativo de ácido palmítico, muitas vezes superior a 50%, aumentando consideravelmente em temperaturas mais elevadas. Além disso, são encontrados níveis relativamente altos de ácido esteárico, decaindo com o aumento da temperatura.

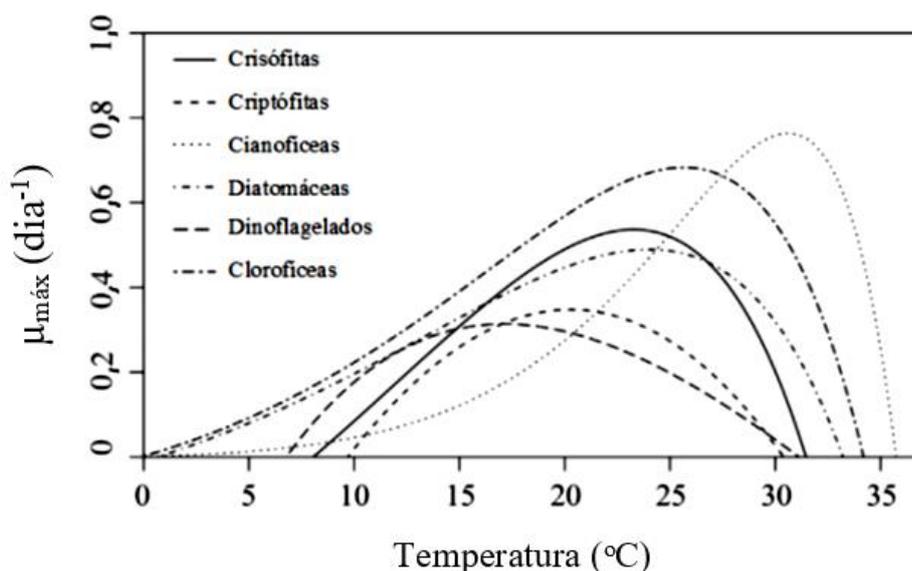


Figura 5- Perfil da velocidade específica de crescimento máxima de microalgas em diferentes temperaturas (Adaptado de Nalley et al., 2018)

De uma forma geral, os perfis de ácidos graxos das microalgas tendem a variar drasticamente com a temperatura. Essas mudanças induzidas pela temperatura dos cultivos nas concentrações dos diferentes ácidos graxos podem ter efeitos consideráveis nas propriedades do biodiesel obtido. Certas espécies de *Desmodesmus* e *Chlorella* transitaram para perfis indesejáveis de ácidos graxos, como aumento dos poli-insaturados e redução dos monoinsaturados, à medida que a temperatura aumentava (Nalley et al., 2018). Nesse sentido, a dependência da temperatura da composição de ácidos graxos sugere que a seleção de cepas

candidatas com base na produção total de ácidos graxos pode ser equivocada. Por exemplo, *C. vulgaris* e *Anabaena sp.* são microalgas recorrentemente pesquisadas para suas aplicações de biocombustíveis, porém, os seus elevados níveis de altos níveis de ácidos linolênicos limitam este potencial como candidatos na obtenção de biodiesel.

De acordo com El-sheekh et al. (2017), a quantidade e a qualidade dos lipídios intracelulares são resultado de alterações nas condições de crescimento, incluindo intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de CO<sub>2</sub> nos cultivos fotoautotróficos, limitação de nitrogênio ou fosfato, deficiência de silício e suplementação de ferro. A composição da vinhaça apresentada na Tabela 1 sugere limitações em termos de nitrogênio e fósforo, além de uma diversificada quantidade de sais, ou seja, um potencial de estudo que precisa ser explorado como meio de cultivo para microalgas objetivando lipídios unicelulares.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Inóculo

O inóculo da cianobactéria *Phormidium autumnale*, isolada do Deserto Cuatro Cienegas no México (26° 59' N 102° 03W) e gentilmente cedido pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foi mantido e propagado em meio BG11 (Braun-Grunow Medium) (RIPKA et al., 1979) no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em estufa a 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro-escuro (Figura 6).

A concentração celular foi obtida por gravimetria após filtração de um volume conhecido em filtro 0,45 µm (APHA, 2005) e para averiguar se o inóculo estava em condições físicas adequadas, foi avaliado a qualidade em microscópio MOTIC BA 210TL equipado com Câmera de vídeo Moticom de 2 Mega pixels, com auxílio de software MOTIC IMAGE 2.0 Plus e Câmara de Neubauer.



Figura 6- Imagens da manutenção de microalgas com destaque para o inóculo de *Phormidium autumnale* em meio BG11 a 25°C e fotoperíodo de 12 horas

## **4.2 Vinhaça de cana-de-açúcar**

A vinhaça usada nos experimentos foi coletada de uma Usina de Açúcar e Álcool da região de Araras/SP, sendo levadas ao laboratório para caracterização e acondicionadas em congelador. A caracterização da vinhaça foi realizada de acordo com a metodologia proposta por APHA (2012): turbidez por medida direta em turbidímetro; pH por potenciometria; carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (TN) em Analisador TOC - LCPN SIMADZU®, sendo calculada a razão carbono/nitrogênio (C/N); fósforo (P) através de reação colorimétrica e medida em espectrofotômetro; e sólidos suspensos (SS) por gravimetria.

## **4.3 Efeito da temperatura no cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça e BG11**

Os ensaios dos cultivos mantidos em diferentes temperaturas e com resfriamento progressivo foram realizados a partir de vinhaça e em meio padrão BG11 em agitador orbital a 100 rpm com amostragem em intervalos de tempo pré-definidas. Considerando as condições heterotróficas, ou seja, na ausência de luminosidade, os ensaios em meio BG11 foram acrescidos de glicose de forma a manter a mesma razão C/N original da vinhaça (em torno de 16), assim como ajuste do pH inicial para 7,5 nos ensaios com a água residuária (Mattos e Bastos, 2015; Morais e Bastos, 2018, Visentin, 2020).

O efeito da temperatura foi avaliado a 25, 35 e 45°C durante todo o período experimental e com resfriamento gradativo em frascos de 125 mL esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos, cobertos com papel alumínio para evitar incidência luminosa e preenchidos com 25 mL de vinhaça ou meio padrão BG11 modificado com glicose previamente esterilizados com 10% de volume de inóculo.

## **4.4 Cinética de crescimento microalgal e consumo de substratos da vinhaça**

A concentração da biomassa durante os ensaios foi monitorada pela densidade por gravimetria após filtração de volume conhecido da suspensão amostrada durante os cultivos em filtro 0,45 µm e secagem a 130°C por 2 horas

(APHA, 2005). Com estes dados, foram obtidas curvas de crescimento, sendo calculadas velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) a partir da regressão linear da curva semilogarítmica, ou seja, pela integração da Equação 1. A partir disto, o tempo de geração ( $t_g$ ) foi calculado para a fase exponencial de crescimento (Equação 2):

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

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

A produtividade em biomassa ( $P_x$ ) foi calculada através da variação de biomassa no tempo considerado, conforme Equação 3:

$$P_x = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (3)$$

Os teores de carbono orgânico total (TOC) e nitrogênio total (TN) foram determinados em analisador TOC - LCPN SHIMADZU® nas amostras filtradas em filtro 0,45  $\mu\text{m}$  e livre de células. O rendimento de carbono e nitrogênio em biomassa calculados pela relação das taxas de crescimento e consumo de substratos, ou seja, usando a inclinação da curva biomassa vs TOC ou TN (Equações 4 e 5):

$$Y_{X/\text{TOC}} = \frac{dX}{d(\text{TOC})} \quad (4)$$

$$Y_{X/\text{TN}} = \frac{dX}{d(\text{TN})} \quad (5)$$

As taxas de consumo dos substratos ( $r_s$ ) da vinhaça (TOC e TN) foram avaliadas pelas curvas S *versus* tempo conforme Equação 6, sendo “k” a constante cinética e “n” a ordem de reação. Além disso, a eficiência de remoção (E) destes substratos foi calculada pela Equação 7:

$$r_S = -\frac{dS}{dt} = kS^n \quad (6)$$

$$E = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (7)$$

O tempo de batelada ideal ( $t_b$ ) para produção de biomassa pode ser estimado a partir do balanço de massa de células microalgais em biorreator batelada conforme Equação 8, onde  $X$  é a concentração celular,  $V$  volume,  $\mu$  velocidade específica de crescimento e  $k_d$  velocidade de morte celular. Como o volume é constante, a Equação 8 pode ser simplificada até a Equação 9 e, integrando para condições iniciais e finais, podemos calcular a concentração de biomassa a partir de um valor inicial ( $X_0$ ) através da Equação 10:

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV - k_d XV \quad (8)$$

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_{m\acute{a}x} - k_d)X \quad (9)$$

$$X = X_0 e^{(\mu_{m\acute{a}x} - k_d)t} \quad (10)$$

Para condição onde as células se encontram na fase exponencial de crescimento, a morte celular pode ser considerada desprezível ( $\mu \gg k_d$ ), o tempo de batelada ideal pode ser estimado pela Equação 11:

$$t_b = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln\left(\frac{X_f}{X_0}\right) \quad (11)$$

## 4.5 Caracterização da biomassa

O teor de proteínas na biomassa microalgal cultivada em vinhaça foi estimado pelo método espectrofotométrico de Warburg e Christian (1941). A biomassa foi separada ao final dos cultivos por centrifugação (2500 rpm por 15 minutos) e submetida ao método de rompimento mecânico em Disruptor celular Modelo TE-099 com uso de esferas de vidro a 55°C, 1600 rpm por 15 minutos. Após, foi utilizada a Equação 12 para estimativa da concentração de proteínas no lisado celular:

$$\text{Proteínas (mg mL}^{-1}\text{)} = [(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})]DF \quad (12)$$

Onde  $A_{280}$  é a absorbância medida em 280 nm;  $A_{260}$  é a absorbância medida em 260 nm (correção de ácidos nucleicos) e DF é o fator de diluição.

O teor de lipídios na biomassa microalgal foi determinado pelo método de extração proposto por Bligh e Dyer (1959). Aproximadamente 1 g de biomassa seca em estufa a 130°C por 2 horas foi macerada e transferida para um tubo Falcon®, sendo adicionado 10 mL de metanol, 4 mL de água deionizada e, por último, 5 mL de clorofórmio. A amostra permaneceu em contato com a solução extratora "*overnight*", sendo posteriormente centrifugada. O sobrenadante foi coletado e a extração realizada mais duas vezes, seguida de uma mistura de clorofórmio, metanol e água deionizada nas proporções de 1:2:0,8. Os três sobrenadantes agrupados tiveram a adição de água deionizada para promover a separação de fases e obter a fase orgânica depositada ao fundo do tubo. A fase orgânica foi coletada em Placa de Petri previamente tarada para determinação da massa lipídica. A produtividade lipídica foi calculada considerando o teor de lipídios e a produtividade em termos de biomassa (Equação 3).

Após a extração lipídica, o material obtido foi transesterificado de acordo com o procedimento adaptado de Van Wychen et al (2015). Primeiramente foram adicionados 200 µL de clorofórmio em 100 mg das amostras em um tubo de ensaio com rosca. O tubo foi encaminhado para bloco de aquecimento a 80°C por 2 minutos, em seguida adicionados 3 mL do catalisador (ácido sulfúrico 1% m/v) em metanol e aquecidos novamente por 2 minutos. Após, são incorporados 1 mL de hexano e 3 mL

de água deionizada ao tubo até ocorrer a separação da fase orgânica, que logo após foi transferida para um tubo Eppendorf e adicionado 1 mL de água MiliQ para novamente coletar a fase orgânica.

A amostra final foi transferida para um vial para determinação por cromatografia em fase gasosa em GC -FID Shimadzu® GC 2010 Plus. O equipamento apresenta um auto injetor e uma coluna RTX-Wax de 30 m com diâmetro interno de 0,25mm e espessura de filme de 25 µm. Uma alíquota de 1 µL 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 foi 50°C por 1 minuto, 25°C por minuto até 200°C, e por fim 3°C por minuto até 230°C. O padrão Supelco 37 component FAME mix (CRM-47885) foi usado 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 do perfil de ácidos graxos obtidos pela cromatografia em fase gasosa foi utilizado o Software *Biodiesel Analyzer* para estimativa das propriedades do biodiesel produzido (TALEBI et al., 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados desta dissertação, sendo que parte destes já foram apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais, conforme pode ser verificado no Apêndice.

### 5.1 Caracterização da vinhaça

A composição físico-química da vinhaça utilizada nos ensaios é apresentada na Tabela 2. Os valores estão dentro da faixa usualmente encontrada na literatura para vinhaça de diferentes mostos (Freire e Cortez, 2000; Morais e Bastos, 2019). Como trata-se de um efluente, os parâmetros físico-químicos podem variar consideravelmente a depender da qualidade e tipo de cana-de-açúcar, assim como as condições de fermentação e destilação alcoólica. De qualquer forma, os valores estão na faixa normalmente encontrada para vinhaça, sendo que qualquer variabilidade também pode ser decorrente de outros aspectos como época da safra e o processamento de diferentes culturas de cana-de-açúcar (Ferreira et al. 2021).

Independente desta variação esperada na caracterização físico-química, em termos de aproveitamento da vinhaça como meio de cultivo microbiano, um dos aspectos mais importantes é a relação carbono:nitrogênio (C/N), sendo favorável em torno de 20. No caso da amostra de vinhaça usada nos experimentos, o valor está ligeiramente inferior, o que sugere uma maior quantidade de nitrogênio com relação ao carbono, indicando não limitação deste nutriente e potencial de produção de biomassa. Além disto, destaca-se o elevado teor de potássio, superior a 3000 mg L<sup>-1</sup>, o qual poderia ser reciclado via fertirrigação a partir da biomassa microalgal gerada como alternativa de incorporação deste nutriente. Bastos et al. (2009) reportaram remoções de potássio pela microalga *Aphanothece* sp. em torno de 65% durante o cultivo em vinhaça bruta, sendo que os autores sugerem que a incorporação à biomassa foi fundamental para tal variação. Além do potássio, de acordo com Morais e Bastos (2018), a vinhaça apresenta teores consideráveis de magnésio, manganês e ferro, o que pode auxiliar a fotossíntese de microalgas em cultivos mixotróficos, desde que seja permitida a disponibilidade de luz.

Outro ponto importante a ser considerado é o pH original que é encontrado na faixa ácida, normalmente em torno de 4 (Ferreira et al. 2021). Mattos e Bastos (2015) obtiveram valores de pH até inferiores, em média, 3,5. Porém, estes valores podem ser decorrentes da variedade de cana-de-açúcar e nível de contaminação da fermentação alcoólica. De qualquer forma, esta caracterização indica a necessidade inevitável de ajuste do pH até valores próximos a neutralidade para qualquer aproveitamento microbiológico da vinhaça.

*Tabela 2 Caracterização da amostra de vinhaça utilizada nos ensaios*

pH	4,37 ± 0,10
Turbidez (NTU)	111,30 ± 0,47
Sólidos suspensos (mg L <sup>-1</sup> )	720 ± 70
TOC (mg L <sup>-1</sup> )	8955 ± 4,0
TN (mg L <sup>-1</sup> )	508,65 ± 3,85
P (mg L <sup>-1</sup> )	34,50 ± 4,13
K (mg L <sup>-1</sup> )	3313 ± 166
Razão C/N*	17,61

\*calculada pela relação entre TOC e TN

A elevada turbidez indica que esta água residuária somente poderia ser aproveitada no cultivo de microalgas que usufruam do metabolismo heterotrófico, ou seja, não limitada pela luminosidade.

## 5.2 Cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça submetida a diferentes temperaturas

Como a vinhaça é a água residuária gerada no processo de destilação alcoólica, grandes volumes são obtidos em temperaturas elevadas, atingindo até 105°C na base do destilador. Por outro lado, de acordo com Nalley et al. (2018), a faixa ótima de temperatura das microalgas fica entre 25 e 35°C, indicando que um resfriamento será sempre necessário para este tipo de aproveitamento. Nesse sentido, foram conduzidos ensaios em diferentes temperaturas para avaliação dos parâmetros de crescimento e consumo de substratos pela cianobactéria *Phormidium autumnale*. A Figura 7 apresenta o perfil de biomassa para o cultivo em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25°C. O perfil indica um crescimento praticamente constante sendo obtido valores superiores a 6000 mg L<sup>-1</sup>. A ausência de uma fase prévia de adaptação e estacionária sugere que a vinhaça apresenta carbono, nitrogênio e demais nutrientes em teores adequados para cultivo desta cianobactéria durante o período amostrado.

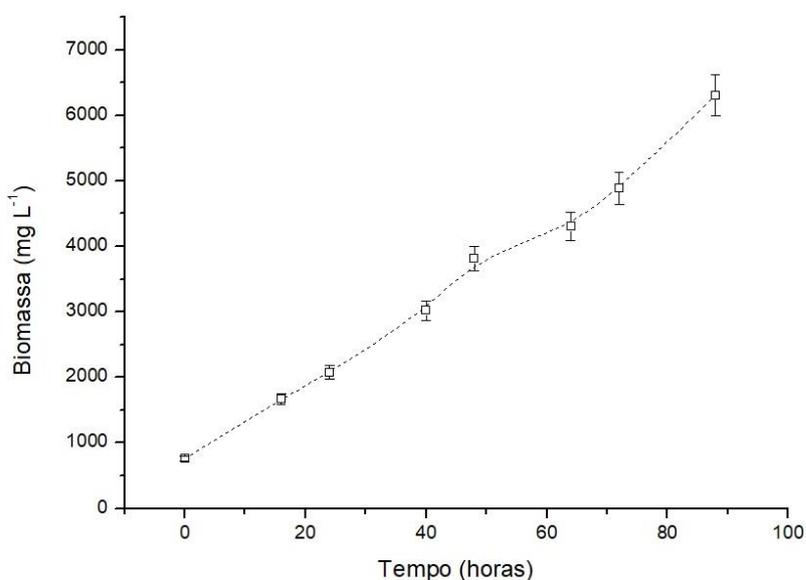


Figura 7 - Curva de crescimento de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25°C

Este perfil praticamente linear de crescimento leva a uma produtividade constante de biomassa (Figura 8), entre 50 e 60 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, indicando que a temperatura de 25°C e a composição da vinhaça não afetaram a produção de biomassa.

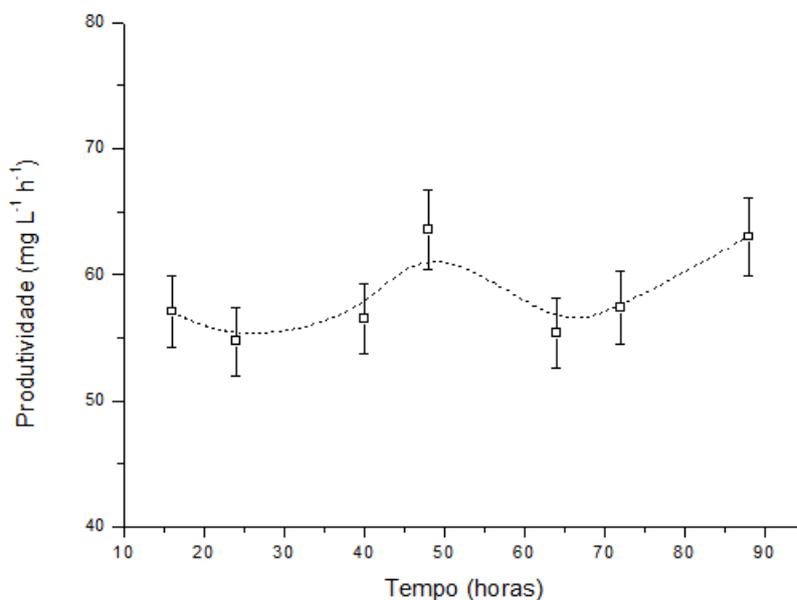


Figura 8 - Perfil de produtividade em biomassa de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25°C

O comportamento tanto do crescimento (Figura 9) como da produtividade (Figura 10) a 35°C apresentaram tendências muito próximas às obtidas a 25°C, sendo que as produtividades em biomassa foram discretamente superiores, em torno de 70 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. De fato, de acordo com Nalley et al. (2018), a faixa de temperatura ótima para cianofíceas é frequentemente entre 30 e 35°C, o que pode explicar estas produtividades mais elevadas.

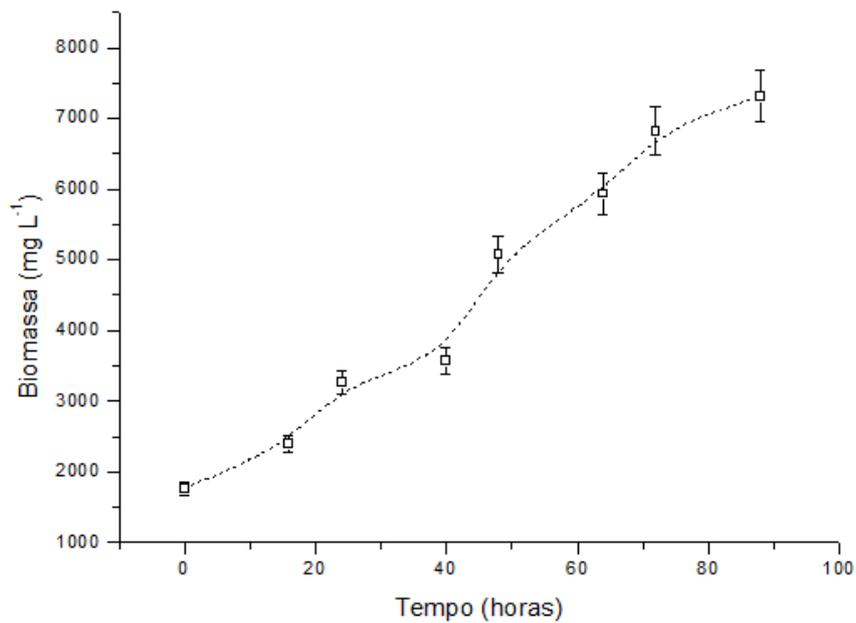


Figura 9 - Curva de crescimento de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 35°C

Diferentemente das temperaturas inferiores, o perfil de biomassa a 45°C apresentado na Figura 11 indica uma fase de adaptação superior a 40 horas, seguida de uma fase de crescimento, porém, atingindo valores máximos bem inferiores do que a 25 e 35°C. Com isso, há uma grande oscilação da produtividade, atingindo os maiores valores ao final do cultivo (Figura 12).

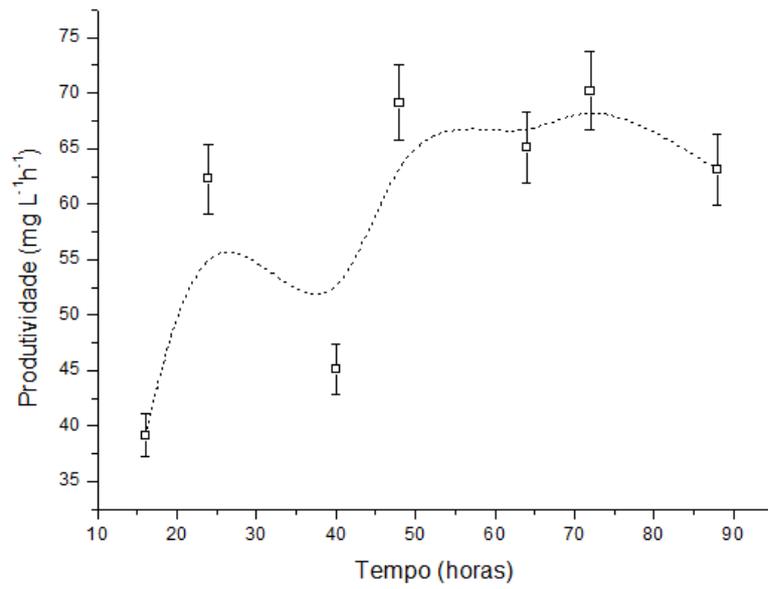


Figura 10 - Perfil de produtividade de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 35°C

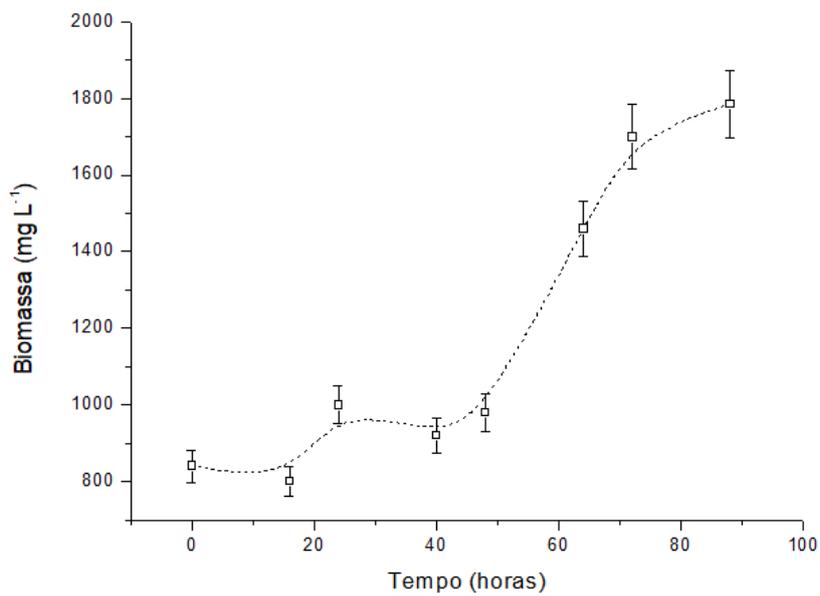


Figura 11 - Curva de crescimento de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 45°C

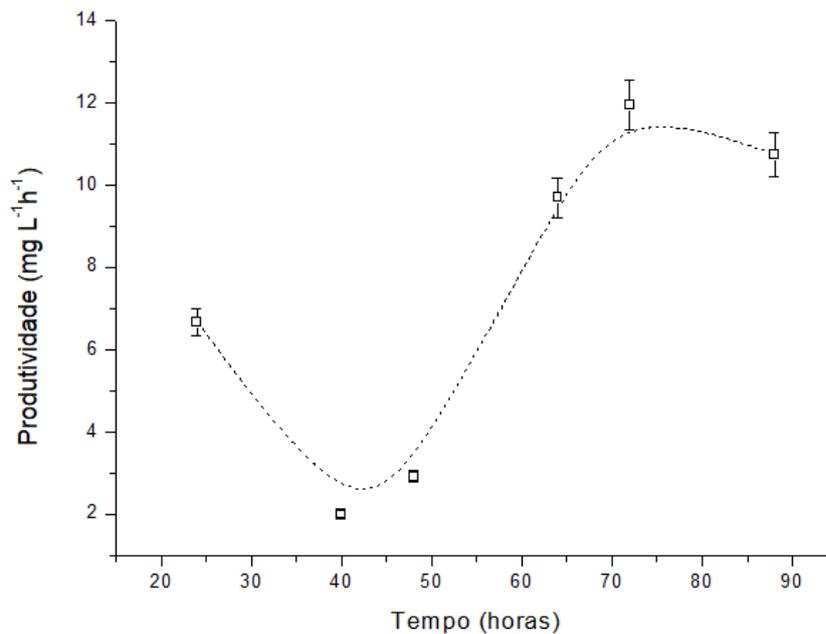


Figura 12- Perfil de produtividade de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 45°C

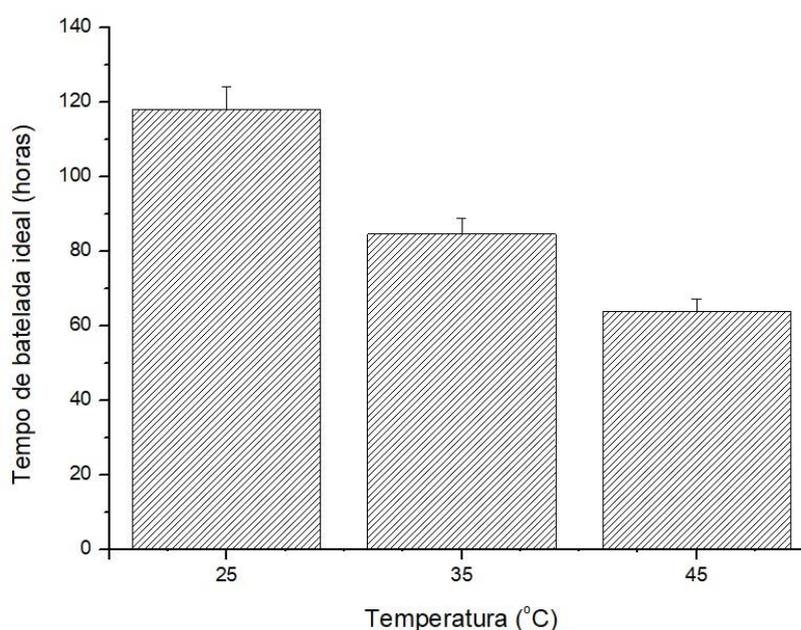
Os resultados dos cultivos em termos de crescimento e produtividades podem ser melhor visualizados na Tabela 3, a qual apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento para *Phormidium autumnale* em vinhaça nas diferentes temperaturas. As velocidades específicas de crescimento máximas e os tempos de geração expressam as melhores condições de cultivo a 25 e 35°C, com valores similares e superiores a 45°C. Mesmo assim, os valores foram inferiores aos obtidos para a microalga clorofícea *Desmodesmus subspicatus* em cultivo heterotrófico a partir de vinhaça (Mattos e Bastos, 2015), assim como para a cianofícea *Aphanothece* em vinhaça complementada com meio BG11 (Morais e Bastos, 2018). Como a *Phormidium autumnale* é uma cianobactéria filamentosa, é esperado um crescimento mais lento, devido a sua morfologia. De qualquer forma, os valores de  $\mu_{máx}$  indicam crescimento considerável e aproveitamento dos substratos da vinhaça, uma vez que, em torno de 40 horas há duplicação da biomassa considerando os tempos de geração calculados.

A partir do balanço de células (Equações 8 a 11), é possível prever o tempo de batelada ideal para uma determinada produção de biomassa. Nesse sentido, considerando os valores experimentais e os parâmetros cinéticos da Tabela 3, a

Figura 13 apresenta tempos de batelada ideais para os cultivos de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25, 35 e 45°C.

*Tabela 3- Parâmetros cinéticos de crescimento para Phormidium autumnale em vinhaça de cana-de-açúcar submetida a diferentes temperaturas*

	25°C	35°C	45°C
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,0179	0,0168	0,0118
$t_g (\text{h})$	38,72	41,25	58,73
$\text{Prod}_{\text{máx}} (\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1})$	63,60 (48 horas)	70,19 (72 horas)	11,94 (72 horas)



*Figura 13 - Tempos de batelada calculados para o cultivo de Phormidium autumnale em vinhaça de cana-de-açúcar mantida a 25, 35 e 45°C*

Os resultados indicam tempos de batelada ideais em torno de 120 horas (25°C), 80 horas (35°C) e 70 horas (45°C) para uma produção máxima de biomassa. Estes resultados justificam a manutenção de bateladas entre 80 e 120 horas, ou seja, intervalos ideais para obtenção de biomassa passível de utilização. O menor tempo de batelada em 45°C indica que esta seria a pior condição, com crescimento mais limitado. Assim, manter nesta condição por mais tempo acarretaria em uma diminuição ainda maior na produtividade. Sendo assim, outro parâmetro que pode ser

estimado considerando os perfis de concentração celular é a produtividade máxima (Tabela 4).

Tabela 4 - Produtividade máxima de biomassa, tempo de batelada ótimo experimental e teórico no cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar submetida a diferentes temperaturas

	25°C	35°C	45°C
Produtividade máxima (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	63,60	70,19	11,94
t <sub>experimental</sub> (h)	48	72	72
t <sub>batelada ideal</sub> (h)	118,20	84,67	63,93

A produtividade máxima a 25°C (63,60 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) é medida a 48 horas. Porém, há uma tendência desse valor se manter por mais tempo, já que a batelada poderia ir até 118 horas sem maiores prejuízos ao cultivo. Por outro lado, tanto 35 como 45°C apresentam tempos de bateladas ideais próximos ao experimental. A 45°C, como a temperatura está acima do ótimo, o tempo ideal fica discretamente abaixo do tempo de cultivo, ou seja, quanto mais tempo, pior vai sendo o desempenho. A maior produtividade ocorre a 35°C (70,19 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) e, nesse sentido, fica justificado que os cultivos sejam mantidos por um pouco mais de 80 horas, momento em que os valores experimental e teórico se aproximam.

Com relação à produtividade, Montalvo et al. (2019) obtiveram 0,150 g L<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup> para o cultivo em vinhaça de *Arthrospira maxima*, com redução da DBO (89,2%) e DQO (81%). Em outros estudos usando vinhaça após biodigestão houve produção de biomassa de 300 mg L<sup>-1</sup> após 10 dias usando 50% de vinhaça no meio de cultivo usando *Chlorella vulgaris* (Trevisan et al., 2020) e produtividade de biomassa de 70 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> usando 100% vinhaça (Marques et al., 2013). Assim, a produtividade máxima obtida neste trabalho (63,60 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> ou 1526 mg L<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup>) foi muito superior ao reportado na literatura, com a vantagem de usar vinhaça bruta com resfriamento e ajuste de pH. Além disso, de acordo com Ferreira et al (2021), a maioria dos estudos que avaliam o cultivo de microalgas em vinhaça indica que etapas prévias como filtração, adsorção, tratamento com ozônio ou mesmo biodigestão para melhorar as condições de crescimento, elevando a produtividade em biomassa.

A Figura 14 apresenta os perfis de carbono e nitrogênio na vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* a 25°C. Os resultados indicam um comportamento de consumo mais intenso do carbono orgânico, o que é esperado em condições heterotróficas, em aproximadamente 20 horas, com reduções em torno de 50% neste período. Já o consumo de nitrogênio foi praticamente constante durante todo o período experimental. Este comportamento pode ser melhor analisado a partir dos dados da Tabela 5, onde as taxas de consumo de nitrogênio inicial ( $r_{inicial}$ ) e final ( $r_{final}$ ) foram praticamente constantes em torno de 0,4 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Isso indica um consumo lento e praticamente constante do nitrogênio, com remoção máxima de 37,55%. No caso do carbono há uma grande variação do perfil cinético antes e depois de 20 horas, com a taxa de consumo variando em praticamente dez vezes (91,82 para 9,20 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Esta evidência pode ser decorrente da complexidade em termos de composição da vinhaça, uma vez que pode ser considerada um meio de cultivo complexo, apresentando diversas fontes de carbono que podem ser assimiladas pelas microalgas.

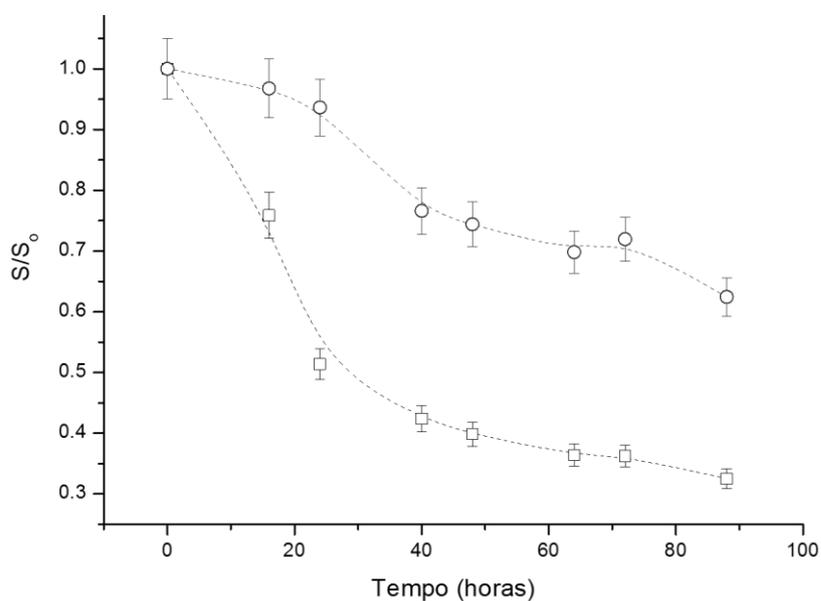


Figura 14 - Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 25°C

Tabela 5 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 25°C

	$r_{\text{inicial}}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$r_{\text{final}}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Remoção máxima (%)
TOC	91,82	9,20	67,46
TN	0,40	0,41	37,55
$r_{\text{TOC}}/r_{\text{TN}}$	229,55	22,43	

Por outro lado, os perfis de carbono e nitrogênio seguem praticamente juntos a 35°C, sugerindo um crescimento equilibrado (Figura 15). Assim, a razão carbono:nitrogênio se mantém praticamente constante durante todo o período experimental (Tabela 6), destacando que, nesta temperatura, as condições de crescimento são melhores do que a 25°C.

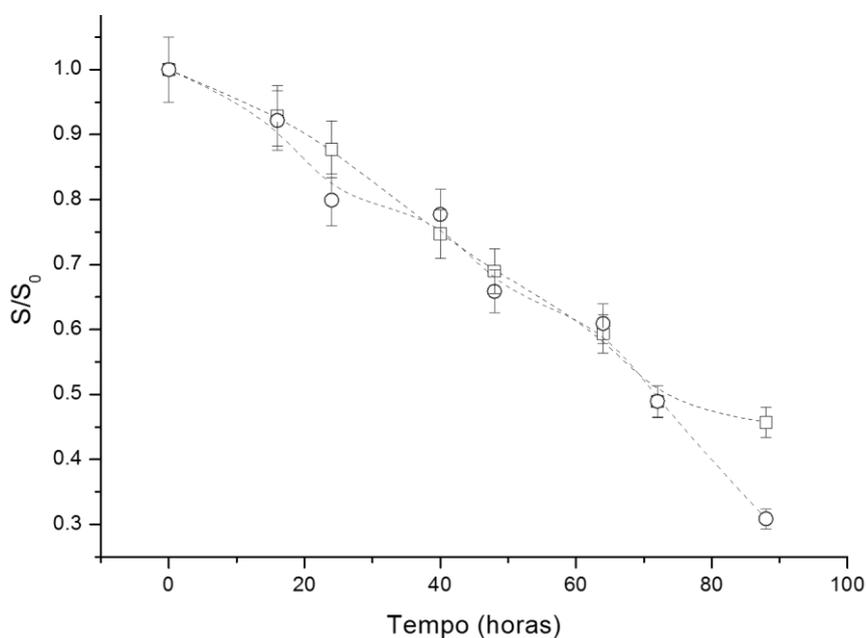


Figura 15 - Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 35°C

De fato, há uma proximidade maior das taxas de consumo de carbono e nitrogênio, como se não houvesse limitação com relação a estes substratos. Esta constatação a 35°C destoa completamente do que ocorre a 45°C, conforme os perfis apresentados na Figura 16. Há um consumo discreto das primeiras horas, como se ocorresse uma adaptação a esta temperatura acima da faixa ótima.

Tabela 6 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 35°C

	$r_{\text{inicial}}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$r_{\text{final}}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Remoção máxima (%)
TOC	18,06	18,06	54,31
TN	1,24	1,24	69,14
$r_{\text{TOC}}/r_{\text{TN}}$	14,56	14,56	

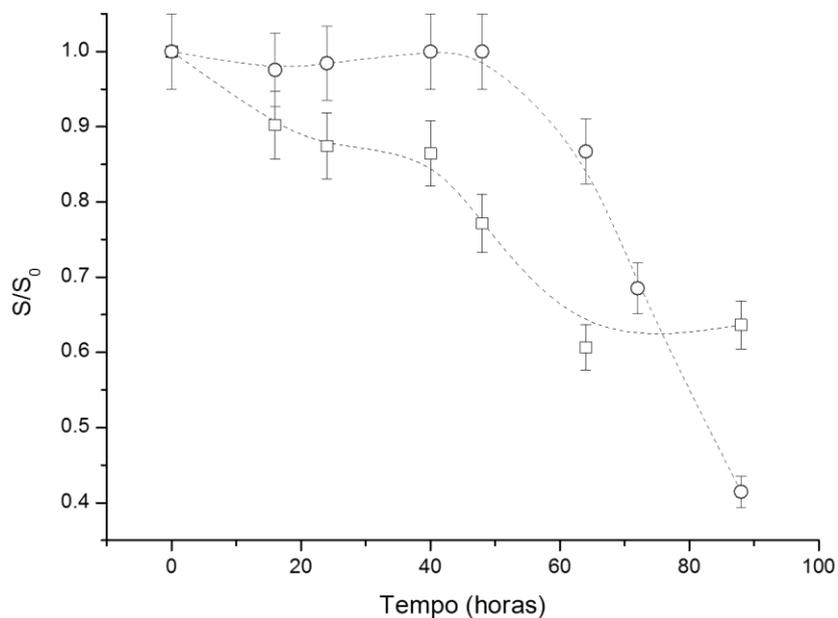


Figura 16 - Perfis de Carbono (□) e Nitrogênio (○) da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 45°C

Como resultado, são obtidas as menores taxas de consumo de carbono e ocorre uma grande variação da razão C/N durante o período, com redução brusca na relação entre as velocidades. A temperatura mais elevada parece interferir mais no consumo de carbono, o que pode estar ligado ao seu efeito nas macromoléculas que compõe a vinhaça. Assim, reações de degradação térmica podem ter influenciado na disponibilidade da matéria orgânica do meio. De qualquer forma, é possível constatar consumo de carbono (remoção máxima de 36,35%) e nitrogênio (58,53%) nessas condições mais drásticas.

Tabela 7- Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a 45°C

	$r_{inicial}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$r_{final}$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Remoção máxima (%)
TOC	13,18	10,56	36,35
TN	0,11	2,28	58,53
$r_{TOC}/r_{TN}$	119,82	4,63	

A partir destes resultados pode-se concluir que a temperatura exerce uma grande influência no cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça, porém, houve produção de biomassa e remoção de parte dos poluentes na faixa de temperatura avaliada. Assim, os dados podem indicar a viabilidade deste cultivo sem a necessidade de manutenção da temperatura no valor ótimo para a atividade das microalgas.

### 5.3 Cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça e meio BG11 submetido a resfriamento progressivo

Considerando os resultados apresentados no item 5.2, tornou-se necessária a avaliação do cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar a partir de um gradiente de temperatura. Os ensaios foram conduzidos partindo-se de temperaturas mais elevadas, já que a água residuária é gerada em altas temperaturas, com resfriamento progressivo. Nesse sentido, a Figura 17 apresenta a curva de resfriamento da vinhaça utilizada como meio de cultivo nos experimentos. Em termos gerais, houve uma redução da temperatura de 45 a 25°C em 88 horas, com uma lenta taxa de resfriamento média de 0,34°C h<sup>-1</sup>. Assim, considerando que as regiões de produção de cana-de-açúcar no Brasil apresentam um clima tropical e mais quente, os grandes volumes de vinhaça levariam um período razoável para resfriar naturalmente.

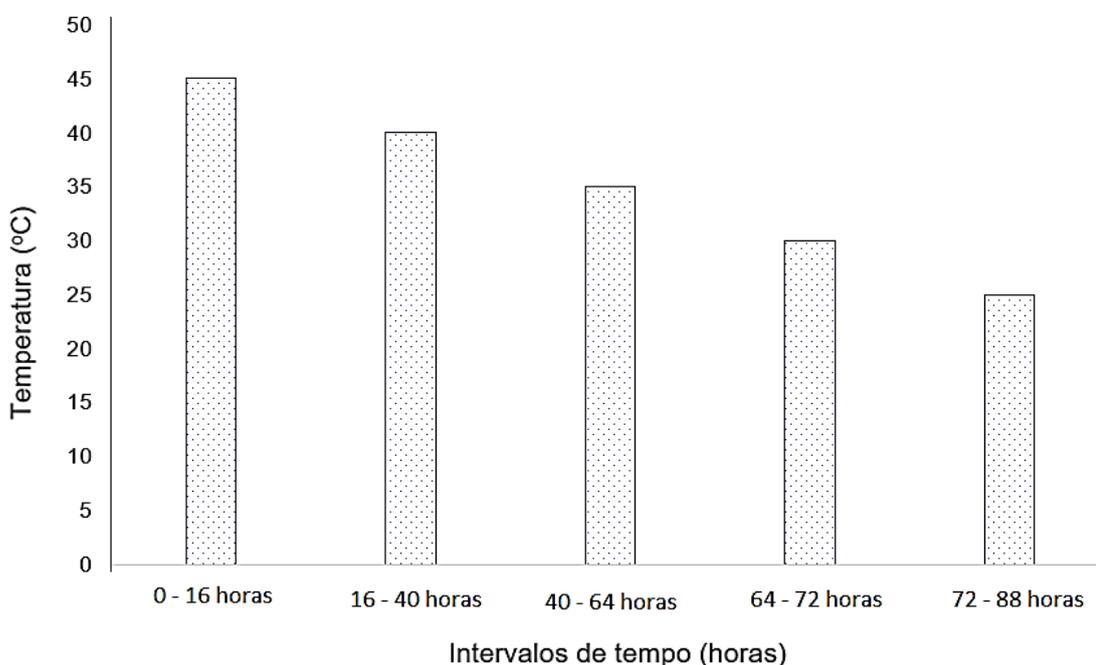


Figura 17 - Curva de resfriamento da vinhaça utilizada como meio de cultivo nos experimentos

A Figura 18 apresenta a curva de crescimento da *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar com resfriamento progressivo. De acordo com perfil

apresentado, observa-se uma elevação considerável nas primeiras 36 horas, seguido de uma estabilização. Nalley et al. (2018) reporta que a temperatura máxima crítica para cianofíceas fica em torno de 35°C, sendo que, acima deste valor, ocorre uma queda significativa na velocidade específica de crescimento destes microorganismos. Entretanto, o perfil apresentado na Figura 18 foi semelhante ao obtido por Visentin (2020) em cultivo desta cianobactéria em vinhaça, conduzido em biorreator batelada de bancada a 30°C durante todo o período experimental. De acordo com o comportamento, é possível sugerir que a faixa de temperatura entre 40 a 45°C parecem ter exercido pouca influência no crescimento. Este resultado pode ser considerado promissor porque a vinhaça apresenta-se originalmente numa temperatura muito elevada e o seu resfriamento pode levar algumas horas. O aproveitamento deste subproduto a partir de temperaturas em torno de 45°C poderia viabilizar tecnicamente a produção de biomassa microalgal associada a produção de etanol nas destilarias.

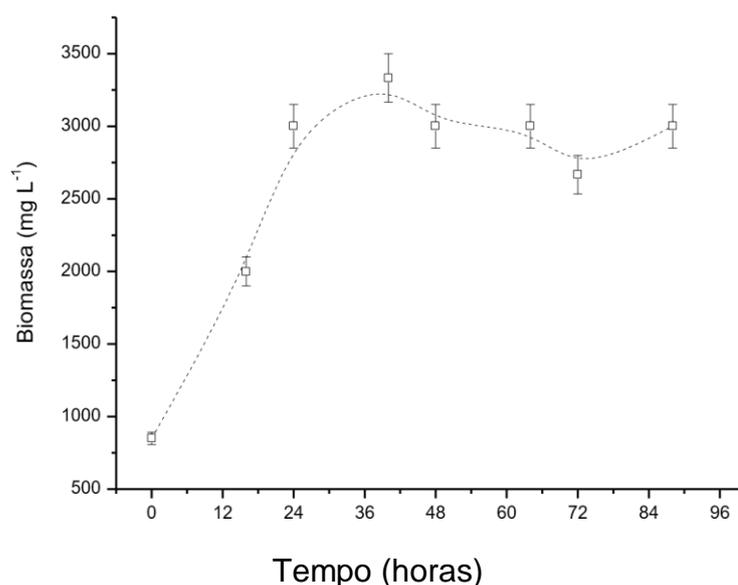
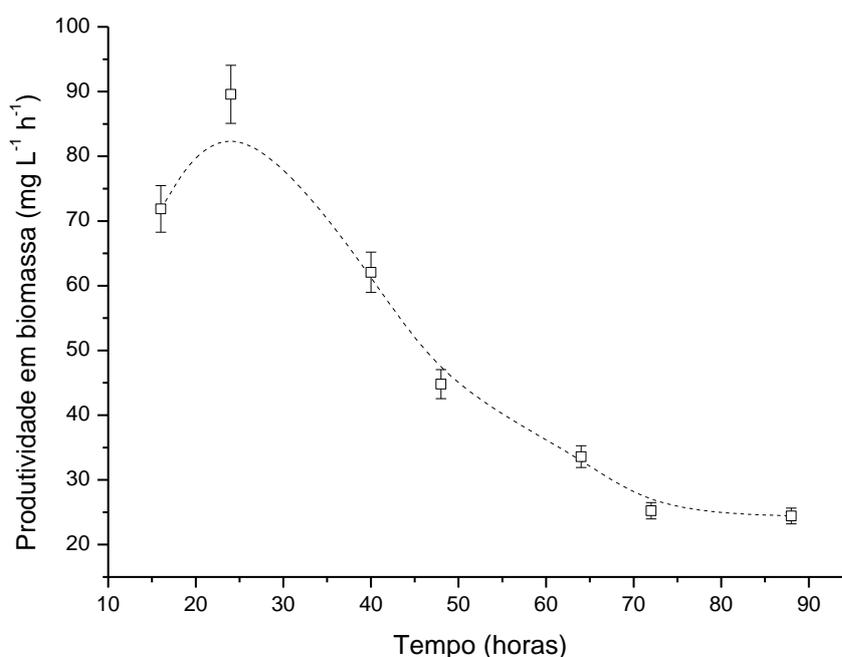


Figura 18 - Perfil da biomassa de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar com resfriamento progressivo

Segundo Visenti (2020) relatou que a obtenção da melhor concentração de biomassa da *P. autumnale* cultivada em vinhaça foram obtidas entre 31 a 35°C em pH ótimo de 7,5. Entretanto, de acordo com a Figura 19 há interação entre a faixa de

temperatura ideal e a disponibilidade de nutrientes. Nas primeiras horas a vinhaça é mantida a 45 e 40°C, temperaturas notadamente mais desfavoráveis para o crescimento. Porém, nessas condições, há uma maior quantidade de nutrientes e uma razão C/N da vinhaça mais adequada.



*Figura 19 - Perfil da produtividade em biomassa de Phormidium autumnale em vinhaça de cana-de-açúcar com resfriamento progressivo*

Neste contexto, ensaios de cultivo heterotrófico simulando o mesmo gradiente de temperatura foram conduzidos em meio padrão BG 11 adicionado de glicose (Ripka et al., 1979). A Figura 20 um perfil com uma variação inicial mais lenta, seguido de oscilações, com as maiores produtividades foram obtidas na faixa de 35 a 30°C (Figura 21). Estes resultados indicam que a variação de temperatura tem um maior impacto quando o meio padrão é fornecido, podendo ser atribuído a uma maior instabilidade térmica ou tendência de oxidação da glicose quando comparado a complexa matéria orgânica da vinhaça.

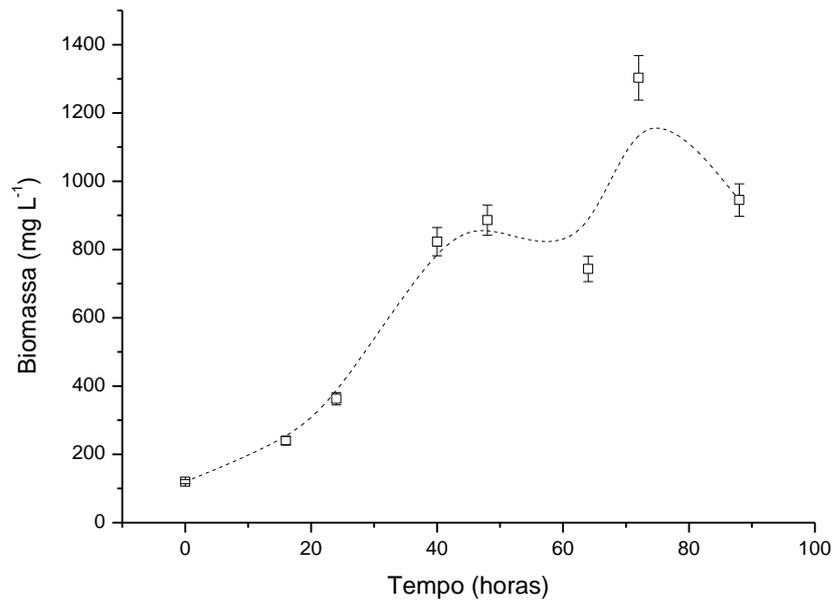


Figura 20 - Perfil da biomassa de *Phormidium autumnale* em meio BG11 com resfriamento progressivo

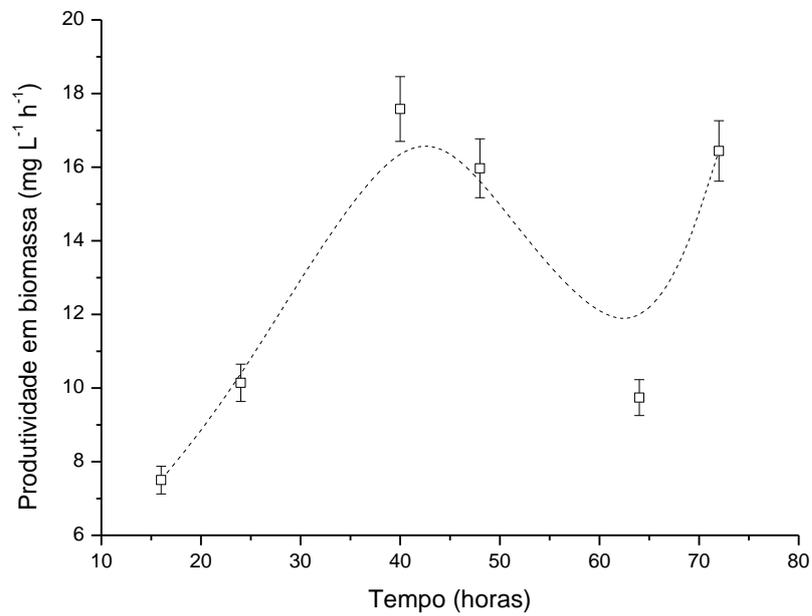


Figura 21 - Perfil da produtividade em biomassa de *Phormidium autumnale* em meio BG11 com resfriamento progressivo.

Estas constatações podem ser melhor quantificados de acordo com a Tabela 8. A proximidade do tempo de batelada ideal, teórico e obtido a partir do balanço de massa de células, com o tempo experimental onde foi obtida a maior produtividade, indica condições equilibradas de crescimento. Neste caso, a vinhaça fornece uma diversidade maior em termos de fonte de carbono orgânico, fundamentais no cultivo heterotrófico. Assim, cultivos microalgais em meios complexos como águas residuárias parecem ser ter uma influência menor da temperatura do que meios padrão quimicamente definidos. Isto demonstra o potencial de aproveitamento da vinhaça de cana-de-açúcar no Brasil para produção de biomassa e bioprodutos microalgais, seguindo os conceitos de biorrefinaria.

Tabela 8 - Produtividade máxima de biomassa, tempo de batelada ótimo experimental e teórico no cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar e meio BG11 com resfriamento progressivo

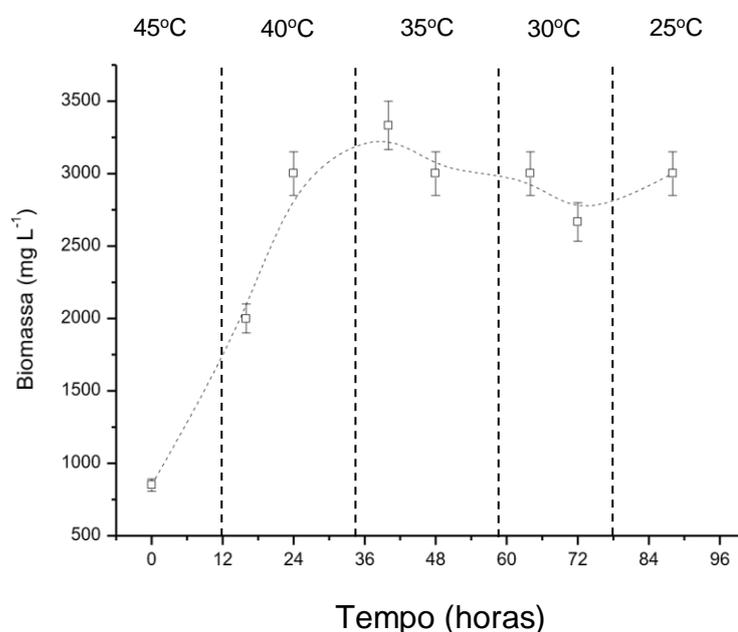
	Vinhaça	Meio BG11
Produtividade máxima (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	89,58	17,58
t <sub>experimental</sub> (h)	24	40
t <sub>batelada ideal</sub> (h)	23,84	61,42

Em termos de produtividade, a Tabela 9 apresenta a variação da biomassa nos diferentes períodos e faixas de temperatura. Como o maior crescimento ocorreu nos períodos de 45 a 40°C (Figura 22), isso repercutiu nas maiores produtividades. Cabe ressaltar que a produtividade máxima obtida a 40°C (90 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Estes resultados podem ser explicados pela combinação de um valor de temperatura mais próximo do ideal associado a um meio ainda contendo um excesso de substratos. À medida que vai ocorrendo o resfriamento, mesmo que atingindo temperaturas mais próximas do ideal, o consumo concomitante de substratos tende a desequilibrar a composição do meio, comprometendo o crescimento e a produtividade. Prova disto é que produtividade máxima só é obtida no intervalo de tempo onde a temperatura é 40°C. Visentin (2020) reporta produtividades em biomassa em torno de 58 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> durante todo o período experimento. Se formos considerando todo o intervalo de

tempo em toda a faixa de 25 a 45°C, a produtividade global seria em torno de 30 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, sugerindo que as temperaturas mais elevadas podem ter apresentando um efeito menor justamente devido ao intervalo de tempo restrito. Assim, os resultados indicam que é possível utilizar a vinhaça em uma temperatura acima do ótimo de crescimento das cianobactérias, desde que exista um resfriamento contínuo.

*Tabela 9- Produtividades em biomassa nas diferentes temperaturas*

Temperatura no intervalo de tempo (°C)	Produtividade (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
45	71,88
40	90
35	20
30	≈ 0
25	≈ 0
Produtividade global (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	24,43



*Figura 22 - Perfil da biomassa de Phormidium autumnale em vinhaça com destaque para a variação de temperatura*

A Figura 23 apresenta o perfil do pH da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale*, onde constata-se uma variação discreta, mantendo o valor na faixa ótima de crescimento em torno de 7,5.

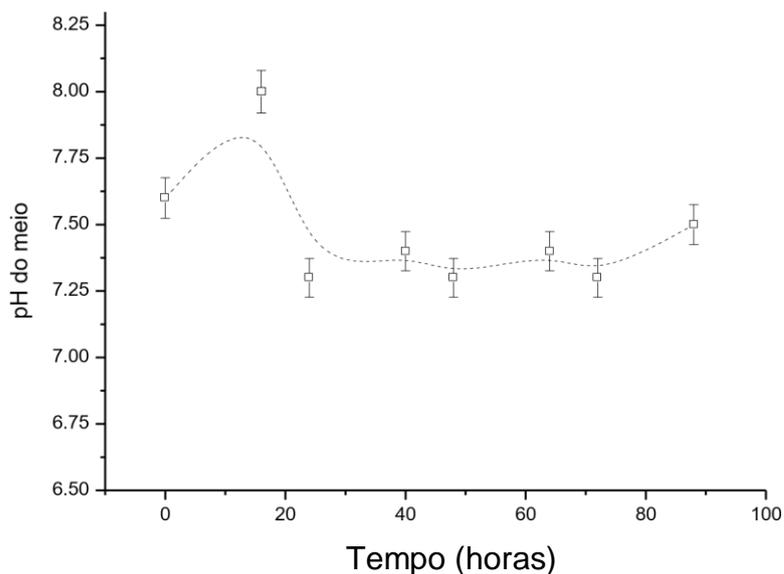


Figura 23 - Perfil do pH da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo

A Figura 24 apresenta o perfil do teor de carbono orgânico total na vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale*. É notadamente percebido um consumo progressivo e praticamente constante, sugerindo que o crescimento não esteve limitado com relação a este substrato, apesar das remoções inferiores ao reportado na literatura (Visentin, 2020). Porém, se considerarmos dois extratos relativos ao período inicial de maior crescimento (45 e 40°C) e ao período final (temperatura inferior a 35°C), nota-se na Figura 25 a existência de duas taxas de consumo de ordem zero representadas pelas retas tracejadas. No período inicial, ocorre um consumo de 46 mg TOC por litro por hora, enquanto que, após 36 horas, até mesmo devido a desaceleração do crescimento (Figura 22), temos uma taxa de consumo de 15 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. A vinhaça apresenta elevados teores de matéria orgânica composta por diferentes tipos de moléculas. Estes resultados indicam que, independentemente do substrato orgânico consumido, tais como glicose, glicerol ou acetato, o consumo não é limitado pela concentração, seguindo uma cinética de ordem zero. Porém, este

consumo ocorre em diferentes velocidades, comprometendo desta forma a remoção global do carbono orgânico.

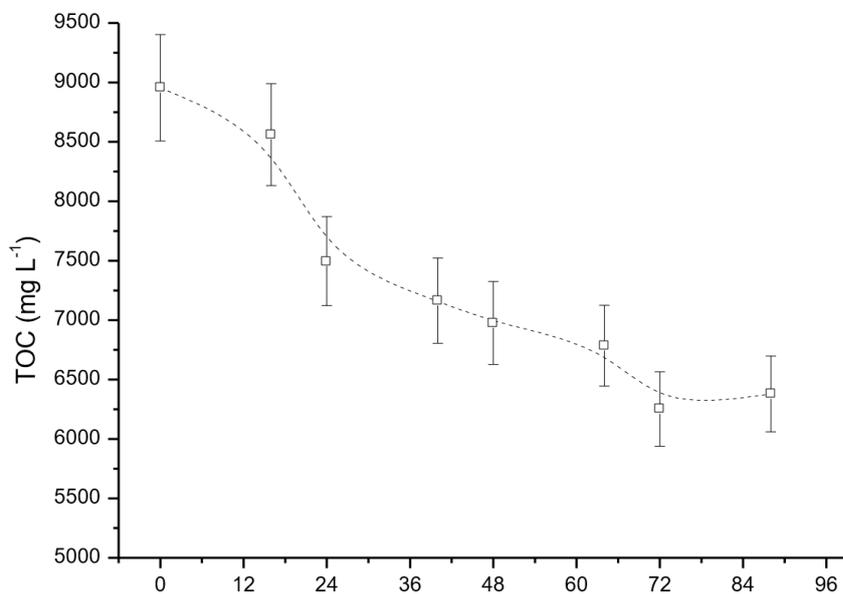


Figura 24 - Perfil de remoção de carbono orgânico total da vinhaça no cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo

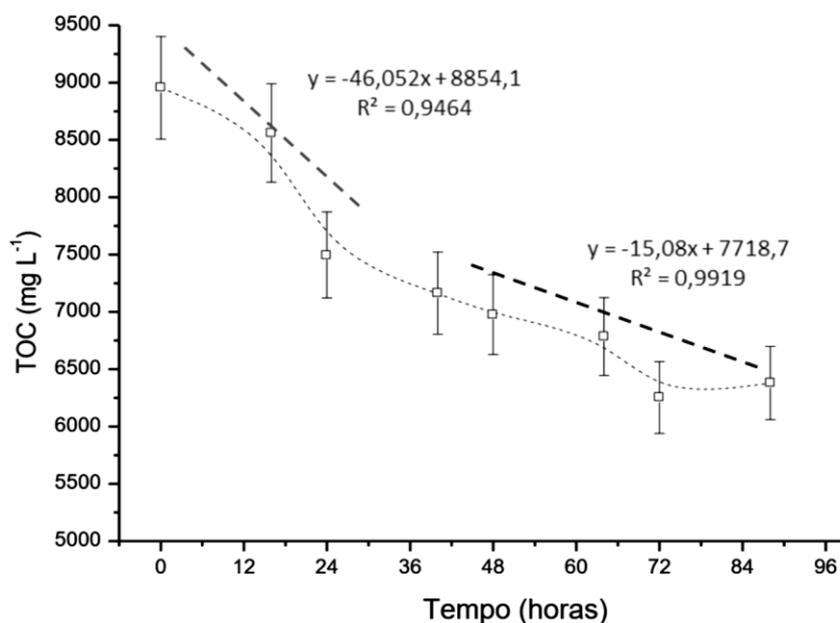


Figura 25 - Perfil e taxas de consumo de carbono orgânico total da vinhaça no cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo

A Figura 26 apresenta o perfil de consumo de nitrogênio total da vinhaça no cultivo de *Phormidium autumnale*. Assim como verificado para carbono, ocorre uma

redução progressiva e praticamente constante deste nutriente. Porém, analisando mais criteriosamente percebe-se também dois períodos de consumo, com taxas de consumo de  $3,38 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$  e de  $1,18 \text{ mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Figura 27). Como observado, o primeiro estágio de remoção tanto de TOC como de NT corresponde ao período com maior crescimento de biomassa, coincidindo com o aumento do consumo de carbono e nitrogênio. Segundo Barbosa (2019), o nitrogênio é considerado como o nutriente mais fundamental para o metabolismo das microalgas devido sua intensa participação na formação de substâncias do metabolismo primário. Quando em abundância no meio de cultivo, há uma tendência no aumento do teor de proteínas, enquanto que a sua ausência interfere nas taxas de crescimento.

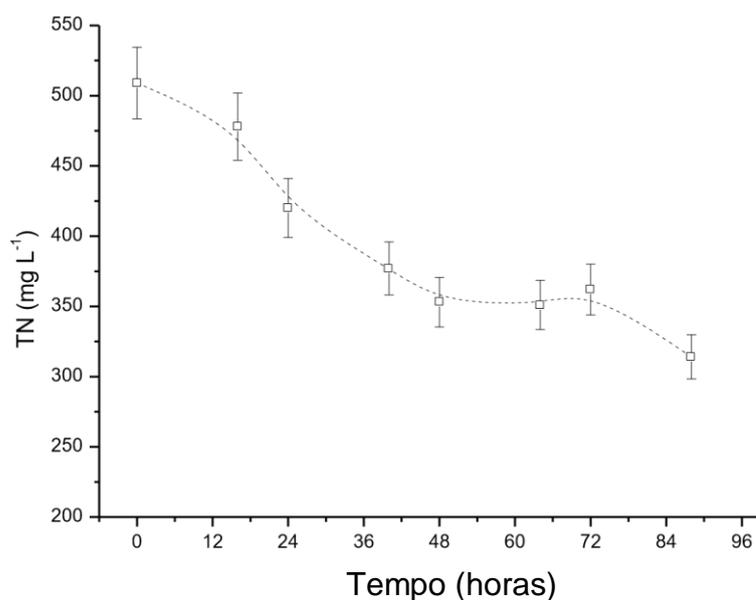


Figura 26 - Perfil de remoção de nitrogênio total da vinhaça no cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo

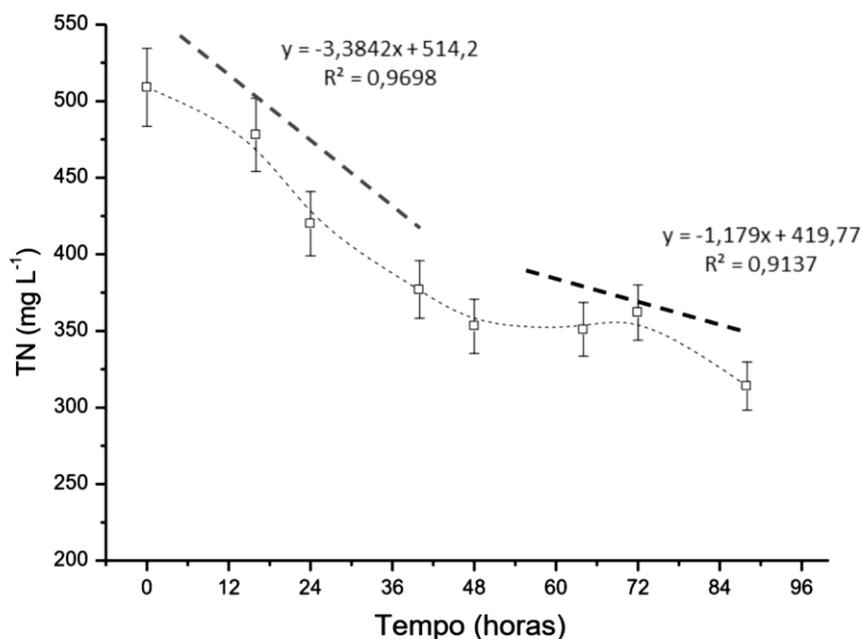


Figura 27 - Perfil e taxas de consumo de nitrogênio total da vinhaça no cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo.

As taxas de consumo apresentadas nas Figuras 25 e 27 parecem indicar que o nitrogênio é o substrato limitante, haja vista os valores muito inferiores quando comparados ao carbono. Esta limitação de nitrogênio pode ser interessante considerando que a sua menor disponibilidade no meio de cultivo quando comparado ao carbono, tende a alterar a composição da biomassa microalgal no sentido dos carboidratos e lipídios em detrimento das proteínas.

A razão C/N permanece praticamente constante durante todo o período experimental, conforme pode ser observado na Figura 28. Com isso, pode-se afirmar que o nitrogênio permanece sendo o substrato limitante durante todo o cultivo nas diferentes faixas de temperatura. Visentin (2020) trabalhando nas mesmas razões C/N obteve produtividade em biomassa de 107,92 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> a 25°C, com remoção de TOC e TN de 49% 47% respectivamente. As menores remoções de carbono e nitrogênio apresentadas na Tabela 10 levam a obtenção de elevados rendimentos destes substratos em biomassa, similares aos obtidos na literatura para *Phormidium autumnale* (VISENTIN, 2020).

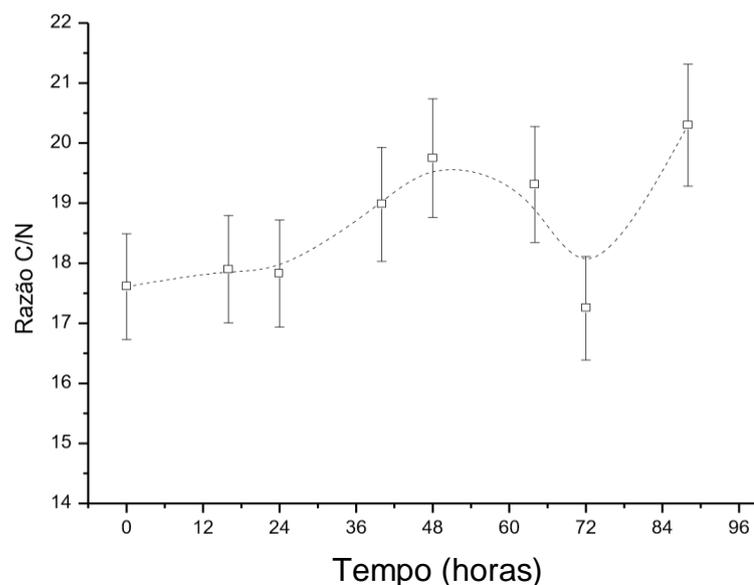


Figura 28 - Perfil da razão C/N da vinhaça durante o cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo.

O rendimento de carbono em biomassa de  $0,83 \text{ g g}^{-1}$  indica que praticamente todo o carbono orgânico consumido foi convertido em biomassa. Porém, como a remoção não foi elevada (máxima de 30,18 % em 72 horas), a concentração máxima de células é inferior a  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 22). O elevado rendimento de nitrogênio em biomassa é característico deste tipo de nutriente, ou seja, que perfaz a biomassa não sendo o majoritário.

A Tabela 10 apresenta ainda os parâmetros cinéticos de crescimento da de *P. autumnale* como velocidade específica de crescimento e tempo de geração, sendo que os valores estão em faixas normalmente encontradas para cultivos heterotróficos (PEREZ-GARCIA et al., 2011; MORAIS, 2018; VISENTIN, 2020). Gupta et al. (2019) obtiveram velocidades específicas de crescimento máximas nesta ordem de grandeza para *Scenedesmus abundans* apenas nos cultivos em batelada alimentada, levando a um acúmulo de biomassa.

Com relação ao teor de lipídios, foram obtidos 9,38 g de óleo em 100 gramas de biomassa, valor superior ao obtido por Visentin (2020), mas inferior ao que normalmente encontrado no inóculo de *Phormidium* mantida em meio BG 11 (em torno de 16%). Estas variações são certamente atribuídas a composição do meio de cultivo e relação carbono/nitrogênio, assim como a incidência luminosa em sistemas fotoautotróficos. Quando se trata de produção de óleos para produção de biodiesel, deve-se considerar a quantidade produzida, bem como a qualidade desses óleos

gerados pela biomassa. (BARBOSA, 2019). Tanto a produtividade de biomassa como o teor de lipídios influenciam na viabilidade econômica da produção de biodiesel a partir da geração dos óleos produzidos por microalgas e cianobactérias. Morais (2018) obteve elevada produtividade lipídica, mesmo que a cianobactéria *A. microscopica* tenha apresentado um teor de lipídios de 6,38% em sua biomassa após cultivo heterotrófico em vinhaça. Gupta et al. (2019) obtiveram produtividades lipídicas similares na ordem de 50 mg L<sup>-1</sup>dia<sup>-1</sup>, mesmo a partir da biomassa de *Scenedesmus abundans* com teores de óleo bem superiores (30%) ao reportado nesta pesquisa.

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de crescimento, remoção de carbono e nitrogênio e teor de lipídios na biomassa final

Parâmetro	Valor
Velocidade específica de crescimento máxima, $\mu_{\text{máx}}$	0,053 h <sup>-1</sup>
Tempo de geração, tg	13,15 h
Remoção máxima de TOC e tempo	30,18 % (72 h)
Remoção máxima de TN e tempo	38,23% (88 h)
Rendimento global de TOC em biomassa	0,83 g g <sup>-1</sup>
Rendimento máximo de TN em biomassa	11,06 g g <sup>-1</sup>
Teor de lipídios na biomassa	9,38 g 100 g <sup>-1</sup>
Produtividade lipídica global	67,54 mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>
Teor de proteínas na biomassa	53,33 g 100 g <sup>-1</sup>

Para fins de comparação, foram conduzidos ensaios nas mesmas condições de gradiente de temperatura em meio BG11 acrescido de glicose para avaliação do consumo de carbono e nitrogênio. Neste caso, trata-se de um carbono fornecido na forma de glicose e nitrogênio como nitrato de sódio. A Figura 29 apresenta uma grande oscilação em termos de consumo destes substratos, o que pode sugerir a transformação e liberação de outras formas de moléculas carbonáceas e nitrogenadas. A matéria orgânica mais complexa da vinhaça parece “sustentar” o crescimento por um período maior, com incorporação das moléculas mais simples e acúmulo de biomassa. Assim, diferentemente do que ocorre para a vinhaça (Figura 28), a razão C/N não permanece constante durante o período experimental, havendo variação nas taxas de consumo ( $r_{\text{TOC}}/r_{\text{TN}}$ , Tabela 11) elevada.

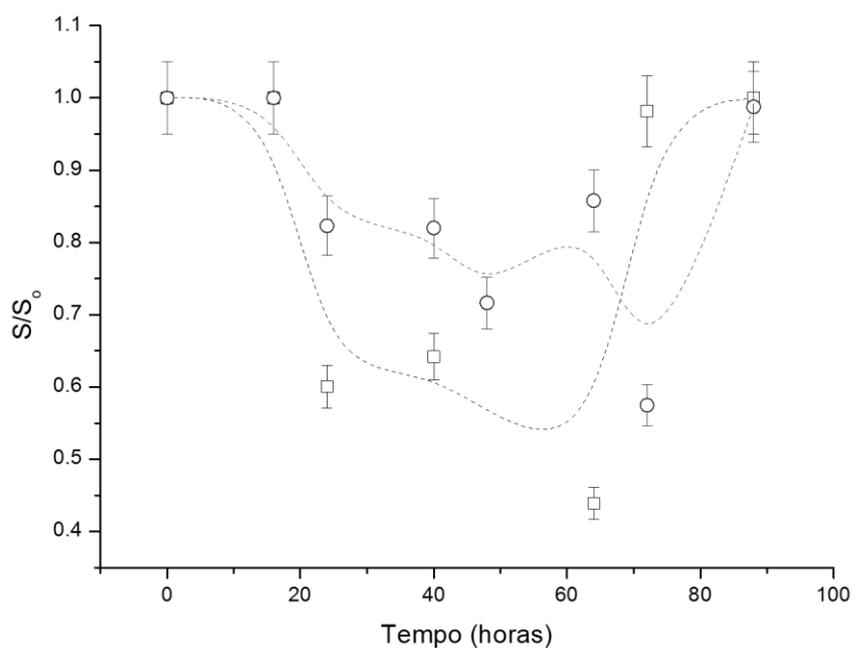


Figura 29- Perfis de carbono (□) e nitrogênio (○) no meio BG11 durante o cultivo de *Phormidium autumnale* com resfriamento progressivo

Tabela 11 - Velocidades de consumo de substratos, razão entre as taxas e remoção máxima de carbono e nitrogênio para cultivo de *Phormidium autumnale* no meio BG11 com resfriamento progressivo

	$r_s$ (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Remoção máxima (%)
TOC	49,47	56,11
TN	0,32	42,52
$r_{TOC}/r_{TN}$	154,59	

A comparação dos cultivos em vinhaça com o BG11 é importante para avaliar justamente os efeitos da temperatura e composição e, a partir dos resultados obtidos, fica demonstrado o potencial da vinhaça para gerar biomassa microalgal com produtividade elevada.

#### 5.4 Perfil de ácidos graxos e estimativa das propriedades do biodiesel microalgal a partir do cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça

De forma a caracterizar o óleo microalgal obtido, a Tabela 12 apresenta a sua composição em termos de ácidos graxos. O ácido palmítico (C16:0) apresenta maior ocorrência, com 43% em massa, seguido do ácido linoleico com 22%, ácido esteárico e eicosapentanóico com cerca de 18%. Quando em elevadas concentrações, o C16:0 concede importantes propriedades ao biodiesel, como por exemplo um alto índice de cetano. Além disso, segundo Visentin, 2020, quanto maior a porcentagem de SFA melhor é o favorecimento do óleo para o uso de biodiesel.

Tabela 12- Perfil dos ácidos graxos de *P. autumnale* cultivada em vinhaça

Ácidos Graxos	(% em massa)
C11:0 (hendecanóico)	8,34 ± 1,33
C12:0 (láurico)	1,68 ± 0,23
C14:0 (mistérico)	2,29 ± 0,16
C16:0 (palmítico)	43 ± 0,02
C17:0 (margárico)	1,81 ± 0,11
C18:0 (esteárico)	18 ± 0,05
C18:1 (oléico)	4,00 ± 0,07
C18:2 (linoléico)	22 ± 0,27
C18:3 n6 (γ-linolênico)	2,52 ± 0,24
C20:0 (araquinídico)	1,65 ± 0,05
C20:2 (eicosadienóico)	6,75 ± 0,88
C20:5 (eicosapentanóico)	18 ± 0,01
C22:0 (behênico)	1,54 ± 0,06
C24:0 (Ácido lignocérico)	2,07 ± 0,21
SFA (saturados)	59,84%
MUFA (mono-insaturados)	4,00%
PUFA (poli-insaturados)	29,33%

De acordo com Gupta et al (2019), elevadas concentrações de C18:3 podem afetar a estabilidade dos metil ésteres obtidos após transesterificação. Estes autores ainda indicam que o teor do C18:3 decrescem com o aumento da concentração de carbono orgânico nos cultivos mixotróficos e heterotróficos. Nesse sentido, conforme os resultados da Tabela 4, o baixo valor obtido deste ácido graxo (3,87%) obtido na biomassa pode ser atribuído a elevada quantidade de matéria orgânica na vinhaça.

A Tabela 13 avalia o potencial de produção do biodiesel a partir da estimativa das propriedades estimadas considerando o perfil de ácidos graxos na biomassa de *P. autumnale* gerada em vinhaça nas condições experimentadas. Dentre os parâmetros, destacam-se o número de cetano, índice de iodo, índice de saponificação, fator de cadeia longa saturada, viscosidade e densidade, os quais geralmente são analisados considerando as normas brasileira (ANP 255), americana (US ASTM 675) e europeia (EM 14214). Cabe ressaltar ainda as variações das propriedades a partir do óleo obtido do inóculo, ou seja, a partir do cultivo em meio fotossintético padrão BG11. Nesse sentido, há um indicativo que a composição da vinhaça e a variação da temperatura influenciaram indesejavelmente nas propriedades estimadas do biodiesel microalgal. Segundo Visentin (2020), os ácidos graxos que mais influenciam na viscosidade são dos de cadeia C10 até C18:0, capazes de reduzir a viscosidade e aumentar o número de cetano obtido.

O índice de iodo (IV), medida de insaturação do biodiesel, deve estar abaixo de 120 gI<sub>2</sub>/100 g de acordo com a norma EN 14214.

Alguns parâmetros conhecidos como “propriedades de fluxo a frio” como o ponto de entupimento de filtro a frio e o ponto de névoa apresentaram valores inadequados considerando as normas apresentadas na Tabela 13. O ponto de congelamento de filtro a frio (CFPP) é definido com a temperatura mais alta em que determinado volume de combustível não passa por meio de um dispositivo de filtração (45 µm) em 60 s (GIRARDI, 2019). Esta propriedade define a temperatura de obstrução das peças presentes no motor. Neste caso, o valor ficou em 37°C para o óleo gerado em vinhaça, diferindo drasticamente da amostra do inóculo. O ponto de nuvem ou névoa (CP) é a temperatura a partir da qual se observa o primeiro cluster por conta da cristalização dos ésteres do biodiesel. O ponto de nuvem influencia diretamente na obstrução de injetores e peças do motor, por conta dos depósitos. Os valores inadequados destas propriedades de frio dificultariam a utilização deste biodiesel sem mistura em países mais frios.

Tabela 13 - Propriedades estimadas do biodiesel obtido da fração lipídica da biomassa de *P. autumnale*

Propriedades	<i>P. autumnale</i> cultivada em vinhaça	Inóculo*	ANP 255	ASTM 6751	EN 14214
CN	56,12	50,62	mín. 45	mín. 47	mín. 51
IV gl <sub>2</sub> 100g <sup>-1</sup>	77,84	102,41			máx. 120
DU (%)	62,66	113,15			
SV	200,23	119,46			
LCSF (%)	17,05	4,07			
CFPP (°C)	37,10	3,69	máx. 19	máx. 5	
CP (°C)	9,84	6,26		-3 à -12	
APE	74,74	113,15			
BAPE	47,23	51,01			
OS (h)	9,43	0	mín.12	mín. 3	mín. 8
HHV	36,43	37,69			
$\nu$ (mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	3,196	1,21	3,0 - 6,0	1,9 - 6,0	3,5 - 5,0
$\rho$ (g cm <sup>-3</sup> )	0,817	0,84	0,85 a 0,90	máx. 0,88	0,86 a 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;  $\nu$  viscosidade cinemática;  $\rho$  densidade. Normas: ANP 255 (Brasil); US ASTM 675 (Estados Unidos); EN 14214 (União Europeia)

\*Adaptado de Visentin (2020)

Mesmo que algumas das propriedades físico-químicas possam estar fora da faixa adequada, é sempre possível misturar uma parte de diesel ao biodiesel microalgal renovável de forma a adequar determinados pontos, tornando-o a sua utilização viável tecnicamente.

Um outro ponto a ser destacado são os elevados teores de ácidos graxos essenciais apresentados na Tabela 12, extraído desta cianobactéria nas condições de cultivo a partir de um subproduto do setor sucroenergético. Este potencial poderia ser explorado em outras aplicações ainda mais nobres como nas indústrias

alimentícia e farmacêutica, ampliando o campo de aproveitamento da biomassa microalgal. Nos últimos anos tem sido dada uma atenção muito particular aos lipídios de microalgas, os quais são constituídos de ácidos graxos com 12 a 24 átomos de carbono, incluindo os ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-3 ou n-6 (n-3 PUFAs e n-6 PUFAs, respectivamente), também chamados de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6. Nesse sentido, conforme apresentado na Tabela 12, cerca de 30% do total do óleo obtido refere-se aos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), produtos de alto valor agregado que são caracterizados por seus benefícios para a saúde humana e animal. Os PUFAs podem atuar na prevenção e tratamento de diversas doenças cardiovasculares, sendo considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral (SIMOPOULOS, 2002). Neste contexto, as suas propriedades dos óleos com esta composição levam a um interesse central no desenvolvimento de novos ingredientes ou compostos para vários setores, incluindo a indústria alimentícia e farmacêutica, na obtenção de produtos com elevado valor comercial. A ingestão dietética de n-3 PUFAs é reconhecidamente destacada na redução de riscos no desenvolvimento de problemas cardiovasculares (Remize et al., 2021). O fato é que, até o momento, as microalgas ainda são pouco exploradas e valorizadas como fonte natural para uma alimentação saudável. Apenas algumas espécies são produzidas comercialmente com viabilidade econômica, dentro dos padrões e regulamentações de segurança alimentar, principalmente na Europa. Desta forma, pode-se afirmar que há um elevado potencial de produção e comercialização dos mais diversos produtos derivados desta biomassa nos próximos anos.

### **5.5 Proposta de biorrefinaria microalgal a partir do cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça**

A partir dos resultados obtidos, é possível propor um sistema que integre a geração de vinhaça nas Usinas de Açúcar e Álcool com a produção de biomassa microalgal, com a busca pelo aproveitamento de todos os subprodutos no circuito conhecido como biorrefinaria microalgal. Assim, a Figura 30 ilustra o que seria a sequência de processos envolvendo diversas operações unitárias. Cada tonelada de cana-de-açúcar processada no Brasil através dos processos convencionalmente

utilizados aproximadamente 60 kg de açúcar e 50 L de etanol, considerando uma destilaria anexa. Além disso, terá como subprodutos 250 kg de bagaço, comumente usados na cogeração de energia, 40 kg de torta de filtro e 500 L de vinhaça. Para fins de estimativa, foi considerado um aproveitamento de 1 m<sup>3</sup> de vinhaça, ou seja, o que seria equivalente à moagem de 2 toneladas de cana-de-açúcar.

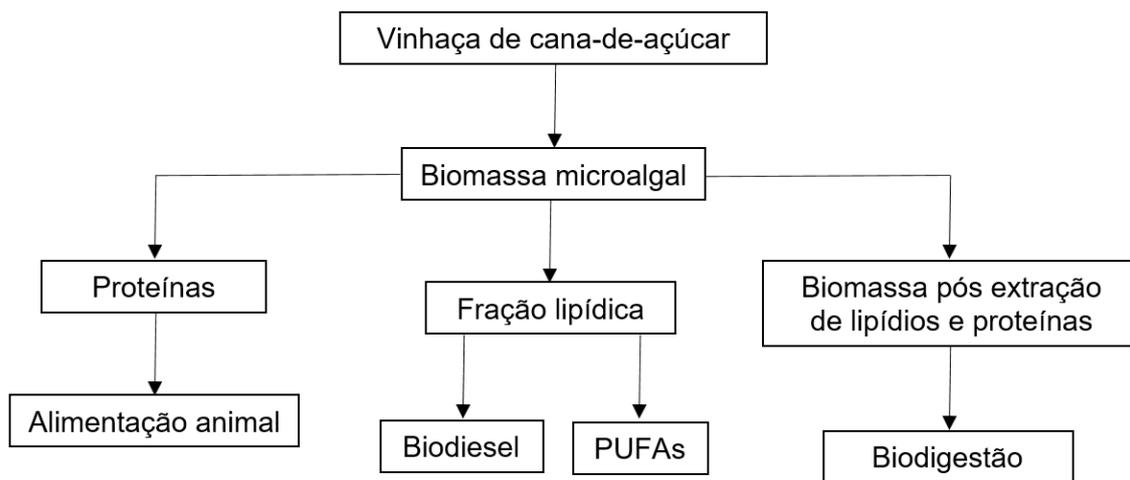


Figura 30 - Proposta de biorrefinaria microalgal integrada ao processamento de cana-de-açúcar no Brasil (Cultivo de *Phormidium autumnale* em vinhaça com resfriamento progressivo)

A biomassa microalgal cultivada em vinhaça seria separada do meio de cultivo por centrifugação, sendo realizada a extração de lipídios e proteínas. Cabe ressaltar que a microalga *Phormidium autumnale*, por ser filamentosa, apresenta uma grande vantagem em termos de recuperação mais facilitada do meio de cultivo. A biomassa pós extração das proteínas e lipídios poderia então ser encaminhada para um biodigestor, gerando biogás que supriria em termos energéticos parte das operações de separação. No caso da fração lipídica, os PUFAs poderiam ser separados para aplicações mais nobre, alimentação por exemplo, enquanto o restante do óleo seria encaminhado para transesterificação e obtenção do biodiesel. Assim, considerando a proposta ilustrada na Figura 30, é possível estimarmos a quantidade de biomassa e produtos obtidos utilizando valores experimentais e algumas referências.

Conforme apresentado na Tabela 14, tendo como base o aproveitamento de 1 m<sup>3</sup> (1000 L) de vinhaça, oriundo do processamento de aproximadamente 2 toneladas de cana-de-açúcar numa destilaria anexa), seriam obtidos em torno de 7,43

kg de biomassa de *Phormidium autumnale* na proposta de cultivo com resfriamento progressivo. Assim, partindo-se desta quantidade e considerando a composição da biomassa determinada (Tabela 10) seriam obtidos cerca de 3,95 kg, quantidade que poderia ser utilizada na alimentação animal. 0,70 kg de óleo poderiam ser encaminhados para a obtenção de 0,77 L de biodiesel microalgal ou 0,54 L com o aproveitamento dos PUFAs.

*Tabela 14 - Balanço de massa da proposta de aproveitamento da vinhaça a partir do cultivo de Phormidium autumnale*

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>	<b>Referência</b>
Vinhaça	1 m <sup>3</sup>	Base de cálculo (valor adotado)
TOC na vinhaça	8955 mg L <sup>-1</sup>	Experimental (Tabela 2)
Rendimento de TOC em biomassa	0,83 g g <sup>-1</sup>	Experimental (Tabela 10)
Biomassa microalgal gerada	7,43 kg	Calculado
Proteínas microalgais	3,95 kg	Calculado
Lipídios microalgais	0,70 kg	Calculado
PUFAs	0,21 kg	Calculado
Densidade do óleo microalgal	0,9 g cm <sup>-3</sup>	Batista et al., 2018
Biodiesel gerado	0,77 L	Calculado
Biodiesel excluindo os PUFAs	0,54 L	Calculado
Biomassa remanescente para biodigestão	2,8 kg	Calculado
Rendimento de microalgas em metano	0,3 m <sup>3</sup> kg <sup>-1</sup>	Ehimen et al., 2011
Metano produzido pelo resíduo da biomassa	844 L	Calculado

Como restariam cerca de 2,8 kg de biomassa remanescente por m<sup>3</sup> de vinhaça, esta quantidade poderia ser encaminhada para um processo de digestão anaeróbia, gerando em torno de 844 L de metano a partir do rendimento citado na literatura (Ehimen et al., 2011). Cabe ressaltar que a quantidade de biogás produzido poderia ser ainda maior se fosse utilizada a vinhaça remanescente e/ou parte da torta de filtro. No entanto, como tais subprodutos apresentam geralmente aplicações agrícolas, a tabela apresenta os dados do uso exclusivo da biomassa microalgal. Como uma usina de cana-de-açúcar no Brasil de porte médio processa em torno de 10 mil toneladas, a quantidade diária de vinhaça seria 5000 vezes maior, levando a

valores estimados bem superiores aos apresentados na tabela. Além disso, outros bioprodutos oriundos da biomassa poderiam ser considerados, como pigmentos, com destaque para a ficocianina nas cianobactérias. Assim, os resultados apresentados na Tabela 14 sugerem a viabilidade da proposta de biorrefinaria microalgal integrada ao setor sucroenergético, com um potencial portfólio de diversos produtos e bioenergia.

## 5.6 Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar ensaios em biorreator de bancada visando a obtenção de maior quantidade de biomassa e o estabelecimento de parâmetros para o escalonamento desta produção;

- Conduzir ensaios de biodigestão da biomassa com e sem tratamento, assim como com a vinhaça remanescente;

- Avaliar a qualidade da proteína de *P. autumnale* cultivada em vinhaça em termos da sua composição de aminoácidos.

- Realizar uma análise econômica da biorrefinaria microalgal integrada ao setor sucroenergético.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais foi possível concluir que:

- Os parâmetros cinéticos indicaram crescimento lento da *P. autumnale* em vinhaça a 45°C, com velocidades superiores a 25 e 35°C;
- No cultivo em vinhaça com resfriamento progressivo, a maior produtividade em biomassa (90 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi obtida no período onde a temperatura ficou mantida em 40°C, levando a uma produtividade lipídica global de 67,54 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> considerando todo o período de resfriamento da vinhaça;
- As remoções de carbono e nitrogênio ficaram em torno de 30%, havendo duas etapas de consumo que seguiram os diferentes perfis de crescimento da biomassa;
- O óleo obtido na biomassa gerada apresentou 59% de ácidos graxos saturados, 4% de mono-insaturados e 29% de poli-insaturados, o que indicou grande parte das propriedades do biodiesel dentro dos padrões internacionais;
- Os resultados indicam um potencial de obtenção de lipídios microalgais por *P. autumnale* cultivada em vinhaça de cana-de-açúcar em um sistema de biorrefinaria.

## 7 LITERATURA CITADA

- 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>>.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21<sup>o</sup> ed.
- ANAND, N. (1998). Cyanobacterial taxonomic – classical concepts and modern trends. In: Subramanian, G., Kaushik, B.D., Venkataraman, G.S. (Eds.), Cyanobacterial Biotechnology. Science Publishers Inc., USA, pp. 337–340.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo. Londrina: IAPAR, v.1, 2014.
- ASTMD6751, Standard Specification for biodiesel Fuel (B100). Blend Stock for Distillate Fuels. In: ASTM International West Conshohocken. P.A. 2002.
- BARBOSA, Sílvia Mariana da Silva. Utilização de microalgas e cianobactérias para tratamento de efluentes e produção lipídica. 2019. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2019. Disponível em: <<https://attena.ufpe.br/handle/123456789/36168>>. Acesso em: 30 de set. de 2021.
- BASTOS, R.G.; QUEIROZ, M.I.; ALMEIDA, T.L.; BENERI, R.L.; ALMEIDA, R.V. & PADILHA, M. (2004) Remoção de nitrogênio e matéria orgânica do efluente da parboilização do arroz por *Aphanothece microscopica Nägeli* na ausência de luminosidade. Revista da Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 9 (2), p.112-116.
- BASTOS, R.G.; SILVA, M.A.; MATTOS, L.F.A.; ANDREATTO JUNIOR, L. C., CODATO ZUMPANO, C. B. C. Challenges for microalgae cultivation in sugarcane processing wastewater (vinasse) for biodiesel production: from the bench to pilot-scale. In: Eduardo Jacob-Lopes; Leila Zepka; Ihana Severo; Mariana Maroneze. (Org.). 3rd Generation Biofuels Disruptive Technologies to Enable Commercial Production. 1ed.: 2022, p. 01-25.
- 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, R.G.; PAIVA, P. R.; RIGO, Mauricio. Cultivo de *Aphanothece microscopica Nägeli* a partir de açúcares. *Bioscience Journal*, v. 27, n. 1, p. 156–161, 2011.
- BASTOS, R. G.; PAIVA, P.R., PARAZZI, C.; VALSECHI, O.A. Cultivo mixotrófico e heterotrófico de cianobactéria em água residuária da indústria sucroenergética. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009, Natal, RN. Anais do XVII SINAIFERM, 2009.
- BATISTA, F. R. M., LUCCHESI, K.W., CARARETO, N.D.D., COSTA, M.C.D., MEIRELLES, A.J.A. Properties of Microalgae Oil from the *Species Chlorella protothecoides* and Its Ethylic Biodiesel. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 35, No. 04, pp. 1383 - 1394, 2018.
- BRASIL, B.S.A.F.; SILVA, F.G.; SIQUEIRA, F.G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. *New Biotechnology*, 39, 90–98. 2017.
- BLIGH, E. G.; DYER, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical and Physiology*, v.37, p.911-917, 1959.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.
- CETESB. Norma Técnica: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, p. 1–12, 2015. <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4\\_231.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Tecnologia/camaras/P4_231.pdf)>.
- 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.

- DUMAS, A.; LALIBERTÉ, G.; LESSARD, P. & DE LA NOÛE, J. Biotreatment of fish farm effluents using cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacultural Engineering*, V. 17, p.57-68, 1998.
- EHIMEN, E.A., SUN, Z.F., CARRINGTON, C.G., BIRCH, E.J., EATON-RYE, J.J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy* 88 (2011) 3454–3463.
- EL-SHEEKH, M., ABOMOHRRA, A. E., & EL-AZIM, M. A. Effect of temperature on growth and fatty acid profile of the biodiesel promising microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Egyptian Academic Society for Environmental Development*. D, *Environmental Studies*, 15(2), 113–119. 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. (1983) *The blue-greens (Cyanophyta-cyanobacteria)*. Ed. Edward Arnold Publishers, 5<sup>a</sup> ed., London, 88p.
- FERREIRA, G.F.; PINTO, L.F.R, MACIEL FILHO, R., FREGOLENTE, L.V. 2021. Effects of cultivation conditions on *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus sp.* grown in sugarcane agro-industry residues. *Bioresource Technology* 342 (2021) 125949.
- FIGUEROA -TORRES, G. M.; WAN MAHMOOD, W.M.A.; PITTMAN, J. K. Microalgal biomass as a biorefinery platform for biobutanol and biodiesel production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 153, n. October 2019, p. 107396, 2020.
- FRANCISCO, E.C.; FRANCO, T.T.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E. From wasttoenergy: the process integration and intensification fo bulk oil and biodiesel production by microalgae. *Journal of Environmental and Chemical Engineering*, v.3, .482-487, 2015.
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. Vinhaça de cana-de-açúcar. *Série Engenharia Agrícola*, v. 1. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 203p.

- GIRARDI, J.C. (2019). Otimização do ponto de entupimento de filtro a frio de biodiesel de babaçu. Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 56p.
- GUPTA, S., PAWAR, S.B., PANDEY, R.A. *et al.* Outdoor microalgae cultivation in airlift photobioreactor at high irradiance and temperature conditions: effect of batch and fed-batch strategies, photoinhibition, and temperature stress. *Bioprocess Biosyst Eng* 42, 331–344 (2019).
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.; DANQUAH, M.K.(2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 14, p.1037-1047.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M.I. E NETTO, F.M. (2006), Protein characterization of the *Aphanothece microscopica Nägeli* cyanobacterium cultivated in parboiled rice effluent. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, v. 26 (2), p.482-488.
- JESUS, G.C.; BASTOS, R. G.; SILVA, M.A. Production and characterization of alginate beads for growth of immobilized *Desmodesmus subspicatus* and its potential to remove potassium, carbon and nitrogen from sugarcane vinasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101438, 2019.
- 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.
- 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.
- KNOTHE, Gerhard; KRAHL, Jürgen; GERPEN, Jon Van. *The Biodiesel Handbook*. 2. ed. Aocs Press, 2010. ISBN: 978-1-893997-62-2.
- MANETTI, A.G.S. (2008) Avaliação do reúso da água residuária oriunda de uma indústria processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscopica Nägeli*. Tese de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS. 85p.

- MARQUES, S.S.I., NASCIMENTO, I.A., DE ALMEIDA, P.F., CHINALIA, F.A., 2013. Growth of *Chlorella vulgaris* on sugarcane vinasse: the effect of anaerobic digestion pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (8), 1933–1943.
- MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and others applications: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, v. 14, p.212-232.
- 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.
- MONTALVO, G.E.B., THOMAZ-SOCCOL, V., VANDENBERGHE, L.P.S., CARVALHO, J.C., FAULDS, C.B., BERTRAND, E., PRADO, M.R.M., BONATTO, S.J.R., SOCCOL, C.R., 2019. *Arthrospira maxima* OF15 biomass cultivation at laboratory and pilot scale from sugarcane vinasse for potential biological new peptides production. *Bioresour. Technol.* 273, 103–113.
- MORAES, Gisely Souza Campos. Produção de biomassa algal e extração de óleo a partir da microalga *Chlorella vulgaris*. Mestrado em Engenharia de Produção, UNESP. 2018. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/180247>>. Acesso em: 30 de set. de 2021.
- MORAIS, Dayane V.; BASTOS, Reinaldo G. Phycocyanin Production by *Aphanothece microscopica Nægeli* in Synthetic Medium Supplemented with Sugarcane Vinasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 187, n. 1, p. 129–139, 2018.
- MORAIS, Dayane Vanessa. Produção de ficocianina por *Aphanothece microscopica Nægeli* a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, UFSCar. Araras 2018. Disponível em: <[https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10249/MORAIS\\_Dayane\\_2018.pdf?sequence=6&isAllowed=y](https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10249/MORAIS_Dayane_2018.pdf?sequence=6&isAllowed=y)>. Acesso em: 30 de set. de 2021.
- NALLEY, J. O., O'DONNELL, D. R., & LITCHMAN, E.. Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria. *Algal Research*, 35, 500–507. 2018.

- NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M.C.; RUBIO, M.C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management* 20, p.581-585, 2000.
- NOVACANA. [Unica] Números finais da safra de cana-de-açúcar 2022/23. NOVACANA. Disponível em: < <https://www.novacana.com/noticias/unica-numeros-finais-safra-cana-de-acucar-2022-23-120423> />. Acesso em: 06 Ago. 2023.
- NOVACANA. Uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar. NOVACANA. [s.d.] Disponível em: < <https://www.novacana.com/noticias/uso-vinhaca-cultura/>>. Acesso em: 06 Ago. 2023.
- O`GRADY, J.; MORGAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 121–125, 2011.
- OLIVEIRA, H. T. Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* CCAP-211/11b. 1988. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) -Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.
- OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v.1, p. 601-610, 1986.
- 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.
- QUEIROZ, M. I., BASTOS, R.G., BENERI, R.L. & ALMEIDA, R.V. (2002) Evaluación del crecimiento de la *Aphanothece microscopica Nägeli* en las aguas residuales de la parbolización del arroz. *Revista Información Tecnológica*, Chile, V. 13 (1). p. 61-65.
- QUEIROZ, M.I.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L.Q.; BASTOS, R.G.; GOLDBECK, R. (2007) 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 (11), p.2163-2169.

- RECK, Nicolli; PINHEIRO, Pricila Nass; VIEIRA, Karem; *et al.* Avaliação da aeração e dos requerimentos de potência em biorreatores heterotróficos microalgais para o tratamento de efluentes agroindustriais. 10º Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental. 2016. PUCRS, Porto Alegre/RS. Disponível em: <[http://www.abesrs.uni5.net/centraldeeventos/\\_arqTrabalhos/trab\\_20161004224044000000111.pdf](http://www.abesrs.uni5.net/centraldeeventos/_arqTrabalhos/trab_20161004224044000000111.pdf)>. Acesso em: 30 de set. de 2021.
- 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.
- REMIZE M, BRUNEL Y, SILVA JL, BERTHON JY, FILAIRE E. Microalgae n-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries. *Mar Drugs*. 2021 Feb 18;19(2):113.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.
- RIPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. (1979) Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, p. 1-61.
- RIZWAN, M., MUJTABA, G. MEMON, S. A. 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, R., GUIHÉNEUF, F., STENGEL, D. B. Algae-derived polyunsaturated fatty acids: implications for human health. *Polyunsaturated fatty acids sources, antioxidant properties and health Benefits*, p. 45–99, 2013.
- SAAVEDRA, Mauricio Daniel Montaña. Processo integrado de eletrocoagulação e cultivo mixotrófico de *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, UFSCar. Araras 2019.
- 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.

- SCHMETTERER, G. (1994) Cyanobacterial Respiration. In: BRYANT, D.A. The Molecular Biology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers. p. 409-435.
- 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.
- SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed. Pharmacoth., v. 56, p. 365-379, 2002
- 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.
- SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. Bioresource Technology, v.124, p.157-162, 2012.
- 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.
- TAM N.F.Y.; WONG, Y.S. (1996) Effect of ammonia concentration on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. Bioresource Technology, v. 57, p. 45-50.
- TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. (2000) Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. Environmental Pollution 107, p. 145-151.
- TAM, N.F.Y.; WONG; J.P.K.; WONG, Y.S. (2001) Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and *WW1* for cyclic nickel biosorption. Environmental Pollution, v. 114, p.85-92.
- TREVISAN, E., GODOY, R.F.B., RADOMSKI, F.A.D., CRISIGIOVANNI, E.L., BRANCO, K.B.Z.F., ARROYO, P.A., 2020. *Chlorella vulgaris* growth in different

- bio digested vinasse concentrations: biomass, pigments, and final composition. *Water Sci. Technol.* 82, 1111–1119.
- 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.
- VASCONCELOS, V.M.; PEREIRA, E. (2001) Cyanobacteria diversity and toxicity in a wastewater treatment plant (Portugal). *Waster Research*, v. 35 (5), p. 1354-1357.
- VIEIRA, Karem Rodrigues. Desodorização de água residuária a partir do cultivo heterotrófico microalgal. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela Universidade Federal de Santa Maria. 2016. Disponível em: <[https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/17687/DIS\\_PPGCTA\\_2016\\_VIEIRA\\_KAREM.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/17687/DIS_PPGCTA_2016_VIEIRA_KAREM.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 30 de set. de 2021.
- VISENTIN, T. G. Produção de bioprodutos a partir do cultivo batelada e batelada alimentada de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar. 2020. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente. Araras 2020.
- WARBURG, O., CHRISTIAN W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384-421.