



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

**Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes
de luz**

Andréa Cristina Moralez de Souza

São Carlos – 2016



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

**Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes
de luz**

Andréa Cristina Moralez de Souza

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

Orientadora: **Prof^a Dr^a Ana Teresa Lombardi**

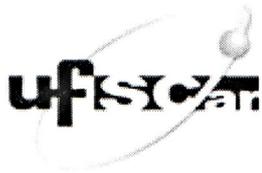
São Carlos – 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S729c Souza, Andréa Cristina Moralez de
Cultivo de Chlorella vulgaris em diferentes
concentrações de vinhaça e fontes de luz / Andréa
Cristina Moralez de Souza. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
81 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Chlorella vulgaris. 2. Efluentes. 3.
Microalgas. 4. Vinhaça. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Andréa Cristina Moralez de Souza, realizada em 08/04/2016:

Prof. Dr. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Westey Oliveira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Paula Cristina Garcia Manoel Crnkovic
EESC/USP

Profa. Dra. Raquel Andrade de Rossi
ALGAE

Dedico este trabalho à memória do Prof. Sergio Rodrigues Fontes.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter conduzido meus caminhos e permitido concluir mais esta etapa da minha vida;

Aos meus pais João André e Maria Aparecida que sempre me incentivaram com meus estudos;

À minha irmã Alessandra pela parceria constante;

Ao meu marido Everton, pela compreensão, pela cumplicidade, pelo companheirismo e pelo apoio ao longo de cada etapa deste trabalho;

À professora Ana Teresa Lombardi pela orientação, pelo legado de conhecimento e ética;

Ao técnico do Departamento de Botânica, Carlos Casali pelo imenso apoio na parte prática desta pesquisa;

À Prof^a Dra. Paula Manoel Crnkovic do departamento de Engenharia Térmica e Fluidos da Escola de Engenharia de São Carlos na Universidade de São Paulo pelas análises térmicas;

Aos meus queridos amigos do laboratório de Biotecnologia de Algas pela ajuda e pelo apoio:

Adriano Marchello, Alex Claudino, Camila Cândido, Daniela Mariano, Eduardo Camargo, Graziela Montanhim, Monica Bonini, Raquel Rossi, Silvia e em especial à Jaqueline Carmo;

Ao estagiário de pré iniciação científica Douglas Oliveira pelo apoio e participação neste trabalho;

À Dra Giseli Swerts pela ajuda na preparação das análises de ácidos graxos;

À Dra Renata Haneda pela co-orientação no início deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais;

À Usina São Francisco por ter gentilmente cedido a vinhaça para os experimentos;

Ao professor Reinaldo Gaspar Bastos, do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio Economia Rural (UFSCar – *campus* Araras), pela disponibilidade dos equipamentos ao longo do trabalho;

À Ocean Sciences - Memorial University Laboratory of Newfoundland, Newfoundland, Canadá pelas análises de ácidos graxos.

.

RESUMO GERAL

O efluente da indústria sucroalcooleira conhecido como vinhaça apresenta altos teores de matéria orgânica e nutrientes que podem ser utilizados no cultivo de microalgas com as vantagens de baixo custo e reaproveitamento de subprodutos. Este trabalho propõe investigar a melhor condição de cultivo de *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890) em vinhaça orgânica tratada e diluída nas concentrações de 10 a 60%. Salienta-se que a vinhaça carrega consigo microrganismos como bactérias e leveduras e, apesar do tratamento prévio aos cultivos algais, os outros microrganismos estiveram sempre presentes. Para o crescimento algal, testamos inicialmente diferentes fontes de luz (fluorescente, LED branco quente e LED branco quente com vermelho). Foi sempre garantida a mesma intensidade luminosa ($120\mu\text{mols m}^2\text{s}^{-1}$) para todas as concentrações de vinhaça. Foi avaliada a densidade celular algal, o pH e a condutividade ao longo de 96 horas. O melhor resultado quanto ao crescimento de *C. vulgaris* foi obtido em vinhaça 20% na presença de LED branco quente e vermelho com taxa de crescimento ($1,45\text{ d}^{-1}$), superior ao controle ($1,29\text{ d}^{-1}$). Numa etapa seguinte foi realizado o cultivo microalgal na melhor condição testada (vinhaça 20%) para avaliação dos parâmetros fotossintéticos e bioquímicos da biomassa produzida, além da caracterização físico-química da vinhaça antes e após o cultivo. Os resultados mostraram redução da eficiência fotossintética e da concentração de clorofila a ao longo do período experimental, sugerindo metabolismo mixotrófico possivelmente decorrente da presença de carbono orgânico. Verificou-se que a produção de biomassa foi 40% maior no cultivo em vinhaça em comparação ao controle. A produção de proteínas e ácidos graxos também foi maior na biomassa mantida em vinhaça do que no controle. O cultivo dos organismos levou à redução significativa dos valores de nitrogênio (98%) e potássio (70%) na vinhaça orgânica. Esta pesquisa mostrou que o cultivo de microalgas em vinhaça reduziu o teor de nutrientes do resíduo, fator de grande impacto ao ser descartado no ambiente e produziu uma biomassa com alto teor de proteínas e presença de ácidos graxos que conferem elevado valor comercial, podendo ser investigada para produção de ração animal. A experiência acadêmica relativa a este estudo foi ainda contribuinte da educação formal no ensino médio de uma escola da rede pública.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*, efluentes, microalgas, vinhaça.

ABSTRACT

The effluent from the sugarcane (sugar and ethanol) industry known as vinasse presents high content of organic matter and nutrients that can be used in the cultivation of microalgae with the advantages of low cost and reuse of byproducts. This work proposes to investigate the best cultivation condition of *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890) in agroecological vinasse treated and diluted in concentrations from 10% to 60%. It is noted that the vinasse carries microorganisms as bacteria and yeasts, and despite previous treatment of algal cultures, other microorganisms were always present. For algal growth, we initially tested different light sources (fluorescent, hot white LED and hot white with red LED). It was guaranteed the same light intensity ($120\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for any of the vinasse concentrations. It was assessed the algal cell density, the pH and conductivity over 96 hours. The best result for growth of *C. vulgaris* was obtained in vinasse 20% in the presence of hot white and red LED with a growth rate (1.45 d^{-1}), higher than the control (1.29 d^{-1}). In a next step it was performed the microalgae cultivation in the best condition tested (20% vinasse) to evaluate the photosynthetic and biochemical parameters of biomass produced in addition to the physicochemical characterization of vinasse before and after cultivation. The results showed a reduction of the photosynthetic efficiency and chlorophyll concentration during the experimental period, suggesting mixotrophic metabolism possibly due to the presence of organic carbon. We observed that the biomass production was 40% higher in the vinasse in culture as compared to the control. The production of proteins and fatty acids was also higher in the biomass held in vinasse than in the control. The cultivation of the organisms led to a significant reduction of nitrogen levels (98%) and potassium (70%) in organic vinasse. This research has shown that microalgae cultivation in vinasse reduced the nutrient content of the residue, this factor has high impact when discarded in the environment and produced a biomass with high protein content and the presence of fatty acids that confer high commercial value, it can be investigated for the production of animal feed. The academic experience related to this study was also contributor of formal education in high school from a public school.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, waste, microalgae, vinasse.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1.

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Local de coleta da vinhaça na Usina sucroalcooleira Santa Lucia em Araras..... | 27 |
| Figura 2 – Células peletizadas..... | 29 |
| Figura 3 – Algas imobilizadas em solução indicadora de pH..... | 30 |
| Figura 4 - Imagem da coloração da solução indicadora de pH, da esquerda para a direita, aumento da distância de exposição à luz. | 30 |
| Figura 5 – Imagem da coloração da solução indicadora de pH, da esquerda para a direita com o aumento da exposição à luz. | 31 |

Capítulo 2.

| | |
|---|----|
| Figura 1- Ensaio experimental com cultivo de <i>C. vulgaris</i> em diferentes concentrações de vinhaça. Triplicatas experimentais da esquerda para a direita representam as concentrações de 10, 20 e 30%..... | 42 |
| Figura 2 - Densidade celular em culturas de <i>C. vulgaris</i> em função do tempo experimental para as diversas concentrações de vinhaça. Tratamento LED branco quente com LED vermelho. Símbolos: ■ Controle; concentrações de vinhaça ○10%, ▲20%, ▽30%; ◆40%; ◁50%; ►60%..... | 45 |
| Figura 3 - Densidade celular (cel mL ⁻¹) final (96 h) em culturas de <i>C. vulgaris</i> para as diversas concentrações de vinhaça. Símbolos – barras pretas: lâmpadas fluorescentes; barras brancas: LED branco; barras cinza: LED branco e vermelho. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas comparando-se as fontes de luz dentro de cada concentração de vinhaça. | 45 |
| Figura 4 - Taxas de crescimento nas culturas de <i>C. vulgaris</i> nas várias concentrações de vinhaça (10 – 60%) expostas às diferentes fontes de luz. Símbolos: □ Fluorescente; * LED branca; ◇ LED branca com vermelha. | 46 |
| Figura 5 - Valores de pH em 96 h para as culturas em diferentes concentrações de vinhaça. Símbolos: □ Lâmpada fluorescente; ◇ LED branco e vermelho; *LED branco..... | 47 |
| Figura 6 - Valores de condutividade elétrica em 96 horas para as culturas em diversas concentrações de vinhaça. Símbolos representados por: □ Lâmpadas fluorescentes; ◇ LED branco e vermelho; *LED branco..... | 47 |

Capítulo 3.

Figura 1 - Imagem do ensaio experimental no cultivo de *C. vulgaris* em A) meio L.C. Oligo modificado e B) na melhor condição testada (vinhaça 20%). 62

Figura 2 - Valores de eficiência fotossintética nos tratamentos controle e em vinhaça ao longo dos quatro dias de experimento. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$). 68

Figura 3 - Valores de clorofila (mg/L) nos tratamentos controle e em vinhaça ao longo de 4 dias de experimento. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas para ($p < 0.05$). 68

Figura 4 - Curvas termogravimétrica (TG) e derivada da termogravimétrica (DTG) em A, vinhaça e, em B, o controle. As etapas da combustão são definidas nas etapas 1,2,3 e 4. 72

Figura 5 – Curva termogravimétrica (TG) em e derivada da termogravimétrica (DTG), dos cultivos vinhaça 20% e controle (LC Oligo). 73

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

Tabela 1 - Relação das áreas de conhecimento com as atividades desenvolvidas e o conteúdo trabalhado juntamente com o aluno estagiário durante o trabalho de pesquisa de doutorado. 26

Capítulo 2.

Tabela 1 - Intensidade de luz incidente/interna ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ao in\ic\iio dos experimentos. 41

Tabela 2 – Caracteriza\c\ao f\isico-qu\imica da vinha\c\aa bruta de acordo com os requerimentos da norma P 4.321- CETESB..... 44

Capítulo 3.

Tabela 1 - Composi\c\ao das solu\c\oes utilizadas (1 – 8) para confec\c\ao do meio LC Oligo (AFNOR, 1980).. 61

Tabela 2 - Caracteriza\c\ao da vinha\c\aa pr\ee p\os-cultivo. Caracteriza\c\ao f\isico-qu\imica da vinha\c\aa 20% antes e ap\os o cultivo de *C. vulgaris*. Todas as concentra\c\oes s\ao reportadas em mg L^{-1} 69

Tabela 3 - Concentra\c\ao de carboidratos, prote\im\as e lip\idios (mg cel^{-1}); valores de biomassa seca (mg L^{-1}). Dados referentes aos cultivos em vinha\c\aa e controle em meio LC Oligo nas fases exponencial (48h) e estacion\aria (96h) de crescimento das c\elulas de *C. vulgaris*. 70

Tabela 4 - Perfil de \c\acidos graxos. Valores em percentual (%) da composi\c\ao da classe lip\idica detectadas em condi\c\oes de cultivo em meio L.C. Oligo e vinha\c\aa dilu\ida em 20% 71

Tabela 5 - Etapas de perda de massa (%) e faixa de varia\c\ao de temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Amostras controle e vinha\c\aa ao longo do processo de combust\ao..... 72

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

DBO – demanda bioquímica de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

PAM - fluorescência com amplitude de pulso modulada

pH – potencial hidrogeniônico

TGA - análise termogravimétrica

DTG – derivada da termogravimétrica

LED – diodo emissor de luz

LDBEN – lei de diretrizes e bases da educação nacional

COT – carbono orgânico total dissolvido

NOT - nitrogênio orgânico total dissolvido

ϕ_m - rendimento fotossintético máximo

SAFA – ácidos graxos saturados

MUFA – ácidos graxos monoinsaturados

PUFA – ácidos graxos poli-insaturados

ω_3 – Ômega três

Sumário

| | |
|------------------------|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| OBJETIVOS | 17 |
| REFERÊNCIAS | 18 |

Capítulo 1. A PESQUISA CIENTÍFICA COMO CONTRIBUINTE DA EDUCAÇÃO FORMAL

| | |
|--|----|
| RESUMO | 20 |
| ABSTRACT | 21 |
| 1.INTRODUÇÃO | 22 |
| 2.METODOLOGIA | 24 |
| 2.1.1ª Etapa: Embasamento teórico e prático sobre produção sucroalcooleira e o cultivo de microalgas | 27 |
| 2.2. 2ª Etapa: Acompanhamento dos experimentos em laboratório | 28 |
| 2.3. 3ª Etapa: Socialização da aprendizagem | 28 |
| 2.4. Atividade experimental para socialização: Fotossíntese e respiração | 29 |
| 3.CONSIDERAÇÕES FINAIS | 31 |
| 4.REFERÊNCIAS | 32 |

Capítulo 2. INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE LUZ NO CRESCIMENTO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR FILTRADA

| | |
|--|----|
| RESUMO | 34 |
| ABSTRACT | 35 |
| 1.INTRODUÇÃO | 36 |
| 2.MATERIAL E MÉTODOS | 40 |
| 2.1. Microalgas | 40 |
| 2.2. Vinhaça | 41 |
| 2.3. Parâmetros monitorados nos experimentos | 42 |
| 2.3.1. Densidade celular | 42 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 2.3.2. Condutividade e pH..... | 43 |
| 2.4. Análise estatística..... | 43 |
| 3. RESULTADOS..... | 43 |
| 4.DISSCUSSÃO..... | 48 |
| 5.CONCLUSÕES..... | 51 |
| 6.REFERÊNCIAS..... | 51 |

Capítulo 3. CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA: ASPECTOS DA FISIOLOGIA CELULAR

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 55 |
| ABSTRACT..... | 56 |
| 1.INTRODUÇÃO..... | 57 |
| 2.MATERIAL E MÉTODOS..... | 59 |
| 2.1.Vinhaça..... | 59 |
| 2.2.Inóculo..... | 60 |
| 2.3.Experimentos..... | 61 |
| 2.4.Crescimento populacional de <i>C. vulgaris</i> | 62 |
| 2.5.Parâmetros fotossintéticos de <i>C. vulgaris</i> | 62 |
| 2.6.Caracterização da vinhaça..... | 63 |
| 2.7.Biomassa Seca e Composição Bioquímica..... | 64 |
| 2.8.Extração de ácidos graxos..... | 65 |
| 2.9.Análise térmica..... | 66 |
| 2.10.Análise Estatística..... | 67 |
| 3.RESULTADOS..... | 67 |
| 4.DISSCUSSÃO..... | 74 |
| 5.CONCLUSÕES..... | 77 |
| 6.REFERÊNCIAS..... | 78 |

INTRODUÇÃO GERAL

O acúmulo dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes industriais, domésticos e agrícolas podem provocar a poluição do solo e de reservatórios de água (Karthikeyan et al., 2010). Em vista disso, estão sendo investigadas tecnologias de reutilização de efluentes para o aproveitamento de subprodutos (Gupta et al., 2012; Bhatti et al., 2015) ou seja, os efluentes podem ser utilizados como insumos para produção de novos produtos (Mateo & Maicas, 2015).

Nas últimas décadas o uso de microalgas fotossintetizantes tem sido investigado no tratamento de efluentes devido à alta capacidade de remoção dos compostos orgânicos com vantagens econômicas, pelo potencial de produção de biomassa com elevado valor agregado e interesse comercial (Matos et al., 2015). Além disso, as microalgas são responsáveis pela redução de gases do efeito estufa através da assimilação do gás carbônico (CO₂) atmosférico durante o processo de fotossíntese (Lee, 2008; Chiu et al., 2015).

A microalga *Chlorella vulgaris* apresenta vantagens biotecnológicas por apresentar alta resistência, grande capacidade de adaptação, elevada produção de biomassa e formação de biomoléculas como carboidratos, proteínas, e ácidos graxos (Lee, 2008; Wang & Park, 2015).

Cultivar microalgas em meio de cultura estéril é tarefa relativamente simples, mas em efluentes, que carregam consigo uma mistura de compostos residuais, o cultivo microalgal pode exigir grande experiência. No caso da vinhaça, a presença de compostos orgânicos, coloração escura e outros microrganismos como bactérias e leveduras, podem atuar como agentes complicadores do cultivo algal. A pesquisa biotecnológica de remediação de efluentes propõe que consórcios microbianos formados por microrganismos heterótrofos degradadores da matéria orgânica do efluente e liberadores de CO₂ e elementos minerais, atuam sinergicamente com as microalgas fotossintéticas para favorecer o crescimento microalgal, que por sua vez produzem

oxigênio para os microrganismos (Kouzuma & Watanabe, 2015). Estes efeitos simbióticos são de grande vantagem na produção de biomassa em resíduos, a qual é passível de ser utilizada como suplemento na ração animal (Becker, 2007; Marchello, 2013; Alcántara et al., 2015).

A vinhaça é um efluente de coloração escura e rica em nutrientes, gerada em grandes volumes durante o processo de produção do etanol em média de 10 L vinhaça/L etanol (EMBRAPA, 2011). O descarte desse efluente vem trazendo preocupações com a qualidade do solo e da água (Mariano et al., 2009). Graças à presença de nutrientes, esse resíduo pode ser utilizado no cultivo de microalgas, consumidoras dos nutrientes inorgânicos em grande quantidade e, em algumas situações e espécies, capazes também de usar a matéria orgânica dissolvida (Matos et al., 2015). Contudo, a presença de cor e outros compostos nesse resíduo pode ser uma dificuldade ao crescimento algal. Diante disso, determinar o potencial desempenho de crescimento das microalgas é crucial para o progresso da biotecnologia de microalgas tendo a vinhaça como meio nutritivo (Fu et al., 2012).

As condições nutricionais durante os estágios de crescimento das microalgas podem influenciar sua composição bioquímica. Em condições desfavoráveis, as células passam a estocar material de reserva como carboidratos e lipídios (Adarme-Vega et al., 2012), porém a presença dos nutrientes nos efluentes pode promover maior crescimento populacional, aumentando o rendimento proteico (Renaudla et al., 1991; Tam et al., 1996).

Associados aos dados sobre análises bioquímicas, a análise térmica é uma ferramenta que possibilita compreender o sistema de conversão termoquímica nas microalgas (Meier & Faix, 1999). Para isso análise termogravimétrica (TGA) é extensamente utilizada para entender as características pirolíticas, ou seja, as características da degradação durante a combustão. Entretanto, são poucos trabalhos que tratam da análise térmica de microalgas. O trabalho de Peng et al., (2001) mostram a comparação de características pirolíticas entre as microalgas *Spirulina*

platensis e *Chlorella* sp. Observaram que a energia de ativação para pirólise de *Spirulina platensis* é maior que a de *Chlorella* sp, sendo esta última preferível para pirólise.

A remediação de efluentes e tecnologias ambientalmente corretas buscam minimizar danos ambientais e conseqüentemente proporcionar melhor qualidade de vida para a população. Concomitante ao avanço tecnológico é importante voltar atenção para a educação, pois esta é a única maneira de reduzir a desigualdade social, garantir a igualdade de oportunidades e, finalmente melhorar as condições do país como um todo. Considerando a falta de perspectiva para a formação profissional em considerável parcela de jovens, esta pesquisa apresentou, em uma de suas etapas, a interação com o ensino formal. Para isso seguimos a proposta do Currículo Oficial do Estado de São Paulo, onde o conteúdo foi trabalhado de forma contextualizada para a solução de um problema.

O principal problema desta pesquisa foi verificar a viabilidade do uso da vinhaça como meio de cultura para as microalgas fotossintéticas. Para isso, garantimos a penetração de luz em todas as concentrações de vinhaça e utilizamos iluminação por LED.

Esta tese é apresentada em três capítulos em forma de artigos, sendo o primeiro um relato do trabalho didático realizado pelo acompanhamento de um aluno de ensino médio como bolsista de pré iniciação científica de acordo com o programa de bolsa doutorado da Secretaria de Educação do Estado de São Paulo. O segundo capítulo apresenta resultados relativos à investigação da melhor condição de cultivo de *C. vulgaris* em vinhaça no que se refere à fonte e intensidade de luz, concentração de vinhaça e, por fim, o terceiro capítulo reporta os parâmetros de crescimento de *C. vulgaris*, sua composição bioquímica e análise térmica.

OBJETIVOS

O objetivo principal desta pesquisa foi cultivar a microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça estudando os efeitos do resíduo na fisiologia celular. Para isso garantimos a mesma intensidade luminosa interna em todas as concentrações de vinhaça testadas. Numa primeira etapa foi definida a melhor condição e a toxicidade do resíduo e, a seguir iniciou-se o estudo da fisiologia celular analisando: eficiência fotossintética, crescimento algal e composição bioquímica da biomassa. Reforça-se neste momento que a biomassa inclui bactérias e leveduras além da microalga inoculada, *C. vulgaris*, formando desse modo um consórcio microbiano.

Como objetivos específicos, delineamos:

- i) Aproximação do aluno da rede pública dos recursos tecnológicos e científicos da universidade;
- ii) Investigação da melhor condição de cultivo em relação à fonte de luz para cada concentração de vinhaça (0 a 60%);
- iii) Verificação da capacidade de remoção de nutrientes pelo consórcio microbiano;
- iv) Análise da biomassa produzida quanto à composição bioquímica;
- v) Análise termogravimétrica das biomassas produzidas.

REFERÊNCIAS

- Adarme-Vega, T.C. et al. 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microbial Cell Factories*. 11:96.
- Alcántara, C. et al. 2015. Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation. *Appl Microbiol Biotechnology*. 99:2393–2404.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207–210.
- Bhatti, H. N.; Sadaf, S.; Aleem, A. 2015. Treatment of textile effluents by low cost agricultural wastes: batch biosorption study. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25: 284-289.
- Chiu, S. Y. et al. 2015. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology*: 179–189.
- EMBRAPA. Árvore do Conhecimento – Cana de Açúcar. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Brasília, 2011. Disponível: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>.
- Fu, W. et al. 2012. Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 161:242– 249.
- Gupta, V.K. et al. 2012. Chemical treatment technologies for waste-water recycling—an overview. *Royal Society of Chemistry*. 2: 6380–6388.
- Karthikeyan, K., Chandran, C., Kulothangan, S. 2010. Biodegradation of oil sludge of petroleum waste from automobile service station using selected fungi. *J. Ecotoxicol. Environ. Monitor.*, 20: 225-230.
- Kouzuma, A.; Watanabe, K. 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 33:125–129.
- Lee, R.E. 2008. *Phycology*. Fourth edition. United States of America by Cambridge University Press, New York.
- Marchello, A.E. 2013. Cultivo de microalgas e redução de coliformes em efluente de tratamento anaeróbio. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.
- Mariano et al. 2009. The use of Vinasse as an Amendment to Ex-Situ Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil. *Brazilian archives of biology and technology*. 52: 1043-1055.
- Matos, A.P. et al. 2015. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. Cultivated in residual concentrated desalination. *Ciência Rural*, Santa Maria. 45:364-370.

Mateo, J.J. & Maicas, S. 2015. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International on Science Direct*: 13–25.

Meier, D, Fax, O. 1999. State of the art of applied fast pyrolysis of lignocellulosic materials – a review. *Biores. Technol.* 68, 71-77.

Peng, W.;Wu,Q.;Tu,P.;Zhao, N. 2001. Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. *Bioresource Technology*.80:1-7.

Renaudla, S.M. et al. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3: 43-53, 1991.

Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource technology* 57:45-50.

Wang, M. & Park, C. 2015. Investigation of anaerobic digestion of *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp. grown in high-nitrogen wastewater and their co-digestion with waste activated sludge. *Biomass and bioenergy*. 80: 30 – 37.

Capítulo 1

A PESQUISA CIENTÍFICA COMO CONTRIBUINTE DA EDUCAÇÃO FORMAL

Andréa Cristina Moralez de Souza¹, Ana Teresa Lombardi²

RESUMO

O elevado índice de evasão escolar no ensino médio ocasiona problemas sociais e econômicos que poderiam ser prevenidos pela valorização da educação formal. Buscou-se aqui a valorização da educação básica através da aplicação da proposta do Currículo Oficial do Estado de São Paulo à metodologia científica de uma pesquisa de doutorado. Para isso foi feita a conexão entre os conteúdos das áreas de conhecimento do ensino com as atividades realizadas ao longo deste doutoramento. Assim, um aluno do ensino médio foi capacitado pelo embasamento teórico sobre o tema do trabalho de pesquisa (uso do efluente da indústria sucroalcooleira para cultivo de microalgas), bem como pelo manuseio de equipamentos de laboratório utilizados nas análises. Ao final de todas as etapas foi discutida a necessidade do conhecimento do conteúdo curricular. No final do processo, o aluno socializou uma atividade experimental com os pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia de Algas do departamento de Botânica da UFSCar e com os demais alunos da escola durante a feira do conhecimento. Em seguida, o aluno participou de uma ampla discussão sobre a importância da base do ensino formal como principal etapa na formação profissional.

Palavras-chave: educação básica, formação profissional, pesquisa científica.

¹ Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

² Laboratório de Biotecnologia de Algas – UFSCar.

ABSTRACT

The high rate of truancy in high school causes social and economic issues what could be prevented by valuing formal education. This research aims the valuing of basic education through the application of the proposed Official Curriculum of São Paulo State to scientific methodology of a doctoral research. For this, we made a connection between the contents of the teaching knowledge area with the activities performed during this doctorate. In this case, a high school student was enabled by the theoretical background about the subject worked in this research work (use of effluent from the sugarcane (sugar and ethanol) industry for microalgae cultivation), as well as in the handling of laboratory equipment used in the analyzes. At the end of all the steps it was discussed the need of knowledge of curriculum content. At the end of the process, the students socialized an experimental activity with the researchers from the Biotechnology Laboratory of Algae from Botany department of UFSCar and with other school students during the fair knowledge. Then the student took part in a broad discussion about the importance of the base of formal education as a major step in professional qualification.

Keywords: basic education, professional qualification, scientific research.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os setores industriais e econômicos produzem tecnologias tendo como um dos principais segmentos o setor energético, em especial o setor sucoenergético. Neste, o Brasil é o maior produtor mundial de etanol, combustível renovável e menos poluente que os combustíveis fósseis (Bacchi, 2007). Seu processo de produção gera um resíduo conhecido como vinhaça que é atualmente utilizado na fertirrigação do solo do próprio cultivo da cana, podendo provocar a contaminação das águas subterrâneas e saturação do solo (Mariano, 2009; Nitayavardhana et al., 2010) em decorrência do alto poder eutrofizante e salinizante da vinhaça.

Por ser alvo de atenção por parte dos países que buscam reduzir a poluição, o uso do etanol vem sendo discutido em fóruns internacionais que tratam sobre a sustentabilidade (Bacchi & Caldarelli, 2015). Nesse panorama mundial há grande preocupação relacionada ao meio ambiente, à energia e a economia global (Vichi & Mansor, 2009) e, portanto, a adoção de tecnologias limpas e sustentáveis impondo menor risco ao ambiente.

Vários microorganismos sintetizam produtos de interesse aplicáveis nas mais diversas áreas, como saúde, alimentação humana e animal, energia, dentre outras, podendo sua biomassa apresentar alto valor agregado. O cultivo desses microorganismos em resíduos de processos industriais é um novo paradigma que se deseja instalar nas biorefinarias, em que a produção de biomoléculas de alto valor comercial é proveniente da reutilização dos resíduos. Neste caso, as microalgas são tidas como potenciais agentes biorremediadoras (Kouzuma & Watanabe, 2015), pois além de crescerem em ambientes inóspitos, utilizam os nutrientes dos efluentes, ao mesmo tempo em que produzem uma biomassa de alto valor agregado para aplicações comerciais (Alcántara et al., 2015).

Existe um grande empenho científico no desenvolvimento de tecnologias renováveis e sustentáveis, porém numerosas populações carentes vivem afastadas do acesso a esse desenvolvimento tecnológico, muitas vezes até desprovidas do uso de eletricidade ou de um

sistema de mobilidade eficiente. Aliado ao avanço tecnológico e econômico, os investimentos devem ser também voltados à educação da sociedade para garantir a igualdade de oportunidades, já que existe uma relação direta entre a educação e a desigualdade social, econômica e cultural. Segundo Barros et al. (2002) *“A sustentabilidade do desenvolvimento socioeconômico está diretamente associada à velocidade e à continuidade do processo de expansão educacional”*.

De acordo com Tinbergen (1975), a valorização da educação corresponde a uma evolução do sistema educacional e do progresso tecnológico. As análises dos investimentos em ciência e tecnologia apontam para a necessidade do domínio da área tecnológica para inserção do país numa economia globalizada (Corbucci, 2004). Para isso, é necessária a formação de um corpo técnico qualificado de modo a atender as demandas do desenvolvimento tecnológico. Sob o ponto de vista econômico, a expansão da educação é essencial para fomentar o desenvolvimento da economia e reduzir a desigualdade e a pobreza (Barros et al., 2002).

A necessidade do ingresso imediato dos alunos da rede pública no mercado de trabalho por questões associadas à situação econômica, para aumento da renda familiar (Sparta & Gomes, 2005), leva a uma maior procura por ensinamentos técnicos profissionalizantes. Para atender essa demanda, as diretrizes apresentam a implantação de propostas curriculares para o Ensino Médio com ensino profissional (Domingues, 2000). De acordo com Fini & Menezes (2010), na Proposta Curricular do Estado de São Paulo, de acordo com a lei de diretrizes e bases da educação nacional (LDBEN) recomenda-se definir a articulação da educação básica e profissional como finalidade para o Ensino Médio.

Por outro lado o processo formativo da educação profissional prepara trabalhadores para o domínio de técnicas de execução do trabalho no setor produtivo, afastando o aluno de uma formação tecnológica, o que envolve o domínio de princípios científicos e tecnológicos (Oliveira, 2000), ocasionando carência de profissionais com qualificação profissional. Schwartzman & Castro (2013), ao analisarem as características da evolução do mercado de trabalho no Brasil,

verificaram que o país vive um “apagão” de mão de obra qualificada, o que torna urgente a necessidade de fortes investimentos na educação, principalmente na formação para o ensino superior.

Diante disso, o presente trabalho buscou aproximar o aluno de uma escola estadual em região periférica a uma universidade pública, por meio de atividades que relacionam a rotina de um trabalho de pesquisa de doutorado na área de ecologia e recursos naturais com o conteúdo do currículo escolar. A intenção foi valorizar a educação básica e sua importância como principal etapa da formação profissional e sócio-cultural do indivíduo.

2. METODOLOGIA

A intervenção didática foi realizada com um aluno do ensino médio da rede pública do estado de São Paulo, localizada na cidade de São Carlos, no bairro Cidade Aracy por um período de dois anos. As atividades realizadas foram de pré iniciação científica e remunerada no período em que o aluno se encontrava no 2º e 3º ano do ensino médio, nível em que o aluno apresenta requisitos básicos de conteúdo para acompanhamento dos trabalhos. O aluno foi selecionado primeiramente pelo interesse e pela disponibilidade de horário e passou a frequentar as dependências do Laboratório de Biotecnologia de Algas, onde participava da realização dos experimentos desta pesquisa e de reuniões de discussão em grupo.

Nesse trabalho buscou-se utilizar o tema deste doutorado (Cultivo de *Chlorella vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça e fontes de luz) como instrumento de aplicação dos princípios da Proposta Curricular do Estado de São Paulo na área de Ciências da Natureza e suas tecnologias pela articulação entre os conteúdos de Língua Portuguesa, Matemática, Física, Química e Biologia como mostrado na tabela 1.

Após realizar e analisar os parâmetros utilizados como amostragens durante todo o trabalho de pesquisa deste doutoramento, havia momentos em que o aluno se encontrava com a aluna de doutorado para discutir as principais etapas do trabalho, como o uso dos equipamentos, os resultados, a finalidade e importância de cada parâmetro utilizado. Em seguida foram feitas as relações de todas as atividades desenvolvidas em laboratório, com os conteúdos das áreas do conhecimento do currículo escolar, para que o aluno pudesse fazer a correlação das áreas de conhecimento entre si, associando à pesquisa científica. Para isso foram utilizados: livros didáticos, *sites* educativos, apostilas do Currículo Oficial do estado de São Paulo das áreas do conhecimento abordadas e revistas científicas. O trabalho com o aluno (estagiário) do ensino médio foi realizado em 3 etapas descritas a seguir.

Tabela 1 - Relação das áreas de conhecimento com as atividades desenvolvidas e o conteúdo trabalhado juntamente com o aluno estagiário durante o trabalho de pesquisa de doutorado.

| Áreas | Atividades desenvolvidas | Conteúdo Trabalhado |
|-------------------|--|--|
| Língua portuguesa | Expressão Oral | Leitura e interpretação textos. |
| | Leitura de textos científicos. | |
| Física | Uso de equipamentos: | Óptica |
| | espectrofotometria, | Absorbância/Transmitância |
| | eficiência fotossintética e clorofila | Fluorescência |
| | Pesagem de Reagentes | Rendimento quântico Destilação Volume, Densidade |
| Química | Preparo de Meio de cultura | Compostos orgânicos e inorgânicos |
| | Análise de pH | Ligações iônicas |
| | Análise de condutividade | Identificação, uso e manuseio de |
| | Análise: composição da vinhaça | vidrarias em laboratório |
| | Análises bioquímicas | |
| Biologia | Cultivo de microalgas | Fotossíntese, Respiração e |
| | Repicagem de cepas | Fermentação |
| | Segurança em laboratório | Fases de crescimento de |
| | Visita às usinas sucroalcooleiras | microrganismos |
| | Contagem de células | Identificação microrganismos Microbiologia |
| Matemática | Análise e interpretação de dados | Crescimento exponencial, |
| | Construção e interpretação de gráficos | Logaritmo |
| | Unidade de medidas | Estatística, Construção de gráficos |
| | | |

A seguir apresenta-se as etapas do trabalho com o aluno do ensino médio.

2.1.1. 1ª Etapa: Embasamento teórico e prático sobre produção sucroalcooleira e o cultivo de microalgas

Nesta primeira etapa buscou-se trabalhar as competências da prioridade da leitura e escrita e, a relação entre a teoria e a prática. Desta forma, foi feito juntamente com o aluno um trabalho de pesquisa em artigos científicos e discussão sobre todas as etapas da produção do etanol, bem como de seu efluente conhecido como vinhaça. Foram realizados estudos sobre a produção da cana-de-açúcar, o processo produtivo do açúcar e do etanol, bem como a geração de efluentes e sua aplicação nos processos de fertirrigação, além de pesquisa sobre a fisiologia das microalgas, o processo de fotossíntese e sua importância na redução do aquecimento global pela fixação de CO_2 e, finalmente a utilidade biotecnológica das microalgas.

Feito o estudo teórico, o aluno visitou duas usinas sucroalcooleiras: a Usina Santa Lucia na cidade de Araras (Figura 1), com uma produção convencional de açúcar e etanol e a Usina São Francisco localizada na cidade de Sertãozinho com uma produção orgânica desde a plantação da cana-de-açúcar até o processo de produção de açúcar e etanol. Durante as visitas o aluno acompanhou todo processo de produção da usina e participou da coleta das amostras que foram utilizadas para os experimentos do projeto de doutorado em laboratório.



Figura 1 - Local de coleta da vinhaça na Usina sucroalcooleira Santa Lucia em Araras

2.2. 2ª Etapa: Acompanhamento dos experimentos em laboratório

Nesta segunda etapa, foram trabalhadas as articulações das competências para aprender, a relação entre a teoria e a prática e as relações entre a educação e a tecnologia. Nesse caso, após garantir um embasamento teórico necessário para acompanhar o trabalho de pesquisa deste doutoramento, o aluno passou a participar das atividades experimentais no laboratório de biotecnologia de algas (UFSCar), pelo uso de todos os equipamentos disponíveis no laboratório, juntamente com a aluna de doutorado e o técnico responsável. Após adquirir domínio do uso dos equipamentos, o aluno passou a acompanhar o cultivo de uma cepa de microalga, durante seu ciclo de crescimento completo, com o uso de programas para análise estatística dos dados e elaboração de gráficos.

Tendo garantido o domínio do cultivo de microalgas e dos equipamentos, o aluno passou a participar das atividades experimentais, auxiliando no desenvolvimento dos experimentos realizados. Após o final de cada experimento, foi feito com o aluno a articulação entre os conteúdos das áreas de conhecimento de Matemática, Biologia, Química e Física, relacionados na tabela 1 e utilizados durante o desenvolvimento do trabalho de pesquisa.

2.3. 3ª Etapa: Socialização da aprendizagem

Nesta terceira etapa foram trabalhadas as competências da escola que aprende e a prioridade para o contexto do trabalho. Neste caso, tendo garantida a base teórica e prática, o aluno passou a socializar o conhecimento adquirido nas aulas de Biologia, Química, Física e Matemática para motivar os demais alunos sobre a importância do aprendizado do conteúdo formal. Além disso, o aluno preparou uma atividade prática sobre fotossíntese e respiração descrita a seguir, e apresentou para os demais alunos em sala de aula, na Feira do conhecimento e para os pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia de Algas – UFSCar.

2.4. Atividade experimental para socialização: Fotossíntese e respiração

Para essa atividade experimental foi necessário realizar a imobilização das microalgas em formatos de pequenas bolas (*pelletes*) de alginato para parcialmente isolar as células do meio, mas permitir a comunicação gasosa. A imobilização das microalgas em alginato foi realizada pela suspensão das células diluídas em solução de alginato de sódio (2%) pipetadas em solução de cloreto de cálcio (20%) em água destilada, formando péletes de 3 - 4 mm de diâmetro. Os *pelletes* foram mantidos em solução de cloreto de potássio por 5 - 10 minutos até se tornarem sólidos, em seguida foram separados da solução por uma peneira e lavados em água destilada.



Fonte: Carlos Casali

Figura 2 – Células imobilizadas

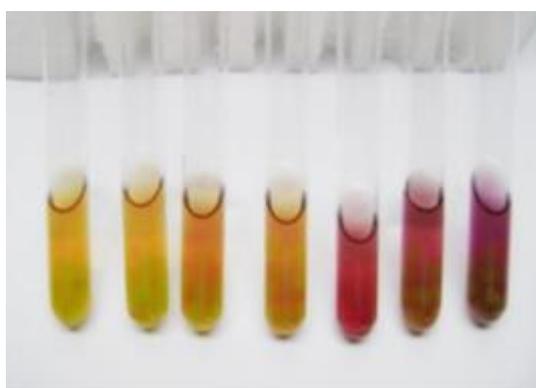
Em seguida os *pelletes* foram contados e distribuídos em tubos de ensaio contendo solução indicadora de pH composta por azul de timol e vermelho de crezol diluídos em etanol.. Para o controle foi utilizado apenas mesma solução indicadora de pH sem os *pelletes*. Os tubos de ensaio foram vedados e colocados em ambiente próximo a diferentes distâncias da fonte luminosa para que fossem expostos a diferentes intensidades de iluminação por um período de 30 minutos.



Fonte: Carlos Casali

Figura 3 – Algas imobilizadas em solução indicadora de pH

Após o período de 30 minutos, foi verificado que na presença de luz houve a fotossíntese e conseqüentemente a produção de O_2 , resultando em coloração roxa da solução indicadora de pH. As amostras que ficaram distantes da luz apresentaram coloração laranja (figura 4).



Fonte: Carlos Casali

Figura 4 - Imagem da coloração da solução indicadora de pH, da esquerda para a direita, aumento da distância de exposição à luz.

Os resultados desse experimento mostraram que o aumento da intensidade luminosa aumenta o processo fotossintético, acarretando no consumo de CO_2 e liberação de O_2 . O consumo de CO_2 resulta em aumento do pH da solução e alteração de sua cor, comprovando assim o processo fotossintético. Dessa forma foi possível discutir sobre a importância da fotossíntese

realizada pelas microalgas na produção do oxigênio e também sua importância na redução dos gases do efeito estufa, que muito tem prejudicado o clima na atualidade.



Fonte: Adaptação School Science Review, 2004.

Figura 5 - Imagem da coloração da solução indicadora de pH, da esquerda para a direita com o aumento da exposição à luz.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante as atividades desenvolvidas com o aluno do ensino médio, que acompanhou grande parte desta pesquisa de doutoramento, demos ao mesmo o acesso a conceitos científicos e recursos inovadores dentro da pesquisa. Além disso, a importância da contextualização e a relação entre a teoria e prática através da articulação entre as áreas de conhecimento (Tabela 1) durante o trabalho de pesquisa foram fundamentais para a construção das competências abordadas no Currículo Oficial do Estado de São Paulo nas áreas de Ciências da Natureza e suas tecnologias. Estas incluem investigar, comunicar, conviver, intervir em situações reais, estabelecer conexões, trabalhar em equipe, diagnosticar e enfrentar problemas, elaborar e verificar hipóteses, relacionar informações e processos com seus contextos e com diversas áreas do conhecimento. Para isso os recursos utilizados como as visitas às usinas sucroalcooleiras, o uso dos equipamentos de laboratório, programas estatísticos para análises dos dados e construção dos gráficos foram de grande relevância na construção do conhecimento.

A possibilidade de atuar com um grupo de vários pesquisadores de diferentes regiões do país e até mesmo de outro país proporcionou ao aluno maior acesso à cultura. Já a oportunidade de participar ativamente de um trabalho de pesquisa de doutorado conferiu-lhe maior interesse pelo conteúdo do ensino formal, que por sua vez foi utilizado em todas as etapas do trabalho desenvolvido. O aluno foi um protagonista do conhecimento, pois levou para a sua sala de aula as experiências vivenciadas no trabalho científico e juntamente com os professores, pôde socializar com os demais alunos a importância e o uso da base do conteúdo do ensino formal para o trabalho de pesquisa científica.

Neste caso, discutiu-se sobre a importância da educação de qualidade para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia, além de sua importância no desenvolvimento do país. Dessa forma, os alunos chegaram à conclusão sobre a importância da escola como início de um processo de qualificação profissional e conseqüentemente para o desenvolvimento de uma nação.

Esta ponte estabelecida entre a universidade e a escola pública trouxe benefícios tanto para o aluno estagiário quanto para os demais alunos que em sua maioria nunca visitaram uma universidade. Observou-se mudança no perfil do aluno, sua intervenção junto aos professores com os demais alunos da sala, o seminário do aluno na escola e as explicações ao final trouxeram aos demais alunos a aproximação da universidade. Isso proporcionou uma perspectiva de acesso ao ensino superior, à oportunidade de conhecer os benefícios de ingressar numa universidade, despertando maior interesse pela busca de novas oportunidades de qualificação para o mundo do trabalho.

4. REFERÊNCIAS

Alcántara, C. et al. 2015. Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:2393–2404.

- Bacchi, M.R.P. Interdependência dos mercados de gasolina C e de álcool combustível no Estado de São Paulo. 2007. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba 150 p.
- Bacchi, M.R.P.; Caldarelli, C.E. 2015. Impactos socioeconômicos da expansão do setor sucroenergético no Estado de São Paulo, entre 2005 e 2009. *Nova Economia*. Belo Horizonte. 25: 209-224.
- Barros, R.P.; Henriques, R.; Mendonça R. 2002. Pelo fim das décadas perdidas: educação e desenvolvimento sustentado no Brasil. Diretoria de Estudos Sociais do IPEA e Departamento de Economia da UFF, Rio de Janeiro.
- Corbucci, P.R. 2004. Financiamento e democratização do acesso à educação superior no Brasil: da deserção do estado ao projeto de reforma. *Educ. Soc.* 25: 677-701.
- Domingues, J.J.; Toschi, N.S.; Oliveira, J.F. 2000. A reforma do Ensino Médio: A nova formulação curricular e a realidade da escola pública. *Educação & Sociedade*. 70.
- Eldridge, D. 2004. A novel approach to photosynthesis practicals. *School Science Review*. 85:312.
- Fini, M.I.; Menezes, L.C. 2010. Currículo do Estado de São Paulo: Ciências da Natureza e suas tecnologias. Secretaria da Educação São Paulo (Estado).
- Kouzuma, A.; Watanabe, K. 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 33:125–129.
- Mariano et al. 2009. The use of Vinasse as an Amendment to Ex-Situ Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil. *Brazilian archives of biology and technology*. 52: 1043-1055.
- Nitayavardhana, S. e Khanal, S.K. 2010. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Bioresource Technology* 101: 9078–9085.
- Oliveira, M.R.N.S. 2000. Mudanças no mundo do trabalho: Acertos e desacertos na proposta curricular para o Ensino Médio (Resolução CNE 03/98). Diferenças entre formação técnica e formação tecnológica. *Educação & Sociedade*, 70.
- Schwartzman, S.; Castro, C.M. 2013. Ensino, formação profissional e a questão da mão de obra. Ensaio: aval. pol. públ. Educ..21: 563-624.
- Sparta, M.; Gomes, W.B. 2005. Importância Atribuída ao Ingresso na Educação Superior por Alunos do Ensino Médio. *Revista Brasileira de Orientação Profissional*. 6:45 – 53.
- Tinbergen, J. 1975. Income differences: recent research. Oxford: North-Holland Publishing, 73.
- Vichi, F.M.; Mansor, M.T.C. 2009. Energia, meio ambiente e economia: o Brasil no contexto mundial. *Quim. Nova*. 32: 757-767.

Capítulo 2.

INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE LUZ NO CRESCIMENTO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR FILTRADA

Andréa Cristina Moralez de Souza¹, Ana Teresa Lombardi²

RESUMO

A vinhaça é um resíduo da indústria sucroalcooleira que pode causar problemas ambientais. Cultivo de microalgas em vinhaça pode reduzir a carga de nutrientes desse resíduo ao mesmo tempo em que custos de produção de biomassa podem ser reduzidos. No entanto, o crescimento de microalgas fotossintética em vinhaça é difícil devido à sua coloração marrom-escura e aos componentes fenólicos desse efluente que, pela falta de luz no primeiro caso e por toxicidade no segundo, podem ser fatores inibitórios. Neste trabalho, foram examinados os efeitos da iluminação através de exposição da microalga à luz LED e fluorescente, nas cores branca e vermelha. A vinhaça foi utilizada na forma filtrada e em concentrações de 10 a 60%. Os resultados mostraram taxas de crescimento superiores ao controle nos tratamentos de 10 e 20% em intensidade luminosa interna de $120\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e taxas de crescimento equivalente ao controle em vinhaça 30% na mesma intensidade luminosa. Por outro lado acima destes valores, as taxas de crescimento foram inferiores ao controle. Os resultados também mostraram um efeito tampão de vinhaça durante o crescimento de microalgas, com o pH mantido entre pH 7,0 – 8,0. Deste estudo conclui-se que houve um fator inibidor do crescimento de microalgas no resíduo a partir de vinhaça 40% que não está relacionada com a disponibilidade de luz, já que foi garantida a mesma intensidade de luz interna em todas as concentrações de vinhaça. Além disso, o uso da vinhaça filtrada em concentrações até 30% pode ser uma alternativa promissora para o cultivo de microalgas, agregando valor ao resíduo pela produção de biomassa, além de diminuir o seu potencial de eutrofização.

Palavras-chave: águas residuais, etanol, LED, microalgas, resíduos.

¹ Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

² Laboratório de Biotecnologia de Algas – UFSCar.

ABSTRACT

Vinasse is a liquid residue of the alcohol/sugar cane industry that can cause soil salinization and groundwater pollution. Growing microalgae in vinasse can reduce its nutrient load at the same time that microalgae production costs are reduced. However, growing photosynthetic microalgae in vinasse is a complex task due to its dark-brown color and unidentified toxic components that can restrict their growth. Here, we examined whether the factor that inhibits microalgae growth in vinasse can be attributed to the availability of light. Our goal is to identify the influence of light in *Chlorella vulgaris* culture having vinasse as medium. We diluted the vinasse in the concentration range of 10 to 60% with distilled water and compared them using three different light sources (fluorescent, white LED and white with red LED) gradually increasing the intensity of light for each of the concentrations, so that internal light was constant throughout the vinasse concentrations. The results showed high growth rates, in excess of the control in 10 and 20% vinasse concentrations and equivalent to the control at 30% with internal light intensity of $120\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$. On the other hand above this, growth rates were lower than the control. Thus, we conclude that the inhibitory factor to microalgae in vinasse is not related to the light availability and its use in concentrations up to 30% vinasse is a promising alternative for growing the microorganism, so increasing the residue value and decreasing its eutrophication potential.

Keywords: ethanol, microalgae, residue, vinasse, waste water.

1. INTRODUÇÃO

A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar está aumentando devido às suas inúmeras aplicações industriais, sendo como combustível alternativo seu uso mais comum (Mohana et al. 2009). No entanto, de acordo com a Espanha-Gamboa (2011), cada litro de etanol gera 10 litros de vinhaça, causando grande preocupação devido à sua composição química. Santana e Machado (2008) mostraram que a presença de compostos fenólicos na vinhaça prejudica o tratamento do resíduo, uma vez que os métodos de tratamento convencionais não eliminam ou transformam esses compostos em formas menos tóxicas.

A vinhaça é constituída de 94-97% de água com alto teor de matéria orgânica, nutrientes como potássio, cálcio, magnésio, fósforo, manganês e nitrogênio orgânico, e em comparação com outros resíduos orgânicos provenientes da indústria do açúcar, a vinhaça é o resíduo mais rico em minerais (Cerri et al., 1988; Espanha-Gamboa et al., 2011). Além dos nutrientes que podem ser benéficos ao solo ou aplicadas no meio de cultura para microalgas, a vinhaça apresenta-se com pH baixo (~ pH 4), odor forte e uma coloração característica marrom escura (Pala 2005; Wadt 2008; Zayas et al., 2007), características que podem dificultar o cultivo algal.

Diante de uma perspectiva econômica e de solução prática para eliminação da vinhaça, foi proposto seu uso na fertirrigação da cana de açúcar. O Estado de São Paulo (Brasil), onde a grande parte do etanol é produzido, possui legislação específica, que regulamenta a dosagem de vinhaça despejada no solo (CETESB 2006; Mariano, 2009). No entanto, devido ao grande volume de produção da vinhaça e sua composição, tal uso tem causado sérios problemas ambientais em virtude da percolação através do solo e contaminação das águas subterrâneas (Cavalett et al., 2012;. Moraes et al., 2014). Dados bibliográficos indicam que um tratamento eficaz e economicamente viável da vinhaça não está disponível. A isso acrescenta-se o fato de que a sua composição e as propriedades não são totalmente conhecidas (Pala 2005; Parnaudeau 2008), o que pode ainda dificultar eventuais tratamentos. A investigação de alternativas viáveis

para seu uso e reciclagem buscando assim a redução dos efeitos negativos ao ambiente vem contribuir com o desenvolvimento sustentável e pode ser de grande interesse.

O uso da vinhaça para o crescimento de microalgas foi mostrado ser possível, embora não seja simples. As microalgas podem ser robustas e suportar condições adversas e o uso do resíduo para seu crescimento pode ser uma solução promissora tanto para diminuir o elevado custo de produção de microalgas, como também para diminuir o potencial de eutrofização da vinhaça. Na qualidade de organismos fotossintéticos, as microalgas consomem os nutrientes da vinhaça, ao mesmo tempo em que produzem uma biomassa rica em biomoléculas como proteínas, carboidratos e lipídios.

Em vinhaça (resíduo ácido e escuro) o cultivo de microalgas é possível, mas apresenta alguns desafios. Oliveira (1988) foi uma das primeiras publicações sobre o crescimento da microalga *C. vulgaris* em vinhaça e já relatara sobre as dificuldades de alcançar altas densidades celulares em altas concentrações de vinhaça. A autora usou vinhaça liofilizada e diluída em meio de cultura, esterilizada e incubada em condições de crescimento ideais. Mostrou que o crescimento de microalgas foi realizado em vinhaça 5%, com maiores concentrações sendo inibitório. Em um trabalho realizado por Kadloglu e Algur (1992) com *Chlamydomonas reinhardtii* em vinhaça os autores observaram que em concentrações acima de 10% há uma diminuição do número de células comparado ao controle. Barrocal (2010) mostrou baixa taxa de crescimento ($0,1 \text{ d}^{-1}$) de *Spirulina maxima* em bagaço de beterraba alcalino diluído (5 g L^{-1}). Coca et al. (2015) utilizaram vinhaça de beterraba suplementada com meio de cultura e obtiveram metade da densidade celular ao dobrar de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ a $5,0 \text{ g L}^{-1}$ a concentração de vinhaça

Microalgas podem ter taxas de crescimento elevadas e algumas espécies mostram metabolismo mixotrófico, situação em que podem usar o carbono orgânico e inorgânico (Arroyo, 2011). Pesquisa por Bhatnagar (2011) demonstrou que culturas de microalgas mixotróficas

podem fornecer mais biomassa, lipídios, carboidratos e proteínas em comparação com condições fotoautotróficas. Kong et al. (2011) estudou a produção de biomassa e o acúmulo de lipídios em *C. vulgaris* em cultivo mixotrófico e mostrou que manter a alga nessas condições pode ser um padrão competitivo para a cultura em larga escala. Abreu et al. (2012) estudaram o cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* em efluente da indústria de laticínios para reduzir os custos de produção de biomassa de microalgas, uma vez que não requer a adição de hidratos de carbono no meio de cultura. Os autores mostraram melhoria significativa na produção de biomassa e utilização de carboidratos quando comparados com culturas enriquecidas com a mistura de glucose e galactose devido à presença de nutrientes do soro do queijo que promovem o crescimento.

A coloração escura da vinhaça pode impedir a penetração da luz (Ramirez et al., 2014). Neste caso, a intensidade luminosa pode ser o fator limitante do crescimento algal dependendo da concentração do resíduo. No entanto, deve ser considerado que a melanoidina, polímero de cor castanha formado pela combinação de amino ácidos e açúcares, presente na vinhaça (Rivero-Pérez et al., 2002) como já foi demonstrado, causa toxicidade para os microorganismos (Barrocal et al., 2010).

A fonte de energia e a sua utilização eficiente por microalgas fotossintéticas tem sido um desafio tecnológico em culturas em grande escala (Ogbonna 2000), que normalmente são densas e escuras. Ramires (2014) investigou o crescimento de microalgas em vinhaça e concluiu que o aumento da intensidade da luz contribuiu positivamente para a produção de biomassa, mas com o aumento da concentração de vinhaça a produção de biomassa diminuiu. De acordo com Wahidin et al. (2013) não somente as questões de intensidade de luz para o crescimento de microalgas, mas qualidade/fonte de luz também podem ser importantes.

As lâmpadas fluorescentes podem obscurecer as bandas de absorção de pigmentos de clorofila (Yoshioka et al., 2012; Atta, 2013). Segundo Atta (2013) e Yoshioka et al. (2012) esse efeito não ocorre com iluminação LED (Light Emitting Diode). A literatura mostra que o LED vermelho é eficaz para a fotossíntese, tendo o espectro de emissão no vermelho encaixado perfeitamente com a energia dos fótons necessária para atingir o primeiro estado excitado das clorofilas **a** e **b** (Bula et al., 1991; Matthijs 1995; Singh, 2015).

Considerando que a vinhaça é um resíduo com nutrientes inorgânicos importantes para as microalgas (Caqueret et al., 2008) e que apresenta cor escura, a sua utilização para o crescimento desses microrganismos pode ser promissor, se o problema da coloração escura for resolvido e os limites da sua toxicidade conhecidos. Além disso, a vinhaça raramente será um recurso limitante devido à grande quantidade em que é gerada.

O objetivo deste capítulo foi de avaliar os efeitos de diferentes fontes de luz no crescimento de *Chlorella vulgaris* na vinhaça filtrada e os limites da sua toxicidade. Tomando o cuidado com a importância de manter constante a temperatura do ambiente, bem como a intensidade da luz no interior dos frascos de cultura, aumentou-se gradualmente a intensidade de luz externa de acordo com a concentração de vinhaça. Luz fluorescente branca, LED branco quente e uma combinação de LED branco quente com vermelho foram usadas para o crescimento algal. Considerando-se o teor de matéria orgânica da vinhaça, escolhemos trabalhar com uma cepa de *Chlorella vulgaris* que foi isolada a partir de um ambiente orgânico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microalgas

A Chlorophyceae *Chlorella vulgaris* foi mantida em meio de cultura LC Oligo (AFNOR 1980) no Laboratório de Biotecnologia de Algas, Departamento de Botânica - Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil). A cepa foi escolhida devido à sua capacidade para crescer em substrato orgânico, uma vez que foi isolada de uma estação de tratamento de esgoto. Como inóculo dos experimentos, foram utilizadas células em crescimento exponencial em concentração inicial de $1,2 \times 10^5$ cel mL⁻¹. Antes da inoculação, a eficiência fotossintética das células foi determinada por meio de fluorescência modulada utilizando-se o equipamento PhytoPAM (Walz, Alemanha) para certificação do estado fisiológico e garantia de inóculo saudável.

Condições ambientais controladas foram mantidas durante: 12/12 h ciclo claro/escuro e temperatura de $24 \pm 2^\circ$ C. A intensidade da luz interna inicial permaneceu constante independente da concentração de vinhaça ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Mas a intensidade de luz incidente variou de 160 a $500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de acordo com a concentração de vinhaça, afastando-se ou aproximando-se o frasco da fonte de luz. Para evitar o aquecimento nas maiores intensidades luminosas incidente, foram usados ventiladores direcionados para as culturas com o objetivo de aumentar a circulação de ar local. Este sistema de ventilação foi suficiente para manter a temperatura constante durante todo o período do experimento. Além da concentração de vinhaça, variamos a fonte de luz. As culturas foram iluminadas por lâmpadas fluorescentes, LED branco quente, e ainda uma combinação de LED's brancos quentes e vermelhos. Os valores utilizados de intensidade luminosa incidente e interna são apresentados na Tabela 1.

Tabela1- Intensidade de luz incidente/interna ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ao in\u00edcio dos experimentos.

| Tratamentos | (% vinha\u00e7a) | Fluorescente | LED | |
|---------------------|------------------|--------------|---------|-----------------|
| | | | Branca | Branca/vermelha |
| 1 (controle) | 0 | 160/120 | 160/120 | 160/120 |
| 2 | 10 | 200/120 | 200/120 | 200/120 |
| 3 | 20 | 260/120 | 260/120 | 260/120 |
| 4 | 30 | 320/120 | 320/120 | 320/120 |
| 5 | 40 | 380/120 | 380/120 | 380/120 |
| 6 | 50 | 440/120 | 440/120 | 440/120 |
| 7 | 60 | 500/120 | 500/120 | 500/120 |

2.2. Vinha\u00e7a

A vinha\u00e7a agroecol\u00f3gica utilizada nos experimentos foi proveniente de um sistema org\u00e2nico de produ\u00e7\u00e3o de a\u00e7\u00facar e \u00e1lcool - Usina S\u00e3o Francisco, localizada na cidade de Sert\u00e3ozinho (SP, Brasil).

Ap\u00f3s a coleta, o material foi levado ao laborat\u00f3rio e a fra\u00e7\u00e3o particulada foi removida. Peneirou-se sequencialmente atrav\u00e9s de cinco peneiramentos com redu\u00e7\u00e3o gradativa da abertura de malha (0,590 - 0,210 - 0,177 - 0,125 - 0,053 mm). Em seguida, a vinha\u00e7a foi armazenada em garrafa pl\u00e1stica e congelada at\u00e9 ser utilizada. Imediatamente antes do uso, a vinha\u00e7a era descongelada a $4 \pm 2^\circ \text{C}$ e centrifugada numa centr\u00edfuga refrigerada (Sorvall Legenda XTR, EUA) a 2516g durante 10 minutos para remover o material particulado restante. Ap\u00f3s centrifuga\u00e7\u00e3o, a vinha\u00e7a foi filtrada atrav\u00e9s de membranas de fibra de vidro com di\u00e2metro de poro $0.7 \mu\text{m}$ (Sartorius, Alemanha).

Todas as culturas, independente da concentra\u00e7\u00e3o de vinha\u00e7a usada, tiveram o pH inicial ajustado para pH 7,0 pela adi\u00e7\u00e3o de NaOH (pHmetro Logen Scientific, Brasil). Os controles foram feitos em LC Oligo esterilizado sem vinha\u00e7a (autoclavado 1 atm, 20 min; Phoenix Lufenco - Brasil). A vinha\u00e7a foi usada nas concentra\u00e7\u00f5es de 10, 20, 30, 40, 50 e 60%, dilu\u00edda em \u00e1gua

destilada autoclavada e sem acréscimo de nutrientes. Estudo anterior em nosso laboratório mostrou ausência de crescimento de *C. vulgaris* em 70, 80, 90 e 100% de vinhaça, por conseguinte, estas concentrações não foram consideradas na presente pesquisa.

As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido posicionados verticalmente e distantes 4,0 centímetros uns dos outros para facilitar a passagem de luz. Os frascos foram aerados com ar ambiente através de borbulhamento feito com bombas de aquário. Os experimentos foram feitos em três réplicas experimentais com duração de 96 h. A figura 1 mostra o arranjo dos frascos expostos à LED branco quente.



Fonte: Carlos Casali

Figura 1. Ensaio experimental com cultivo de *C. vulgaris* em diferentes concentrações de vinhaça. Triplicatas experimentais da esquerda para a direita representam as concentrações de 10, 20 e 30%.

2.3. Parâmetros monitorados nos experimentos

2.3.1. Densidade celular

A densidade celular na cultura foi monitorada por meio de contagem de células ao microscópio óptico (BioFocus, Brasil), utilizando hemocitômetro Fuchs-Rosenthal a cada 24 h. As taxas de crescimento das microalgas foram calculadas representando graficamente o logaritmo natural da densidade celular (células mL⁻¹) em função do tempo (dias). A linha reta

obtida durante o crescimento exponencial foi ajustada por meio de regressão linear e o coeficiente angular da equação foi tomado como a taxa de crescimento específico máxima.

2.3.2. Condutividade e pH

A condutividade foi monitorada para avaliar o consumo e a dissolução de íons nas culturas pelo condutivímetro Hach® hq 40d Multi (E.U.A.). Já o pH foi medido por um pHmetro Logen Scientific® (Brasil).

2.4. Análise estatística

As figuras foram elaboradas usando Origin Pro 8.5 (EUA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando programa estatístico R (Áustria), por meio de análise de variância e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, portanto, valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

A caracterização físico-química da vinhaça mostrada na Tabela 2 foi realizada pelo laboratório de análises ambientais ASL® na cidade de Rio Claro, com a vinhaça bruta, sem qualquer tratamento, logo após a coleta. A presença de fósforo e de potássio, dentre outros elementos nutritivos confirma o potencial do resíduo para o crescimento de microalgas. No entanto, em altas concentrações sua composição rica em minerais promove o aumento da salinidade e pode provocar estresse salino nas microalgas.

Tabela 2. Caracterização físico-química da vinhaça bruta de acordo com os requerimentos da norma P 4.231 – CETESB

| Parâmetros | Unidade | Resultados |
|--|----------------|-------------------|
| Sólidos suspensos totais | mg/L | 2200,0 |
| Condutividade elétrica | mS/cm | 1563,0 |
| Nitrogênio amoniacal (NH₄) | mg /L | 8,3 |
| Nitrogênio Kjeldahl | mg/L | 180,0 |
| Cálcio | mg/L | 755,0 |
| Potássio | mg/L | 5373,0 |
| Magnésio | mg/L | 205,0 |
| Sulfato | mg/L | 2154,0 |
| Fosfato | mg/L | 17,8 |

As curvas de crescimento são apresentadas na Figura 2, na qual observa-se que não houve fase de adaptação nos tratamentos controle, vinhaça 10, 20 e 30%, que começou diretamente na fase exponencial, mas uma diminuição da densidade populacional inicial (1º dia) em vinhaça 40, 50 e 60% foi observada. Isto resultou em menor biomassa final nos tratamentos em vinhaça mais concentradas (Figura 3).

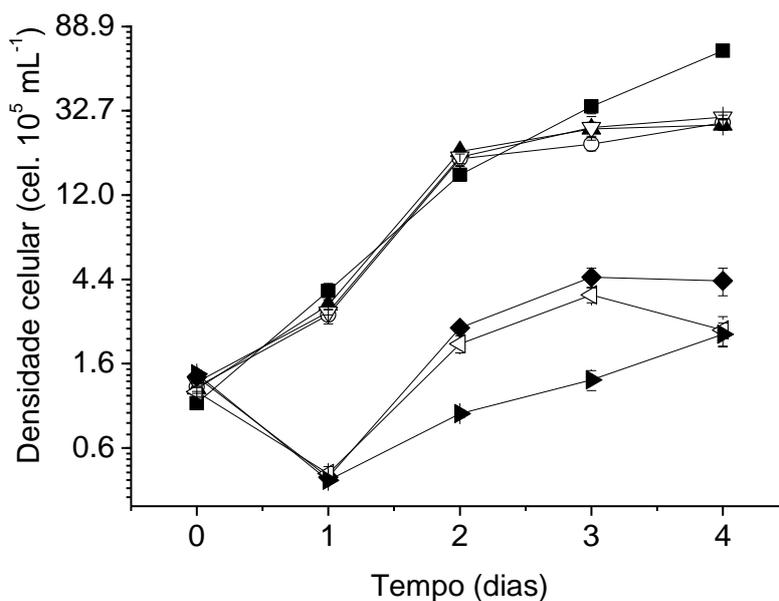


Figura 2. Densidade celular em culturas de *C. vulgaris* em função do tempo experimental para as diversas concentrações de vinhaça. Tratamento LED branco quente com LED vermelho. Símbolos: ■ Controle; concentrações de vinhaça ○ 10%, ▲ 20%, ▽ 30%; ◆ 40%; ◁ 50%; ► 60%.

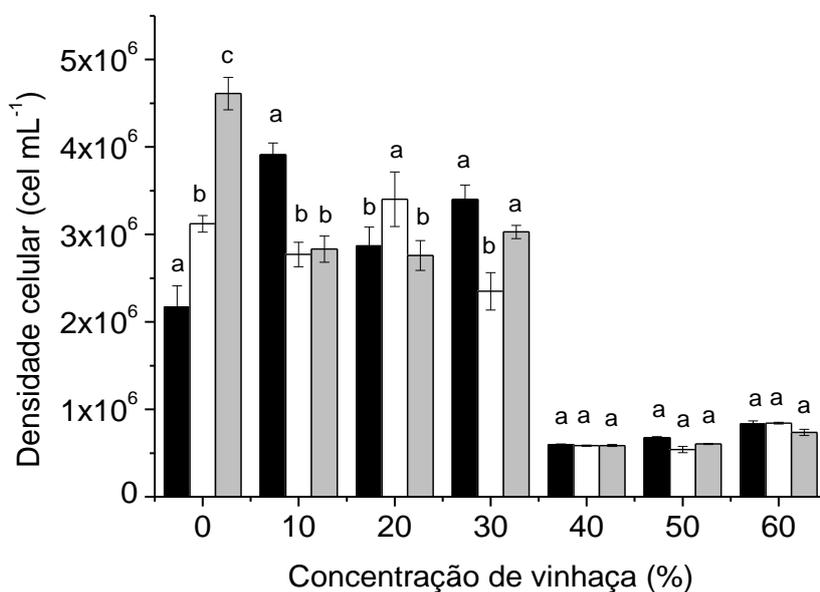


Figura 3. Densidade celular (cel mL^{-1}) final (96 h) em culturas de *C. vulgaris* para as diversas concentrações de vinhaça. Símbolos – barras pretas: lâmpadas fluorescentes; barras brancas: LED branco; barras cinza: LED branco e vermelho. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas comparando-se as fontes de luz dentro de cada concentração de vinhaça

A Figura 4 apresenta as taxas de crescimento para os tratamentos com as três fontes de luz (fluorescente, LED branco quente e, branco quente com LED vermelho). Comparando-se as

fontes de luz, diferença significativa foi encontrada nos tratamentos. Em 10 e 20% as taxas de crescimento nos cultivos em vinhaça foram maiores do que no controle ($1,45 \text{ d}^{-1}$) e, taxa equivalente à do controle ocorreu em vinhaça 30% ($1,20 \text{ d}^{-1}$). Nos tratamentos com vinhaça 40, 50 e 60% as taxas de crescimento foram menores do que o controle, mesmo recebendo a mesma intensidade de luz.

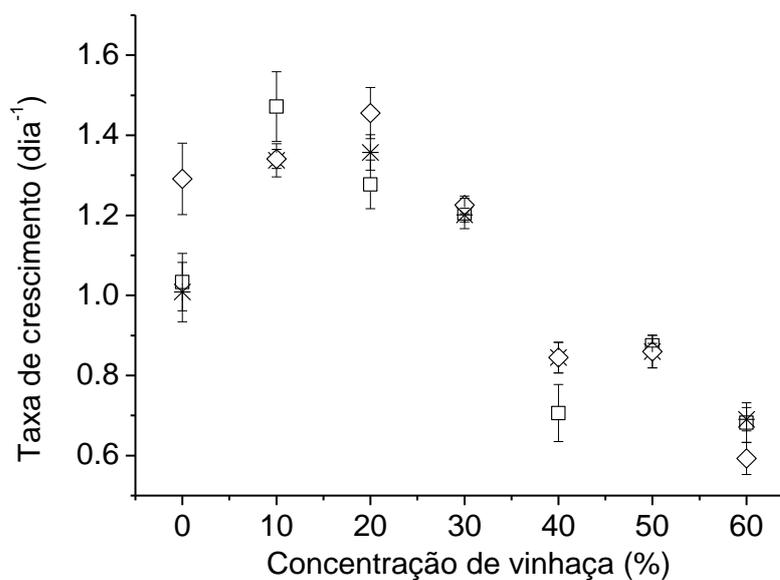


Figura 4. Taxas de crescimento máximo nas culturas de *C. vulgaris* nas várias concentrações de vinhaça (10 – 60%) expostas às diferentes fontes de luz. Símbolos: □ Fluorescente; * LED branca; ◇ LED branca com vermelha.

A Figura 5 apresenta os valores de pH para os tratamentos nas diferentes fontes de luz. O pH variou significativamente, com diferença estatística apenas nos controles, mas não nos tratamentos com vinhaça. Independentemente da concentração de vinhaça e fonte de luz, o pH oscilou entre 7 e 8.

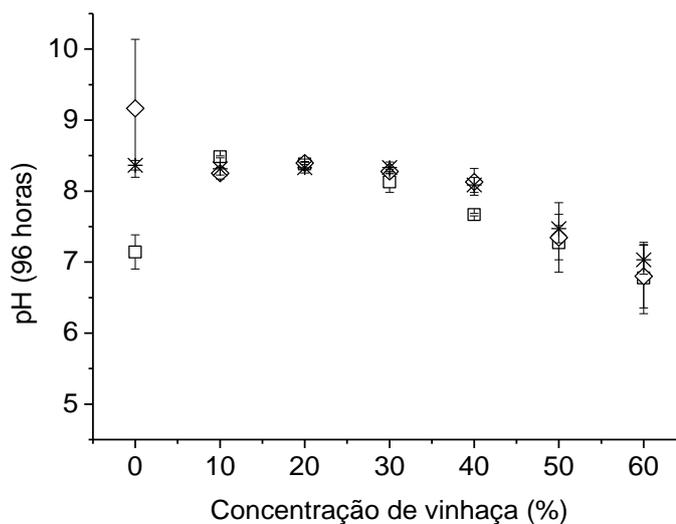


Figura 5. Valores de pH em 96 h para as culturas em diferentes concentrações de vinhaça. Símbolos: □ Lâmpada fluorescente; ◇ LED branco e vermelho; *LED branco.

A Figura 6 mostra os valores de condutividade para os controles e tratamentos, que foram diretamente proporcionais à concentração de vinhaça.

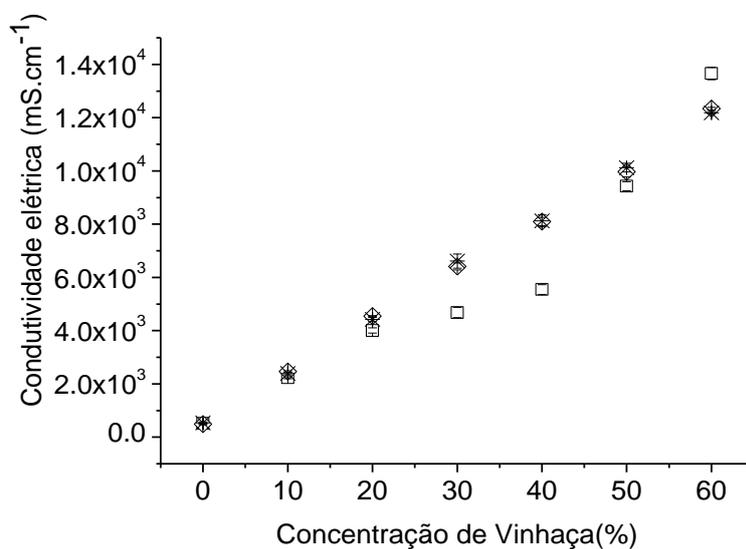


Figura 6. Valores de condutividade elétrica em 96 horas para as culturas em diversas concentrações de vinhaça. Símbolos representados por: □ Lâmpadas fluorescentes; ◇ LED branco e vermelho; * LED branco.

4. DISCUSSÃO

O crescimento da microalga *C. vulgaris* em vinhaça, ainda que filtrada para a remoção do material particulado e todas as concentrações testadas expostas à mesma intensidade luminosa, apresentou diferenças de taxa de crescimento em relação às concentrações. Portanto, essas diferenças não podem ser atribuídas à iluminação, mas aos outros fatores intrínsecos do resíduo.

Conforme a tabela 2 à seguir, os resultados mostram que as vinhaças diluídas em 10 – 20% proporcionaram maiores taxas de crescimento de *C. vulgaris* (1,4 - 1,5 d⁻¹), superiores ao valor encontrado por Candido (2015) com cultivos de *C. vulgaris* em meio de cultura BG11 (1,08 d⁻¹), caracterizado por ser altamente nutritivo. A maioria das investigações da literatura que utiliza vinhaça para o cultivo de microalgas, geralmente o fazem com vinhaça diluída em solução nutritiva ou com outro resíduo rico em nutrientes. Por exemplo, Marques et al. (2013) usou vinhaça da cana de açúcar biodigerida e diluída (2%) com efluentes secundários de tratamento de esgoto para o crescimento de *C. vulgaris*, e obteve taxa de crescimento de 0,76 dia⁻¹. Da mesma forma, Budyono et al. (2014) obteve crescimento significativo de *Spirulina platensis* em vinhaça 0,8%, obteve taxa de crescimento de 0,15 d⁻¹.

Tabela 3. Comparação deste trabalho de pesquisa com os dados da literatura sobre taxa de crescimento.

| Literatura | Espécie | Cultivos | Taxa de Crescimento (d ⁻¹) |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------|--|
| Neste trabalho | <i>Chorella vulgaris</i> | Vinhaça (10-20%) | 1,4 – 1,5 |
| Candido (2015) | <i>Chorella vulgaris</i> | BG11 | 1,1 |
| Marques et al. (2013) | <i>Chorella vulgaris</i> | Vinhaça (2% + esgoto) | 0,76 |
| Budyono et al. (2014) | <i>Spirulina platensis</i> | Vinhaça (0,8 %) | 0,15 |

Culturas em vinhaça 40, 50 e 60% cresceram mais lentamente e apresentaram fase de adaptação inicial em contraste com os tratamentos mais diluídos (10, 20, 30% vinhaça e controle), que tiveram maior taxa de crescimento e ausência de fase de adaptação. Estes resultados estão de acordo com outros resultados da literatura que mostram maior crescimento de *Chlorella* sp em culturas suplementadas com uma fonte orgânica, além do fornecimento de condições fotoautotróficas. Isso pode ser indicativo de metabolismo mixotrófico (Yang et al., 2000; Bhatnagar, 2011; Lin e Wu, 2015).

Os resultados aqui apresentados confirmam que a combinação de LED branco quente com vermelho estimulou o crescimento de *C. vulgaris* no tratamento controle. A literatura mostra que durante a fotossíntese a clorofila absorve luz azul (450-475 nm) e vermelha (630-675 nm). Segundo Korbee et al. (2005), o crescimento de microalgas pode ser melhorado quando expostas à luz vermelha. Matthijs (1995) investigou o crescimento de microalgas usando LED vermelho como fonte de energia e concluiu que é mais atraente para a fotossíntese do que o LED branco. Fu et al. (2012) trabalharam com microalgas verdes em fotobiorreatores equipados com LEDs e alcançou melhor rendimento com LED vermelho. Os autores detectaram uma otimização da fotossíntese, e justificaram isso com base em menor requerimento de fluxo de fótons para estimular o crescimento máximo de microalgas. Khoeyi et al. (2012) cultivaram *Chlorella vulgaris* sob luz fluorescente branca em $100 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e obteve taxa de crescimento máxima de $1,13 \text{ d}^{-1}$, menor do que as obtidas com LED em outros estudos.

Este estudo demonstrou que a concentração de vinhaça filtrada acima de 30% é o fator de inibição do crescimento de *C. vulgaris* neste resíduo e não a intensidade de luz. No entanto, a literatura refere que a ausência de luz é o fator dominante desfavorável ao crescimento de microalgas em altas concentrações de vinhaça. Neste estudo, a dificuldade da passagem da luz atribuída ao resíduo de cor acastanhada, que bloqueia a transmissão de luz dentro das culturas foi superada ao manter a mesma intensidade de luz no interior de todas as culturas, independente

de sua concentração. De acordo com Ramires (2014), aumentando as concentrações do efluente, a intensidade da luz deve ser aumentada proporcionalmente, a fim de manter a mesma produção de biomassa. No entanto, mesmo tendo garantido a igualdade na intensidade de luz em relação ao aumento da concentração de vinhaça, praticamente não se observou crescimento em culturas com vinhaça 40, 50 e 60%. Nessas concentrações as células foram severamente inibidas. Se a concentração elevada de vinhaça pode inibir o crescimento de microalgas, tendo luz suficiente, isto significa que algum composto tóxico está presente.

Há dados da literatura que mostram alto teor de minerais e componentes orgânicos, tais como nitrogênio, fósforo e potássio em vinhaça nas concentrações elevadas. O aumento da condutividade em relação ao aumento das concentrações de vinhaça confirmam esses dados. Segundo Kadioglu & Algur (1992) esses nutrientes podem causar efeito osmótico que conduzem à degradação das células. Em um estudo com *C. vulgaris*, Alyabyev et al. (2007) observaram que o estresse causado pelo aumento de salinidade pode diminuir processos bioenergéticos de *C. vulgaris* e, conseqüentemente, podendo inibir a sua taxa metabólica. Neste trabalho, a salinidade decorrente dos elementos Nitrogênio, Cálcio, Potássio, Magnésio e Fósforo presentes na vinhaça em concentrações elevadas, pode ter sido o fator de estresse para o crescimento das células.

A manutenção do pH dentro de faixa estreita próximo à neutralidade e ligeiramente alcalino (pH 7 - 8) nas várias concentrações de vinhaça está de acordo com os resultados da literatura. Diaz et al. (2002) utilizaram vinhaça 10, 20, e 40% diluída e o controle, sem adição de vinhaça e, ao final do experimento obtiveram valores de pH de 7,93, 8,14 e 8,41 respectivamente e pH 7,64 para o controle. De acordo com os autores, os valores de pH finais foram maiores nas diluições que receberam as maiores quantidades de vinhaça. Ribeiro et al. (2010), adicionando diferentes concentrações de vinhaça (20, 50 e 100%) com pH 4,70 no solo notaram aumento de pH deste com o passar do tempo. De acordo com os autores, esse efeito pode ser considerado um efeito tamponante de pH e decorre da presença de materiais orgânicos dissolvidos na vinhaça.

No geral, estes resultados mostraram que *C. vulgaris* pode ser cultivada em vinhaça em concentração de até 30%. Demonstramos ainda que uma combinação de LED's branco quente e vermelho estimulou o crescimento da microalga em comparação com a luz branca fluorescente e LED branco quente.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo mostramos que a fonte de luz pode ser utilizada para estimular o crescimento *C. vulgaris* em meio sintético, mas não teve efeito em vinhaça. Melhor rendimento de biomassa foi obtido com a combinação de LEDs branco quente e vermelho no controle. Também ficou claro que as melhores condições de crescimento deram-se em vinhaça 10 – 20%, situação em que a taxa de crescimento de *C. vulgaris* foi 1,4 - 1,5 d⁻¹. A taxa de crescimento em vinhaça 30% foi equivalente ao tratamento controle (1,2 d⁻¹). Em vinhaça 40, 50 e 60% outros fatores que não a intensidade de luz, afetaram o crescimento da microalga. Assim, o cultivo de microalgas em vinhaça 10 – 30% pode ser considerando promissor para o reaproveitamento de um resíduo gerado em grandes volumes.

6. REFERÊNCIAS

Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource technology*. 118, 61-65.

AFNOR-Association Française de Normalisation. 1980. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale T90-304.

Alyabyev, A. J. et al., 2007. The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. *Thermochimica Acta*. 458, 1–2, 25, 65–70.

- Arroyo, T.H., Wei, W., Ruan, R.B., 2011. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*. 35, 2245–2253.
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., Wahidin, S., 2013. Intensity of blue LED light: a potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 148, 373–378.
- Barrocal, V.M., Garcia-Cuber, M.T., González-Benito, G., Coca, M., 2010. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. *Biotechnology*. 27, 851–856.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.D. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*. 88, 3425–3431.
- Budiyono, I. S.; Sumardiono, S.; Sasongko, S. B. (2014). Production of *Spirulina platensis* Biomass Using Digested Vinasse as Cultivation Medium. *Trends in Applied Sciences Research*, 9 (2), 93 – 102.
- Bula, R.J., Morrow, R.C., Tibbitts, T.W., Barta, D.J., Ignatius, R.W., Martim, T.S. 1991. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *Hort Science*. 26, 203–205.
- Caqueret, V., Bostyn, S., Cagnon, B., Fauduet, H., 2008. Purification of sugar beet vinasse – Adsorption of polyphenolic and dark colored compounds on different commercial activated carbons. *Bioresource Technology*. 99, 5814–5821.
- Candido, C. 2015. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas: uma abordagem ecofisiológica. Dissertação de mestrado. São Carlos : UFSCar, 64 f.
- Cavalett, O., et al., 2012. Environmental and economic assessment of sugarcane first generation biorefineries in Brazil. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 14, 399-410.
- Cerri, C. C., Polo, A., Andreux, F., Lobo, M. C., Eduardo, B.M.P., 1988. Resíduos orgânicos da agroindústria canavieira: Características físicas e químicas. *STAB: açúcar, álcool e subprodutos*. 6, 34-37.
- CETESB. 2006. Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 4.231.
- Coca, M., Barrocal, V.M., Lucas, S., González-Benito, G., García-Cubero, M.T. 2015. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. *Food and bioproducts processing*. 94, 306–312.
- Diaz, M.J., Madejón, E. F., López, F. R., López, R., Cabrera, F., 2002. Optimization of the rate vinasse/grape marc for co-composting process. *Process Biochemistry*. 37, 1143–1150.
- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L.B., Domingues-Maldonado, J.D., Hernández-Zarate, G.H., Alzate-Gaviria, L., 2011. Vinasse: characterization and treatments. *Waste Management*. 29, 1235–1250.

- Fu, W., Gudmundsson, O., Feist, A.M., Herjolfsson, G., Brynjolfsson, S., Palsson, B., 2012. Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 161, 242–249.
- Kadloglu, A., Algur O. F., 1992. Tests of Media with Vinasse for *Chlamydomonas reinhardtii* for Possible Reduction in Vinasse Pollution. *Bioresource Technology* 42: 1-5.
- Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J., & Ramezanpour, Z. 2012. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*. 20, 41-49.
- Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H., Hual, S., Xial, C. 2011. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. *African Journal of Biotechnology*. 10, 11620-11630.
- Korbee, N., Figueroa, F. L., Aguilera, J., 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochemistry and Photobiology*. 80, 71–78.
- Lin, T. S., Wu, J. Y. 2015. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*. 184, 100–107.
- Mariano, A.P., Crivelaro, S.H.R., Angelis, D.F.A., Bonotto, D.M., 2009. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. *52*, 1043-1055.
- Marques, S.S.I., Nascimento, I.A., Almeida, P.F., Chinalia, F.A., 2013. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. *Appl Biochem Biotechnol*. 171, 1933-1943.
- Matthijs, H. C., Balke, H., Vanhes, U .M., Kroon, B., Mur, L. R., Binot, R. A., 1996. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and bioengineering*. 50, 98-107.
- Moraes, B.S., Junqueira, T.S., Pavanello, L.G., Cavalett, O., Matelatto, P.E., Bonomi, A., Zaiat, M., 2014. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense. *Applied Energy*. 113, 825–835.
- Mohana, S., Acharya, B.K., Madamwar, D., 2009. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. *Journal of hazardous materials*. 163, 12–25.
- Ogbonna, J.C.; Tanaka, H., 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation-Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*. 12, 207–218.
- Oliveira, H.T. Utilização de vinhaça como de cultura para *Chlorella vulgaris*. 1988. 146p. Dissertation Federal University of São Carlos, São Paulo, São Paulo.
- Pala, A., Erdem, G., 2005. Decolorization of a baker's yeast industry effluent by Fenton oxidation. *Journal Hazard Mater*. 127, 141-148.

- Parnaudeau, V., Condom, N., Oliver, R., Cazevieille, P., Recous, S., 2008. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology*. 99, 1553–1562.
- Ramirez, N.N.V., Farenzena, M., Trierweiler, J.O., 2014. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57, 630-635.
- Ribeiro, B.T., Lima, J.M., Guilherme, L.R.G., Julião, L.G.F. 2010. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. *Sci. Agric*. 67, 441-447.
- Rivero-Pérez, M.D., Magariño, S.P., San José, M.L.G., 2002. Role of melanoidins in sweet wines. *Analytica Chimica Acta* . 458, 169–175.
- Santana, V.S., Machado, N.R.C.F., 2008. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. *Catalysis Today*. 133-135, 606-610.
- Singh, S.P., Singh P. 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 50, 431–444
- Wadt, L.C., 2008. Cultivo de *Pleurotus spp.* em vinhaça visando à produção de biomassa e exopolissacarídeos. Dissertation University of São Paulo—CENA.
- Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S.R.M. 2013. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis sp* *Bioresource Technology*. 129, 7–11.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal* 6. 87–102.
- Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H., Morinaga, T., 2012. Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. 338–341, 111–117.
- Zayas, T., Romero, V., Salgado, L., Merz, M., Morales, U. 2007. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. *Separation and Purification Technology*. 57, 270–276.

Capítulo 3.

CULTIVO DE *Chlorella vulgaris* EM VINHAÇA: ASPECTOS DA FISIOLOGIA CELULAR

Andréa Cristina Moralez de Souza¹, Ana Teresa Lombardi²

RESUMO

A vinhaça é um resíduo da indústria sucroalcooleira rico em compostos orgânicos e minerais que podem ser utilizados como nutrientes para produção de microalgas. Avaliamos nesta pesquisa o crescimento de *C. vulgaris* em vinhaça, bem como sua biomassa. Para isso, utilizamos vinhaça tratada (filtrada e centrifugada) em concentração de 20% e comparamos com o tratamento controle em meio sintético LC Oligo considerando análises de densidade celular, biomassa seca, parâmetros fotossintéticos e bioquímicos num período de 96 h. Para avaliação da remoção de nutrientes e compostos orgânicos, a vinhaça foi analisada antes e após o cultivo. Com os valores de densidade celular, calculamos as taxas de crescimento e observamos maiores valores nos cultivos em vinhaça ($1,1 \text{ d}^{-1}$) em relação ao meio LC Oligo ($0,9 \text{ d}^{-1}$). Conseqüentemente, os valores de biomassa seca mostraram-se superiores no cultivo em vinhaça. Porém, os parâmetros fotossintéticos foram melhores no controle do que em vinhaça. Isso pode ser um indicativo de que a microalga utilizou de metabolismo mixotrófico devido à presença de carbono orgânico. Na vinhaça, houve redução significativa de nitrogênio (98%) e potássio (72%), bem como do conteúdo de carbono orgânico total dissolvido. As culturas apresentaram elevadas concentrações de proteínas, confirmando as boas condições de cultivo. Este estudo mostrou que a microalga *C. vulgaris* adaptou-se à vinhaça e seu cultivo foi viável nesse resíduo, crescendo, em geral, melhor na vinhaça do que no controle.

Palavras-chave: águas residuais, biomassa, consórcio microbiano, microalgas.

¹ Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

² Laboratório de Biotecnologia de Algas – DB – UFSCar.

ABSTRACT

Vinasse is a residue from sugarcane (sugar and ethanol) industry rich in organic compounds and minerals that can be used as nutrients for the production of microalgae. We propose to evaluate the growth and biomass of *C. vulgaris* in vinasse. To do so, we used treated vinasse (filtered and centrifuged) in a concentration of 20% and compared with the control treatment in synthetic Oligo LC medium, considering culture density (cell mL⁻¹), dry weight, photosynthetic and biochemical parameters over a period of 96 h. To evaluate the removal of nutrients and organic compounds, the vinasse was analyzed before and after algal growth. With cell density values, we calculated the growth rates and observed higher growth rates in the vinasse (1,1 d⁻¹) in comparison with the LC Oligo (0,9 d⁻¹). Consequently, the dry biomass values proved superior when cultivated in vinasse. However, the photosynthetic parameters were greater in the control treatment than in the vinasse. This may be an indication that the microalgae used mixotrophic metabolism since there was organic carbon in the vinasse. In vinasse, there was a significant reduction of nitrogen (98%), potassium (72%), as well as the total dissolved organic carbon content. The cultures presented high concentrations of proteins, confirming the healthy growing conditions and absence of stressing conditions. This study showed that *C. vulgaris* adapted well in the diluted vinasse, and its cultivation was feasible, growing generally better in vinasse than in the control treatment.

Key words: waste water, biomass, microbial consortium, microalgae, vinasse.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas numerosos esforços foram direcionados na busca de fontes alternativas para oferta de proteínas para o futuro. Neste caso, o potencial das microalgas como fonte proteica tem sido investigado (Ogbonna et al., 1997) por estudos nutricionais que demonstraram claramente seu alto valor como suplemento proteico para ração animal. Além de ser fonte de nutrientes básicos, as microalgas fornecem antioxidantes, provitaminas e vitaminas que aprimoram a fisiologia e saúde animal (Belay et al., 1996; Kotrbáček et al., 2015).

No entanto o alto custo de produção de microalgas impede seu amplo uso como composição de ração animal (Ogbonna et al., 1997, Kotrbáček et al., 2015). Estudos sugerem que produção em grande escala de microalgas não é economicamente viável (Woertz et al., 2006). Em se tratando de microalgas de água doce, Bhatnagar et al., (2011) aponta ainda que a disponibilidade de água doce é um problema mundial e, além disso associa-se os custos de nutrientes, resultando por fim em alto custo da produção de biomassa algal. Dessa forma, faz-se necessário buscar fontes alternativas para o uso da água e dos nutrientes utilizados no cultivo de microalgas que possam ser aplicados em grande escala.

Atualmente o conceito de ecologia ligada à indústria e economia é considerado como princípio para eco inovação, ou seja, os resíduos podem ser utilizados como insumos para novos produtos e aplicações (Mateo e Maicas, 2015). Neste caso, as microalgas apresentam um papel fundamental no tratamento de efluentes, com vantagens relacionadas à sustentabilidade econômica e ambiental (Serejo et al., 2015), pois promovem a redução dos custos de insumos como água e nutrientes, além de apresentar biomassa com potencial biotecnológico de alto valor agregado para indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e como suplemento de ração animal (Chen et al., 2011; Laime et al., 2011).

Segundo Kouzuma e Watanabe (2015), as algas são o foco de pesquisas em aplicações biotecnológicas para tratamento de efluentes e, sua interação com os microrganismos designados como consórcio microbiano tem sido uma proposta recente em direção à biotecnologia. Os efeitos sinérgicos derivados da simbiose entre as microalgas e outros microrganismos em termos, representa um grande nicho de pesquisa biotecnológica (Alcántara et al., 2015), além da alta capacidade de produzir biomassa rica em proteínas (Becker, 2007).

A vinhaça é um subproduto da destilação no processo de produção do etanol. É constituída por aproximadamente 95% água e caracterizada por alto conteúdo de matéria orgânica, potássio, cálcio, nitrogênio e fósforo, dentre outros elementos minerais (Laime et al., 2011). Devido à sua composição, o descarte desse subproduto é motivo de grande preocupação devido ao volume em que é produzido, que chega a 10 L por litro de etanol (Mariano et al., 2009; Pramanik et al., 2012).

De acordo com a companhia nacional de abastecimento (Conab) a produção total da cana-de-açúcar na safra 2015/2016 foi de 654,6 milhões de toneladas, com acréscimo de 3,1% em relação à safra anterior. Já a produção de etanol foi 29,2 bilhões L na safra de 2015/2016, o que representa em torno de 292 bilhões L de vinhaça gerada. Segundo Nitayavardhana et al. (2010) o processo de fertirrigação tem sido o método mais comumente utilizado para descarte da vinhaça no Brasil, causando contaminação de vastas áreas de águas subterrâneas. A prática prolongada da fertirrigação aumenta a concentração de cálcio, magnésio, matéria orgânica e potássio, elevando a condutividade elétrica e a salinização do solo (Mariano et al., 2009). Assim, graças à presença de nutrientes na vinhaça, esta pode ser utilizada como meio de cultura para as microalgas.

Devido à alta capacidade de produção de biomassa, resistência e capacidade de adaptação, *Chlorella vulgaris* é comumente utilizada no tratamento de efluentes (Aslan e Kapdan, 2006; Wang et al., 2015). Muitos estudos demonstram o potencial dessa microalga na remoção de nutrientes como o nitrogênio, fósforo, além de poder usar fontes orgânicas de carbono muitas

vezes presentes em águas residuárias (Devi et al., 2012; Matos et al., 2015). Neste caso, o reaproveitamento da vinhaça, insumos de grande produção agrícola, pode promover vantagens ambientais por tratar o efluente e, econômica por produzir biomassa com alto valor agregado.

Nesta parte da pesquisa de doutorado utilizamos vinhaça agroecológica obtida de um sistema de produção orgânica. No laboratório a vinhaça foi submetida à filtração e centrifugação para a remoção de material particulado. Tendo em vista que vinhaça é um resíduo rico em elementos minerais, não foi acrescido qualquer nutriente adicional à vinhaça. Os experimentos que constaram do cultivo de *C. vulgaris* na vinhaça tratada foram comparados com controles feitos em meio de cultura sintético. Os resultados mostraram que em vinhaça 20%, *C. vulgaris* mostraram melhores taxas de crescimento em relação ao controle.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Vinhaça

A vinhaça usada nesta pesquisa foi doada pela Usina São Francisco, localizada na cidade de Sertãozinho (SP, Brasil). Essa vinhaça é proveniente de um sistema de produção orgânico de açúcar e álcool. No laboratório de Biotecnologia de Algas, a vinhaça foi filtrada de modo sequencial através de cinco peneiras com abertura de malha de 0,590 - 0,210 - 0,177 - 0,125 - 0,053 mm. Em seguida foi armazenada em frascos plásticos e congelada em freezer (-15 °C). No momento de uso, a vinhaça foi descongelada e centrifugada em centrífuga refrigerada (Sorvall Legenda XTR, EUA) a 2516 g por 10 minutos. Em seguida, filtrada em filtros de fibra de vidro com diâmetro de poro 0,7 µm (Sartorius, Alemanha). A vinhaça foi então diluída em água destilada autoclavada (1 atm, 20 min; Phoenix Lufarco – Brasil) e utilizada em concentração de 20%. O pH final foi ajustado para 7,0 (pHmetro Logen Scientific, Brasil).

A vinhaça é contaminada por microrganismos heterotróficos, dentre os quais citamos leveduras e bactérias (Cândido, 2015). Salientamos que não houve procedimentos de esterilização da vinhaça diluída antes dos experimentos, uma vez que tal etapa seria inviável em larga escala.

Os experimentos controle foram feitos em L.C. Oligo (AFNOR, 1980) modificado. A modificação constou de aumentar em 2x a concentração de nutrientes e em 4x a concentração de NaHCO_3 . Os controles foram esterilizados em autoclave (1 atm, 20 min; Phoenix Lufenco – Brasil). Todos os experimentos foram feitos com 3 réplicas.

2.2. Inóculo

Foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris* isolada de uma estação de tratamento de esgoto (ETE) no distrito de Água Vermelha, município de São Carlos (SP, Brasil). A alga foi mantida em meio de cultura L.C. Oligo (AFNOR, 1980), conforme tabela 2, modificado (2x mais nutrientes e 4x mais NaHCO_3) no Laboratório de Biotecnologia de Algas (Universidade Federal de São Carlos – SP, Brasil).

Para a confecção do inóculo, uma alíquota foi retirada do banco de cultura e mantida em fase exponencial através de sucessivas repicagens sempre na fase exponencial de crescimento. Estas culturas foram mantidas em condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C), luminosidade ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e fotoperíodo 12/12 h ciclo claro/escuro.

Tabela 1 - Composição das soluções utilizadas (1 – 8) para confecção do meio LC Oligo (AFNOR, 1980).

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

2.3. Experimentos

O experimento foi inoculado com células em fase exponencial de crescimento e cuja eficiência fotossintética foi previamente determinada (0,71), para certificação do estado fisiológico das células. Em situação saudável (PhytoPAM ~ 0,69 – 0,75), as células eram inoculadas, mas tendo-se resultados de eficiência fotossintética menor, as células eram descartadas e novo inóculo era feito). As culturas que continham 330 mL foram iniciadas com densidade de 1,2x10⁵ cel mL⁻¹ e mantidas sob condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade interna (120 μmol m⁻²s⁻¹), fornecida por LED branco quente e vermelho em fotoperíodo 12/12 h ciclo claro/escuro. Os experimentos tiveram a duração de 96 h.

As células foram cultivadas em meio L.C. Oligo modificado em frascos de cultura de tecido aerados individualmente com ar ambiente fornecido por bombas de aquário em triplicatas experimentais para os tratamentos e controle conforme a imagem da figura 1 a seguir.



Figura 1 - Imagem do ensaio experimental no cultivo de *C. vulgaris* em A) meio L.C. Oligo modificado e B) na melhor condição testada anteriormente (vinhaça 20%).

2.4. Crescimento populacional de *C. vulgaris*

O crescimento populacional nos cultivos foi monitorado por contagem ao microscópio óptico (BioFocus, Brasil), utilizando-se um hemocitômetro (Fuchs-Rosenthal) a cada 24 h. As taxas de crescimento máximas foram calculadas representando graficamente o logaritmo natural da densidade celular (células mL⁻¹) em função do tempo (dias). A linha reta obtida no crescimento exponencial foi ajustada por meio de regressão linear e o coeficiente angular foi tomado como a taxa de crescimento específica.

2.5. Parâmetros fotossintéticos de *C. vulgaris*

Como os parâmetros fotossintéticos são quantificados por fluorescência e a vinhaça possui compostos fluorescentes em sua composição, para estas determinações, as células algais foram separadas do resíduo. Para isso, amostras de 2 mL foram obtidas das culturas e colocadas em 8 mL de meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), centrifugadas em tubos de polipropileno em centrífuga refrigerada (Sorvall Legenda XTR, EUA) em $1.329 \times g$ por 15 minutos. O sobrenadante foi removido, e as células foram lavadas duas vezes por centrifugação para garantir a remoção de

resíduos de vinhaça. O mesmo procedimento foi feito com o controle. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi removido e ao sedimentado algal foi adicionado meio LC Oligo no mesmo volume inicial da amostra coletada (2 mL). A amostra foi agitada e finalmente usada para as análises envolvendo fluorescência modulada (PhytoPAM) e não modulada (Fluorímetro Turner – Turner Designs, USA).

A concentração de clorofila **a** (mg L^{-1}) foi determinada através de fluorescência *in vivo* (Fluorímetro Turner) usando-se uma curva de calibração onde no eixo *X* tem-se a concentração de clorofila **a** extraída de uma cultura de *C. vulgaris* em fase exponencial de crescimento e no eixo *Y* tem-se a fluorescência equivalente. Esta curva foi ajustada através de regressão linear, cuja equação foi usada para o cálculo da concentração de clorofila **a** através da fluorescência. As determinações de eficiência fotossintética máxima foram feitas com células, mantidas previamente no escuro por 20 min, em um fluorímetro PhytoPAM (Walz – Alemanha).

Estas análises, que envolvem a fluorescência da clorofila, quer via PhytoPAM quer via fluorímetro Turner, são seletivas e se aplicam somente às microalgas, não a todos os organismos presentes na vinhaça.

2.6. Caracterização da vinhaça

A vinhaça teve vários de seus constituintes determinado em dois momentos, antes e após o cultivo de *C. vulgaris*. Para a caracterização após o cultivo, a vinhaça foi centrifugada em $1.329 \times g$ por 15 minutos para separação das células e o sobrenadante, constituído por vinhaça 20%, foi enviado para análise físico-química no Laboratório de Análises Ambientais (ASL[®]), localizado no município de Rio Claro (SP, Brasil). A caracterização da vinhaça seguiu a norma P 4.231 (CETESB). A vinhaça também teve a concentração de carbono orgânico total (COT) dissolvido e nitrogênio orgânico total dissolvido (NOT) no meio de cultivo determinadas. Para tanto usou-se um analisador de carbono (LABMAC - Shimadzu modelo TOC/TN, Japão) no Departamento

de Tecnologia Agroindustrial e Sócio Economia Rural da Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras.

2.7. Biomassa Seca e Composição Bioquímica

A quantificação gravimétrica da biomassa seca (mg L^{-1}) incluiu a biomassa total dos cultivos, ou seja, a microalga *C. vulgaris*, eventuais bactérias e leveduras presentes no meio, já que os cultivos não foram axênicos. A biomassa seca foi feita ao início do crescimento (00 h), na exponencial (48 h) e na transição da fase de crescimento exponencial para a estacionária (96 h).

Para a determinação da biomassa seca, usou-se volume de 30 mL que foi centrifugado em $1.329 \times g$ por 15 min para a remoção da vinhaça e, em seguida, a amostra foi ressuspensa em meio LC Oligo e foi filtrada em filtros de fibra de vidro com diâmetro de poro $0,7 \mu\text{m}$ (Sartorius, Alemanha). A amostra foi filtrada e o filtro transferido para secagem em estufa (temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 h), período previamente testado para obtenção de peso constante dos filtros. Estes, contendo a biomassa seca tiveram a massa determinada em balança de precisão microanalítica Sartorius MC 21S. Dos resultados obtidos para cada filtro com biomassa seca subtraiu-se o valor do respectivo filtro seco e incinerado, mas sem biomassa.

As determinações bioquímicas foram feitas na biomassa total (*C. vulgaris*, bactérias e leveduras) nas fases exponencial e estacionária do crescimento das células de acordo com o método Bradford (1976) pra proteínas totais e Albalasmeh et al. (2013) para carboidratos totais.

A determinação de lipídios totais foi feita por cromatografia de camada delgada com detector por ionização em chama (TLC/FID) usando-se um IATROSCAN (Iatron Laboratories, Japan). Para extração dos lipídios, todo material utilizado foi incinerado em mufla FDG3P-S, modelo 7000, por $400 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 8 h. No momento de uso, o material foi enxaguado por três vezes com metanol e posteriormente clorofórmio na lavagem. A amostra foi filtrada em membrana de fibra

de vidro (diâmetro de poro 0,2 μm - Sartorius, Alemanha) previamente incinerada em 400 °C por 8 h. Somente pinça de metal previamente enxaguada com metanol e clorofórmio foi usada para manipular a membrana. Em seguida as membranas com as amostras filtradas foram armazenadas em frascos previamente enxaguados com metanol e clorofórmio (3 vezes cada), contendo 2,0 mL de clorofórmio. Nitrogênio gasoso (N_2) foi usado para a remoção do oxigênio e os frascos foram lacrados e conservados em freezer até o momento da extração dos lipídios.

Para a extração de lipídios, os filtros contendo as amostras foram inseridos em tubo de Teflon® da marca Nalgene, previamente enxaguados por três vezes em metanol e clorofórmio. Nos tubos foram adicionados 2 mL de metanol e 2 mL de clorofórmio conforme metodologia modificada descrita em Lombardi et al. (1995) e Parrish (1999). As amostras foram submetidas a ultrassom para rompimento celular usando-se um aparelho de ultrassom de ponteira UNIQUE (Unique Group, Indaiatuba, Brazil) por 5 minutos por duas vezes e centrifugadas em 1846 $\times g$ em 0 °C por 5 minutos. Isso resultou na formação de duas fases, uma camada aquosa inferior e uma camada superior contendo lipídios. As amostras foram concentradas sob N_2 , para posterior determinação no Iatroscan.

2.8. Extração de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram extraídos com 14 % $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ e hexano. O extrato de lipídio foi seco sob nitrogênio e adicionados 0,5 mL de hexano e 1,5 mL de $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (14 %). A mistura foi agitada, submetida ao ultrassom por 4 minutos e aquecida a 85 °C por 1,5 h. Posteriormente a amostra foi resfriada até atingir temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de água e 2,0 mL de hexano, formando duas camadas. A camada orgânica foi retirada, seca sob N_2 , vedada e armazenada em freezer (-20 °C). Essas amostras foram enviadas para o Ocean Sciences Laboratory da Memorial University of Newfoundland (Newfoundland, Canadá) e

gentilmente analisadas pela equipe do Prof. Dr. Christopher C. Parrish, coordenador do laboratório.

A análise de ácidos graxos foi feita em cromatógrafo gasoso com ionização em chama equipado com autoamostrador (HP 6890 GC FID; 7683 autosampler). A coluna do cromatógrafo foi a ZB wax+ (Phenomena, USA), com 30 m de comprimento e diâmetro interno de 0,32 mm. O procedimento cromatográfico teve início com a temperatura da coluna em 65 °C por 0,5 min, seguida de aumento em rampa até 195 °C em taxa de 40 °C/min, onde foi mantida por 15 min e então elevada até a temperatura de 220 °C em uma taxa de 2 °C/min. A temperatura final foi mantida por 0,75 min. O hidrogênio foi o gás carreador a 2,0 mL/min e a temperatura do injetor teve início em 150 °C, sendo elevada a 250 °C em uma taxa de 120 °C/min. A temperatura do detector permaneceu constante em 260 °C. Os picos cromatográficos foram identificados usando-se os tempos de retenção de padrões comprados da Supelco: 37 component FAME mix (47885-U), bacterial acid methyl ester mix (47080-U), PUFA 1 (47033) e PUFA 3 (47085-U). Os cromatogramas são integrados usando o Varian Galaxies Chromatography Data System, versão 1.9.3.2.

2.9. Análise térmica

Para os testes termogravimétricos, utilizou-se massa de aproximadamente 4,0 mg de amostra liofilizada para a biomassa cultivada em meio de cultura L.C. Oligo (*C. vulgaris* – controle) e biomassa cultivada em 20% de vinhaça (*C. vulgaris*, bactérias e leveduras). As amostras foram inseridas em suporte de alumina e introduzidas no forno da balança termogravimétrica (TGA) da marca Shimadzu 50-H. O suporte escolhido foi o de alumina por ser resistente a altas temperaturas. A programação de temperatura foi ajustada entre a temperatura ambiente até 800 °C com razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. Como gás de arraste foi utilizado ar sintético com vazão de 100 mL min⁻¹. Essas determinações foram gentilmente realizadas pela Dra. Paula Cristina Manoel Crnkovic, no Laboratório de Engenharia Térmica e Fluidos, da Escola de

Engenharia de São Carlos (EESC/USP).

2.10. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram plotados em gráficos usando-se o programa Origem Pro 8.5 (EUA). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R (Áustria), ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$) foi usado para a comparação dos resultados.

3. RESULTADOS

O rendimento fotossintético máximo (ϕ_m) é mostrado na figura 2. No controle, os valores de ϕ_m foram mais elevados do que na vinhaça somente a partir do segundo dia de cultivo, entretanto a taxa de crescimento foi maior na vinhaça ($1,1 \text{ dia}^{-1} \pm 0,02$ do que no controle ($0,9 \text{ dia}^{-1} \pm 0,05$).

Os resultados da concentração de clorofila **a** são mostrados na figura 3, onde observamos aumento em função do tempo experimental. Destaca-se o maior aumento do controle em comparação com a vinhaça.

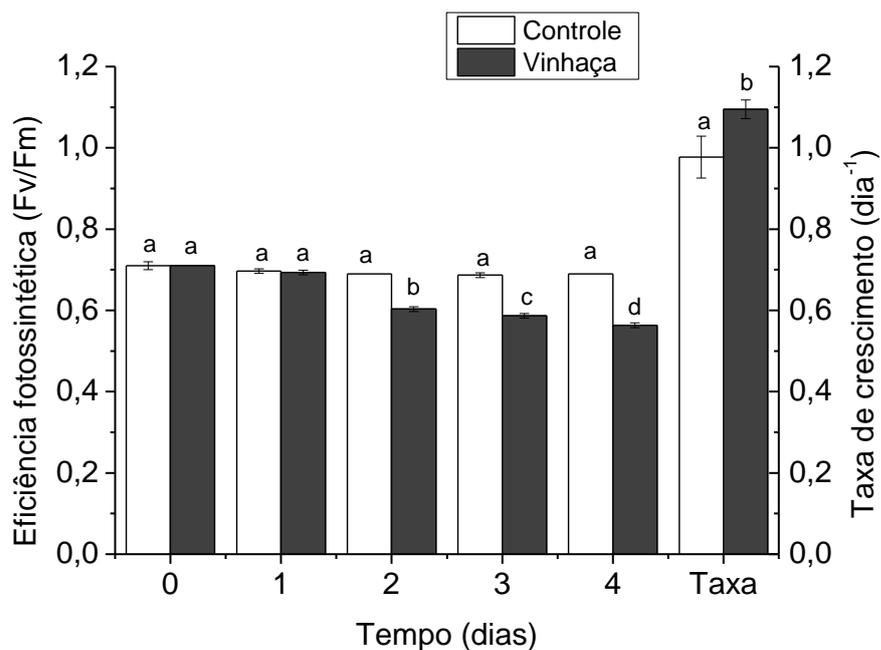


Figura 2 - Valores de eficiência fotossintética nos tratamentos controle e em vinhaça 20% ao longo dos quatro dias de experimento. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0.05$).

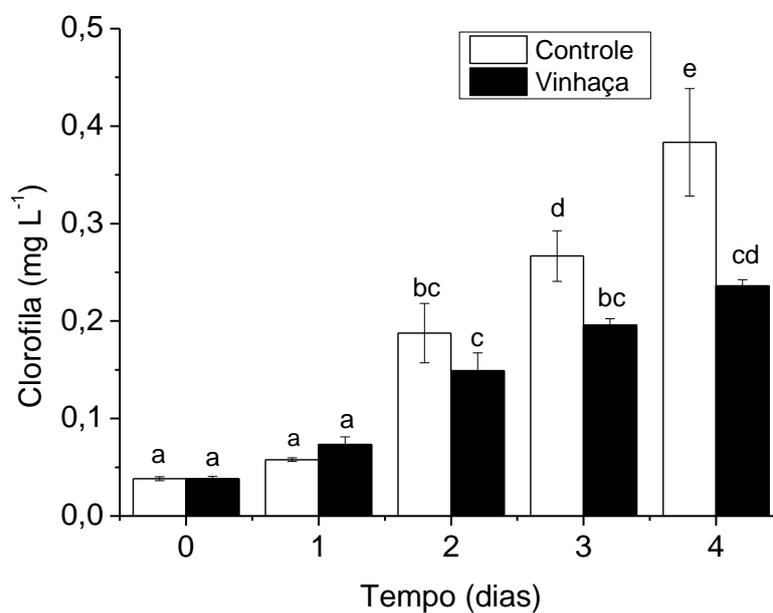


Figura 3 - Valores de clorofila (mg/L) nos tratamentos controle e em vinhaça 20% ao longo de 4 dias de experimento. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas significativas para ($p < 0.05$).

Os dados referentes ao rendimento fotossintético máximo, clorofila **a** e taxas de crescimento possibilitam analisar as células da microalga *C. vulgaris* separadamente aos contaminantes presentes na vinhaça. Porém, recordamos que a partir dos próximos dados, a biomassa produzida nos cultivos em vinhaça significa inclusão de bactérias e leveduras por não se tratar de cultivo axênico. Portanto, os valores apresentados a seguir são relativos à *Chlorella vulgaris* e contaminantes, formando um consórcio microbiano. A alteração na composição química da vinhaça como resultado da atividade metabólica do consórcio microbiano é mostrada na tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização da vinhaça pré e pós-cultivo. Caracterização físico-química da vinhaça 20% antes e após o cultivo de *C. vulgaris*. Todas as concentrações são reportadas em mg L⁻¹.

| Parâmetros | Pré cultivo | Pós cultivo | Eficiência de Remoção (%) |
|---|--------------------|--------------------|----------------------------------|
| Sólidos Suspensos Totais | 255 | 80 | 69 |
| Dureza (CaCO₃) | 467,4 | 460 | 1,4 |
| N - Nítrico (NO₃⁻) | > 11.400 | > 11.400 | -- |
| N - Nitroso (NO₂⁻) | > 300 | > 300 | -- |
| N - Amoniacal (NH₄⁺) | 3,31 | 0,073 | 98 |
| Sódio | 175 | 177 | -- |
| Cálcio | 143 | 141 | 1,4 |
| Potássio | 2400 | 683 | 71,5 |
| Magnésio | 26,8 | 26,6 | -- |
| Sulfato | 432 | 408 | 5,6 |
| Fosfato | > 2000 | > 2000 | -- |
| DBO | 3370 | 2248 | 33 |
| DQO | 5696 | 4352 | 24 |
| N - orgânico total | 35,42 | 20,73 | 42 |
| C - orgânico total | 1821 | 1283 | 30 |

Observa-se neste caso, elevada eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal (98%) e potássio (72%), e remoção parcial do nitrogênio orgânico total (42%), carbono orgânico total (30%), DBO (33%) e DQO (24%).

Os valores de biomassa seca são mostrados na tabela 3. Em vinhaça, cerca de $124 \text{ mg L}^{-1} \pm 2,95$ foi obtido em contraste com $71,94 \text{ mg L}^{-1} \pm 5,03$ no controle. A utilização dos nutrientes pelo consórcio microbiano conferiu o aumento significativo da biomassa seca no final do cultivo em vinhaça.

De acordo com a tabela 3 observa-se que no tratamento controle, a concentração de proteínas de *C. vulgaris* é superior na fase exponencial do crescimento, mas na vinhaça, é maior na fase estacionária e, neste caso refere-se à concentração proteínas no consórcio microbiano, não somente nas microalgas. Em ambos os cultivos não foram observados fatores de estresse nutricional evidenciado pela concentração reduzida de carboidratos e lipídios.

Tabela 3 - Concentração de carboidratos, proteínas e lipídios (mg cel^{-1}); valores de biomassa seca (mg L^{-1}). Dados referentes aos cultivos em vinhaça e controle em meio LC Oligo nas fases exponencial (48h) e estacionária (96h) de crescimento das células de *C. vulgaris*.

| | Vinhaça | | Controle (LC Oligo) | |
|----------------------|------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Fase Exponencial | Fase estacionária | Fase Exponencial | Fase estacionária |
| Carboidratos | $1,81 \pm 0,18$ | $3,81 \pm 0,19$ | $3,34 \pm 0,20$ | $2,10 \pm 0,12$ |
| Proteínas | $5,42 \pm 0,80$ | $9,44 \pm 0,75$ | $7,40 \pm 0,80$ | $6,11 \pm 0,76$ |
| Lipídios | $0,14 \pm 0,02$ | $0,22 \pm 0,02$ | $0,12 \pm 0,22$ | $0,14 \pm 0,06$ |
| Biomassa Seca | $33,05 \pm 2,93$ | $124,02 \pm 2,95$ | $44,6 \pm 6,5$ | $71,94 \pm 5,03$ |

O perfil de ácidos graxos é mostrado na tabela 4. Observa-se que não ocorre diferença entre as classes lipídicas nos cultivos controle e vinhaça, porém no cultivo em vinhaça os valores são relativamente maiores.

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos. Valores em percentual (%) da composição da classe lipídica detectados em condições de cultivo em meio L.C. Oligo e vinhaça diluída em 20%

| Ácido graxo | Controle | Vinhaça |
|--------------------|-----------------|----------------|
| C16:0 | 22,0 ± 0,52 | 24,0 ± 0,04 |
| C18:0 | 4,0 ± 0,59 | 5,0 ± 0,19 |
| C18:1n9 | 2,0 ± 0,42 | 4,0 ± 0,47 |
| C18:1n11 | 8,0 ± 0,37 | 13,0 ± 0,26 |
| C18:2n6 | 4,0 ± 0,35 | 9,0 ± 0,68 |
| C18:3n3 | 9,0 ± 0,42 | 7,0 ± 0,67 |
| SAFA | 34,0 ± 0,20 | 35,0 ± 0,66 |
| MUFA | 26,0 ± 0,22 | 31,55 ± 0,45 |
| PUFA | 34,0 ± 0,32 | 34,0 ± 0,10 |
| ω 3 | 18,0 ± 0,89 | 20,0 ± 0,32 |

Pela finalidade de verificarmos as diferenças entre a biomassa cultivada em vinhaça e no meio L.C. Oligo (controle), utilizamos análise termogravimétrica como complementar. Esta técnica analítica foi escolhida devido a sua sensibilidade, podendo assim indicar sensíveis alterações na composição algal. Os resultados desta técnica são representados pelas curvas termogravimétricas (TG) e sua derivada (DTG), cujos perfis caracterizam cada amostra.

Nas figuras 4 A e B são mostradas as curvas TG e DTG das amostras controle e vinhaça, respectivamente. Nota-se que ambas as biomassas apresentam perfis de curvas semelhantes, isto é, ambas apresentam quatro etapas de perdas de massa, sendo a primeira entre a temperatura ambiente e 150 °C, a segunda entre 150 °C e 400 °C e a terceira etapa entre 400 °C e 640 °C e a quarta entre 640 °C e 800 °C.

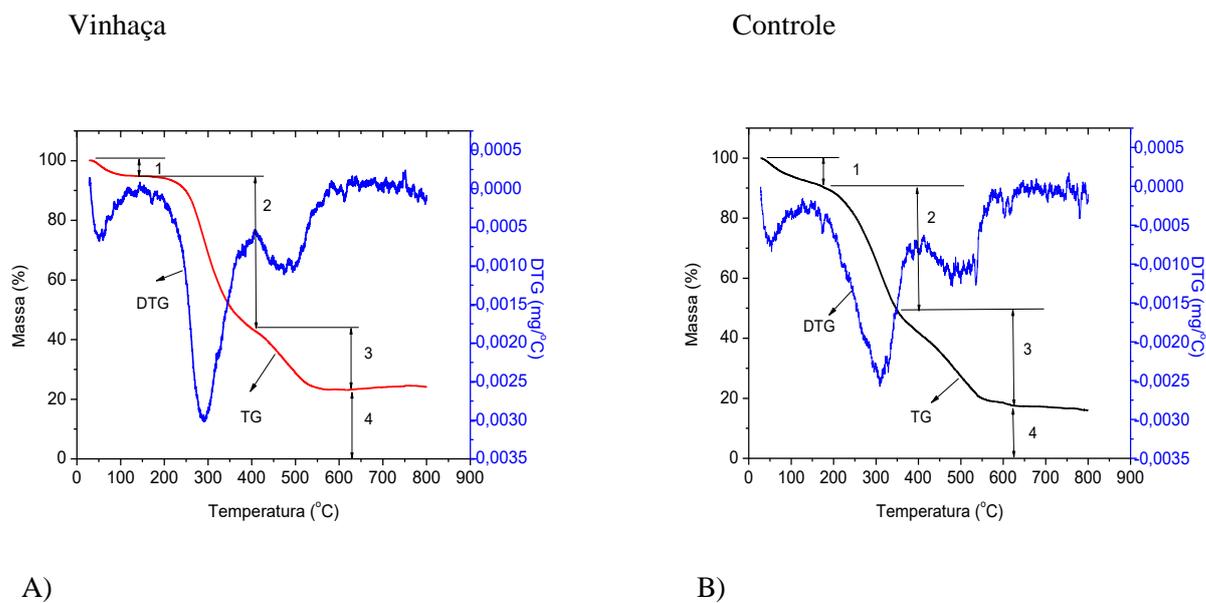


Figura 4 - Curvas termogravimétrica (TG) e derivada da termogravimétrica (DTG) em A, vinhaça e, em B, o controle. As etapas da combustão são definidas nas etapas 1,2,3 e 4.

Neste caso, os valores relativos às perdas de massa em cada etapa da combustão, são apresentados a seguir na tabela 5.

Tabela 5 – Etapas de perda de massa (%) e faixa de variação de temperatura (°C). Amostras controle e vinhaça ao longo do processo de combustão.

| Etapas | Perdas de massa das amostras (%) | | | |
|--------|----------------------------------|------|----------|------|
| | Vinhaça | T °C | Controle | T °C |
| 1 | 5,0 | 52 | 7,0 | 53 |
| 2 | 52,0 | 290 | 51,0 | 311 |
| 3 | 20,0 | 496 | 24,0 | 480 |
| 4 | 23,0 | 800 | 18,0 | 800 |

Os intervalos de temperatura indicados para cada etapa nas curvas TG são delimitados de acordo com as inflexões das curvas DTG, cujos picos das etapas 1, 2 e 3 encontram-se nas temperaturas 53 °C, 311 °C e 480 °C para a biomassa de *C. vulgaris* e nas temperaturas 52 °C, 290 °C e 496 °C para a biomassa em vinhaça. Mesmo que há um descolamento dos picos das curvas DTG estes resultados mostram que a análise termogravimétrica indica uma tendência de semelhança entre as amostras.

Para ilustrar tal semelhança, apresenta-se a sobreposição das curvas TG (Figura 5-A) e DTG (Figura 5-B) para ambas as amostras. Assim, pode-se notar que os intervalos de temperatura nos quais ocorrem as etapas de degradação térmica são muito próximos, podendo-se confirmar a semelhança das amostras. Neste caso, a característica do comportamento térmico em oxigênio do tratamento controle é similar à característica da biomassa em vinhaça, o que significa que a biomassa algal predominou na vinhaça, mesmo na presença de outros microrganismos.

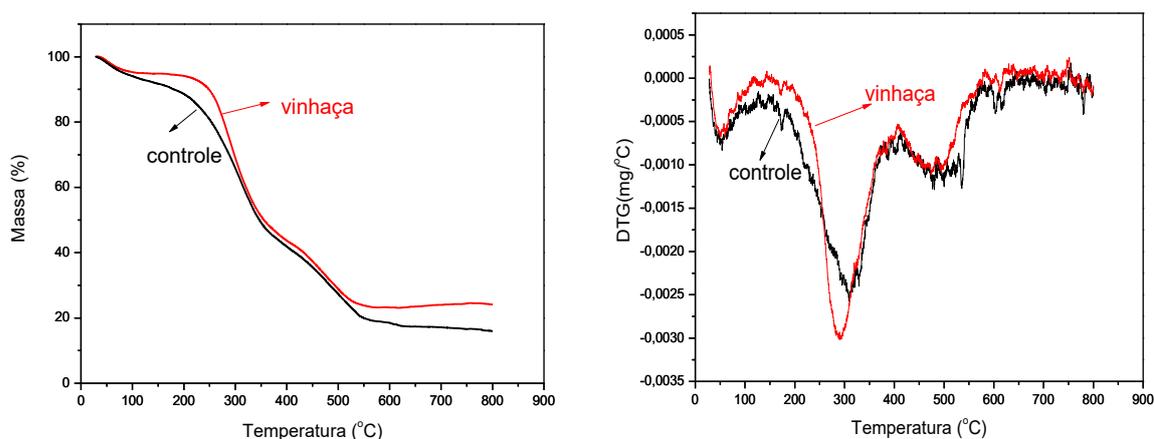


Figura 5 - Curva termogravimétrica (TG) e derivada da termogravimétrica (DTG), dos cultivos vinhaça 20% e controle(LC Oligo)

Nota-se pelos dados apresentados na Tabela 4, que a etapa 1 refere-se ao percentual de hidratação das amostras, as etapas 2 e 3 são referentes a compostos orgânicos, de massa molecular menor e maior, respectivamente. Na etapa 4 é possível verificar a diferença entre as amostras em relação conteúdo de cinzas, pois enquanto a amostra de biomassa controle apresenta 18% de resíduo, a amostra cultivada em vinhaça apresenta 23%.

4. DISCUSSÃO

O valor de rendimento quântico máximo obtido para o controle está de acordo com o esperado para células saudáveis ($\phi_m \sim 0,70$) como mostrado na literatura (Lombardi e Maldonado, 2011). Entretanto, o rendimento máximo obtido para os cultivos em vinhaça foi abaixo de 0,6 - valor considerado representativo de baixa atividade fotossintética. Mas, apesar disso, a taxa de crescimento foi maior na vinhaça do que no controle. Segundo a literatura, o cultivo de *C. vulgaris* na presença de carbono orgânico que por ela pode ser usado como fonte de energia, resulta em menor dependência da luz. Borges et al. (2007) avaliaram o potencial de absorção de carbono pelas microalgas e relacionaram a saúde fisiológica das células à fixação de carbono por esses microrganismos. Tendo como base o maior crescimento de *C. vulgaris* na vinhaça, apesar do menor potencial em realizar fotossíntese e a presença de carbono orgânico, podemos sugerir que houve atividade de metabolismo mixotrófico na microalga (Titte et al., 2005; Liu et al., 2009; Bhatnagar et al., 2011; Abreu et al., 2012; Candido, 2015).

Este estudo demonstrou a capacidade de assimilação de nutrientes, principalmente nitrogênio (98%) e potássio (72%), o que contribui para redução dos efeitos negativos do uso da vinhaça em processos de fertirrigação, já que o excesso de nutrientes causa salinização do solo e poluição do lençol freático (Silva et al., 2007). De acordo com a literatura, *C. vulgaris* mostra-se eficiente na remoção dos nutrientes presentes nos efluentes (Aslan & Kapdan, 2006). Entretanto, neste estudo, a redução da concentração de nutrientes na vinhaça pode ter a contribuição do metabolismo dos outros organismos presentes, bactérias e leveduras. De acordo com Nitayavardhana et al. (2010) o cultivo de microrganismos em vinhaça de tequila reduziu a concentração de nutrientes. Neste estudo, o consumo de nutrientes é suportado pelo aumento de biomassa e consequente produção de proteínas, (Renaud et al., 1991; Tam et al., 1996; Arumugam et al., 2013), mas não de carboidratos.

De acordo com a literatura, as microalgas podem sofrer alterações bioquímicas de acordo com as condições a que são submetidas. A síntese de material de reserva apresenta-se mais importante em situações de estresse, podendo este ser nutricional. Como a vinhaça ofereceu condições propícias que resultou em elevada taxa de crescimento algal, a síntese de material de reserva tal qual aos carboidratos, cedeu lugar à síntese proteica e formação de biomassa. O elevado valor de proteínas em relação aos carboidratos revela o estado saudável de crescimento das células (Illman et al., 2000; Chia, 2013; Montanhim et al., 2014; Candido, 2015).

Em relação aos lipídios, seu acúmulo indica a redução do potencial de crescimento das células (Takeshita et al., 2014). Sabe-se que quando vários fatores de estresse agem simultaneamente, as células respondem com o aumento do seu teor de lipídios totais (Lombardi e Wangersky, 1991; Gardner et al., 2011; Pal et al., 2011; Chia et al., 2013). Esta mudança metabólica para conversão de reserva não ocorreu neste trabalho, já que a presença de nitrogênio permitiu o crescimento celular (Devi et al., 2012; Lin et al., 2015). A baixa concentração de lipídios celulares em vinhaça é mais um sinal de que as condições de crescimento à biomassa (microalga, bactérias e leveduras) encontravam-se adequadas, não ocorrendo fatores de estresse sobre a microalga (Lombardi e Wangersky, 1991).

A limitação de nutrientes afeta o metabolismo lipídico com alterações qualitativas e quantitativas nas classes lipídicas (Lombardi and Wangersky, 1991). Como em ambos os cultivos prevalecem cadeias C₁₆ e C₁₈ conforme os dados da literatura para *Chlorella* sp., não ocorreram diferenças de classes lipídicas entre os cultivos (Devi et al., 2012; Villar-Argaiz et al., 2009; Chia et al., 2013).

A formação de MUFA e SAFA está relacionada com o teor de lipídios totais no qual a fonte de carbono pode interferir, por exemplo, na síntese de ácido graxo (Gushina e Harwood, 2006; Chia et al., 2015). Neste caso, em comparação com o cultivo controle, ocorre diferença quantitativa com maior percentual de ácidos graxos no cultivo em vinhaça. Estes dados estão de

acordo Das et al. (2011) que observou aumento na quantidade de ácidos graxos em cultivo de *Nannochloropsis* sp em meio suplementado com glicerol e cultivadas expostas a LEDs. Esses dados são confirmados pela literatura sobre o aumento na produção de ácidos graxos em culturas mixotróficas em relação às culturas fotoautotróficas e heterotróficas (Bhatnagar et al., 2011; Devi et al., 2012; Lin e Wu, 2015).

Em relação ao comportamento térmico, a curva TG possibilita verificar os eventos de perda de massa que ocorrem com as amostras, sendo considerado como uma impressão digital da amostra (Angrawal e Chakraborty, 2013). Neste trabalho, nas duas amostras (controle e vinhaça) os perfis das curvas TG são similares, indicando o mesmo comportamento térmico mesmo na presença de microrganismos no cultivo em vinhaça. Isso sugere que prevaleceu o conteúdo algal sobre o microbiano.

Somente com os dados da análise termogravimétrica não é possível identificar precisamente a composição das amostras. Porém, ao associar os dados da análise termogravimétrica com os dados referentes às análises bioquímicas, é possível verificar a presença dos compostos orgânicos da biomassa produzida. Em estudos da literatura sobre análise térmica de *C. vulgaris* com perfil similar a este trabalho, os autores relataram que a etapa 2 como consta na Figura 5 é um indício de desvolatilização de carboidratos e proteínas e a etapa 3, corresponde a desvolatilização de lipídios (Angrawal & Chakraborty, 2013; Rizzo et al., 2013).

Segundo a literatura, cultivar microalgas em vinhaça pode auxiliar na saúde de animais, pois os microrganismos presentes atuam como probióticos, podendo tornar mais eficiente na absorção dos nutrientes pelos animais. No caso de aves, as microalgas contribuem com a fertilidade, o que resulta em maior produção de ovos e melhora na qualidade das gemas (Belay et al., 1996; Becker, 2007; Morales, 2007; Laime et al., 2011; Hidalgo et al., 2011). Segundo Václav Kotrbáček et al. (2015) as células de *Chlorella* é um complexo suplemento para diferentes espécies animais que melhora a saúde e fisiologia do animal, porém se fosse produzida com baixo custo, a biomassa

algal poderia atuar como um aditivo parcial para o mais caro componente da ração. Assim, devido ao elevado conteúdo proteico detectado na biomassa produzida nesta pesquisa, sugere-se maior investigação do seu uso como suplemento em ração animal.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo mostramos, pela avaliação do rendimento fotossintético, clorofila **a** e taxa de crescimento que *C. vulgaris* apresentou um metabolismo mixotrófico na presença de fonte de carbono orgânico na vinhaça.

A alta eficiência das microalgas e dos microrganismos na remoção dos compostos orgânicos, DBO, elementos minerais e, em especial o nitrogênio (98%) e o potássio (70%) presentes na vinhaça diluída, mostrou que esse substrato é capaz de gerar biomassa rica em proteínas, com variedade de ácidos graxos.

As melhores condições de crescimento à microalga *Chlorella vulgaris* foram proporcionadas pela vinhaça filtrada e diluída (vinhaça 20%) em culturas iluminadas com lâmpadas LED branco quente com vermelho. Nessa situação foram obtidas as maiores produções de proteínas e menores sínteses de carboidratos e lipídios, indicando ausência de estresse fisiológico.

6. REFERÊNCIAS

- Abreu, A.P. et al. 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresource Technology* 118: 61–66.
- AFNOR-Association Française de Normalisation. 1980. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale T90-304.
- Agrawal, A. & Chakraborty, S. 2013. A kinetic study of pyrolysis and combustion of microalgae *Chlorella vulgaris* using thermo-gravimetric analysis. *Bioresource Technology* 128:72–80.
- Albalasmeh, A.A.; Berhe, A.A.; Ghezzehei, T.A. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, 97 (2), 253 – 61.
- Alcántara, C. et al. 2015. Mixotrophic metabolism of *Chlorella sorokiniana* and algal-bacterial consortia under extended dark-light periods and nutrient starvation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:2393–2404.
- Arumugam, M. et al. 2013. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource Technology* 131: 246–249.
- Aslan, S. & Kapdan, I.K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological engineering* 28: 64–70.
- Becker, E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25: 207–210.
- Belay, A; Kato, T.; Ota, Y. 1996. *Spirulina (Arthrospira)*: potential application as an animal feed supplement. *Journal of Applied Phycology* 8: 303-311.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.D. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy.* 88, 3425–3431.
- Budiyono, I. S.; Sumardiono, S.; Sasongko, S. B. (2014). Production of *Spirulina platensis* Biomass Using Digested Vinasse as Cultivation Medium. *Trends in Applied Sciences Research*, 9 (2), 93 – 102.
- Borges, L.V.; Faria, B.M.; Odebrecht, C.; Abreu, P.C. O. V. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Revista Atlântica*, Rio Grande, 29: 35-46.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochemistry*, 72, 248p.
- Candido, C. 2015. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça convencional e biodigerida tratadas: uma abordagem ecofisiológica. Dissertação de mestrado. São Carlos : UFSCar, 64 f.

- Chen, M. et al., 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102: 1649–1655.
- Chia, M.A. et al. 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquatic Toxicology* 128–129:171–182.
- Chia, M.A. et al, 2015. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). *Aquatic Toxicology* 160: 87–95.
- Conab – Companhia nacional de abastecimento- 2015. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. V. 2 – Safra 2015/16 N. 1, Brasília, 1-28.
- Das, P. et al. 2011. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light. *Bioresource Technology*. 102: 3883 – 3887.
- Devi, M.P. et al. 2012. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy* 43: 276 – 283.
- Gardner, R., Peters, P., Brent, P., Cooksey, K.E., 2011. Medium pH and nitrate concentration effects on the accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. *Journal of Applied Phycology* 23, 1005–1016.
- Gushina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 45. 160-186.
- Hidalgo K. et al. 2011. Vinhaça de destilaria como aditivo alternativo na alimentação de aves. XXII Congresso Latino-Americano de Avicultura 2011.
- Illman, A.M.; Scragg, A.H; Shales, S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27 : 631–635.
- Kouzuma, A.; Watanabe, K. 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 33:125–129.
- Kotrbaček, Y. et al. 2015. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal Appl Phycol*. 27: 2173–2180.
- Laime, E.M.O. et al. 2011. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*.5:16.
- Lin, T.S e Wu, J.Y. 2015. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology* 184: 100–107.
- Liu, X. et al. 2009. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricorutum*. *Appl Phycol*. 21:239–246.

- Lombardi A.T., Wangersky, P.J., 1995. Particulate lipids class composition of tree marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. *Hydrobiologia*, 306, 1-6.
- Lombardi, A.T., Wangersky, P.J., 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Marine Ecology Progress Series* 77, 39–47.
- Lombardi, A.T. & Maldonado, M.T. 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth Res.* 108:77–87.
- Mariano et al. 2009. The use of Vinasse as an Amendment to Ex-Situ Bioremediation of Soil and Groundwater Contaminated with Diesel Oil. *Brazilian archives of biology and technology.* 52: 1043-1055.
- Matos, A.P. et al. 2015. Protein and lipid contents from *Chlorella* sp. Cultivated in residual concentrated desalination. *Ciência Rural*, Santa Maria.45:364-370.
- Mateo, J.J. & Maicas, S. 2015. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Research International.* 73: 13–25.
- Montanhim G.C. et al. 2014. Uso de biomassa de algas para a peletização de sementes de *Bowdichia virgilioides*. *Revista Árvore*, 38: 867-877.
- Morales R. 2007. Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Tesis presentada en opción al título académico de Doctor en Producción Animal. Barcelona, España. p 3.
- Nitayavardhana, S. e Khanal, S.K. 2010. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. *Bioresource Technology* 101: 9078–9085.
- Ogbonna, J.C. et al. 1997. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *Journal not defined* 9: 359–366, 1997.
- Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S., 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 1429–1441.
- Parrish, C.C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. In *Lipids freshwater ecosystems* (ed. M.T. Arts and B.C. Wainman, 4-20. New York: Springer-Verlag.
- Pramanik, A. et al. 2012. Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiol* 57:71–79.
- Renaudla, S.M. et al. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 3: 43-53, 1991.

- Rizzo, A.M. et al. 2013. Characterization of microalga *Chlorella* as a fuel and its thermogravimetric behavior. *Applied Energy*. 102: 24–31.
- Serejo, M.L. et al. 2015. Influence of Biogas Flow Rate on Biomass Composition During the Optimization of Biogas Upgrading in Microalgal-Bacterial Processes. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 3228–3236.
- Silva, M. A. S.; Griebeler, N. P.; Borges, L. C. 2007. Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. *Revista Brasileira de Eng. Agrícola Ambiental*, 11, 108 – 14.
- Takeshita, T. et al. 2014. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology* 158: 127–134.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource technology* 57 :45-50.
- Tang, H. et al. 2011. Culture of Microalgae *Chlorella minutissima* for Biodiesel Feedstock Production. *Biotechnology and Bioengineering* 108:10.
- Titte, J. et al. 2005. Inorganic Carbon Limitation and Mixotrophic Growth in *Chlamydomonas* from an Acidic Mining Lake. *Protist*, 156, 63—75
- Villar-Argaiz, M., Medina-Sánchez, J.M., Bullejos, F.J., Delgado-Molina, J.A., Pérez, O.R., Navarro, J.C., Carrillo, P., 2009. UV radiation and phosphorus interact to influence the biochemical composition of phytoplankton. *Freshwater Biology* 54, 1233–1245.
- Václav Kotrbáček et al. 2015. The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *J. Appl Phycology*. 27: 2173 – 2180.
- Wang Y. et al. 2015. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology* 198: 619–625.
- Woertz, I.; Feffer, A.; Lundquist, T.; Nelson, Y. 2009. Algae Grown on Dairy and Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Lipid Production for Biofuel Feedstock. *Journal of environmental engineering*.