

JAVIER HERNÁN FALCONÍ HEREDIA

**VINHAÇA COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA CULTIVO DE  
MICROALGAS DO FILO *CHLOROPHYTA***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

F184v  
2019 Falconí Heredia, Javier Hernán, 1989-  
Vinhaça como fonte de nutrientes para cultivo de microalgas do  
filo *Chlorophyta* / Javier Hernán Falconí Heredia. - Viçosa, MG, 2019.  
xiv, 75 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Márcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microalgas. 2. Resíduos industriais. 3. Águas residuais. 4.  
Ozônio. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Engenharia Agrícola. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Agrícola. II. Título.

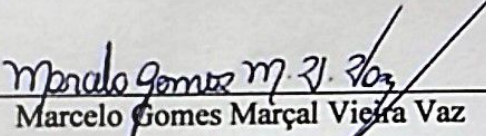
CDD 22. ed. 579.8

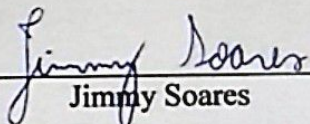
JAVIER HERNÁN FALCONÍ HEREDIA

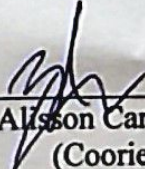
VINHAÇA COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA CULTIVO DE  
MICROALGAS DO FILO *Chlorophyta*

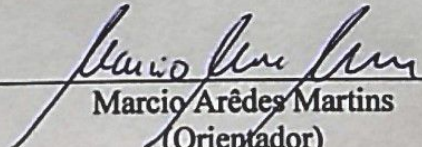
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2019.

  
Marcelo Gomes Marçal Vieira Vaz

  
Jimmy Soares

  
Alison Carraro Borges  
(Coorientador)

  
Marcio Arêdes Martins  
(Orientador)

Aos meus pais, Isabel e Galo.

Aos meus irmãos, Galo e Daniel.

Aos meus sobrinhos, Leonardo, Federico, Maria, Pedro e Ignacio

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG pelo bolsa de estudos concedida.

À Petrobras pelo financiamento à pesquisa e infraestrutura do laboratório.

Aos meus pais Galo Falconí e Isabel Heredia, pela educação, apoio, amor incondicional que mesmo longe sempre estão presentes.

Aos meus irmãos, Galo e Daniel que me incentivaram a continuar e alcançar as minhas metas.

As minhas tias, especialmente a Faby pelo grande carinho.

Aos amigos de republica “Capim e limão”, Cristian, Jessica, Victor, Rodrigão, que fizeram sempre me sentir como em casa.

Aos professores Pablo Moncayo e Juan Carlos García da Universidade de las Américas que me ajudaram no meu crescimento acadêmico.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Engenharia Agrícola, pelo ensino e excelência e oportunidade dada.

Ao meu orientador Dr. Marcio Arêdes Martins, pela orientação, paciência, atenção, sabedoria, confiança e as oportunidades concedidas que foram fundamentais para o trabalho acontecer.

Ao meu coorientador Dr. Alisson Carraro Borges por estar sempre acessível e disponível para ajudar.

Especial agradecimento ao doutor Jimmy Soares e o mestre Dilson Rocha, pelo apoio e auxílio prestado no desenvolvimento do trabalho.

Ao demais colegas do laboratório pela amizade, parceria e cooperação: Rúben, Daniel, Matheus, Eloiny, Marcos, Lorena, Bruno e Paula.

Aos meus grandes amigos Equador Sthephany, Erika, Hernán, Carlos e Daniel que mesmo longe sempre me deram força e estiveram na torcida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE EQUAÇÕES .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. Revisão de literatura .....	4
2.1 Produção de bioetanol no Brasil .....	4
2.2 Vinhaça e água residuária de produção de etanol .....	6
2.3 Microalgas .....	9
2.3.1 Diversidade de microalgas.....	9
2.3.2 Cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis .....	10
2.3.3 Integração do cultivo de microalgas com uma biorrefinaria de bioetanol	11
2.4 Ozonização.....	12
2.5 Referências bibliográficas.....	12
3. OBJETIVO GERAL.....	18
3.1 Objetivos específicos .....	18
4. ARTIGO I: SELEÇÃO DE LINHAGENS ROBUSTAS DE MICROALGAS PARA O CULTIVO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE BIOREFINARIA DE BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	19
4.1 Introdução .....	21
4.2 Material e métodos.....	22
4.2.1 Caracterização da vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol.....	23
4.2.2 Série de sólidos .....	23
4.2.3 Demanda bioquímica de oxigênio .....	26
4.2.4 Demanda química de oxigênio .....	26
4.2.5 Determinação dos pH da vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol.....	27
4.2.6 Aclimatação, produção do inóculo e seleção de linhagens de microalgas	27
4.2.7 Crescimento das microalgas em vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol .....	28

4.2.8	Taxa específica de crescimento .....	30
4.3	Resultados .....	30
4.3.1	Composição das VCA e ARE.....	30
4.3.2	Crescimento das microalgas em vinhaça de cana de açúcar .....	32
4.3.3	Crescimento das microalgas em ARE .....	34
4.3.4	Perfis de crescimento de linhagens de microalgas em VCA e ARE .....	35
4.4	Discussão .....	37
4.5	Conclusão.....	40
4.6	Referências.....	40
5.	ARTIGO II: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Chlorella</i> SP. BR054 E <i>Scenedesmus bajacalifornicus</i> BR024 EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA RESIDUÁRIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL.....	43
5.1	Introdução .....	45
5.2	Material e métodos.....	46
5.2.1	Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.....	46
5.2.2	Ozonização da vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.....	47
5.2.3	Cinética de reação de ozônio em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol .....	47
5.2.4	Cinética de decomposição do ozônio em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol .....	48
5.2.5	Contagem e viabilidade de leveduras em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.....	49
5.2.6	Determinação de compostos fenólicos da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada. ....	49
5.2.7	Determinação de amônio da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.....	49
5.2.8	Determinação de nitrato da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.....	50
5.2.9	Determinação de fosfato da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.....	50

5.2.10	Determinação do perfil espectrofotométrico da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.	50
5.2.11	Determinação da DBO <sub>5</sub>	50
5.2.12	Determinação da DQO	51
5.2.13	Linhagens de microalgas	51
5.2.14	Produção de inoculo	51
5.2.15	Sistema de cultivo	51
5.2.16	Monitoramento densidade óptica dos cultivos	52
5.2.17	Determinação de massa seca	52
5.2.18	Extração de pigmentos fotossintetizantes	52
5.2.19	Determinação de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i>	53
5.2.20	Determinação de proteínas totais	53
5.2.21	Determinação de carboidratos neutros totais	53
5.2.22	Determinação de lipídeos totais	54
5.2.23	Análises estatísticas	54
5.3	Resultados	54
5.3.1	Cinética de ozonização da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol	54
5.3.2	Composição da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.	55
5.3.3	Perfil espectrofotométrico de da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol durante o pré-tratamento com gás ozônio	56
5.3.4	Contagem e viabilidade de leveduras em vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.	58
5.4	Discussão	67
5.5	Conclusões	70
5.6	Referências	70
6.	CONCLUSÕES GERAIS	74
	ANEXO I Composição dos meios de cultura usados no estudo	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Localização de usinas de cana-de-açúcar e radiação fotossinteticamente ativa média anual no Brasil. Adaptado de Klein et al. (2018).....	5
<b>Figura 2.</b> Sistema usada na aclimação das linhagens de microalgas. ....	28
<b>Figura 3.</b> Microplacas acondicionadas em embalagens plásticas transparentes e herméticas.....	30
<b>Figura 4.</b> Taxa específica de crescimento das microalgas em VCA com pH 7 (a) e 4,55 (b). ....	33
<b>Figura 5.</b> Taxa específica de crescimento das microalgas em ARE com pH 7 (a) e 4,22 (b). ....	35
<b>Figura 6.</b> Perfil de crescimento das microalgas em diferentes meios de cultura: a) <i>C. sorokiniana</i> BR001 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (b) <i>C. sorokiniana</i> BR001 em VCA (pH 4,55) e ARE (pH 4,22); (c) <i>S. obliquus</i> BR003 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (d) <i>S. obliquus</i> BR003 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (e) <i>Chlorella</i> sp. BR054 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (f) <i>Chlorella</i> sp. BR054 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (g) <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (h) <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (i) <i>Chlorella</i> sp. BR052 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7), (j) <i>Chlorella</i> sp. BR052 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55).....	37
<b>Figura 7.</b> Gerador de ozônio utilizado para o tratamento da VCA e ARE.....	47
<b>Figura 8.</b> Massa de ozônio na solução de iodeto durante a ozonização da VCA. ....	55
<b>Figura 9.</b> Massa de ozônio na solução de iodeto durante a ozonização da ARE. ....	55
<b>Figura 10.</b> Perfil espectrofotométrico de VCA durante a ozonização.....	57
<b>Figura 11.</b> Perfil espectrofotométrico de ARE durante a ozonização .....	58
<b>Figura 12.</b> Micrografia das leveduras presentes em amostras de VCA utilizando microscopia em campo claro (a) VCA (b) ARE.....	59
<b>Figura 13.</b> Placas de Petri contendo meio de cultura YEPD sólido inoculado com 100 µL de (a) VCA e (b) ARE após dias 3 cultivo. ....	59
<b>Figura 14.</b> Fotografia de placas de Petri contendo YEPD sólido inoculadas com 100 µL de (a) VCA-O3 e (b) ARE-O3, após 3 dias de cultivo .....	60
<b>Figura 15.</b> Fotografia de placas de Petri contendo YEPD sólido inoculadas com 1 mL de (a) VCA-O3 e (b) ARE-O3, após 3 dias de cultivo. A seta azul indica a unidade formadora de colônia.....	60

<b>Figura 16.</b> Curva de crescimento <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 17.</b> Curva de crescimento de <i>Chlorella</i> sp BR054 em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> .....	62
<b>Figura 18.</b> Massa seca de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054, após 12 dias de cultivo. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	63
<b>Figura 19.</b> Clorofila a de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	64
<b>Figura 20.</b> Clorofila b de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	65
<b>Figura 21.</b> Carboidratos neutros totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	65
<b>Figura 22.</b> Proteínas totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	66
<b>Figura 23.</b> Lipídeos totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> , e ARE-O <sub>3</sub> inoculados com <i>S. bajacalifornicus</i> BR024 e <i>Chlorella</i> sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Características químicas de diferentes VCA. ....	6
<b>Tabela 2.</b> Microalgas usadas no estudo. ....	27
<b>Tabela 3</b> Composição físico-química da VCA e ARE. ....	31
<b>Tabela 4</b> Composição da VCA e ARE antes e depois de serem submetidas ao pré-tratamento de ozonização (VCA-O <sub>3</sub> e ARE-O <sub>3</sub> ). ....	56
<b>Tabela 5</b> Composição da VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> e ARE-O <sub>3</sub> após o cultivo de <i>S. bajacalifornicus</i> BR024.....	62
<b>Tabela 6</b> Composição da VCA, ARE, VCA-O <sub>3</sub> e ARE-O <sub>3</sub> após o cultivo de <i>Chlorella</i> sp. BR054.....	63

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Sólidos totais.....	24
<b>Equação 2.</b> Sólidos fixos .....	24
<b>Equação 3.</b> Sólidos voláteis.....	24
<b>Equação 4</b> Sólidos suspensos totais.....	25
<b>Equação 5</b> Sólidos dissolvidos totais.....	25
<b>Equação 6.</b> Sólidos suspensos fixos .....	26
<b>Equação 7.</b> Sólidos suspensos voláteis .....	26
<b>Equação 8.</b> Demanda bioquímica de oxigênio cinco dias .....	26
<b>Equação 9.</b> Taxa específica de crescimento .....	30
<b>Equação 10.</b> Processo de oxidação do KI pelo ozônio .....	47
<b>Equação 11.</b> Processo de oxidação de tiosulfato pelo iodo .....	48
<b>Equação12.</b> Massa de O <sub>3</sub> .....	48
<b>Equação13.</b> Clorofilas <i>a</i> .....	53
<b>Equação14.</b> Clorofilas <i>b</i> .....	53

## RESUMO

FALCONÍ-HEREDIA, Javier Hernán, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Vinhaça como fonte de nutrientes para cultivo de microalgas do filo *Chlorophyta***. Orientador: Marcio Arêdes Martins. Coorientador: Alisson Carraro Borges

Estima-se que a população mundial chegue a 11,2 bilhões de habitantes até 2100, este crescente aumento populacional está diretamente relacionado como o aumento na demanda por alimentos, água e energia. Assim, preocupações crescentes em relação às mudanças climáticas e à dependência excessiva em combustíveis fósseis têm direcionado os investimentos e o interesse público para biocombustíveis sustentáveis e renováveis. As microalgas destacam-se com uma fonte promissora para a produção de biocombustíveis porque apresentam altas produtividades de lipídios e carboidratos, excedendo em muito as de culturas convencionais como a soja e a cana-de-açúcar, respectivamente. Entretanto, para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas é necessário reduzir os custos de cultivo e produção, a viabilidade comercial pode ser obtida através do cultivo de microalgas em efluentes industriais. Dentre os resíduos agroindustriais produzidos no Brasil, a vinhaça de cana-de-açúcar (VCA) e água residuária de produção de etanol (ARE) destacam-se em função do grande volume gerado, 13 L por 1 L de bioetanol. A VCA e ARE apresentam altas concentrações de macronutrientes que podem ser utilizados pelas microalgas. O presente estudo teve por objetivo avaliar o uso da VCA, ARE, vinhaça de cana-de-açúcar ozonizada (VCA-O<sub>3</sub>) e água residuária de produção de etanol (ARE-O<sub>3</sub>) de como fonte de nutrientes para cultivo de 10 microalgas do filo *Chlorophyta* visando reduzir o potencial poluidor destes efluentes. Membros da família *Scenedesmaceae*: *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024, *Desmodesmus communis* BR007 e *Chlorella* sp. BR054 apresentaram as maiores taxas específicas de crescimento ao serem cultivadas em VCA e ARE com pH ajustado em 7. No entanto, o pH ácido da VCA e ARE apresentou um grande efeito sobre o desempenho do crescimento das linhagens de microalgas. Apenas a linhagem *Chlorella sorokiniana* BR001 apresentou uma elevada taxa de crescimento quando cultivada em meio à base de ARE com pH ácido de 4,22. Por outro lado, a elevada disponibilidade de nutrientes na VCA e ARE vem acompanhada de características menos favoráveis aos cultivos que podem comprometer a produção de biomassa como por exemplo: elevada carga de material orgânica que favorece a proliferação de bactérias e leveduras, presença de compostos fenólicos (relatados como possíveis inibidores de crescimento).

Na segunda etapa do estudo, foi avaliado a ozonização como um pré-tratamento da VCA e ARE prévio ao cultivo das microalgas *S.bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054, que se destacaram ao apresentar as maiores taxas de crescimento no estudo prévios. Estas microalgas foram cultivadas VCA, VCA-O<sub>3</sub>, ARE e ARE-O<sub>3</sub> . Os maiores valores de biomassa, carboidratos e proteínas foram obtidos quando *S.bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 quando cultivadas em VCA e VCA-O<sub>3</sub>. Além disso, o cultivo com as microalgas permitiu uma significativa diminuição da carga poluidora de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, ARE-O<sub>3</sub>. Finalmente, o cultivo da microalga em vinhaça mostra-se uma alternativa promissora, possibilitando reduzir os custos de produção da biomassa microalgal e contribuindo para valoração e melhoria da qualidade deste abundante resíduo da indústria sucroalcooleira. Além disso, é importante ressaltar que o aumento de escala do cultivo é um passo essencial para integrar o cultivo de microalgas ao setor de etanol. No entanto, em cultivos em grande aumentar os parâmetros não poderão ser facilmente controlados, o que tornara indispensável o uso de uma linhagem de microalga que não sejam susceptíveis a vários no meio de cultivo e que seja competitiva contra contaminantes. Consequentemente, este é um grande desafio ao se trabalhar com um meio de cultivo com alta carga orgânica (DBO<sub>5</sub> e DQO) que promove o crescimento de contaminantes heterotróficos

## ABSTRACT

FALCONÍ-HEREDIA, Javier Hernán, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Vinasse as nutrient source for microalgae cultivation of the *Chlorophyta* phylum.** Advisor: Marcio Arêdes Martins. Co-advisers: Alisson Carraro Borges.

The world population is estimated to reach 11.2 billion by 2100; this growing population increase is directly related to the increase in demand for food, water and energy. Thus, growing concerns about climate change and over-reliance on fossil fuels have driven investments and the public interest for sustainable and renewable biofuels. Microalgae stand out as a promising source for the production of biofuels because they have high lipid and carbohydrate yields, far exceeding crops such as soybeans and sugarcane respectively. However, for the production of biofuels from microalgae it is necessary to reduce the costs of cultivation and production, a commercial viability can be obtained through the cultivation of microalgae in industrial effluents. The agroindustrial residues produced in Brazil, sugar cane vinasse (VCA) and ethanol production water (ARE) stand out due to the large volume generated, 13 L per 1 L of bioethanol. VCA and ARE have high concentrations of macronutrients that can be used by microalgae. The objective of the present study was to evaluate the use of VCA, ARE, ozonized sugarcane vinasse (VCA-O3) and wastewater from ethanol production (ARE-O3) as a source of nutrients for cultivation of 10 microalgae phyto *Chlorophyta* in order to reduce the polluting potential of these effluents. Members of the family *Scenedesmaceae*: *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024, *Desmodesmus communis* BR007 and *Chlorella* sp. BR054 presented the highest specific growth rates when cultivated in VCA and ARE with pH adjusted at 7. However, the acid pH of the VCA and ARE showed a great effect on the growth performance of the microalgae strains. Only the *Chlorella sorokiniana* BR001 showed a high growth rate when cultivated in the AER base medium with acid pH of 4.22. On the other hand, the high availability of nutrients in VCA and ARE is accompanied by less favorable crop characteristics that can compromise the biomass production, such as: high organic matter load that favors the proliferation of bacteria and yeasts, the presence of phenolic compounds (reported as possible growth inhibitors). In the second stage of the study, ozonation was evaluated as a pretreatment of VCA and ARE prior to the cultivation of microbials *S.bajacalifornicus* BR024 and *Chlorella* sp. BR054, who stood out with the highest growth rates in the previous study. These microalgae were cultured VCA, VCA-O3, ARE and ARE-O3. The highest values of biomass, carbohydrates and proteins were obtained when *S.bajacalifornicus* BR024 and

*Chlorella* sp. BR054 when grown in VCA and VCA-O3. In addition, cultivation with microalgae allowed a significant decrease in the pollutant load of VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, ARE-O<sub>3</sub>. Finally, the cultivation of microalgae in vinasse shows a promising alternative, making it possible to reduce the production costs of microalgal biomass and contributing to the evaluation and improvement of the quality of this abundant residue of the sugar and alcohol industry. In addition, it is important to note that increasing the scale of the crop is an essential step in integrating microalgae cultivation into the ethanol sector. However, in larger crops the parameters can not be easily controlled, making it indispensable to use a line of microalgae that are not susceptible to several in the culture medium and that is competitive against contaminants. Consequently, this is a great challenge when working with a culture medium with high organic load (BOD<sub>5</sub> and COD) that promotes the growth of heterotrophic contaminants

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da população está diretamente relacionado com uma maior demanda por alimentos, água e energia. Além disso, o elevado consumo de combustíveis resultará, inevitavelmente, no esgotamento das reservas de combustíveis fósseis e aumento das emissões de carbono (WAGNER *et al.*, 2016). Assim, preocupações crescentes em relação às mudanças climáticas e à dependência excessiva em combustíveis fósseis têm direcionado os investimentos para alternativas mais sustentáveis (QARI; REHAN; NIZAMI, 2017). Desta forma, as biorrefinarias são instalações que integram processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, ração e energia. O objetivo da biorrefinaria é otimizar o uso dos recursos e minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro. As biorrefinarias brasileiras apresentaram diversos avanços tecnológicos nas últimas décadas quanto a produção de bioetanol de cana-de-açúcar, sendo observado um uso mais eficiente e racional da biomassa e subprodutos (vinhaça e bagaço de cana) (VAZ, 2017a). Nesse contexto, o bagaço de cana-de-açúcar é utilizado em parte para produção energia elétrica e geração de vapor nas usinas, e já corresponde a 7% da matriz energética nacional. Ainda, o excedente de bagaço também é comercializado pelas empresas, em especial para a queima em caldeiras (COSTA; ROSADA DE SÁ RIBEIRO; CAETANO XAVIER JUNIOR, 2018)

Na produção de bioetanol de cana-de-açúcar é gerado um grande volume do efluente aquoso denominado vinhaça de cana-de-açúcar (VCA). Este subproduto é obtido após a destilação do etanol, e geralmente é produzido em uma proporção de 13 L para cada 1 L de bioetanol (ZANI *et al.*, 2018). Estima-se que 360 bilhões de litros de VCA foram produzidos no Brasil em 2015 (ROMANHOLO FERREIRA *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016). Além disso, a vinhaça é frequentemente misturada com outros efluente produzidos nas refinarias de bioetanol, como por exemplo a água utilizada para lavar a cana-de-açúcar, máquinas e caminhões, e este complexo efluente é denominado água residuária de produção de etanol (ARE). A VCA e a ARE são geralmente aplicadas no solo como fertilizante (fertirrigação) para o cultivo da cana-de-açúcar (SILVA; BONO; PEREIRA, 2014). A fertilização do solo com esses efluentes se justifica devido ao alto teor de matéria orgânica, compostos orgânicos (e.g. glicerol, ácido láctico, açúcares), e nutrientes (e.g. potássio em maior quantidade, nitrogênio, fosforo, cálcio e magnésio). No entanto, apesar da comprovada viabilidade técnica e econômica da fertirrigação, a

aplicação contínua no solo pode resultar em problemas ambientais como a salinização, acidificação e alteração da microbiota do solo, (FUESS *et al.*, 2017; TADEU; LOUREIRO; ZAIAT, 2018). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de tecnologias promissoras para valorar a cadeia produtiva do bioetanol, assim como produzir resíduos que, ao serem descartados, ocasionem menores alterações no meio ambiente.

A VCA e a ARE são produzidas em larga escala, e apresentam baixo custo e elevadas concentrações de nutrientes. Portanto, estes subprodutos da cadeia produtiva de bioetanol são uma fonte potencial de nutrientes para cultivos comerciais de microalgas (HOARAU *et al.*, 2018). As microalgas são microrganismos eucariotos que realizam fotossíntese como a principal via de assimilação de carbono. As microalgas podem se desenvolver como células individuais ou em colônias, sendo encontradas em ambientes de água doce e marinhos. A biomassa de microalgas apresenta grande potencial para a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos, sendo considerada uma biomassa promissora devido aos impactos positivos de sustentabilidade que podem ser obtidos com o amadurecimento e desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo e processamento de microalgas (SALIAN; STREZOV, 2017).

As microalgas destacam-se com uma fonte promissora para produção de biocombustíveis porque apresentam altas produtividades de lipídios e carboidratos, excedendo em muito as de culturas convencionais como a soja e a cana-de-açúcar, respectivamente (YANG *et al.*, 2019). As microalgas podem ser cultivadas em diferentes fontes hídricas, tais como águas salinas, salobras e outras fontes de água não potáveis (CHEW *et al.*, 2018). Desta forma, pode-se produzir biomassa sem aumentar a demanda por água utilizada na irrigação de culturas vegetais convencionais, ou água destinada ao consumo humano e animal. (MARTINS *et al.*, 2018)

Além disso, a exploração comercial de microalgas pode ser concebida em um sistema de biorrefinaria no qual a produção de matéria-prima para biocombustíveis (*i.e.* carboidratos e lipídeos) pode estar associada com a produção de compostos de alto valor agregado como proteínas e pigmentos (COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018). Assim, a integração de sistemas de cultivo de microalgas com biorrefinarias de bioetanol de cana-de-açúcar é uma opção bastante promissora. Os efluentes líquidos (*i.e.* VCA e ARE), e CO<sub>2</sub> advindos da produção de bioetanol podem ser integrados aos sistemas de cultivo de microalgas para fornecer os macros e micronutrientes necessários para o seu crescimento. Desta forma, as emissões de refinaria de bioetanol e os custos de

cultivo de microalgas poderiam ser drasticamente reduzidos, uma vez que os nutrientes utilizados nas formulações dos meios de cultura de microalgas representam 30-35% do custo total de material necessário para a produção de biomassa (MOLINA GRIMA *et al.*, 2003; JARAMILLO; NARANJO; CARDONA, 2012; CHUNG; LEE; CHUNG, 2017; CHEN *et al.*, 2018)

A seleção de microalgas com potencial para cultivo em VCA e ARE é a etapa inicial para o desenvolvimento de tecnologias promissoras que se propõem a tratar destes efluentes. A elevada disponibilidade de nutrientes na VCA e ARE vem acompanhada de características menos favoráveis aos cultivos de microalgas, e que podem comprometer a produção de biomassa. Desta forma, o uso de VCA e ARE como fonte de nutrientes para microalgas apresenta alguns desafios, tais como a elevada carga de material orgânico que favorece a proliferação de bactérias e leveduras. Para minimizar estes problemas, pode-se realizar o pré-tratamento da VCA e ARE antes do cultivo de microalgas. Algumas alternativas de pré-tratamento destes efluentes são a clarificação química, ozonização, biodigestão (anaeróbia ou aeróbica), ou mesmo a diluição da vinhaça em água (FUENTES *et al.*, 2016; CABRERA-DÍAZ *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017).

A ozonização é uma alternativa particularmente atrativa para o pré-tratamento da VCA e ARE, uma vez que esta é uma técnica simples e de fácil escalabilidade industrial. Além disso os reatores e custos de produção de O<sub>3</sub> são baixos em comparação com alguns métodos de tratamento da VCA que requerem elevadas concentrações de hidróxido de cálcio (*i.e.* 3 g L<sup>-1</sup> de vinhaça) e energia, além de gerar resíduo e remover compostos que podem ser utilizados pelas microalgas (SANTANA *et al.*, 2017). A técnica de ozonização permite que compostos complexos e recalcitrantes sejam convertidos em moléculas menores e biodegradáveis, melhorando assim a taxa de biodegradabilidade do resíduo por microrganismos (YANG *et al.*, 2018)

O presente estudo teve por objetivo determinar a composição de VCA e ARE com enfoque no cultivo de microalgas, selecionar microalgas capazes de crescer em VCA e ARE, avaliar a técnica de ozonização como pré-tratamento da VCA e ARE para cultivo de microalgas, avaliar a composição do efluente obtido após o cultivo de microalgas. O uso de VCA e de ARE como fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de microalgas apresentam vantagens comerciais muito claras que possibilitam a redução dos custos de produção de biocombustíveis de microalgas juntamente com significativas melhorias ambientais (SANTANA *et al.*, 2017). A dissertação foi organizada na forma de dois

artigos científicos independentes, precedida de uma revisão de literatura e seção de objetivos, e finalizada com as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros.

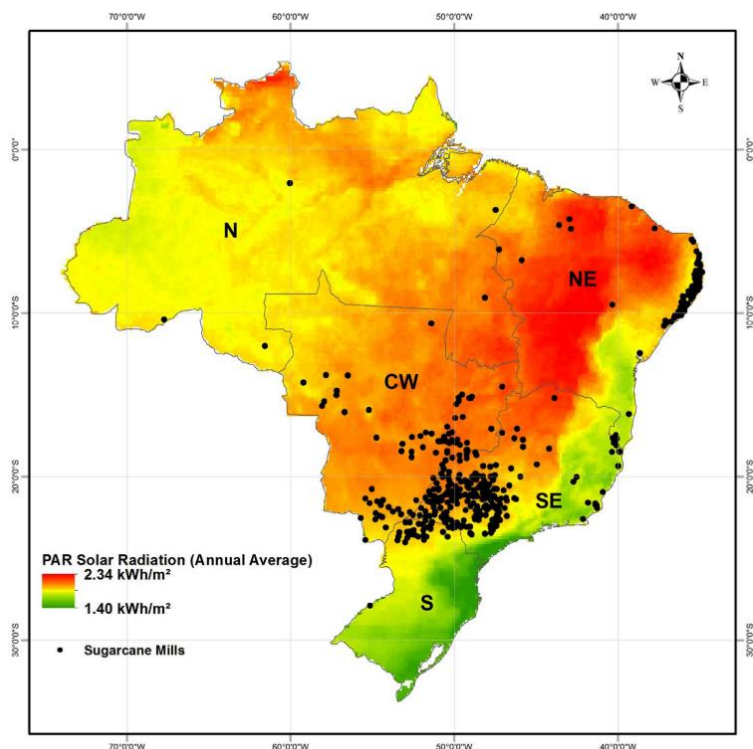
## **2. Revisão de literatura**

### **2.1 Produção de bioetanol no Brasil**

A cana-de-açúcar é uma das biomassas mais utilizadas no setor de energia renovável sendo utilizada para a produção de bioetanol e eletricidade. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, sendo uma cultura importante para o agronegócio brasileiro (CARDOSO *et al.*, 2019; RINKE *et al.*, 2019). O processamento de cana-de-açúcar em plantas industriais brasileiras ocorre em três formas distintas: usinas de açúcar, destilarias autônomas de etanol, e usinas de açúcar com destilarias anexas. Além disso, as biorrefinarias podem ter uma unidade de cogeração de energia, que é um coproduto valioso.

A moagem da cana de açúcar nas usinas ocorre durante o período de safra que no Brasil varia de acordo com a região. A safra da cana-de-açúcar na Região Centro-Sul ocorre entre abril e novembro, e no Nordeste de setembro a março. A operação na entressafra não é uma prática comum no setor, no entanto algumas usinas armazenam material lignocelulósico (*i.e.* bagaço de cana-de-açúcar) durante a safra para produção de energia elétrica durante todo o ano (COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

O cultivo de cana-de-açúcar e as instalações para o processamento se concentram em regiões geográficas específicas do Brasil (Figura 1). A maior concentração de usinas está localizada na região Sudeste, especificamente no estado de São Paulo. Por outro lado, observa-se a expansão de novas áreas de cultivo de cana-de-açúcar em estados da região Centro-Oeste do Brasil, tais como Goiás e Mato Grosso do Sul. Ademais, outra área favorável para o crescimento da cana-de-açúcar está localizada na região costeira nordestina do país, onde há alta incidência solar e solo adequado para esta cultura.



**Figura 1** Localização de usinas de cana-de-açúcar e radiação fotossinteticamente ativa média anual no Brasil. Adaptado de Klein et al. (2018).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento 2018, a produção nacional de cana de açúcar no Brasil para a safra 2018/2019 é estimada em 615.839.900 toneladas. Por outro lado, a produção brasileira de etanol, derivado da cana de açúcar, da safra 2018/2019 é estimada em 32.314.145,9 m<sup>3</sup> (CONAB, 2018). Em relação ao cenário mundial, os Estados Unidos se destacam com uma produção de 57.8 milhões de m<sup>3</sup> o que representa 60 % da produção mundial de bioetanol, seguido pelo Brasil com uma produção de 27.6 milhões de m<sup>3</sup> 27%. A União Europeia, China e Canadá são responsáveis pelo restante da produção mundial (13 %)(KOHLER, 2019)

A integração entre usinas de cana-de-açúcar com outras unidades industriais já ocorre no Brasil. Dependendo do tipo de processo industrial, as usinas integradas podem se beneficiar da gestão conjunta do suprimento de matérias-primas, obtenção de produtos intermediários da cadeia produtiva, venda ou aquisição de produtos acabados e excedente de energia produzida em usinas de cana-de-açúcar, assim como o compartilhamento de prédios administrativos, instalações de pesquisa, recursos agrícolas e equipamentos (VAZ, 2017).

A possibilidade de anexar a produção de microalgas a usinas de cana-de-açúcar existentes está em avaliação nos setores industrial e acadêmico (YUE; YOU; SNYDER,

2014). Por exemplo, sugere-se a integração de uma unidade produtora de biodiesel de microalgas a uma planta de produção de bioetanol visando a substituição do diesel fóssil utilizado pelas máquinas agrícolas na produção de cana-de-açúcar. (RIZWAN; LEE; GANI, 2015). Com essa abordagem, as emissões de gases associadas a mudanças climáticas da cadeia de produção de bioetanol poderiam ser reduzidas em cerca de 30% se fossem utilizadas microalgas para capturar metade do CO<sub>2</sub> produzido durante a fermentação alcoólica (CHAGAS *et al.*, 2016). O Brasil possui uma planta de cultivo de microalgas anexa a uma biorrefinaria de cana-de-açúcar instalada em Orindiúva em São Paulo. Esta planta é resultado do empreendimento conjunto da Bunge e TerraVia (antiga Solazyme), e possui capacidade de produção efetiva de até 100.000 toneladas de óleo de microalgas por ano (BUNGE, 2016)

## 2.2 Vinhaça e água residuária de produção de etanol

A VCA sai da coluna de destilação a uma elevada temperatura, entre 85 e 95 °C, e posteriormente é bombeada para torres de resfriamento onde a temperatura da vinhaça é reduzida para 45 °C. Por fim, a VCA é transferida das torres de resfriamento e é mantida em lagoas de armazenamento (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000; CABRERA-DÍAZ *et al.*, 2017; CANDIDO; LOMBARDI, 2017; CLAUDIA *et al.*, 2019). A VCA apresenta em sua composição melanoidinas, são produtos poliméricos finais da reação de Maillard, de alto peso molecular, contendo nitrogênio, que conferem a VCA a cor escura e acastanhada, e ácidos orgânicos que resultam em um pH ácido. A Tabela 1 apresenta uma comparação química dos principais componentes presentes na VCA.

**Tabela 1.** Características químicas de diferentes VCA.

Parâmetro	Unidade	Roling et al. (2013)	Candido et al. (2017)	Cabreira et al. (2017)	Marcato et al. (2019)
pH	-	4,4	4,38	4,5	4,7
DBO <sup>1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	12.000	18.925	n.i	8.846
DQO <sup>2</sup>	mg L <sup>-1</sup>	21.500	27.461	24.500	13.252
DBO/DQO		0,56	0,69	--	0,67
CE <sup>3</sup>	u.u.u.u.u.u.u.u.u.u	13.750	18.310	5.150	n.i
ST <sup>4</sup>	mg L <sup>-1</sup>	n.i	n.i	30.800	n.i
SST <sup>5</sup>	mg L <sup>-1</sup>	n.i	1.593	n.i	880
K	mg L <sup>-1</sup>	3.000	3.548	3.670	898
Ca	mg L <sup>-1</sup>	5.600	557,3	430	687
Mg	mg L <sup>-1</sup>	280	351,8	346	n.i
Na	mg L <sup>-1</sup>	300	1.505	3.820	32,6

N-NH <sub>4</sub>	mg L <sup>-1</sup>	n.i	10,4	n,i	0,87
PO <sub>4</sub>	mg L <sup>-1</sup>	415	59,2	92	32,49
SO <sub>4</sub>	mg L <sup>-1</sup>	n.i	2.079	1.410	323
CL <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	1.219	n.i	1.620	n.i
Carboidratos	mg L <sup>-1</sup>	n.i	n.i	4.500	n.i

<sup>(1)</sup> Demanda Bioquímica de Oxigênio, <sup>(2)</sup> Demanda Química de Oxigênio, <sup>(3)</sup> Condutividade Elétrica, <sup>(4)</sup> Sólidos Totais  
<sup>(5)</sup> Sólidos Suspensos Totais. Ni não identificado.

A composição da vinhaça depende de uma série de fatores como: a natureza e composição matéria-prima a ser fermentada, podendo ser o caldo de cana-de-açúcar ou o melaço da produção de açúcar. Em uma destilaria autônoma (*i.e.* produzem apenas bioetanol), a vinhaça será originada somente do caldo da cana-de-açúcar. Em contrapartida, as destilarias anexas são caracterizadas por produzir açúcar, bioetanol e energia; portanto, a vinhaça será oriunda do caldo e do melaço da cana-de-açúcar (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015). b) Sistema de fermentação c) aditivos utilizados na fermentação, produtos químicos, ácidos, antibióticos e nutrientes à base de nitrogênio e fósforo d) tipos de aparelhos utilizados na destilação; e) raça de levedura utilizada; f) qualidade da água usada; e, finalmente, g) sistema de trabalho e influência dos operadores. No entanto, independente da origem, os principais compostos orgânicos presentes na VCA são os ácidos orgânicos (*e.g.* lactato e acetato), álcoois (*e.g.* glicerol e etanol), e em menor quantidade carboidratos (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*, 2011).

A vinhaça do melaço de cana-de-açúcar geralmente apresenta valores elevados de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) quando comparada com a vinhaça obtida do caldo de cana-de-açúcar. Segundo Wilkie *et al.* (2000) a concentração de açúcares no melaço, pela cristalização e evaporação, resulta em maiores teores de compostos orgânicos não fermentescíveis, aumentando assim a demanda química de oxigênio (DQO). A relação BDO/DQO é usada para determinar a biodegradabilidade de um efluente, em que a melhor tratabilidade biológica do efluente é observada quando essa relação é unitária. Por outro lado, se a relação for menor a 0,3 o tratamento biológico não é mais eficiente, o que indica a presença de produtos resistentes a degradação ou tóxicos aos microrganismos (METCALF EDDY *et al.*, 2003). Teores elevados de potássio, magnésio, cálcio e fósforo também são observados na vinhaça do melaço decorrente da adição destes nutrientes durante a fase de processamento do açúcar. A presença de sulfato na VCA se deve a adição de ácido sulfúrico para controle bacteriano durante a etapa de fermentação alcoólica. Portanto, a VCA pode ser considerada uma água residuária complexa.

A VCA é amplamente utilizada como fertilizante na fertirrigação do solo, especialmente para o cultivo da cana-de-açúcar, devido ao alto teor de matéria orgânica, compostos ricos em carbono (glicerol, ácido láctico, açúcares) e nutrientes (potássio, nitrogênio, fosforo, cálcio e magnésio) (ORTEGÓN *et al.*, 2016). Do ponto de vista econômico, esta aplicação representa uma solução conveniente e simples de se dispor esse efluente. Entretanto, não é possível afirmar com segurança que esta aplicação não causa impacto ambiental (KLEIBER *et al.*, 2015). Quando a VCA é disposta no solo pode melhorar a fertilização do mesmo, no entanto a aplicação não deve exceder capacidade de retenção de íons do solo. Assim, a dosagem de VCA deve ser determinada com base nas características de cada tipo de solo, e seu uso indiscriminado pode provocar a lixiviação de íons, especialmente nitrato e potássio (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Alguns dos fatores que devem ser considerados para o uso da VCA na fertirrigação são: a quantidade a ser aplicada no solo, a composição e a composição química do solo, o relevo, o tipo de cultura, e as condições econômicas envolvidas no processo. Devido a variabilidade na composição da VCA da produção de bioetanol é muito variável, faz-se necessária a padronização prévia para aplicação no solo. Por exemplo, a DQO da VCA varia entre 20.000 a 50.000 mg L<sup>-1</sup>. A DBO e a acidez também são elevadas em relação aos padrões estabelecidos na Conama 430 de 2005 quanto a descarga de efluentes em corpos hídricos (MORAES; ZAIAT; BONOMI, 2015).

Segundo Neves *et al.* (1983) a adição de VCA, juntamente com a incorporação de matéria orgânica, pode melhorar as condições físicas do solo e promover maior mobilização de nutrientes, em função da também maior solubilidade proporcionada pelo resíduo líquido. No entanto, a aplicação sucessiva em solo argiloso leva ao desequilíbrio de bases e elementos utilizados para avaliar a fertilidade do solo, tais como cálcio, magnésio e potássio (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Além disso, a adição de VCA no solo causa mudanças temporárias na microbiota, resultando em alterações dos processos biológicos e químicos, tais como: decomposição da matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação, fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, e aumento do pH (GONÇALVES *et al.*, 2013). O aumento do pH do solo após a aplicação da VCA pode estar associado ao desenvolvimento da população microbiana e à transformação do nitrogênio durante o processo de desnitrificação do nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013). Ademais, solos que receberam aplicação de vinhaça por vários anos têm apresentado risco potencial de aumento de salinidade devido as altas concentrações de

nitrito da VCA. Em estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2010) foi detectada um aumento na lixiviação de chumbo quando a VCA foi aplicada no solo, particularmente devido aos compostos orgânicos solúveis presentes no efluente.

Devido a preocupações ambientais a respeito do uso da VCA foram criadas normas como a CETESB P4.231 de 2005 em São Paulo, e a COPAM 164 de 2011 em Minas Gerais. Estas normas regulam a aplicação de VCA no solo em relação a dosagem de potássio. No entanto, estas regulamentações não são abrangentes o suficiente. Estas normas preveem somente o impacto causado no solo e na água (superficiais e subterrâneas), não incluindo o teor de matéria orgânica e impactos devido as emissões atmosféricas. As legislações não contemplam a composição química da vinhaça para aplicação do solo, e permitem que a fertirrigação de VCA atue como fonte potencial de poluição ambiental (FUESS; GARCIA, 2014)

## **2.3 Microalgas**

As microalgas são um grupo diversificado de microrganismos eucarióticos e procariotos fotoautotróficos. São organismos microscópicos tipicamente encontrados em sistemas de água doce e marinhos (FALKOWSKI *et al.*, 2004), com tamanho variando entre 5 a 50  $\mu\text{m}$  e de morfologia simples. Indivíduos da maioria das espécies não são observáveis a olho nu, e se tornam notavelmente visíveis apenas quando produzem grandes populações, denominadas florações, formando culturas com colorações tipicamente pretas, verdes, vermelhas ou pardas (STERN *et al.*, 2010; PERUMAL, 2015; KUMAR; NANDA; VERMA, 2017).

### **2.3.1 Diversidade de microalgas**

As microalgas são extremamente diversas, e ainda são um grupo pouco explorado em relação a outros microrganismos como bactérias heterotróficas e fungos. Estima-se que cerca de 200.000 a 800.000 espécies existam, das quais cerca de 50.000 espécies são conhecidas (NORTON *et al.*, 1996). A diversidade genética e fenotípica das microalgas é evidente devido, entre outros fatores, a sua ampla distribuição na biosfera.

As microalgas verdes geralmente crescem em água doce e água do mar, enquanto outras espécies de microalgas (clorofitas) crescem em ambientes extremamente salinos, como o grande lago salgado em Utah nos Estados Unidos e o mar Morto em Israel. Microalgas estão amplamente distribuídas ao longo de toda a coluna d'água em habitat aquosos (MASSANA *et al.*, 2006). Estes microrganismos estão presentes praticamente

em qualquer tipo de ambiente terrestre, incluindo ambientes adversos, como a crosta biótica de desertos, na neve antártica, e no ar em uma altitude de 2000 m (KIM,2015 ).

Mesmo sendo um grupo extremamente diverso, poucos são os gêneros de microalgas explorados para fins biotecnológicos. Entre os gêneros comerciais e produtos de interesse se destacam a *Dunaliella* ( $\beta$  caroteno), *Haematococcus* (astaxantina), *Chlorella Tetraselmi* e *Isochrysis* (aquicultura), entre outras (TRENTACOSTE; MARTINEZ; ZENK, 2014).

### **2.3.2 Cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis**

As microalgas apresentam uma diversidade de metabólitos primários e secundários (lipídeos, pigmentos, carboidratos, óleos, hidrocarbonetos e proteínas) que pode ser comercialmente explorada (ANGELO; ANDRADE; FILHO, 2014). Além disso, a produção de metabólitos de microalgas pode ser controlada por mudanças nas condições de cultivo que afetem e regulem o metabolismo das mesmas. Assim, a manipulação dos parâmetros de cultivo, tais como a presença ou ausência de nutrientes, intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e pH, estimula a biossíntese de compostos de interesse (*e.g.* lipídeos para a produção de biodiesel) (GOUVEIA; MARQUES; BANDARRA, 2008; QARI; REHAN; NIZAMI, 2017).

Para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas é necessário a redução dos custos de cultivo e produção, com a finalidade de tornar o processo economicamente competitivo. Uma maneira de tornar o processo economicamente viável é a integração com outras instalações já estabelecidas. A utilização de efluentes industriais de diferentes fontes é uma opção interessante para abordar questões econômicas e ambientais ao mesmo tempo (POSADAS *et al.*, 2017).

Cultivos de microalgas em grande escala visando a produção de biocombustíveis envolvem custos e desafios técnicos adicionais em relação com às culturas terrestres. Além disso, o cultivo industrial de microalgas é caracterizado pelo consumo de grandes quantidades de carbono, água e nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Geralmente, os cultivos comerciais de microalgas são realizados com nutrientes fornecidos por fertilizantes convencionais de plantas ou formulações específicas para cada espécie de microalga (SLADE; BAUEN, 2013).

O processo de produção de matéria-prima a partir de microalga envolve as seguintes etapas: cultivo (*i.e.* produção de biomassa), colheita da biomassa, secagem, extração de compostos e processamento final em bens para consumo (SU *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm sido direcionados para a simplificação do processamento de microalgas por meio da combinação de múltiplas operações unitárias em etapas simples ou utilizando novas técnicas recentemente desenvolvidas para melhorar a viabilidade econômica do processo.(COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

### **2.3.3 Integração do cultivo de microalgas com uma biorrefinaria de bioetanol**

Durante o processamento de uma matéria-prima em produto acabado em qualquer atividade industrial são gerados efluentes, Os quais precisam ser tratados para serem dispostos no meio ambiente, diminuindo assim o seu impacto. A integração de uma biorrefinaria de bioetanol com o cultivo de microalgas é uma oportunidade real para a gestão adequada de efluente. A biorrefinaria de bioetanol gera grandes quantidades de efluentes líquidos (*e.g.* VCA e ARE) e gasosos (*e.g.* dióxido de carbono) que podem ser utilizados na nutrição de microalgas. Diferentes aspectos podem ser evidenciados como vantagens diretas da integração de processos com instalações industriais: minimização do consumo água, requerimentos energéticos, redução de efluentes enviados para tratamento e redução de contaminantes dispostos no meio ambiente (DONG *et al.*, 2016; MOHD UDAIYAPPAN *et al.*, 2017)

A VCA pode ser um promissor substrato para o cultivo de microalgas devido à sua elevada carga de nutrientes, e a sua ampla disponibilidade e baixo custo. No entanto, pesquisas visando o uso de vinhaça para cultivo de microalgas são recentes e o processo ainda não é consolidado para que seja aplicado em escala comercial. O trabalho desenvolvido por Ramirez *et al.* (2014) mostrou que a adição de VCA como uma fonte alternativa de nutrientes apresentou um efeito positivo para o crescimento da clorófitica *Scenedesmus* sp.

Candido (2017) avaliou o cultivo de *Chlorella vulgaris* em VCA e VCA biodigerida. Além disso, avaliou o efeito da remoção de sólidos por centrifugação e filtração no crescimento da microalga. Esse estudo demonstrou que as maiores densidades celulares de *C. vulgaris* foram obtidas quando se utilizou concentrações de 60 e 80 % de VCA e VCA biodigerida, respectivamente. Concluiu-se, ainda, que a filtração possibilitou que maiores concentrações de VCA biodigerida fossem utilizadas no cultivo de microalgas em comparação com a centrifugação.

No estudo desenvolvido por Santana *et al.* (2017) foi avaliado o crescimento de 40 linhagens de microalgas do filo clorófitas em diferentes concentrações de VCA *in natura* e clarificada. Este estudo mostrou que somente algumas linhagens de microalgas

conseguem crescer em VCA, e que concentrações elevadas de VCA influenciam negativamente no crescimento das microalgas.

## 2.4 Ozonização

O ozônio é uma molécula polar solúvel em água e se decompõe rapidamente para formar vários radicais livres, como hidroxila (OH), HO<sub>3</sub>, HO<sub>4</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Estes radicais livres estão prontamente disponíveis para reagir com compostos orgânicos diversos, como corantes, compostos fenólicos, pesticidas organoclorados e compostos aromáticos (SILES *et al.*, 2011). O processo de ozonização é fortemente influenciado pelo pH, sendo que o processo é acelerado em pH baixo. Compostos orgânicos saturados, que são resistentes a ozonização, reagem vagarosamente com os radicais hidroxila. Isso resulta em uma baixa seletividade na presença de umas misturas contaminantes orgânicas. Sendo assim, as condições ótimas de operação da ozonização são específicas para cada tipo de resíduo (HOARAU *et al.*, 2018).

Dentre os pré-tratamentos da vinhaça, a ozonização é particularmente atrativa porque esta técnica permite que compostos complexos e recalcitrantes sejam convertidos em moléculas menores e biodegradáveis, melhorando assim a taxa de biodegradabilidade do resíduo por microrganismos. Em estudo desenvolvido por Aquino e Pires (2016) foi avaliado o uso de ozônio como pré-tratamento da VCA. Os autores confirmaram que a ozonização aumenta a biodegradabilidade da VCA e reduz a concentração de compostos fenólicos. Os autores também concluíram que a aplicação de ozônio na VCA sem ajuste de pH (*i.e.* pH ácido) é economicamente viável porque a decomposição do ozônio é afetada pela temperatura e pH do meio, e baixos valores de pH e temperaturas aumentam a meia-vida do ozônio tornando o processo mais eficiente.

Por conseguinte, o cultivo de microalgas em VCA e ARE apresenta-se como uma opção técnica atrativa. O ozônio é um potente desinfetante que pode reduzir a carga microbiana presente na VCA e ARE para posterior cultivo de microalgas. Além disso, a ozonização aumenta a biodegradabilidade da vinhaça principalmente pela diminuição de composto recalcitrantes, dentre os quais se destacam os compostos fenólicos, que afetam negativamente a taxa de crescimento das microalgas (SURKATTI; AL-ZUHAIR, 2018)

## 2.5 Referências bibliográficas

ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; FILHO, A. C. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas : uma visão geral. **Ciências Biológicas e da Saúde**. p. 125–136, 2014.

AQUINO, S.; PIRES, E. C. Assessment of ozone as a pretreatment to improve anaerobic

digestion of vinasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 279–285, 2016.

BUNGE. **Bunge e TerraVia lançam AlgaPrime™ DHA para o Mercado de Ingredientes para Rações Especiais.** Disponível em <<http://www.bunge.com.br/imprensa/Noticia.asp?id=892>>. Acesso em: 15 out. 2018.

CABRERA-DÍAZ, A. et al. Anaerobic digestion of sugarcane vinasse through a methanogenic UASB reactor followed by a packed bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1127–1145, 2017.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 45–53, 2017.

CARDOSO, L. C. B. et al. Biofuels policies and fuel demand elasticities in Brazil. **Energy Policy**, v. 128, n. December 2018, p. 296–305, 2019.

CHAGAS, M. F. et al. Life Cycle Assessment of technologies for greenhouse gas emissions reduction in sugarcane biorefineries. **Chemical Engineering Transactions**, v. 50, p. 421–426, 2016.

CHEN, J. et al. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, n. April, p. 336–346, 2018.

CHEW, K. W. et al. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 332–344, 2018

CHRISTOFOLETTI, C. A. et al. Sugarcane vinasse : environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.

CHUNG, Y. S.; LEE, J. W.; CHUNG, C. H. Molecular challenges in microalgae towards cost-effective production of quality biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. February, p. 139–144, 2017.

CLAUDIA, A. et al. Science of the total environment hybrid treatment system for remediation of sugarcane vinasse. **Science of the Total Environment**, v. 659, p. 115–121, 2019.

COLLING KLEIN, B.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: a critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. xxxx, p. 1376–1392, 2018.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar.** v. 5

COSTA, J. A. F.; ROSADA DE SÁ RIBEIRO, M.; CAETANO XAVIER JUNIOR, E. **Energy Law and Regulation in Brazil.** Cham: Springer International Publishing, 2018.

DONG, T. et al. Combined algal processing: a novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. **Algal Research**, v. 19, p. 316–323, 2016.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FALKOWSKI, P. G. et al. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 354–360, 2004.

FU, S. F. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

FUENTES, J. L. et al. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, 2016.

FUESS, L. T.; GARCIA, M. L. Implications of stillage land disposal: a critical review on the impacts of fertigation. **Journal of Environmental Management**, v. 145, p. 210–229, 2014.

GONÇALVES, B. et al. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, v. 201, p. 77–84, 2013.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A. E.; BANDARRA, N. M. Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. **Food science and technology** n. Shahidi, 2008.

HOARAU, J. et al. Toward a status shift from waste to valuable resource . A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 24, n. January, p. 11–25, 2018.

JARAMILLO, J. J.; NARANJO, J. M.; CARDONA, C. A. Growth and oil extraction from *Chlorella vulgaris*: A techno-economic and environmental assessment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 31, p. 10503–10508, 2012.

KIM, S. **HANDBOOK OF MARINE MICROALGAE**. Elsevier Inc., 2015.

KLEIBER, J. et al. Fertirrigação com vinhaça na produção de cana. p. 7–12, 2015.

KOHLER, M. Economic assessment of ethanol production. In: Ethanol Elsevier Inc., p. 1–564, 2019.

KUMAR, V.; NANDA, M.; VERMA, M. Application of agar liquid-gel transition in cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 163–168, 2017.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MARTINS, A. A. et al. Water footprint of microalgae cultivation in photobioreactor.

**Energy Procedia**, v. 153, p. 426–431, 2018.

MASSANA, R. et al. Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1515–1522, 2006.

METCALF EDDY et al. Wastewater Engineering. New York: McGraw-Hill, 2003.

MOHD UDAIYAPPAN, A. F. et al. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 20, n. September, p. 8–21, 2017.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 2003.

MORAES, B. S.; ZAIAT, M.; BONOMI, A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 888–903, 1 abr. 2015.

ORTEGÓN, G. P. et al. Vinasse application to sugar cane fields: effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 410–419, 2016.

PERUMAL, P. S. A. R. T. P. Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture. Edition, 1 ed. Springer India, 2015. v. 10.1007/97

POSADAS, E. et al. Microalgae cultivation in wastewater. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, p. 67–91, 1 jan. 2017.

QARI, H.; REHAN, M.; NIZAMI, A. S. Key Issues in microalgae biofuels: a short review. **Energy Procedia**, v. 142, p. 898–903, 2017.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630–635, 2014.

RIBEIRO, B. T. et al. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 4, p. 441–447, 2010.

RINKE, N. et al. Sugarcane ethanol and beef cattle integration in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, n. November 2018, p. 448–457, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.12.012>>.

RIZWAN, M.; LEE, J. H.; GANI, R. Optimal design of microalgae-based biorefinery: Economics, opportunities and challenges. **Applied Energy**, v. 150, p. 69–79, 2015.

ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011.

SALIAN, K.; STREZOV, V. Biofuels From Microalgae. Encyclopedia of sustainable technology, v.3, p. 107-120, 2017.

SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 1 mar. 2017.

SILES, J. A. et al. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, n. 1–3, p. 247–253, 15 abr. 2011.

SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. D. A. R. Fertigation with vinasse in sugarcane crop: effect on the soil and on productivity. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, n. 2003, p. 38–43, 2014.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** n. 62, p. 108–114, 2007.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: cost , energy balance , environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, n. 0, p. 29–38, 2013.

STERN, R. F. et al. Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

SU, Y. et al. Progress of microalgae biofuel’s commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. October 2015, p. 402–411, 2017.

SURKATTI, R.; AL-ZUHAIIR, S. Microalgae cultivation for phenolic compounds removal. International Agency for Research on Cancer. 2018.

TADEU, L.; LOUREIRO, M.; ZAIAT, M. Science of the total environment seasonal characterization of sugarcane vinasse : assessing environmental impacts from fertirrigation and the bioenergy recovery potential through biodigestion. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 29–40, 2018.

TRENTACOSTE, E. M.; MARTINEZ, A. M.; ZENK, T. The place of algae in agriculture : policies for algal biomass production. **Photosynth Res**. 2014.

VAZ, S. Sugarcane-Biorefinery. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 127–141, 2017a.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63–102, 1 ago. 2000.

YANG, C. et al. Pyrolysis of microalgae: A critical review. **Fuel Processing Technology**,

v. 186, n. September 2018, p. 53–72, 2019.

YANG, L. et al. Improve the biodegradability of post-hydrothermal liquefaction wastewater with ozone: conversion of phenols and N-heterocyclic compounds. **Water Science and Technology**, v. 2017, n. 1, p. 248–255, 2018.

YUE, D.; YOU, F.; SNYDER, S. W. Biomass-to-bioenergy and biofuel supply chain optimization: Overview, key issues and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, v. 66, p. 36–56, 2014.

ZANI, C. F. et al. Vinasse application and cessation of burning in sugarcane management can have positive impact on soil carbon stocks. **PeerJ**, v. 6, n. May, p. e5398, ago. 2018.

### **3. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho objetivou avaliar do uso da VCA e ARE como fonte de nutrientes para cultivo microalgas do filo *Chlorophyta* visando reduzir o potencial poluidor destes efluentes.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- ξ Determinar a composição da com enfoque no cultivo de microalgas
- ξ Avaliar a toxicidade da VCA e ARE em 10 linhagens de clorofíceas.
- ξ Avaliar o pré-tratamento da VCA e ARE com ozônio.
- ξ Avaliar o crescimento das linhagens de maior potencial em VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub>.
- ξ Caracterizar a biomassa algal das linhagens potenciais após o cultivo.
- ξ Avaliar os parâmetros DBO<sub>5</sub> e DQO das vinhaças após o cultivo das linhagens potenciais.

#### **4. ARTIGO I: SELEÇÃO DE LINHAGENS ROBUSTAS DE MICROALGAS PARA O CULTIVO EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE BIOREFINARIA DE BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Resumo:** O bioetanol de cana-de-açúcar é um biocombustível líquido de primeira geração produzido em escala comercial nas últimas décadas. O desafio atual das refinarias de bioetanol é a valorização dos subprodutos do bioetanol, com a produção de químicos verdes e biocombustíveis. A vinhaça é um subproduto de refinarias de bioetanol de cana-de-açúcar, e muitas vezes é misturada com outros efluentes resultando em águas residuárias complexas. Estes efluentes apresentam elevados níveis de nutrientes que podem ser uma alternativa adequada e de baixo custo para cultivos de microalgas. A seleção de linhagens com potencial biotecnológico é um passo importante para integrar a produção de bioetanol com culturas de microalgas. Neste estudo foram avaliadas dez microalgas da classe Chlorophyta em vinhaça de cana-de-açúcar (VCA) e água residuária de produção de etanol (ARE). Membros da família *Scenedesmaceae*: *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024, *Desmodesmus communis* BR007 e *Chlorella* sp. BR054 apresentaram as maiores taxas específicas de crescimento ao serem cultivadas em VCA e ARE com pH ajustado em 7. No entanto, o pH ácido da VCA e ARE apresentou um grande efeito sobre o desempenho do crescimento das linhagens de microalgas. Apenas a linhagem *Chlorella sorokiniana* BR001 apresentou uma elevada taxa de crescimento quando cultivada em meio à base de ARE com pH ácido de 4,22. A seleção de linhagens robustas de microalgas é um importante passo inicial para incorporar um sistema de cultivo de microalgas em uma biorrefinaria de bioetanol.

**Palavras-chaves:** seleção de linhagens de microalgas, vinhaça de cana-de-açúcar, água residuária da produção de etanol.

**Abstract:** Sugarcane bioethanol is a first-generation liquid biofuel produced on a commercial scale over the last decades. A current challenge in bioethanol refineries is the valorization of bioethanol by-products, like the production of green chemicals and biofuels. Vinasse is a byproduct from sugarcane bioethanol refineries, and it is often mixed with other residual effluents resulting in a complex wastewater. Those effluents contain high levels of nutrients that may be a suitable and low-cost alternative for microalgae crops. Selection of robust microalgae strains with biotechnological potential is an important step to integrate the bioethanol production with microalgae crops. In this study, ten microalgae of the phylum Chlorophyta were screened in sugarcane bioethanol vinasse (VCA) and bioethanol biorefinery wastewater (ARE). Members of the family *Scenedesmaceae*: *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024, *Desmodesmus communis* BR007, and *Chlorella* sp. BR054 showed higher specific growth rates when cultivated in VCA and ARE with pH adjusted to 7. However, acidic pH of the VCA and ARE exerted a great effect on the growth performance of the microalgae strains. Only the *Chlorella sorokiniana* BR001 strain showed a high growth rate when cultivated in the ARE-based media with acidic pH of 4.29. Selection of robust microalgae strains was an important first-step to incorporate a microalgae cultivation system in a bioethanol biorefinery.

**Keywords:** microalgae strain selection, sugarcane vinasse, bioethanol biorefinery wastewater

## 4.1 Introdução

O crescimento populacional implica em crescente demanda por alimentos, água, transporte e energia. No entanto, o intenso uso de veículos automotores durante as últimas décadas resultou em um alto consumo de combustíveis fósseis que diminuíram as fontes de petróleo e aumentaram as emissões de carbono (Wagner *et al.* 2016). O uso de diferentes biomassas e tecnologias será necessário para sustentar o crescimento da população com impactos mínimos no meio ambiente (Tan *et al.* 2018). Um exemplo bem-sucedido é a produção de biocombustíveis líquidos para atenuar a alta demanda por combustíveis fósseis e problemas associados ao seu consumo, como as mudanças climáticas, as crises do petróleo e os conflitos geográficos (ERDIWANSYAH *et al.*, 2019).

O bioetanol de cana-de-açúcar tem sido produzido em grande escala no Brasil nas últimas décadas, melhorias nas biorrefinarias de bioetanol de cana-de-açúcar têm sido propostas visando o uso de biomassa de cana-de-açúcar inteira e subprodutos derivados da produção de bioetanol (Vaz 2017). O uso sistemático da biomassa da cana-de-açúcar tende a minimizar a geração de resíduos e os impactos ambientais das biorrefinarias, além de produzir novos químicos (lático, succínico, sorbitol e butanol entre outros) com alto valor agregado baseados na química verde. Nesse contexto, as refinarias brasileiras de bioetanol vêm utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de vapor e eletricidade, que já correspondem a 7% da matriz energética nacional (Costa *et al.*, 2018).

Durante a produção de bioetanol de cana-de-açúcar é gerado um grande volume do efluente aquoso denominado vinhaça (VCA). Este subproduto é obtido após a destilação do etanol, e geralmente é produzido em uma proporção de 13 L por 1 L de bioetanol (Zani *et al.* 2018). Estima-se que 360 bilhões de litros de vinhaça foram produzidos no Brasil em 2015 (Lopes *et al.* 2016). A VCA possui uma alta concentração de matéria orgânica, baixo pH e altos níveis de nutrientes, sendo amplamente utilizado como fertilizante do solo em lavouras de cana-de-açúcar. No entanto, o uso excessivo de VCA como fertilizante pode causar salinização do solo, lixiviação de nitrato para as águas subterrâneas e eutrofização dos corpos d'água (Moran-Salazar *et al.* 2016; Zani *et al.* 2018). Além disso, a VCA é frequentemente misturada a outros efluentes residuais produzidos em biorrefinarias de bioetanol, como a água usada para lavar a cana-de-açúcar, máquinas e caminhões. A composição desse efluente composto, denominado água residuária de etanol (ARE) não está bem descrita na literatura. A VCA contém altos níveis

de macronutrientes como N, K, Ca e P (Zani *et al.* 2018), portanto este subproduto é uma fonte promissora e de baixo custo de nutrientes para cultivos de microalgas.

As microalgas são uma fonte promissora de biomassa para muitas aplicações, como a produção de biocombustíveis líquidos (*e.g.* biodiesel e bioetanol). A alta produtividade de macromoléculas observada em muitas linhagens de microalgas (Demirbas e Fatih Demirbas, 2011) sugere que a integração de sistemas de cultivo de microalgas com refinarias de bioetanol seja uma alternativa promissora para a produção de biomassa sem a necessidade de se utilizar terras agricultáveis (DE-LUCA *et al.*, 2018). Efluentes líquidos e dióxido de carbono da produção de bioetanol podem ser integrados aos sistemas de cultivo de microalgas para fornecer nutrição às linhagens de microalgas. Assim, as emissões de refinaria de bioetanol e os custos de cultivo de microalgas poderiam ser drasticamente reduzidos. Os custos de cultivo de microalgas ainda são economicamente restritivos para a produção comercial de químicos verdes de baixo valor agregado, como os biocombustíveis. Assim, os nutrientes usados nas formulações de meio de culturas representam 30-35% dos custos totais de material necessários para a produção de biomassa (Molina Grima *et al.* 2003; Jaramillo *et al.* 2012; Chung *et al.* 2017; Chen *et al.* 2018).

Estudos anteriores mostraram que apenas algumas espécies de microalgas são capazes de crescer em VCA (Santana *et al.* 2017), e o uso de altos níveis de VCA limita o crescimento de microalgas (Ramirez *et al.* 2014). Além disso, a VCA tem um pH característico entre 3,8 e 4,7 (Moran-Salazar *et al.* 2016), e seu ajuste em grande escala pode não ser viável na maioria das biorrefinarias. Portanto, a seleção de linhagens de microalgas robustas e tolerantes a inibidores é necessária para aplicações industriais.

A seleção de linhagens de microalgas capazes de crescer em altas doses de VCA e ARE é crucial para a integração de uma biorrefinaria de bioetanol com os sistemas de cultivo de microalgas. Neste estudo, a VCA e a ARE foram investigadas como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas da filo *Chlorophyta*. O crescimento de 10 linhagens de microalgas foi avaliado ao ser cultivadas em VCA e ARE. As linhagens utilizadas foram isoladas de reservatórios de água doce e apresentaram alto potencial para aplicações biotecnológicas (Rocha *et al.* 2017; Soares *et al.* 2018).

## **4.2 Material e métodos**

#### **4.2.1 Caracterização da vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol**

A VCA e ARE foram fornecidas pela companhia Bambuí Bioenergia (Minas Gerais, Brasil). A caracterização físico-química da VCA e da ARE foi realizada conforme metodologias descritas por Matos *et al.* (2012).

As VCA e ARE foram descongeladas e centrifugadas a 7.000 G por 15 minutos para remoção dos sólidos suspensos e obtenção da fração líquida. As frações líquidas foram utilizadas para a formulação das diluições dos meios de cultura utilizadas para a seleção das linhagens de microalgas. Água deionizada foi utilizada para obter as diluições de 100 % (v v<sup>-1</sup>), 75 % (v v<sup>-1</sup>), 50 % (v v<sup>-1</sup>), e 25 % (v v<sup>-1</sup>) de VCA e ARE. Além disso, para correção do pH das VCA e ARE, foi utilizada uma solução 2M de NaOH. A turbidez das diluições foi determinada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 750 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha).

#### **4.2.2 Série de sólidos**

A fração sólida refere-se ao material suspenso e dissolvido nas VCA e ARE. A determinação de sólidos sedimentáveis (SP), sólidos totais (ST), fixos (SFT) e voláteis (SVT), sólidos em suspensão (SST), sólidos dissolvidos (SDT), sólidos suspensos fixos (SSF), sólidos suspensos voláteis (SSV) conforme metodologias descritas por Matos (2012).

##### **4.2.2.1 Sólidos sedimentáveis**

Para determinação dos sólidos sedimentáveis, utilizou-se o cone de Imhoff, preenchendo-o com a suspensão até a marca de 1 L com VCA ou ARE. Agitou-se cuidadosamente a amostra com o auxílio de um bastão de vidro na borda superior do cone após 45 minutos, deixando as suspensões sedimentarem por 15 minutos. Decorrido o tempo total de 1 hora, o volume de sólido que sedimentaram foram medidos no cone de Imhoff, e os teores de SP foram expressos em mL L<sup>-1</sup>.

##### **4.2.2.2 Sólidos totais, sólidos fixos e sólidos voláteis**

Na determinação dos ST, SFT e SVT foram utilizados cadinhos de 150 mL que foram previamente calcinados em forno mufla (LF2312, Jung, Brasil) a 550 °C por 30 minutos. Após a calcinação, os cadinhos foram retirados do forno e mantidos em dessecadores contendo sílica gel até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, os

cadinhos calcinados tiveram a massa determinada em balança analítica (AY220, Shimadzu Corporation, Japão).

Para determinação de ST, os cadinhos foram preenchidos com 50 mL das amostras de VCA e ARE, e mantidos em estufa de secagem (AL 102/150, American Lab, Brasil) a 65 °C até atingirem massa constante (cerca de 12 horas). Os cadinhos com amostras secas foram retirados da estufa e colocados em dessecador contendo sílica gel até atingirem a temperatura ambiente, e finalmente tiveram a massa seca determinada em balança analítica. Para determinação dos sólidos totais foi utilizada a equação 1.

$$ST = 1000 \frac{M_S - M_R}{V_A} \quad \text{Equação 1}$$

em que:

ST = sólidos totais (mg L<sup>-1</sup>);

M<sub>S</sub> = massa da amostra seca com o cadinho (mg);

M<sub>R</sub> = massa do cadinho (mg); e,

V<sub>A</sub> = volume de amostra (mL).

Os resíduos da secagem obtidos após a determinação dos ST foram utilizados para as determinações de SFT e SV. Para tal, os resíduos da determinação de ST foram acondicionados em forno mufla a 550 °C por 3 horas. Os sólidos remanescentes foram definidos como sólidos fixos totais (SFT), enquanto a diferença de massa observada foi definida como os sólidos voláteis (SV). Decorrido o tempo do ensaio, o forno foi desligado e aguardou-se a temperatura atingir 105 °C. Os cadinhos foram então transferidos para dessecador contendo sílica gel. As massas das cinzas foram obtidas após a pesagem dos cadinhos com as amostras queimadas em balança analítica. Para determinação dos SFT e SVT utilizou-se as equações 2 e 3, respectivamente.

$$STF = 1000 \frac{M_C - M_R}{V_A} \quad \text{Equação 2}$$

$$STF = ST - SFT \quad \text{Equação 3}$$

em que:

SFT = sólidos fixos (mg L<sup>-1</sup>);

M<sub>C</sub> = massa das cinzas com o cadinho (mg);

SVT = Sólidos voláteis (mg L<sup>-1</sup>);

$M_R$  = massa do cadinho (mg);

$V_A$  = volume de amostra (mL); e,

ST = sólidos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

#### 4.2.2.3 Sólidos em suspensão e sólidos dissolvidos

Para determinação de SST e SDT das VCA e ARE foram utilizados filtros de microfibras de vidro de 1,6  $\mu\text{m}$  de poro (Whatman 1820-047 GF/A). Os filtros foram secos em estufa a 65 °C por 6 horas, e depois foram mantidos em dessecador contendo sílica gel até atingirem a temperatura ambiente. As massas dos filtros de microfibras de vidro foram então determinadas utilizando uma balança analítica (AY220, Shimadzu, Brasil)

Amostras devidamente homogêneas de VCA e ARE 15 ml foram filtradas utilizando os filtros de microfibras de vidro com auxílio de sistema de filtração a vácuo. Os filtros de microfibras de vidro contendo os filtrados foram mantidos em estufa a 65 °C até atingirem massa constante (cerca de 12 horas). Após resfriamento em dessecador, os filtros de microfibras de vidro contendo os filtrados secos foram pesados em balança analítica. Os teores de SST e SDT, em  $\text{mg L}^{-1}$ , foram determinados pelas equações 4 e 5, respectivamente.

$$SST = 1000 \frac{M_{FD} - M_{FA}}{V_A} \quad \text{Equação 4}$$

$$SDT = ST - SST \quad \text{Equação 5}$$

em que:

SST = Sólidos suspensos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$M_{FD}$  = massa do filtro de microfibras de vidro com amostra seca (mg);

$M_{FA}$  = massa do filtro de microfibras de vidro seco (mg);

SDT = Sólidos dissolvidos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ); e,

ST = Sólidos totais ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

#### 4.2.2.4 Sólidos suspensos fixos e sólidos suspensos voláteis

Os filtros de microfibras de vidro contendo as biomassas secas obtidas na determinação dos SST foram acondicionados em cadinhos previamente calcinados e de massa conhecida, e mantidos a 550 °C por 3 horas em mufla. Os sólidos remanescentes dessa queima são os SSF, enquanto que a diferença de massa representa os SSV. Decorrido o tempo de queima, a mufla foi desligada e aguardou-se a temperatura atingir

105 °C para retirada e transferência dos cadinhos para o dessecador até atingir a temperatura ambiente. A massa das cinzas foi obtida em balança analítica. Os teores de sólidos suspensos fixos (SSF) e voláteis (SSV), em mg L<sup>-1</sup>, foram determinados pelas equações 6 e 7, respectivamente.

$$SSF = 1000 \frac{M_{FC} - M_{FT}}{V_A} \quad \text{Equação 6}$$

$$SSV = SST - SSF \quad \text{Equação 7}$$

em que:

SSF = Sólidos suspensos fixos (mg L<sup>-1</sup>);

M<sub>FC</sub> = massa das cinzas e massa do cadinho (mg);

M<sub>FT</sub> = massa do cadinho (mg);

V<sub>a</sub> = volume da amostra (mL);

SST = Sólidos suspensos totais (mg L<sup>-1</sup>); e,

SSV = Sólidos suspensos voláteis (mg L<sup>-1</sup>).

#### 4.2.3 Demanda bioquímica de oxigênio

Foi utilizado 2 mL de VCA e ARE da vinhaça *in natura* e ARE diluídas 50 vezes para determinação da DBO fixo em 5 dias (DBO<sub>5</sub>). As amostras foram colocadas em frascos Winkler de 300 mL, e completou-se o volume de 300 mL com a solução nutriente (*i.e.* água de diluição) descrita por Matos (2012). O branco foi preparado utilizando somente a água de diluição. Os frascos foram fechados e retirou-se o excesso de líquido, em seguida a concentração de oxigênio dissolvido foi aferida pelo método de titulação iodometrica, usando tiosulfato de sódio (NA<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5H<sub>2</sub>O) 3,125 mmol L<sup>-1</sup>. As amostras foram acondicionadas em câmara do tipo BOD a 20 °C durante 5 dias. Aferiu-se novamente a leitura da concentração de oxigênio dissolvido após a incubação, e o valor da DBO<sub>5</sub> foi determinado por meio da equação 8.

$$DBO_5 = \frac{OD_0 - OD_5}{P} \quad \text{Equação 8}$$

em que:

DBO<sub>5</sub> = demanda bioquímica de oxigênio em cinco dias;

OD<sub>0</sub> = concentração de oxigênio dissolvido inicial (mg L<sup>-1</sup>);

OD<sub>5</sub> = concentração de oxigênio dissolvido após 5 dias (mg L<sup>-1</sup>); e,

P = fração volumétrica da amostra usada (volume da amostra/ volume do frasco<sup>-1</sup>).

#### 4.2.4 Demanda química de oxigênio

Para determinação da DQO das amostras de VCA e ARE foi utilizado o reagente para determinação de DQO (DQO 20-1.500 mg L<sup>-1</sup>, Hach Company, Estados Unidos), em que 2 mL de amostra diluída 50 vezes e adicionada ao tubo contendo a solução de digestão. Os tubos foram submetidos a digestão a 150 °C por 2 horas. Após o resfriamento da amostra, mediu-se a absorbância em 620 nm em espectrofotômetro descontado a valor do branco. A determinação de DQO se baseia na metodologia descrita em APHA (1998), em que a matéria orgânica é oxidada por dicromato de potássio em meio ácido (ácido sulfúrico). A curva padrão foi construída utilizando solução padrão de biftalato de potássio a 200 mg L<sup>-1</sup>, que foi digerida utilizando n as mesmas condições de determinação da DQO das amostras.

#### 4.2.5 Determinação dos pH da vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol.

Os valores pH das VCA e ARE foram obtidos utilizando medidor de pH de bancada (HI2221, Hanna Instruments, Estados Unidos) conectado a um eletrodo universal de pH de junção dupla (HI113B, Hanna Instruments, Estados Unidos) e termopar. O sistema de medição de pH foi previamente calibrado utilizando soluções de calibração (Exôdo Científica, Brasil) com os seguintes valores de pH: 4,01 ± 0,02, 7,01 ± 0,02, 10,01 ± 0,02.

#### 4.2.6 Acclimação, produção do inóculo e seleção de linhagens de microalgas

Dez linhagens de algas *Chlorophyceae* monoespecíficas foram obtidas da Coleção Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (MG). As microalgas foram mantidas em incubadora (LS-550FT-2, Logen Scientific, Brasil) à 20 °C e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), nos meios de cultura BG11 ou BBM com pH 7 (ANDERSEN, 2005). As linhagens de microalgas usadas neste estudo estão listadas na Tabela 3.

**Tabela 2.** Microalgas usadas no estudo.

Linhagens	Meio	GenBank access	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i> BR001	BG11	KY303731 KY303737	(ROCHA <i>et al.</i> , 2017)
<i>Scenedesmus obliquus</i> BR003	BG11	KY303738	(ROCHA <i>et al.</i> , 2017; SOARES <i>et al.</i> , 2018)
<i>Desmodesmus communis</i> BR007	BG11	KY303739	(ROCHA <i>et al.</i> , 2017)

<i>Chlamydomonas</i> sp. BR020	BG11	KY303734 KY303743	(ROCHA <i>et al.</i> , 2017)
<i>Scenedesmus</i> <i>bajacalifornicus</i> BR024	BG11	KY303736 KY303744	(ROCHA <i>et al.</i> , 2017)
<i>Haematococcus pluvialis</i> BR040	BBM		Este estudo.
<i>Chlamydomonas</i> sp. BR050	BG11		Este estudo.
<i>Chlamydomonas</i> <i>mutagenica</i> BR051	BG11		Este estudo.
<i>Chlorella</i> sp. BR052	BG11		Este estudo.
<i>Chlorella</i> sp. BR054	BG11		Este estudo.

As linhagens de microalgas foram aclimatadas antes dos cultivos utilizando VCA e ARE. As microalgas foram aclimatadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura BG11. As microalgas foram cultivadas por 5 dias em meio de cultura BG11 contendo 0,782 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio como fonte de carbono. O pH do meio de cultura foi ajustado para 7. As condições de cultivo foram fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro), 22 °C, e irradiância na altura da bancada de 184 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proveniente de quatro lâmpadas fluorescentes de luz diurna de 14 watts.



**Figura 2.** Sistema usada na aclimação das linhagens de microalgas.

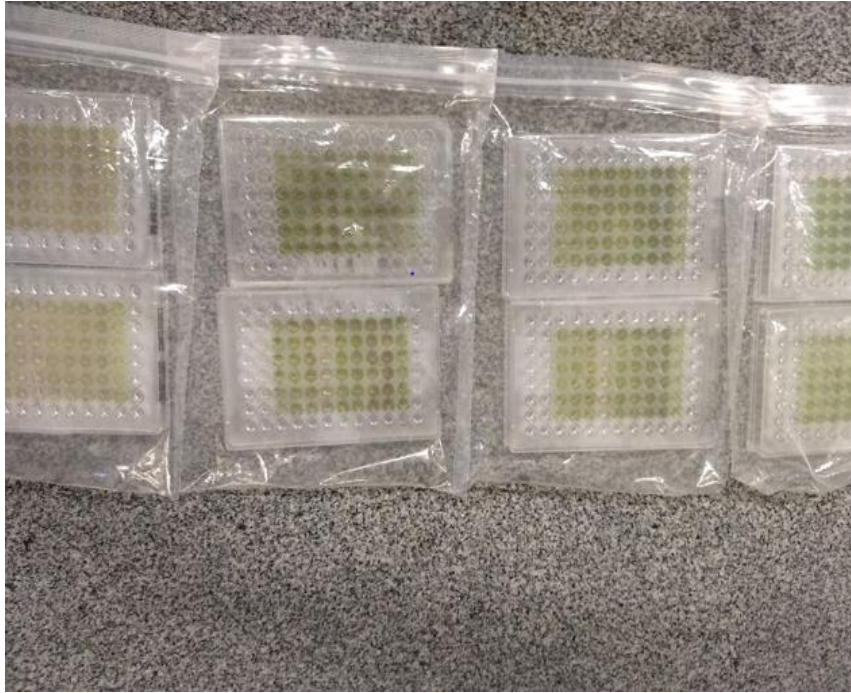
#### 4.2.7 Crescimento das microalgas em vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol

O crescimento das microalgas foi avaliado em VCA e ARE. Uma fração das fases líquidas foi suplementada sem o ajuste de pH, e o pH das VCA e ARE foram 4,55 e 4,22, respectivamente. Uma fração da VCA e ARE centrifugadas tiveram o pH ajustado para 7 utilizando uma solução 2 M de NaOH.

Os cultivos das microalgas em VCA e ARE foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano conforme descrito por Paixão *et al.* (2008). Para assegurar a completa aclimação das microalgas adicionou-se 100 µL de inoculo (previamente padronizados na densidade ótica de 750 nm de 0,2 como acetato de sódio) em microplacas de 96 poços. As microplacas foram mantidas durante 3 dias nas mesmas condições de crescimento de 12:12 horas de fotoperíodo (luz:escuro), 22 °C, e irradiância na altura da bancada de 184 µmols fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proveniente de quatro lâmpadas fluorescentes de luz diurna de 14 watts).

Após a etapa de 3 dias aclimação adicionaram-se 100 µL de VCA ou ARE com diferentes diluições e pH nas microplacas de 96 poços. Os cultivos foram mantidos até o final da fase de crescimento exponencial (*i.e.* 4 dias após a adição de VCA ou ARE). As diluições de 100 µL de VCA ou ARE em 100 µL de culturas de microalgas resultaram nas concentrações finais de VCA e ARE de 12,5, 25, 37,5 e 50% (v v<sup>-1</sup>). Um controle positivo foi estabelecido pela adição de 100 µl de meio de cultura BG11 com acetato de sódio e pH 7, e um controle negativo foi utilizado com 100 µl de solução isotônica de NaCl com a mesma concentração de sal do meio de cultura BG11 e pH 7. As microplacas de 96 poços foram cobertas com tampa e mantidas em embalagens plásticas transparentes e seladas para evitar a evaporação (Figura 4). As embalagens foram abertas diariamente para leitura de densidade ótica e permitir trocas gasosas.

Os crescimentos das microalgas foram monitorados diariamente em leitor de microplacas utilizando a DO750 (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). As DO750 das VCA e ARE foram subtraídas dos dados de absorbância obtidos durante os cultivos. Todo o material utilizado no cultivo das microalgas, excetuando as microplacas, foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As VCA e ARE não foram esterilizadas para evitar alterações em suas composições.



**Figura 3.** Microplacas acondicionadas em embalagens plásticas transparentes e herméticas.

#### 4.2.8 Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento foi calculada na fase exponencial da curva de crescimento, conforme a equação descrita por ANDERSEN (2005).

$$\mu = \frac{\ln c_F - \ln c_I}{t_F - t_I} \quad \text{Equação 9}$$

em que:

$\mu$  a taxa específica de crescimento ( $\text{dia}^{-1}$ );

$\ln c_i$  logaritmo natural da absorbância do cultivo (nm);

$\ln c_f$  logaritmo natural da absorbância final do cultivo (nm); e

$t_f - t_i$  é o intervalo de tempo (dias);

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Composição das VCA e ARE

VCA e o ARE são efluentes complexos e ácidos (Tabela 4) que não podem ser descarregados diretamente em corpos de água, segundo a resolução CONAMA 430( NASPOLINI *et al.*, 2017) O pH da ARE foi inferior ao da VCA, e os valores foram 4,22 e 4,55, respectivamente. Em geral, a VCA apresentou maiores concentrações de sólidos e minerais em comparação com a ARE, e também apresentou uma coloração mais acastanhada.

Os ST referem-se ao material suspenso e dissolvido em águas residuais, e a VCA apresentou 1,9 vezes mais sólidos totais do que a ARE (Tabela 3). Os ST da ARE e VCA

corresponderam principalmente a matéria orgânica (*i.e.* SVT) que corresponderam a 84 e 90 % ( $\text{m m}^{-1}$ ), respectivamente. Os SDT e SST estavam presentes em valores semelhantes na VCA e ARE, os SST foram predominantemente compostos por matéria orgânica (*i.e.* SSV). Os elevados teores de matéria orgânica presentes na VCA e ARE apresentam relação direta com os elevados níveis de  $\text{DBO}_5$  e DQO observados nestes efluentes (Tabela 3). As razões  $\text{DBO:DQO}$  foram 0,3 e 0,39 para VCA e ARE respectivamente.

A matéria inorgânica (SFT) corresponderam a 10,2 e 16 % dos ST de VCA e ARE, respectivamente (Tabela 3). Os elementos P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn e Na foram responsáveis por 59 % da composição de SFT em ambos os efluentes (Tabela 4). Os valores elevados do macronutriente K foram observados em VCA e ARE, como esperado para esses efluentes. A concentração de K foi 24,8 % maior em VCA do que em ARE. VCA e ARE mostraram concentrações semelhantes de Ca, que foi o segundo nutriente encontrado em maiores valores. Por outro lado, o macronutriente P foi 49,7 % maior na VCA em comparação com a ARE. A concentração do micronutriente Zn foi 50,6 % maior na VCA em comparação com a ARE. Pequenas diferenças foram observadas na composição dos demais micronutrientes essenciais ao cultivo de microalgas (Mg, S, Fe, Mn e Na). Concentrações baixas de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  e concentrações intermediárias de  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  foram observadas em VCA e ARE (Tabela 3), tendo como referência a concentração de nitrato do meio de cultura do tratamento controle BG11 ( $1.094 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ).

**Tabela 3** Composição físico-química da VCA e ARE.

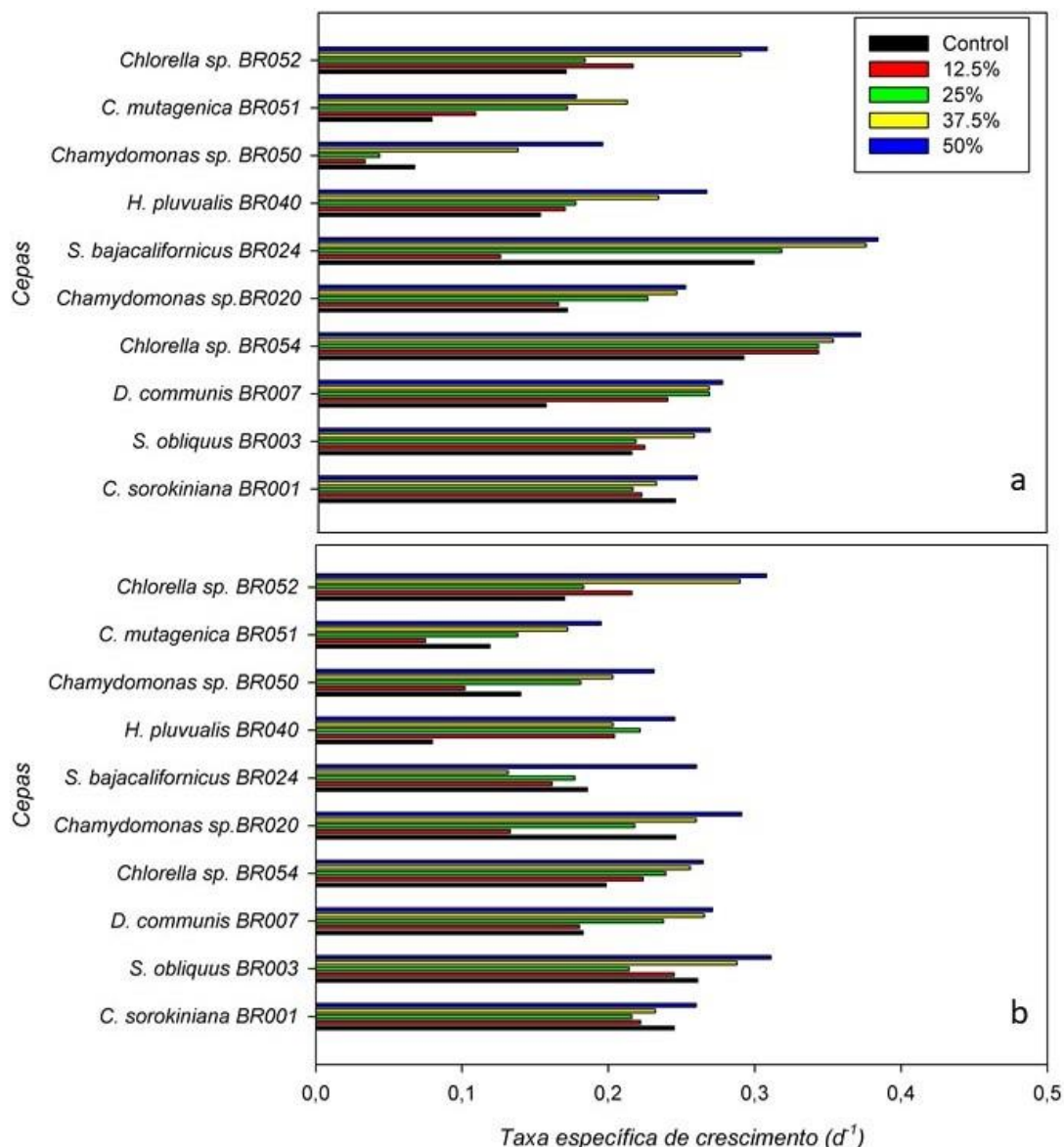
Parâmetro	Unidade	VCA	ARE
SS <sup>1</sup>	$\text{mL L}^{-1}$	24,3	13,5
ST <sup>2</sup>	$\text{g L}^{-1}$	31,3	16,3
SF <sup>3</sup>	$\text{g L}^{-1}$	3,2	2,6
SVT <sup>4</sup>	$\text{g L}^{-1}$	28,2	13,7
SST <sup>5</sup>	$\text{g L}^{-1}$	16,2	7,7
SDT <sup>6</sup>	$\text{g L}^{-1}$	15,1	8,6
SSF <sup>7</sup>	$\text{g L}^{-1}$	0,38	0,12
SSV <sup>8</sup>	$\text{g L}^{-1}$	15,8	7,5
$\text{DBO}_5$ <sup>9</sup>	$\text{mg L}^{-1}$	10,900	6,300
DQO <sup>10</sup>	$\text{mg L}^{-1}$	35935	16,191
pH	-	4,55	4,22

NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	mg L <sup>-1</sup>	15,6	14,8
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	mg L <sup>-1</sup>	135,5	114,2
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N	mg L <sup>-1</sup>	n.d	n.d
P	mg L <sup>-1</sup>	61,4	30,9
K	mg L <sup>-1</sup>	1.138,1	856,3
Ca	mg L <sup>-1</sup>	355,9	321,8
Mg	mg L <sup>-1</sup>	119,6	90,7
S	mg L <sup>-1</sup>	207,4	140,7
Fe	mg L <sup>-1</sup>	20	21,9
Zn	mg L <sup>-1</sup>	1,2	0,58
Mn	mg L <sup>-1</sup>	2,8	2,3
Na	mg L <sup>-1</sup>	27,2	31,5

<sup>(1)</sup> sólidos sedimentáveis, <sup>(2)</sup>Sólidos totais, <sup>(3)</sup>Sólidos fixos, <sup>(4)</sup>Sólidos voláteis Totais, <sup>(5)</sup>Sólidos Suspensos Totais, <sup>(6)</sup>Sólidos dissolvidos totais, <sup>(7)</sup> Sólidos suspensos fixos <sup>(8)</sup> Sólidos suspensos voláteis ó, <sup>(9)</sup> Demanda bioquímica de oxigênio <sup>(10)</sup> Demanda química de oxigênio, n.d não detectado.

#### 4.3.2 Crescimento das microalgas em vinhaça de cana de açúcar

O desempenho do crescimento das dez linhagens de microalgas em VCA foi avaliado pelas curvas de crescimento e pelas taxas específicas de crescimento. A VCA foi utilizada com um pH de 4,55 (Figura 4b) ou ajustado para 7 (Figura 4a). Aumentar as concentrações de VCA de 12,5 para 50 % (v v<sup>-1</sup>) resultou em uma maior taxa específica de crescimento para a maioria das linhagens de microalgas (Figura 4).



**Figura 4.** Taxa específica de crescimento das microalgas em VCA com pH 7 (a) e 4,55 (b).

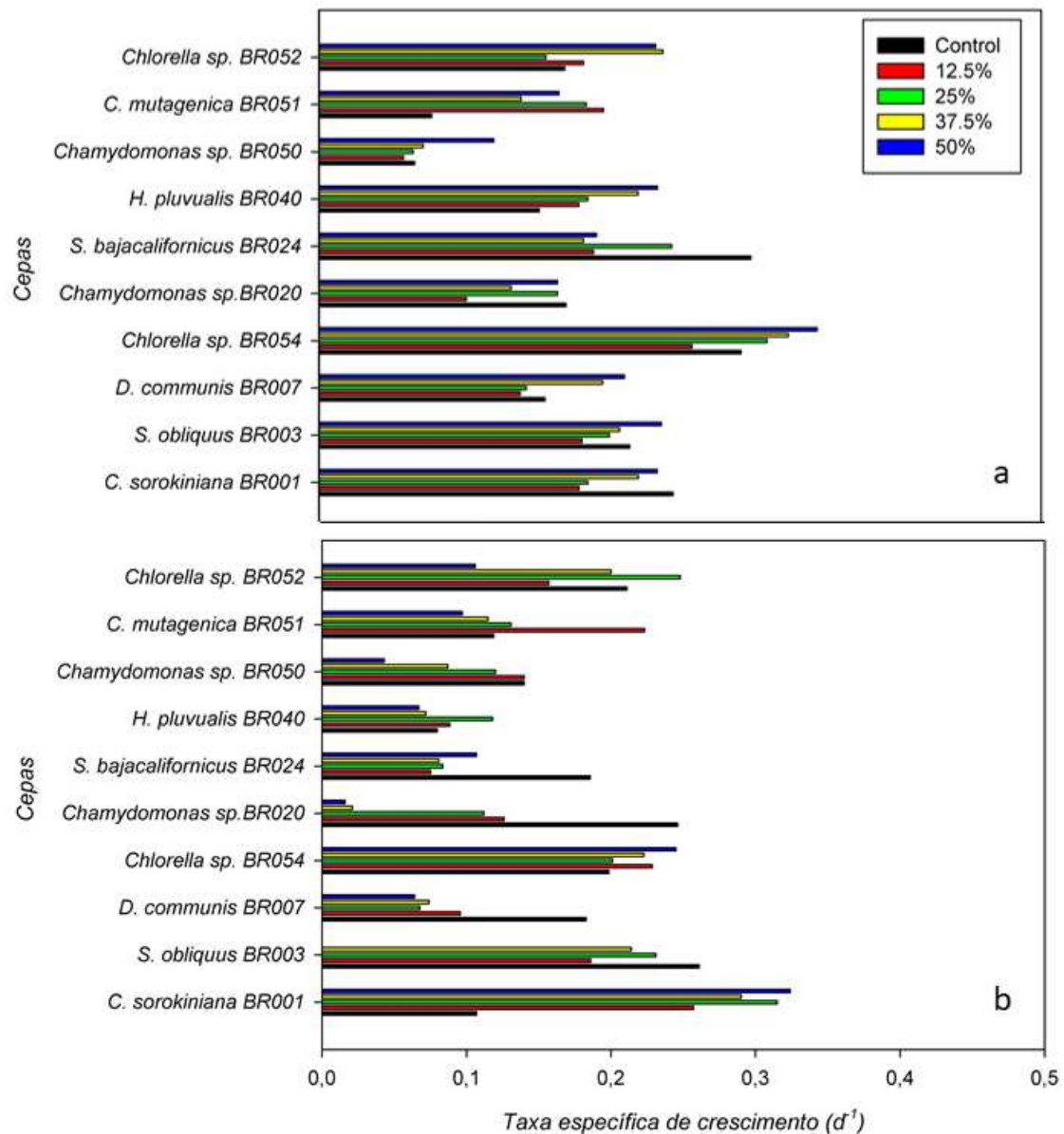
*Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 apresentaram as maiores taxas de crescimento específico quando cultivadas em VCA com pH 7 (Figura 4a). No entanto, as taxas de crescimento específico de *S. bajacalifornicus* BR024 foram maiores nos meios de cultura contendo 37,5 e 50% ( $v v^{-1}$ ) de VCA, enquanto as taxas específicas de crescimento de *Chlorella* sp. BR054 foram afetadas de forma menos pronunciada pela concentração de VCA (Figura 4a). Os meios de cultura a base de VCA sustentaram altas taxas de crescimento específico para as linhagens BR024 e BR054 quando comparados ao meio de cultura controle BG11 (Figura 4a). A VCA na concentração de 50% ( $v v^{-1}$ ) teve maior o crescimento quando comparada com o controle nas linhagens *D. communis* BR007 e *C. mutagenica* BR051 (Figura 4a). Por outro lado, taxas específicas de

crescimento de *Chlamydomonas* sp. BR050 foram maiores nos meios de crescimento à base de VCA contendo 37,5 e 50% (v v<sup>-1</sup>), mas esta linhagem apresentou um desempenho de crescimento inferior quando comparada às linhagens BR024 e BR054 (Figura 5a).

O uso de VCA com pH de 4,55 afetou o desempenho de crescimento de todas as linhagens (Figura 4b) quando comparado ao VCA com pH de 7 (Figura 4a). As linhagens BR003 e BR052 apresentaram as maiores taxas de crescimento específico quando cultivadas em 37,5 e 50% (v v<sup>-1</sup>) de VCA com pH 4,55 (Figura 4b). O crescimento específico da linhagem BR054 foi afetado, mas em menor intensidade, pelas diferentes concentrações de VCA com pH 4,55 (Figura 4b), também observada quando cultivada em VCA com pH de 7 (Figura 4a). No entanto, o cultivo da BR054 em condições ácidas (pH 4,55) resultou numa taxa de crescimento específico mais baixa (Figuras 4a e 4b). O desempenho de crescimento da cepa BR024 foi drasticamente afetado pela VCA com pH de 4,55 (Figura 4b) quando comparado com o VCA com pH 7 (Figura 4a). O aumento da concentração de VCA resultou em uma maior taxa de crescimento específico para as linhagens *Chlamydomonas* sp. BR020, BR050 e BR051 (Figura 5b).

#### **4.3.3 Crescimento das microalgas em ARE**

Subsequentemente, o desempenho de crescimento das dez linhagens de microalgas foi avaliado utilizando ARE com pH 7 (Figura 5a) e 4,22 (Figura 5b). Em geral, os desempenhos de crescimento específicos das linhagens foram drasticamente afetados pelo aumento da concentração de ARE. De fato, apenas *Chlorella* sp. BR054 apresentou uma taxa de crescimento específica superior a 0,3 (Figura 6a) quando cultivada em ARE com pH 7.

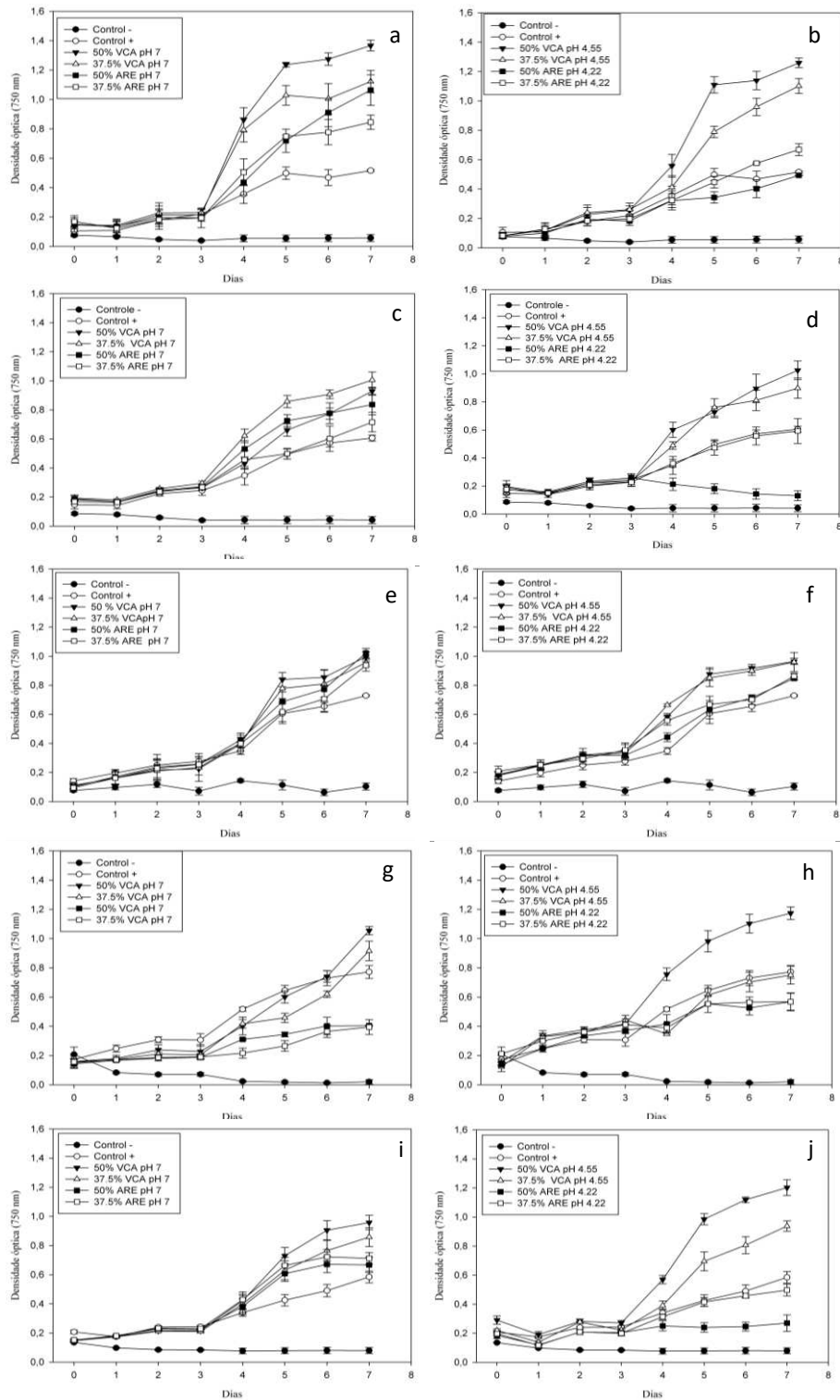


**Figura 5.** Taxa específica de crescimento das microalgas em ARE com pH 7 (a) e 4,22 (b).

Os crescimentos das microalgas foram ainda menores quando cultivadas em ARE com pH de 4,22 (Figura 5b). Somente a linhagem *C. sorokiniana* BR001 apresentou crescimento superior em ARE com pH 4,22 em comparação com as demais linhagens (Figura 5b). As seguintes microalgas mostraram-se sensíveis à altas concentrações de ARE com pH 4,22: *H. pluvialis* BR040, *Chlamydomonas* sp. BR020, *Chlamydomonas* sp. BR050, *C. mutagenica* BR051 e *Chlorella* sp. BR052 (Figura 5b).

#### 4.3.4 Perfis de crescimento de linhagens de microalgas em VCA e ARE

As microalgas *C. sorokiniana* BR001, *S. obliquus* BR003, *S. bajacalifornicus* BR024, *Chlorella* sp. BR052, e *Chlorella* sp. BR054 mostraram um padrão de crescimento mais robusto em VCA e ARE em comparação com as outras microalgas. Em geral, as linhagens BR001, BR003, BR024, BR054 e BR052 apresentaram crescimento rápido nas diferentes concentrações de VCA e ARE em comparação com o meio de cultura controle BG11 (Figura 6).



**Figura 6.** Perfil de crescimento das microalgas em diferentes meios de cultura: a) *C. sorokiniana* BR001 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (b) *C. sorokiniana* BR001 em VCA (pH 4,55) e ARE (pH 4,22); (c) *S. obliquus* BR003 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (d) *S. obliquus* BR003 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (e) *Chlorella* sp. BR054 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (f) *Chlorella* sp. BR054 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (g) *S. bajacalifornicus* BR024 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7); (h) *S. bajacalifornicus* BR024 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55); (i) *Chlorella* sp. BR052 em VCA (pH 7) e ARE (pH 7), (j) *Chlorella* sp. BR052 em VCA (pH 4,22) e ARE (pH 4,55).

As linhagens BR001 e BR054 apresentaram um perfil de crescimento típico, não sendo observada fase de adaptação (fase *lag*) nos diferentes meios (Figuras 6a, 6b, 6e e 6f). No entanto, a BR001 apresentou menor crescimento em 50% (v v<sup>-1</sup>) de ARE com pH 4,22, em comparação com o meio de cultura contendo 50% (v v<sup>-1</sup>) de ARE com pH 7 (Figuras 6a e 6b). Observou-se uma inibição de crescimento semelhante nas linhagens BR003 e BR052 cultivadas em 50% (v v<sup>-1</sup>) de ARE com pH 4,22 (Figuras 6d e 6j), enquanto que a linhagem BR024 apresentou um crescimento desfavorável na maioria dos meios de crescimento como exceção do VCA 50% (Figuras 6g e 6h).

A BR001 apresentou um rápido crescimento nos primeiros 2 dias (dia 5) após a adição de VCA (Figuras 6a e 6b). E as condições ácidas da VCA (pH 4,55) também suportaram um rápido crescimento de *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR052 (Figuras 6h e 6j). As linhagens *S. obliquus* BR003 e *Chlorella* sp. BR054 apresentaram um rápido crescimento nas primeiras 24 h após a adição de VCA e ARE com pH de 7 (dia 3).

#### 4.4 Discussão

Um desafio atual no cultivo de microalgas usando águas residuárias de biorrefinarias de bioetanol é a seleção de linhagens de microalgas robustas. As VCA e ARE estão disponíveis em grandes volumes no Brasil. No entanto, o uso da VCA e ARE como fertilizante (fertirrigação) tem algumas limitações, tais como o transporte destes resíduos e alterações nas características físicas e químicas do solo (Lopes *et al.* 2016). VCA e ARE são fontes de abundantes nutrientes para o cultivo de microalgas (Tabela 3), e estes efluentes podem ser usados juntamente com o CO<sub>2</sub> gerado durante a produção de bioetanol. No entanto, o baixo pH e os altos níveis de matéria orgânica presentes na VCA e ARE podem limitar o crescimento de algumas microalgas (Tabela 3).

As VCA e o ARE apresentaram altos níveis de DBO<sub>5</sub> e DQO, e as baixas relações DBO:DQO de 0,3 e 0,39 indicam que estes efluentes não são facilmente biodegradáveis.

Os valores de DBO e DQO observados na VCA estão de acordo com estudos anteriores (Doušková *et al.* 2010; Olguín *et al.* 2015). A composição da ARE não foi previamente descrita na literatura, possivelmente por ser um efluente composto de diferentes processos, mas os valores de DQO e DBO<sub>5</sub> foram menores que os observados na VCA (Tabela 4). Esses efluentes não podem ser descartados diretamente em corpos d'água, devido à alta carga orgânica que pode induzir a proliferação de microrganismos que esgotam o oxigênio dissolvido na água, alterando a vida aquática e poluindo os corpos hídricos. Além disso, o valor de pH ácido de 4,22 observado na VCA é semelhante a outros estudos que mostraram uma variação de pH de 3,9 a 5 (Romanholo Ferreira *et al.* 2011; Napolini *et al.* 2017).

Existem diferenças significativas na composição elementar de VCA e ARE (Tabela 3). Em geral, a ARE apresentou menores concentrações de elementos em relação a VCA, uma vez que a ARE é obtida através da diluição da VCA com outros efluentes residuais produzidos na biorrefinaria de bioetanol. As VCA e ARE apresentaram elevadas concentrações de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Zn, Mn e Na em comparação com o meio de cultura BG11. Altas concentrações de K observadas na VCA estão de acordo com estudos anteriores (Santana *et al.* 2017; Zani *et al.* 2018). A principal fonte de N observada em VCA e ARE foi NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Tabela 4), e os níveis NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em VCA e ARE foram menores quando comparados com o meio de cultura BG11 (Andersen 2005). Resultados semelhantes foram observados em um estudo anterior (Santana *et al.* 2017).

O desempenho de crescimento de dez microalgas foi avaliado usando VCA e ARE, uma vez que a concentração de alguns elementos pode limitar o crescimento algal. Microalgas do filo Chlorophyta foram utilizadas devido ao seu alto potencial biotecnológico (Rocha *et al.* 2017). Adicionalmente, avaliou-se a necessidade de correção do pH da VCA e ARE, no entanto, a correção do pH ácido destes efluentes pode não ser viável em escala comercial. Os cultivos de microalgas em VCA e ARE mostraram claramente que apenas algumas linhagens de microalgas foram capazes de crescer em VCA, mesmo com ajuste de pH (Figuras 5). *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 são linhagens promissoras para cultivos em VCA com pH 7. O gênero *Scenedesmus* é considerado potencial para a produção de biocombustível, pois possui alta taxa de crescimento e boa produtividade lipídica, apresentando resistência elevada a altas concentrações de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e amônio (Soares *et al.*, 2017). Este gênero também apresenta alta produção de biomassa e lipídios (Gouveia e Oliveira 2009; Mandal

e Mallick 2009; Yoo *et al.* 2010). O gênero *Chlorella* sp é um dos gêneros de microalgas mais estudado devido ao seu potencial biotecnológico, caracterizado por produção de proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerais, pigmentos e a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia curta (GUCCIONE *et al.*, 2014). Assim, *Chlorella* está entre as algas de maior interesse para os biocombustíveis, uma vez que sob condições de estresse, pode acumular grandes quantidades de lipídios ou sintetizar o amido. Cultivos realizados sob privação de nitrogênio ou fósforo mostraram significativo acúmulo de lipídios de até 50%, e uma alta produtividade lipídica (CHOI; LEE, 2016; MONDAL *et al.*, 2017)

Concentrações altas de VCA afetaram o crescimento de *D. communis* BR007 e *C. mutagenica* BR051 (Figuras 5a e 5b). A base bioquímica para a inibição do crescimento de microalgas em VCA ainda é pouco compreendida. No entanto, a composição da VCA sugere que os altos níveis de metais pesados (Tabela 3) podem limitar o crescimento de algumas linhagens (Figuras 5a e b). Estudos anteriores mostraram que o crescimento de *Phaeocystis antarctica* foi drasticamente afetada pelas concentrações de 0,38 e 1,11 mg L<sup>-1</sup> de Zn, respectivamente (Miazek *et al.* 2015). Esses níveis de Zn estão no intervalo observado em VCA, que foi de 1,2 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 3).

O cultivo de microalgas em VCA com um pH de 4,55 mostrou a importância da seleção de linhagens de microalgas em condições industriais adversas. Apenas algumas linhagens apresentaram desempenho de crescimento adequado em VCA ácido (Figura 4b). O baixo pH da VCA ocorre porque a fermentação de levedura ótima é conduzida em condições ácidas, e durante o processo de fermentação são produzidos ácidos orgânicos que alteram o pH (Ramos-Vaquerizo *et al.* 2018). As linhagens BR003 e BR052 apresentaram as maiores taxas de crescimento específico (Figura 4b). Por outro lado, as linhagens BR020, BR050 e BR051 do gênero *Chlamydomonas* apresentaram baixa tolerância à VCA ácida (Figura 4b). De fato, o crescimento ótimo de *C. reinhardtii* é observado na faixa de pH de 5,5 a 8,5 (Messerli *et al.* 2005). O pH é um dos parâmetros mais importantes para o cultivo de microalgas, pois determina a disponibilidade de nutrientes no meio, assim como afeta o metabolismo das microalgas (Chen e Durbin, 1994). As linhagens de microalgas possuem uma faixa ótima de pH para crescimento, acúmulo de lipídios e biomassa (Bautista-Chamizo *et al.*, 2019).

Curiosamente, as linhagens de microalgas apresentaram crescimento menor quando cultivadas em ARE em contraste com VCA (Figuras 4 e 5). O desempenho do crescimento foi afetado pelo aumento da concentração de ARE (Figuras 5). Estes

resultados sugerem que elevadas concentrações de ARE são tóxicas para microalgas. A ARE é uma combinação de VCA com outros efluentes da biorrefinaria de bioetanol, portanto, os compostos inibitórios em ARE possivelmente não estão presentes no VCA. O efeito inibitório do crescimento pode ser observado no cultivo utilizando 50% (v v<sup>-1</sup>) de ARE com pH 4,22 (Figura 5b), em que se observa que somente a linhagem *C. sorokiniana* BR001 apresentou alta taxa específica de crescimento quando cultivada nesta água residuária. Esta espécie é considerada promissora para uso comercial como alimento e nutracêuticos, e apresenta altas taxas de crescimento quando cultivada em águas residuárias (Ramanna *et al.* 2014). A linhagem BR001 apresenta taxa de crescimento superior, altos teores de pigmentos (clorofila *a* e carotenoides) e moléculas ricas em C (lipídeos e carboidratos) quando comparada com outras clorofíceas (Rocha *et al.* 2017).

#### 4.5 Conclusão

A seleção de linhagens robustas de microalgas foi uma importante etapa para usar a VCA e ARE como fontes de nutrientes de baixo custo. Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* cresceram de forma promissora nas águas residuárias de biorefinaria de bioetanol. Estes dois gêneros de clorofíceas são considerados potenciais para uso comercial. O pH foi um parâmetro importante, uma vez que as microalgas têm uma faixa específica e estreita de pH para o crescimento, e o pH ácido afetou o crescimento da maioria das linhagens. *C. sorokiniana* BR001 foi a única cepa que apresentou crescimento expressivo em ARE com pH ácido. O baixo pH dos efluentes da biorrefinaria de bioetanol sugere que novas melhorias biotecnológicas nas linhagens de microalgas podem ser necessárias para incorporar um sistema eficiente de cultivo de microalgas em uma biorrefinaria de bioetanol.

#### 4.6 Referências

- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 1st edition ed. Elsevier Inc., 2005.
- BAUTISTA-CHAMIZO, E. et al. Comparative effects of seawater acidification on microalgae: single and multispecies toxicity tests. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 224–232, 2019.
- CHEN, C.; DURBIN, E. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 111, n. 1992, p. 83–94, 1994.
- CHOI, W. Y.; LEE, H. Y. Effective production of bioenergy from marine *Chlorella sp.* by high-pressure homogenization. v. 2818, 2016.
- COSTA, J. A. F.; ROSADA DE SÁ RIBEIRO, M.; CAETANO XAVIER JUNIOR, E. **Energy law and regulation in Brazil**. Cham: Springer International Publishing, 2018.

- DE-LUCA, R. et al. Microalgae growth optimization in open ponds with uncertain weather data. **Computers and Chemical Engineering**, v. 117, p. 410–419, 2018.
- DEMIRBAS, A.; FATIH DEMIRBAS, M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 1, p. 163–170, 2011.
- DOUŠKOVÁ, I. et al. Utilization of distillery stillage for energy generation and concurrent production of valuable microalgal biomass in the sequence: Biogas-cogeneration-microalgae-products. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 3, p. 606–611, 1 mar. 2010.
- ERDIWANSYAH et al. An overview of Higher alcohol and biodiesel as alternative fuels in engines. **Energy Reports**, v. 5, p. 467–479, 2019.
- GORAIN, P. C.; BAGCHI, S. K.; MALLICK, N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. **Environmental Technology**, v. 34, n. 13–14, p. 1887–1894, 2013.
- GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 2009.
- GUCCIONE, A. et al. *Chlorella* for protein and biofuels : from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. p. 1–12, 2014.
- JARAMILLO, J. J.; NARANJO, J. M.; CARDONA, C. A. Growth and oil extraction from *Chlorella vulgaris*: A techno-economic and environmental assessment. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 31, p. 10503–10508, 2012.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.
- MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 281–291, 2009.
- MESSERLI, M. A. et al. Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 13, p. 2569–2579, jul. 2005.
- MIAZEK, K. et al. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23929–23969, 2015.
- MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 2003.
- MONDAL, M. et al. Carbon dioxide bio-fixation by *Chlorella sp.* BTA 9031 towards biomass and lipid production: Optimization using Central Composite Design approach. **Journal of CO2 Utilization**, v. 22, n. October, p. 317–329, 2017
- MORAN-SALAZAR, R. G. et al. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1007, dez. 2016.
- NASPOLINI, B. F. et al. Bioconversion of sugarcane vinasse into high-added value products and energy. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- OLGUÍN, E. J. et al. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid

- enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1813–1822, 2015.
- PAIXÃO, S. M. et al. Performance of a miniaturized algal bioassay in phytotoxicity screening. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 165–171, 2008.
- RAMANNA, L. et al. The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 168, p. 127–135, 2014.
- RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630–635, 2014.
- RAMOS-VAQUERIZO, F. et al. Anaerobic Treatment of Vinasse from Sugarcane Ethanol Production in Expanded Granular Sludge Bed Bioreactor. **J Chem Eng Process Technol**, v. 9, n. 375, p. 3, 2018.
- ROCHA, R. P. et al. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. **Algal Research**, v. 28, n. September, p. 139–150, 2017.
- ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011.
- SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 1 mar. 2017.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** n. 62, p. 108–114, 2007
- SOARES, J. et al. *Scenedesmus* sp. cultivation using commercial-grade ammonium sources. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 35–45, 2018.
- TAN, X. B. et al. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 17–30, jan. 2018.
- VAZ, S. Sugarcane-Biorefinery. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 123, n. July 2015, p. 127–141, 2017a.
- WAGNER, L. et al. Trading off global fuel supply , CO2 emissions and sustainable development. **PLOS OneS One**, p. 1–17, 2016.
- YOO, C. et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, Supplement, p. S71–S74, 2010.
- ZANI, C. F. et al. Vinasse application and cessation of burning in sugarcane management can have positive impact on soil carbon stocks. **PeerJ**, v. 6, n. May, p. e5398, ago. 2018.

## 5. ARTIGO II: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Chlorella* SP. BR054 E *Scenedesmus bajacalifornicus* BR024 EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR E ÁGUA RESIDUÁRIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL.

**Resumo:** A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar gera uma extensa quantidade de resíduos. O principal subproduto gerado é a vinhaça, obtida após a destilação do etanol, e geralmente é produzida em uma proporção de 13 L por 1 L de etanol. A vinhaça é um resíduo líquido, turbido, fétido, corrosivo, que apresenta elevada DBO e DQO, baixo pH e altos níveis de nutrientes, dentre eles nitrato e potássio. A presença de altos níveis de nutrientes torna a vinhaça como uma fonte econômica e adequada para o cultivo de microalgas, no entanto, o uso da vinhaça como meio de cultura para microalgas apresenta alguns desafios, como presença de compostos fenólicos, elevada turbidez e carga de material orgânico, o que pode favorecer a proliferação de bactérias e leveduras. A proliferação desses microrganismos pode o crescimento das microalgas. Para minimizar esses problemas, é necessário realizar o pré-tratamento da vinhaça. Destaca-se como um potencial pré-tratamento devido a sua capacidade de reduzir compostos fenólicos e contaminantes microbianos. Neste estudo foram avaliadas *S.bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 em vinhaça de cana-de-açúcar (VCA), em vinhaça de cana-de-açúcar ozonizada (VCA-O<sub>3</sub>), água residuária de produção de etanol (ARE), e água residuária de produção de etanol ozonizada (ARE-O<sub>3</sub>). Os maiores valores de biomassa, carboidratos e proteínas foram obtidos quando *S.bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 foram cultivadas em VCA e VCA-O<sub>3</sub>. Além disso, o cultivo com as microalgas permitiu uma significativa diminuição da carga poluidora de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, ARE-O<sub>3</sub>.

**Palavras chaves:** ozonização, *S. bajacalifornicus*, *Chlorella* sp, biodegradabilidade

**Abstract:** the production of ethanol from sugarcane generates an extensive amount of waste. The main byproduct generated is vinasse obtained after distillation of ethanol, and is generally produced in a ratio of 13 L per 1 L of ethanol. Vinasse is a liquid, turbid, fetid, corrosive residue that presents high chemical and biological oxygen demand, low pH and high levels of nutrients, such as nitrate and potassium. The presence of high nutrient levels suggest vinasse an economical and adequate source for the cultivation of microalgae. However, the use of vinasse as a culture medium for microalgae presents some challenges, such as presence of phenolic compounds, high turbidity, high load of organic material, which favors the proliferation of bacteria and yeast. These microorganisms may affect growth of microalgae. To minimize these problems, it is necessary to preteat the vinasses. Ozonization is a potencial pretreatment to reduce the level of phenolic compounds and microbial contaminants. In this study, *S. bajacalifornicus* BR024 and *Chlorella* sp. BR054 in sugarcane vinasse (VCA), ozonized sugar cane vinasse (VCA-O<sub>3</sub>), ethanol wastewater (ARE), ozonated ethanol production wastewater (ARE-O<sub>3</sub>).The highest biomass, carbohydrate and protein levels were obtained when the tested microalgae *S. bajacalifornicus* BR024 and *Chlorella* sp. BR054 were cultured in VCA and VCA-O<sub>3</sub>. In addition, the cultivation of microalgae allowed a significant decrease in the pollutant load of VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, ARE-O<sub>3</sub>. The ozonation of VCA and ARE improved the conditions for microalgae growth

**Keywords:** Ozonation, *S. bajacalifornicus*, *Chlorella* sp, biodegradability

## 5.1 Introdução

Estima-se que a população mundial chegue a 11,2 bilhões de habitantes até 2100 (UNITED-NATIONS, 2019). O desenvolvimento de tecnologias limpas, eficientes e de alto rendimento é essencial para que o crescimento populacional impacte o mínimo possível o meio ambiente. Além disso, preocupações crescentes com mudanças climáticas e a dependência excessiva em combustíveis fósseis têm direcionado investimentos e o interesse público para biocombustíveis mais sustentáveis e renováveis. Portanto, o amadurecimento e desenvolvimento de novas tecnologias para produção e processamento de novas fontes de biomassa serão necessárias para conciliar crescimento econômico e a sustentabilidade ambiental a longo prazo (TAN *et al.*, 2018).

As microalgas destacam-se por apresentarem alta produtividade de biomassa em relação a outras matrizes oleaginosas (soja, polpa dendê, semente de girassol, caroço de algodão, semente de canola entre outros) utilizadas para a produção de biodiesel (RAVINDRAN *et al.*, 2016). Entretanto, para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas é necessário reduzir os custos de cultivo e produção, tornando assim as microalgas comercialmente viáveis.

A viabilidade comercial pode ser obtida pela integração da unidade de produção de microalgas com outras unidades agroindustriais já estabelecidas. Apenas recentemente a produção de microalgas foi pensada como um conceito integrado, seja recuperando vários compostos da biomassa de microalgas ou empregando matérias-primas fornecidas por unidades industriais adjacentes. Além disso, a utilização de efluentes industriais no cultivo de microalgas é uma opção interessante para prover soluções para questões econômicas e ambientais (POSADAS *et al.*, 2017).

Dentre os resíduos agroindustriais produzidos no Brasil, a vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol destacam-se em função do grande volume gerado. Estima-se que 360 bilhões de litros de VCA foram produzidos no Brasil em 2015 (ROMANHOLO FERREIRA *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2016). O destino comum deste resíduo é a aplicação no solo como fertilizante. A VCA apresenta coloração escura-acastanhada devido à altas concentrações de melanoidinas e compostos fenólicos (*e.g.* ácido tânico e ácido húmico). As melanoidinas são produzidas pela reação de Maillard que ocorre quando monossacarídeos reagem com o grupo amino de proteínas em elevadas temperaturas durante a etapa de destilação da VCA (ESPAÑA-GAMBOA *et al.*,

2011). Os compostos fenólicos e as melanoidinas são compostos que podem afetar o crescimento de microrganismos (MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009)

A VCA e ARE apresentam altas concentrações de macronutrientes que podem ser utilizados pelas microalgas. Entretanto, a VCA apresenta características menos favoráveis aos cultivos de microalgas, e que restringem o crescimento de diversas microalgas conforme demonstrado no capítulo 1 deste presente estudo. O uso da VCA como meio de cultura para microalgas apresenta alguns desafios. Além da presença de compostos fenólicos e melanoidinas, a VCA apresenta elevada carga de material orgânico que pode possibilitar a proliferação de bactérias e leveduras. Para atenuar tais problemas, faz-se necessário o pré-tratamento da VCA e ARE de forma a favorecer o crescimento de microalgas. Dentre os pré-tratamentos reportados na literatura destacam-se a clarificação química, ozonização e a biodigestão (anaeróbia ou aeróbica) (FUENTES *et al.*, 2016; CABRERA-DÍAZ *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2017).

Dentre os pré-tratamentos da vinhaça, a ozonização é particularmente atrativa, pois esta técnica permite que compostos complexos e recalcitrantes sejam convertidos em moléculas menores e biodegradáveis, melhorando assim a taxa de biodegradabilidade. O ozônio é solúvel em água e se decompõe rapidamente para formar vários radicais livres que reagem com qualquer composto orgânico, tais como os compostos fenólicos que são abundantes na VCA e ARE (SILES *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2018).

Neste capítulo foi avaliado o uso combinado da ozonização com o cultivo de microalgas em VCA e ARE visando a produção de biomassa e macromoléculas potenciais para a produção de biocombustíveis, assim como a redução do potencial poluidor dos efluentes oriundos de biorrefinarias de bioetanol. As microalgas *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram selecionadas porque apresentaram maior taxa de crescimento, conforme reportado no capítulo 1 do presente estudo.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Caracterização da vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol**

A VCA e a ARE foram fornecidas pela companhia Bambuí Bioenergia (Minas Gerais, Brasil) e armazenadas a -20 °C. A VCA e a ARE foram descongeladas, centrifugadas a 7.000 g por 15 minutos e filtradas em papel filtro para filtração lenta (JP42 faixa azul, J Prolab, São Paulo, Brasil) para remoção dos sólidos suspensos e obtenção da

fração líquida. Parte das frações líquidas de VCA e ARE foi ozonizada e armazenada a 4 °C até sua utilização. Amostras filtradas de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub>) foram verificadas quanto a presença de leveduras, viabilidade de crescimento de leveduras, compostos fenólicos, amônio, nitrato, fosfato, DBO<sub>5</sub>, DQO, perfil espectrofotométrico, proteínas totais, e carboidratos neutros totais. A turbidez das vinhascas foi determinada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 750 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha).

### 5.2.2 Ozonização da vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol

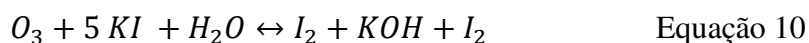
Amostras de VCA e ARE foram submetidas a tratamento com ozônio utilizando uma vazão de 1 L min<sup>-1</sup>, e concentração de 2,4 mg L<sup>-1</sup> por 500 minutos. O ozônio foi produzido em um gerador de ozônio portátil (O&L 1.5-Portátil, Ozone &Life, Brasil) (Figura 8).



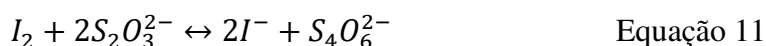
**Figura 7.** Gerador de ozônio utilizado para o tratamento da VCA e ARE.

### 5.2.3 Cinética de reação de ozônio em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol

A taxa de decomposição de ozônio foi determinada pela injeção de ozônio na concentração de 2,4 mg L<sup>-1</sup>. O tempo de saturação de injeção de ozônio em VCA e ARE foi determinado pelo método iodométrico de titulação indireta. O método iodométrico foi realizado conforme a International Ozone Association, sendo descrito por Clescerl *et al.* (2000). O método iodométrico de titulação indireta consiste no borbulhamento de ozônio em uma solução a 1% (m/v) de KI. Durante o processo de oxidação do KI pelo ozônio ocorre a liberação de iodo conforme descrito na equação 10.



Para garantir o deslocamento da reação para a produção do iodo, os meios foram acidificados pela adição de 2 ml de solução 0,5 mol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e logo em seguida foi realizada a titulação com solução 0,01 M de tiosulfato de sódio. A titulação foi interrompida quando ocorreu a mudança de coloração de amarelo para incolor (Equação 11).



Posteriormente, foi adicionado 1 ml da solução indicadora a 1% (m/v) de amido. A titulação foi retomada até a mudança de coloração de azul índigo para incolor. Devido à instabilidade do ozônio, a quantificação do foi realizada imediatamente após o borbulhamento de ozônio. A determinação da massa de ozônio em mg foi determinada conforme a equação 12, e foi descrita por SANTOS, (2008).

$$M_{O_3} = \frac{N f V W}{2} \text{Equação 12}$$

em que:

$M_{O_3}$  = massa de O<sub>3</sub> (mg);

N = molaridade do tiosulfato de sódio (M);

f = fator de correção do tiosulfato de sódio ;

V = volume gasto do tiosulfato de sódio (mL); e,

W = massa molar de O<sub>3</sub> (g mol<sup>-1</sup>).

#### **5.2.4 Cinética de decomposição do ozônio em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol**

A cinética de decomposição de ozônio foi determinada para VCA e ARE. Foram vertidos 600 mL de amostra em frasco tipo reagente de 1 L, e as amostras foram submetidas ao fluxo de gás ozônio na concentração de 2,4 mg de O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> e vazão de 1 L min<sup>-1</sup>.

Alíquotas de 1 mL de VCA e ARE foram coletadas a cada 20 minutos para quantificação do ozônio residual. O tempo de saturação da VCA e ARE foi obtido quando a concentração de ozônio residual se manteve constante, o que indica que todos os compostos passíveis de reagir com o ozônio foram convertidos a outros compostos, inertes ao ozônio e suas formas radicalares. Os dados da concentração residual de oxigênio em função do tempo de ozonização foram ajustados ao modelo de cinética de primeira ordem.

### **5.2.5 Contagem e viabilidade de leveduras em vinhaça de cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol**

Amostras de VCA e ARE foram diluídas 50 vezes em água deionizada, e as concentrações de células de levedura foram obtidas a partir da contagem de células em câmara de Neubauer utilizando microscópio de luz configurado com a objetiva de 40 vezes de magnificação.

Amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> foram espalhadas em placas de Petri para avaliar a efetividade da ozonização quanto a redução da carga microbiana. Foram pipetados 100 µL de amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> ou 1 mL de amostras de VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> em placas de Petri contendo meio de cultura YEPD sólido (10 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g L<sup>-1</sup> de peptona bacteriológica, 20 g L<sup>-1</sup> de D-glicose, e 20 g L<sup>-1</sup> de ágar), as amostras foram estriadas com auxílio de alça de Drigalski. As placas foram então incubadas a 28 °C por 72 h, e após esse período as placas foram examinadas visualmente quanto ao crescimento microbiano. Amostras das colônias foram coletadas, diluídas em água deionizada estéril e observadas em microscopia de luz com objetivas de 40 e 100 vezes de magnificação.

### **5.2.6 Determinação de compostos fenólicos da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.**

Compostos fenólicos em amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> foram determinados por espectrofotometria conforme o método proposto por Escarpa e González (2001). Amostras de 10 µL foram adicionadas de 10 µL de reagente Folin Ciocalteu e 200 µL de solução 1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A reação foi mantida na ausência de luz em temperatura ambiente por 1 h. A absorbância do produto da reação colorimétrica foi quantificada no comprimento de onda de 750 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Uma curva-padrão compreendendo concentrações de ácido gálico entre 20 e 500 µg mL<sup>-1</sup> ( $R^2 = 0,9944$ ) foi utilizada para estimar a concentração de compostos fenólicos.

### **5.2.7 Determinação de amônio da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.**

As concentrações de amônio nas amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> foram determinadas conforme metodologia descrita por Strickland e Parsons (1972), modificada para uso em microplacas de 96 poços. A absorbância do extrato foi lida em 640 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). O sulfato de amônio foi utilizado para construção de curva padrão de 0 a 3 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9744)

#### **5.2.8 Determinação de nitrato da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.**

Para determinação da concentração de nitrato foi utilizado o método APHA-4500-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, adaptado por Oliveira (2007), em que se utiliza a segunda derivada. As amostras foram pipetadas em microplacas de quartzo e lidas nos comprimentos de onda 210, 220 e 230 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Leituras com água deionizada foram utilizadas como branco. KNO<sub>3</sub> foi utilizado para construção da curva padrão de 0 a 4 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio na forma de nitrato (R<sup>2</sup> = 0,9647).

#### **5.2.9 Determinação de fosfato da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.**

A quantificação do fosfato nas amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> foi realizada segundo a metodologia descrita por (Murphy;Riley, 1962). A absorbância do sobrenadante foi medida utilizando o comprimento de onda 882 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Utilizou-se fosfato de potássio dibásico anidro para a construção da curva padrão de 0 a 0,5 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0,9796)

#### **5.2.10 Determinação do perfil espectrofotométrico da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.**

O perfil espectrofotométrico de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> foi determinado em microplaca de quartzo de 96 poços. O perfil espectrofotômetro foi realizado entre 220 a 750 nm com intervalo de medição de 1nm realizado em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Esse ensaio permite avaliar a degradação de pigmentos e redução de turbidez das amostras.

#### **5.2.11 Determinação da DBO<sub>5</sub>**

A determinação da DBO<sub>5</sub> foi realizada conforme descrito no item 4.2.3

### **5.2.12 Determinação da DQO**

A determinação da DQO5 foi realizada conforme descrito no item 4.2.4

### **5.2.13 Linhagens de microalgas**

As microalgas *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram utilizadas no presente capítulo. As linhagens de microalgas foram obtidas da Coleção Microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (MG). As microalgas foram mantidas em incubadora para BOD (LS-550FT-2, Logen Scientific, Brasil) à 22 °C e fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro) no meio de cultura BG11 com pH 7 (ANDERSEN, 2005).

### **5.2.14 Produção de inoculo**

Aclimatou-se as microalgas antes dos cultivos utilizando VCA e ARE in natura e ozonizadas. As microalgas foram aclimatadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultura BG11. Os frascos foram tampados com gaze e algodão para proporcionar a troca gasosa como o ambiente externo e impedir a contaminação microbiana. Cultivou-se as microalgas por 5 dias em meio de cultura BG11 contendo 0,782 g L<sup>-1</sup> de acetato de sódio como fonte de carbono. O pH do meio de cultura foi ajustado para 7. Os frascos contendo o meio de cultura foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As condições de crescimento foram: fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro), 22 ± 2 °C e irradiância na altura da bancada de 184 μmols fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proveniente de quatro lâmpadas fluorescentes de luz diurna de 14 watts.

### **5.2.15 Sistema de cultivo**

Os cultivos das microalgas *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml com volume útil de 140 mL. As microalgas foram cultivadas em VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> em pH 7. O meio de cultura BG11 foi utilizado como controle (ANDERSEN, 2005).

Os cultivos foram mantidos sob agitação constante em incubadora com fotoperíodo e agitação orbital (430-RFPDE, Nova Ética, Brasil). As condições de crescimento foram: agitação de 120 rpm, 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12:12 horas (luz:escuro), e irradiância média de 184 μmols fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes de 14 W. Os valores pH dos cultivos foram mantidos entre 7±0,5, utilizando

soluções 2 M de HCl e NaOH. Os cultivos foram mantidos por 12 dias. Amostras foram coletadas diariamente para determinação da densidade óptica dos cultivos. Ao final do cultivo amostras foram coletadas para determinação de pigmentos fotossintetizantes, proteínas totais, carboidratos neutros totais, e lipídeos totais.

#### **5.2.16 Monitoramento densidade óptica dos cultivos**

Medidas de densidade óptica dos cultivos foram realizadas diariamente utilizando os comprimentos de onda de 680 e 750 nm. As leituras das absorbâncias dos cultivos foram subtraídas pela turbidez dos respectivos meios de cultura: BG-11 (controle com acetato), VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub>.

#### **5.2.17 Determinação de massa seca**

Volumes conhecidos dos cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> foram centrifugados a 7.000 rpm por 10 minutos a 25 °C em tubos de centrífuga de 50 mL com massa conhecida. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi lavada com o mesmo volume de água deionizada para a remoção de sais, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez (Zhu & Lee, 1999). Os tubos contendo a biomassa úmida foram secos em estufa à 65 °C até peso constante. As amostras foram armazenadas a -20 °C para determinação de lipídeos totais.

#### **5.2.18 Extração de pigmentos fotossintetizantes**

Amostras dos cultivos de *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> foram submetidas a extração com etanol (FERNIE *et al.*, 2001). De acordo com o protocolo utilizado, 2 mL de amostra foi centrifugados a 11.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Pipetou-se 250 µL de solução a 98% (v/v) de etanol nos microtubos de 2 mL, e as amostras foram incubadas a 80 °C por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi vertido em um novo tubo e mantido a -20 °C. A extração foi realizada mais duas vezes para a completa extração dos pigmentos fotossintetizantes. A segunda extração foi realizada com 150 uL de solução a 80% (v/v) de etanol, e a terceira extração com 250 uL de solução a 50% (v/v) de etanol. Os extratos das 3 etapas de extração foram combinados para a determinação de pigmentos fotossintetizantes. A biomassa sem os pigmentos fotossintetizantes foi armazenada a -20 °C para determinação de proteínas totais.

### 5.2.19 Determinação de clorofilas *a* e *b*

As absorvâncias dos extratos em etanol dos cultivos de *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram obtidas em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha) nos comprimentos de onda de 630, 647, 664 e 691 nm. As equações propostas por Ritchie (2008) foram utilizadas para determinação das clorofilas *a* e *b* (Equações 13 e 14).

$$\text{Clorofila } a = 0,0604 \times DO_{630} - 4,5224 \times DO_{647} + 13,2969 \times DO_{664} - 1,7453 \times DO_{691} \quad \text{Equação 13}$$

$$\text{Clorofila } b = -4,1982 \times DO_{630} + 25,7205 \times DO_{647} - 7,4096 \times DO_{664} - 2,7418 \times DO_{691} \quad \text{Equação 14}$$

Em que:

DO<sub>630</sub> = absorvância a 630 nm;

DO<sub>647</sub> = absorvância a 647 nm;

DO<sub>664</sub> = absorvância a 664 nm; e,

DO<sub>691</sub> = absorvância a 691 nm.

### 5.2.20 Determinação de proteínas totais

A biomassa sem pigmentos fotossintetizantes dos cultivos de *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> foi submetida a extração de proteínas totais utilizando 400 µL de solução 0,1 M de NaOH. A extração de proteínas totais foi realizada a 95 °C por 1 hora, em seguida as amostras foram mantidas a -20 °C por 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> também foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos a 4 °C para determinação de proteínas totais.

Os sobrenadantes foram utilizados para a determinação de proteínas totais conforme metodologia proposta por Bradford, (1976). A reação colorimétrica foi realizada pipetando-se 5 µL de sobrenadante e 250 µL de reagente de Bradford. Após 5 minutos foi realizada a leitura da absorvância em 595 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Uma curva-padrão compreendendo concentrações de albumina do soro bovino entre 16 e 480 µg mL<sup>-1</sup> foi utilizada para estimar a concentração de proteínas totais ( $R^2 = 0,9962$ )

### 5.2.21 Determinação de carboidratos neutros totais

Centrifugou-se 2 mL dos cultivos de *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os carboidratos neutros totais foram extraídos pipetando-se 1 mL de solução 1 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As amostras foram então mantidas a 80 °C por 30

minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi diluído 10 vezes em água deionizada. Amostras de VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> também foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C para determinação de carboidratos neutros totais. Os sobrenadantes de VCA e VCA-O<sub>3</sub> foram diluídos 20 vezes em água deionizada, e os sobrenadantes de ARE e ARE-O<sub>3</sub> foram diluídos 10 vezes em água deionizada.

Os sobrenadantes foram utilizados para a determinação de carboidratos neutros totais conforme metodologia proposta por Masuko (2005), e se baseia no método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois (1956). A reação colorimétrica foi realizada pipetando-se 100 µL de sobrenadante diluído, 60 µL de solução a 5% (m v<sup>-1</sup>) de fenol e 300 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em 490 nm em leitora de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific, Alemanha). Uma curva-padrão compreendendo concentrações de D-glicose entre 8 e 240 µg mL<sup>-1</sup> foi utilizada para estimar a concentração de carboidratos neutros totais.

#### **5.2.22 Determinação de lipídeos totais**

A determinação de lipídeos foi realizada segunda a metodologia de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1986), modificado pelo grupo de pesquisa em microalgas do Laboratório de Biocombustíveis do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (Minas Gerais).

#### **5.2.23 Análises estatísticas**

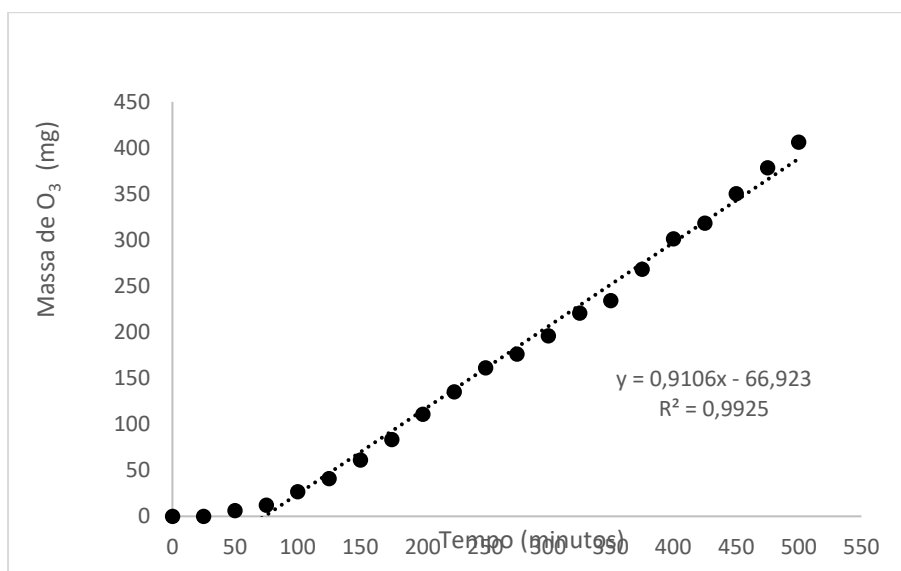
O experimento de cultivo foi montado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento. Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância. A análise de variância e o teste de Tukey foram realizados no programa GraphPad Prism (versão 6.01, GraphPad Software). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o software SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

### **5.3 Resultados**

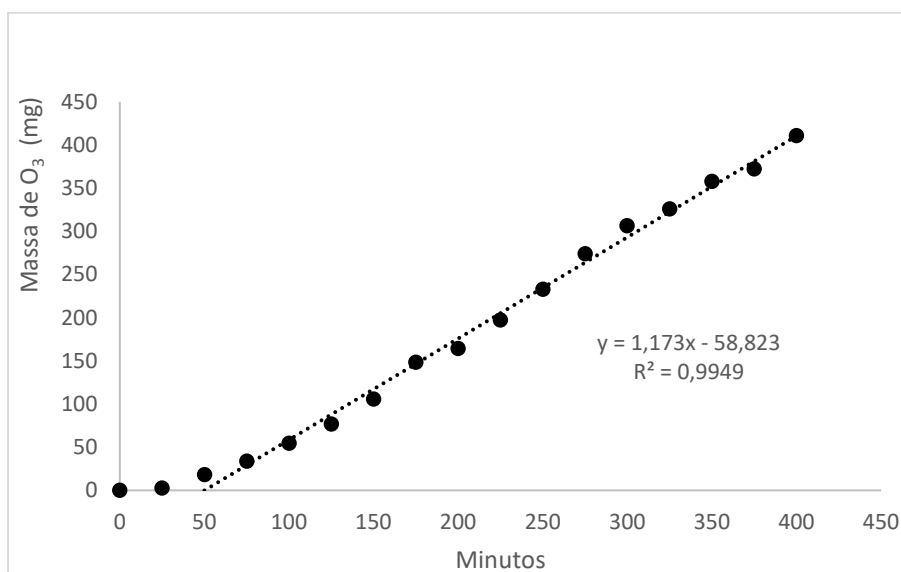
#### **5.3.1 Cinética de ozonização da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.**

A variação na inclinação das curvas de concentração de ozônio, capturada na solução de iodeto de potássio, indicou o momento no qual o gás ozônio não mais reage

com a VCA e ARE (Figuras 8 e 9), indicando assim o tempo necessário para a completa ozonização (reação com ozônio) destes efluentes. A completa ozonização de VCA ocorreu em 100 minutos (Figura 8), e um menor tempo de ozonização (75 minutos) foi necessário para a reação com a ARE (Figura 9).



**Figura 8.** Massa de ozônio na solução de iodeto durante a ozonização da VCA.



**Figura 9.** Massa de ozônio na solução de iodeto durante a ozonização da ARE.

### 5.3.2 Composição da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol, vinhaça cana-de-açúcar ozonizada e água residuária de produção de etanol ozonizada.

Primeiramente foram avaliadas modificações na VCA e ARE após o pré-tratamento de ozonização. O pré-tratamento com ozônio reduziu consideravelmente

quase todos os parâmetros avaliados no presente estudo (Tabela 4). A acidez dos efluentes ozonizados aumentou em quase 100 vezes, sendo observada uma redução de quase duas unidades de pH dos efluentes após a ozonização. Adicionalmente, observou-se a redução da DBO<sub>5</sub> da VCA e ARE em 29,8 e 7,2%, respectivamente, acompanhada de reduções também expressivas na DQO de 26,4 e 21,7% para VCA e ARE, respectivamente.

O pré-tratamento por oxidação reduziu a concentração de amônio. O amônio presente na ARE-O<sub>3</sub> foi reduzido pela metade em comparação com a ARE, ao passo que a concentração deste macronutriente foi menos afetada em VCA-O<sub>3</sub> em relação a VCA. Por outro lado a concentração de fosfato aumentou em 51,85 e 663,33 % para a VCA e ARE, respectivamente (Tabela 4). Uma significativa redução dos compostos fenólicos de 82,2 e 89,4% em VCA e ARE também foi observada, assim como a concentração de carboidratos neutros totais foi 32,97 e 11% menor em VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> em relação a VCA e ARE, respectivamente.

**Tabela 4** Composição da VCA e ARE antes e depois de serem submetidas ao pré-tratamento de ozonização (VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub>).

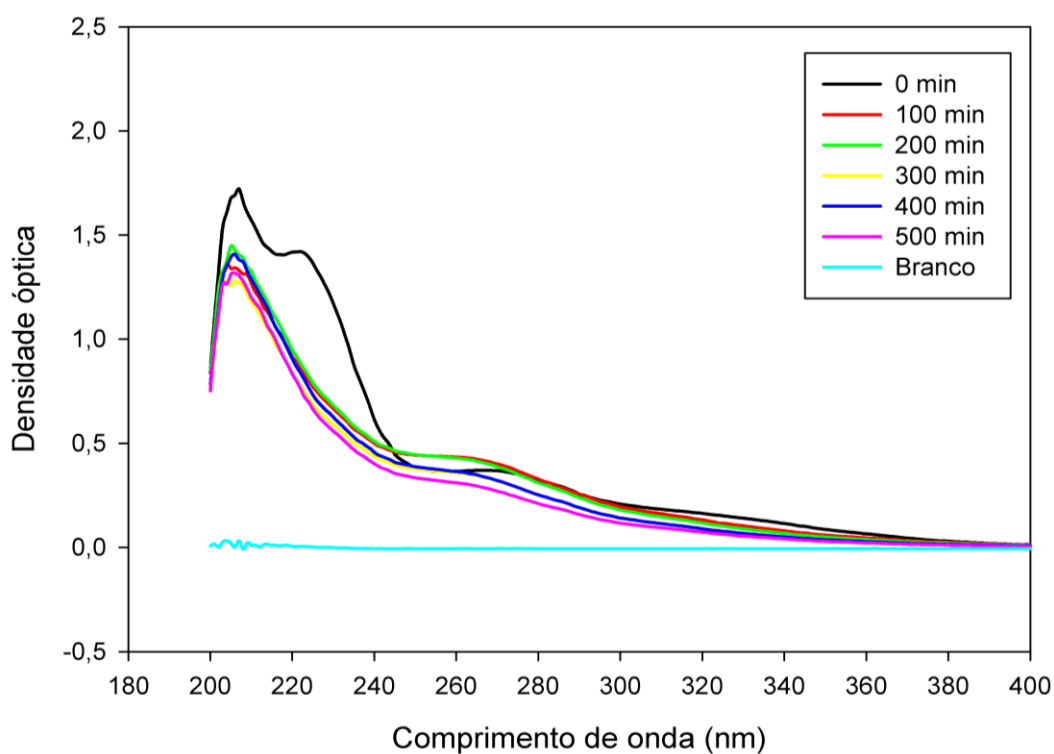
Parâmetro	Unidade	VCA	VCA-O <sub>3</sub>	ARE	ARE-O <sub>3</sub>
pH	-	4,47	2,71	4,27	2,85
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	12.517,3±222,3	11.545,5±59,3	8.792,8±53,3	8.492±171,1
DQO	mg L <sup>-1</sup>	12.804,3±262,4	10.763,1±524,8	11.876,5±0	8.424,9±367,4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	34,5±1,3	24,2±1,9	32,1±0,9	19,9±1,63
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	136,2±1,6	247,71±1,5	130,9±0,1	223,97±2,0
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	8,1±1,0	12,3±0,6	0,3±0,0	2,2±0,1
Composto fenólicos	mg L <sup>-1</sup>	266,7±10,3	47,6±2,43	180,7±8,5	19,1±0,9
Carboidratos neutros totais	mg L <sup>-1</sup>	395,4±37,9	265,0±43,6	117,7±19,7	104,9±17,4

### 5.3.3 Perfil espectrofotométrico de da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol durante o pré-tratamento com gás ozônio

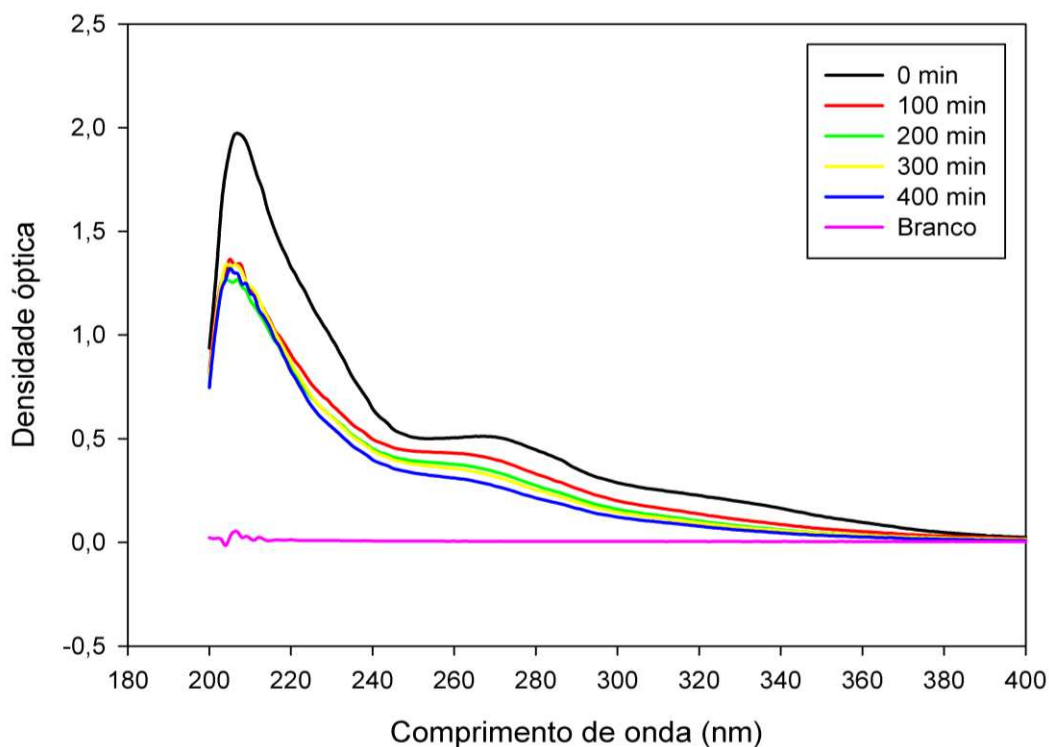
O perfil espectrofotométrico apresentado na Figura 10 para a VCA mostra dois picos de absorção acentuados entre os comprimentos de onda de 200 e 220 nm, e 220 e

240 nm. Após 100 minutos de pré-tratamento com ozônio ocorreu uma pequena redução da absorbância entre os comprimentos de onda de 200 e 220 nm, e uma redução bastante expressiva entre os comprimentos de onda entre 220 e 240 nm. Não foram observadas alterações expressivas nos perfis espectrofotométricos de VCA submetida a diferentes tempos de ozonização, indicando que os compostos que absorvem nesses comprimentos de onda de fato reagiram rapidamente com ozônio.

Diferentemente, o perfil espectrofotométrico de ARE apresentou um pico de absorção acentuado entre os comprimentos de onda de 200 e 220 nm, e um pico de absorção menos acentuado entre os comprimentos de onda de 260 e 290 nm (Figura 11). Observa-se uma significativa redução do pico de absorção entre os comprimentos de onda de 200 e 220 nm após 100 minutos de ozonização da ARE (Figura 11). O pico de absorção entre os comprimentos de onda de 260 e 290 nm também foi reduzido após o pré-tratamento com ozônio (Figura 11).



**Figura 10.** Perfil espectrofotométrico de VCA durante a ozonização.

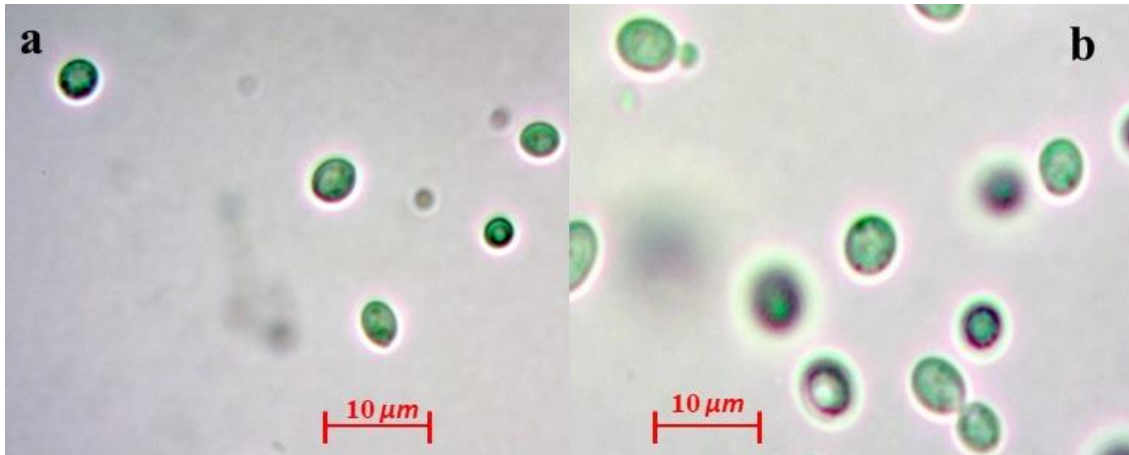


**Figura 11.** Perfil espectrofotométrico de ARE durante a ozonização

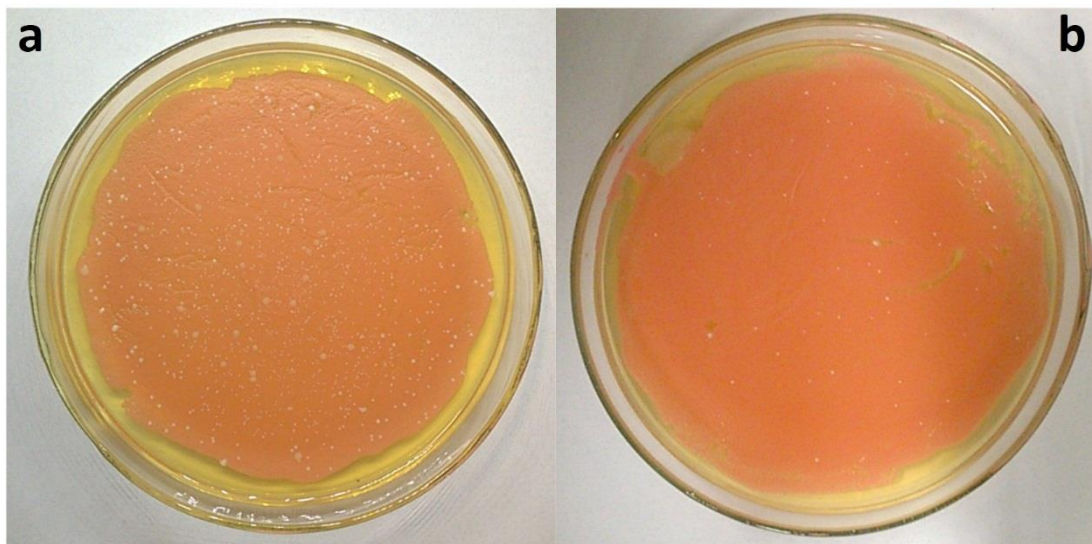
#### **5.3.4 Contagem e viabilidade de leveduras em vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol.**

VCA e ARE apresentaram elevadas concentrações de leveduras,  $3,9 \times 10^7$  e  $2,9 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. A análise morfológica das leveduras presentes em VCA e ARE em microscopia de luz demonstrou células com morfologia simples, com formato elipsoide e presença de brotos (Figuras 12).

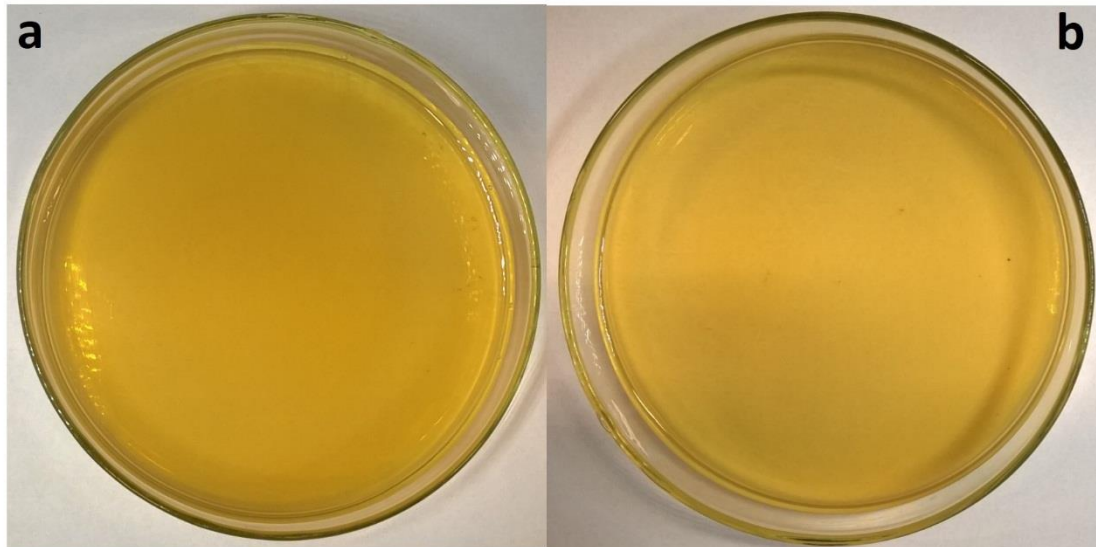
A viabilidade das leveduras foi observada após o plaqueamento de 100  $\mu\text{L}$  de amostras de VCA e ARE em meio de cultura sólido YEPD (Figura 13). Não foi observado o crescimento de colônias quando se plaqueou 100  $\mu\text{L}$  de amostras de VCA- $\text{O}_3$  e ARE- $\text{O}_3$  em meio de cultura sólido YEPD (Figura 14). Ao aumentar o volume do inóculo de 100  $\mu\text{L}$  para 1 mL de VCA- $\text{O}_3$  foi observada a formação de uma única unidade formadora de colônia em duas das três repetições (Figura 15). Não foram observadas unidades formadoras de colônia nas placas inoculadas com 1 mL de ARE- $\text{O}_3$  (Figura 15).



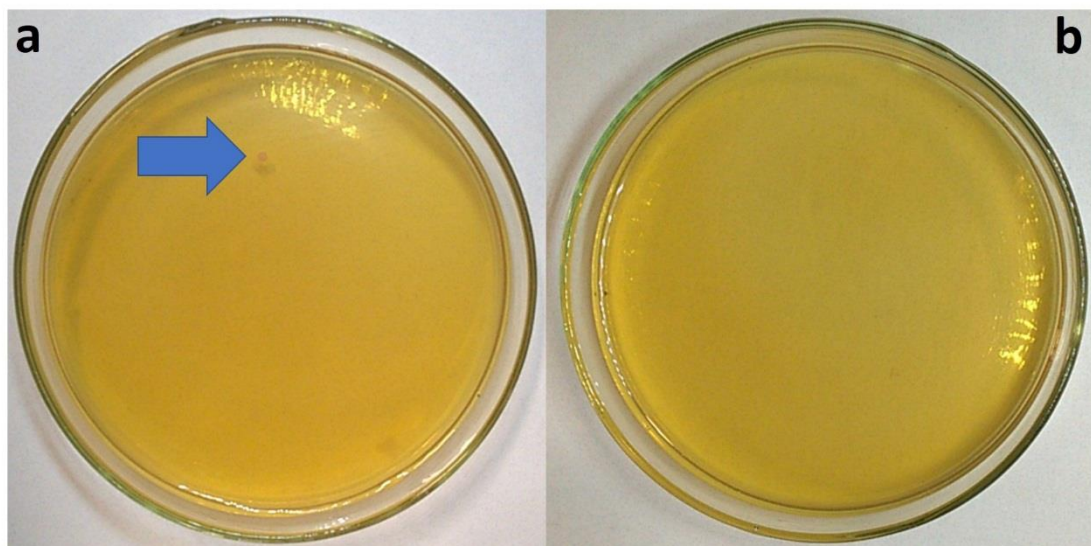
**Figura 12.** Micrografia das leveduras presentes em amostras de VCA utilizando microscopia em campo claro (a) VCA (b) ARE



**Figura 13.** Placas de Petri contendo meio de cultura YEPD sólido inoculado com 100 μL de (a) VCA e (b) ARE após dias 3 cultivo.



**Figura 14.** Fotografia de placas de Petri contendo YEPD sólido inoculadas com 100  $\mu$ L de (a) VCA-O<sub>3</sub> e (b) ARE-O<sub>3</sub>, após 3 dias de cultivo

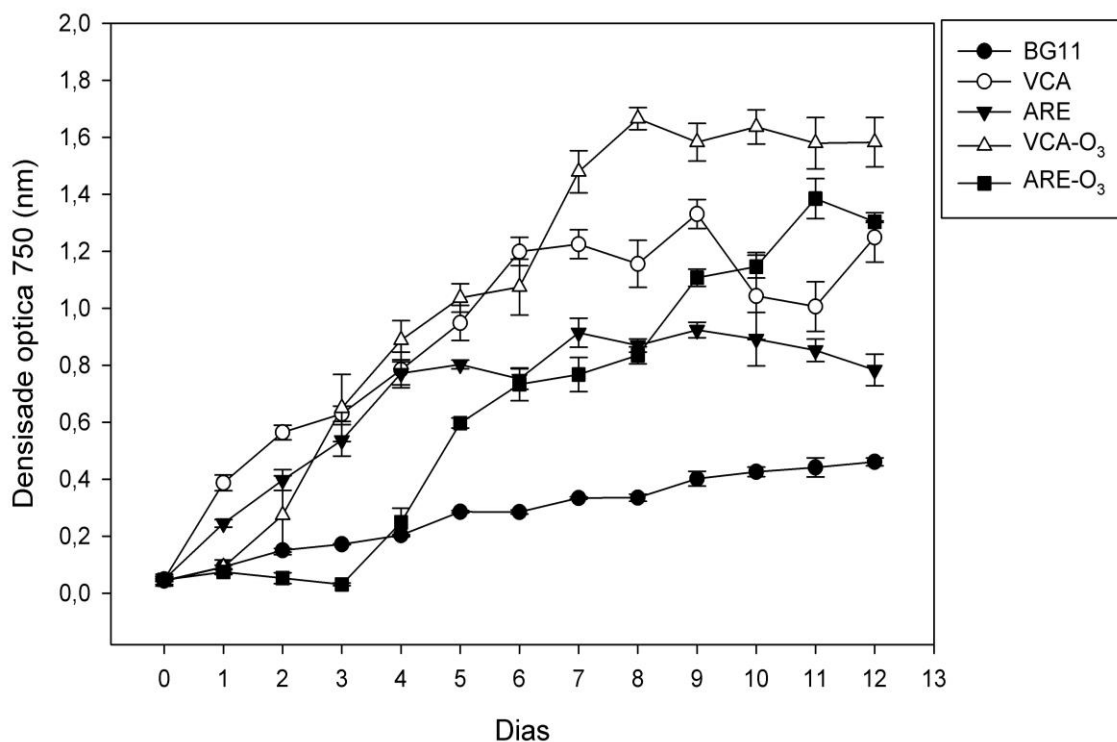


**Figura 15.** Fotografia de placas de Petri contendo YEPD sólido inoculadas com 1 mL de (a) VCA-O<sub>3</sub> e (b) ARE-O<sub>3</sub>, após 3 dias de cultivo. A seta azul indica a unidade formadora de colônia.

### **5.3.5. Cultivo de *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 em da vinhaça cana-de-açúcar e água residuária de produção de etanol com e sem pré-tratamento**

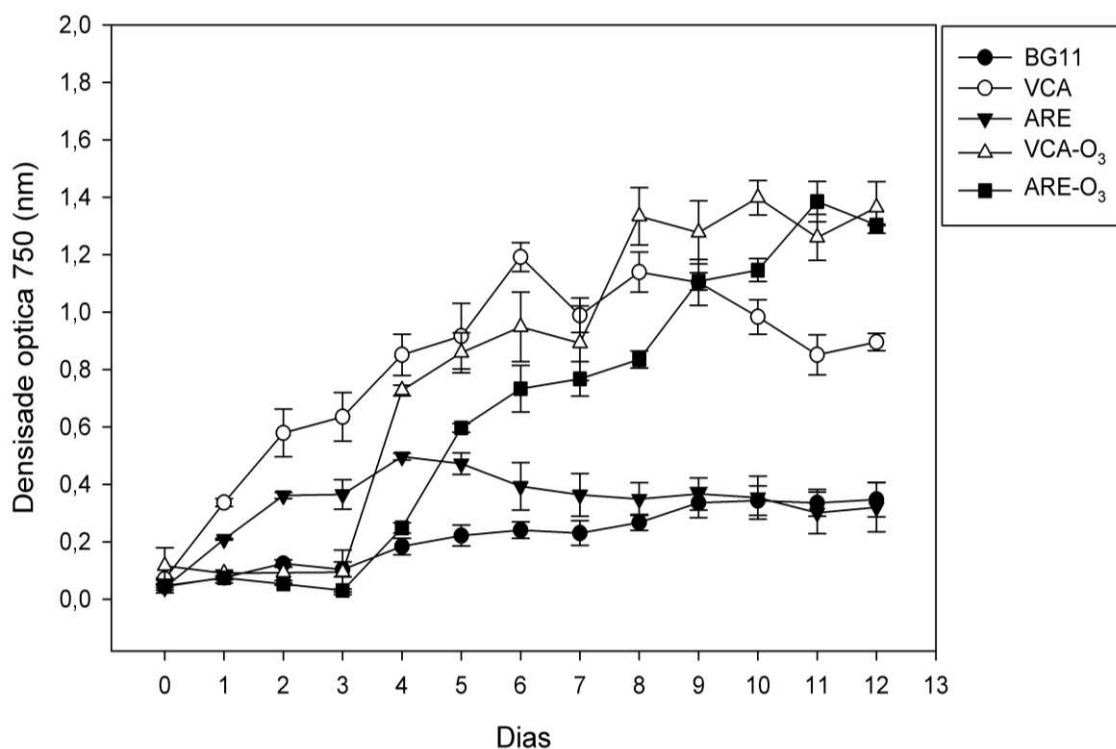
A Figura 16 apresenta a curva de crescimento dos cultivos utilizando BR024, no qual pode-se verificar que o cultivo em BG11 apresentou os menores crescimento, ao passo que em VCA-O<sub>3</sub> apresentou crescimento mais pronunciado. Além disso, observou-se que nos meios de cultivo VCA, ARE e VCA-O<sub>3</sub> não apresentaram a fase lag (adaptação), em contraste como a ARE-O<sub>3</sub>. Ademais, pode-se observar que fase

exponencial de crescimento ocorreu entre o primeiro e o sexto dia, sendo precedida da fase linear e estacionária.



**Figura 16.** Curva de crescimento *S. bajacalifornicus* BR024 em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub>.

A Figura 17 apresenta a curva de crescimento da *Chlorella* sp BR054. Se observa claramente que as menores taxas de crescimento e a presença de fase lag são verificadas nos cultivos em BG11 e ARE. Além disso, a maior taxa de crescimento foi observada no cultivo em VCA-O<sub>3</sub>, seguido pelo cultivo em ARE-O<sub>3</sub>. Interessantemente, o cultivo em ARE-O<sub>3</sub> também apresentou fase lag entre o primeiro e o terceiro dia, seguido de um crescimento exponencial, assim como verificado nos cultivos *S. bajacalifornicus* BR054 (Figura 16).



**Figura 17.** Curva de crescimento de *Chlorella sp* BR054 em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub>.

A composição das vinhaças após o cultivo das microalgas é aprestando na Tabelas 5 e 6 para *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella sp.* BR054, respectivamente, onde pode-se verificar a redução dos parâmetros de qualidade de efluentes medidos. É possível observar que o cultivo de microalgas promoveu uma redução da DBO<sub>5</sub> e DQO em 50 %, acompanhada de uma elevada redução nas concentrações de fosfato, amônio e ainda mais acentuada em relação ao nitrato.

**Tabela 5** Composição da VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> após o cultivo de *S. bajacalifornicus* BR024.

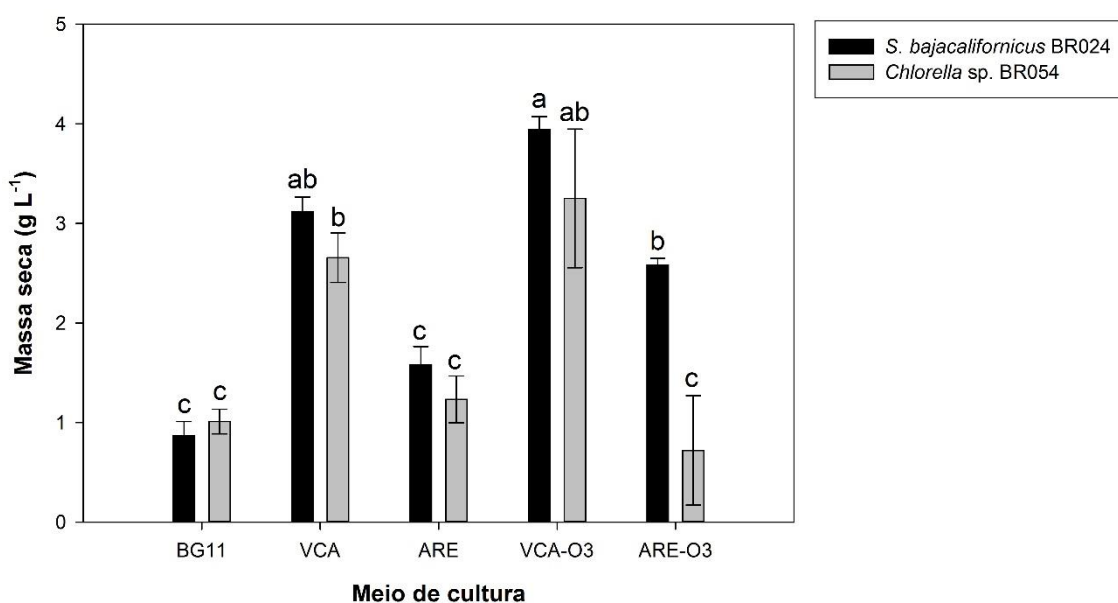
Parâmetro	Unidade	VCA	ARE	VCA-O <sub>3</sub>	ARE-O <sub>3</sub>
pH	-	7	7	7	7
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	4.848,3±520,9	4.534,88±569,2	4.692,86±1209,9	4.644,47±77,5
DQO	mg L <sup>-1</sup>	5.460,5±78,9	5.222,1±110,1	5.763,7±252,9	5.692,6±101,5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	0	0	21,00±1,30	0,96±0,25
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	27,49±2,2	26,93±5,32	82,66±26,7	84,22±0,7
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	2,4±0,36	2,1±0,01	2,0±0,05	2,0±0,03

**Tabela 6** Composição da VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub> e ARE-O<sub>3</sub> após o cultivo de *Chlorella* sp. BR054

Parâmetro	Unidade	VCA	ARE	VCA-O <sub>3</sub>	ARE-O <sub>3</sub>
pH	-	7	7	7	7
DBO <sub>5</sub>	mg L <sup>-1</sup>	4.406,1±60,1	4.956,02±558,0	6.671,43±301,2	6.515,24±99,68
DQO	mg L <sup>-1</sup>	4.869,5±181,1	4.786,50±367,3	6.580,17±335,2	7.157,92±921,6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	7,77±0,5	n.d	17,77±1,0	10,56±0,2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	31,08±7,4	29,47±3,0	96,46±16,4	7,18±1,2
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	1,5±0,35	n.d	1,13±0,2	1,2±0,3

n.d-Não detectado

Maiores valores de massa seca (Figura 18) foram obtidos quando as microalgas *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram cultivadas em VCA e VCA-O<sub>3</sub>, em contraste com ARE, ARE-O<sub>3</sub> e no tratamento controle (BG11). Em geral, observou-se que os valores de massa seca das duas microalgas não diferiram significativamente quando cultivadas em um mesmo meio de cultura, com exceção da ARE-O<sub>3</sub> (Figura 18).

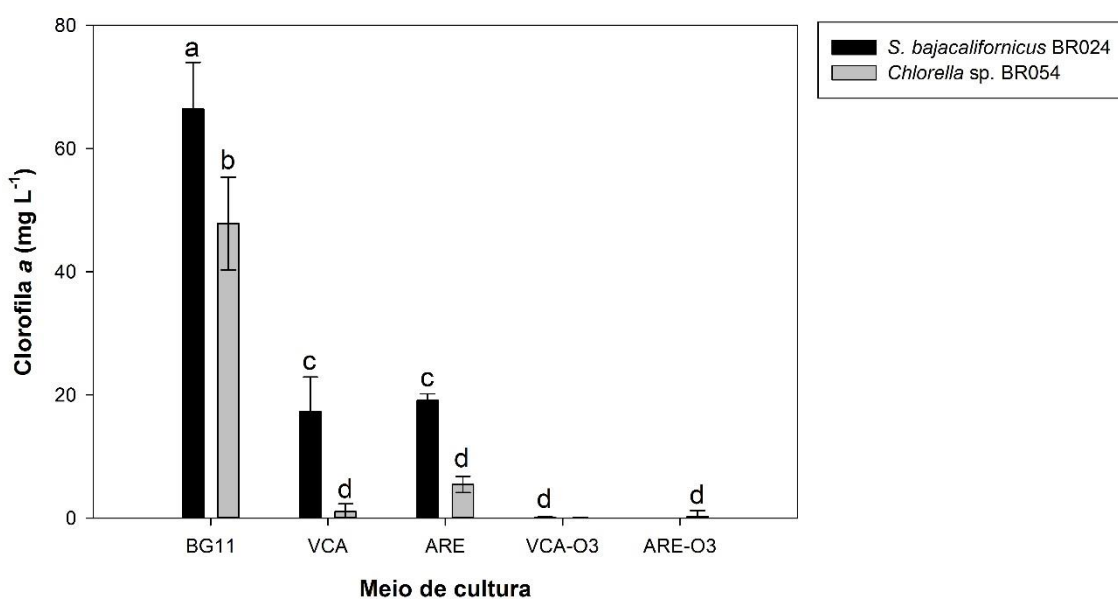


**Figura 18.** Massa seca de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054, após 12 dias de cultivo. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

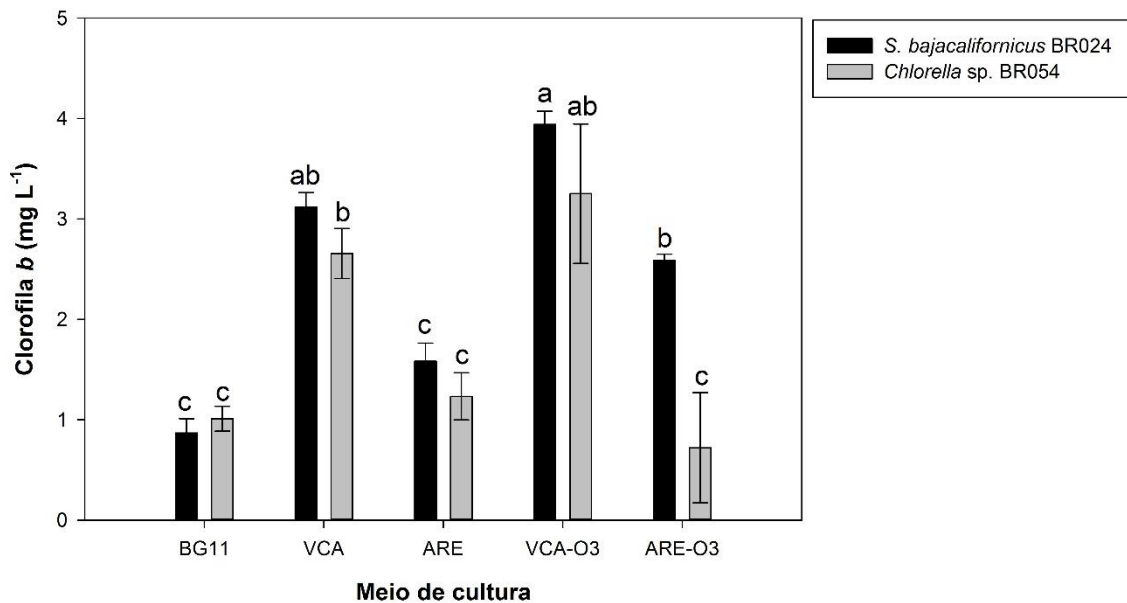
Os dados de composição bioquímica da biomassa coletada (*i.e.* pigmentos fotossintetizantes, carboidratos neutros totais, proteínas totais, e lipídeos totais) dos cultivos de *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 em BG11, VCA, ARE,

VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> foram expressos em concentração volumétrica. Desta forma, ao invés de se utilizar o percentual em relação a massa seca, valores em concentração (massa por unidade de volume de cultivo) permitem avaliar o potencial dos meios de cultura a base dos efluentes quanto a produção em massa de biomoléculas de interesse comercial.

Observa-se que as maiores concentrações de clorofilas *a* foram obtidos nos cultivos de *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 no meio de cultura BG-11 (Figura 19). Por outro lado, este mesmo meio de cultura proporcionou os menores teores de clorofila *b* (Figura 20). Os cultivos realizados em VCA e VCA-O<sub>3</sub> sustentaram maiores concentrações de clorofila *b* dentre os meios avaliados (Figura 19). As razões clorofila *a/b* foram 78 e 47 para *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 em meio de cultura BG11. O cultivo de *S. bajacalifornicus* BR024 em ARE apresentou uma relação clorofila *a/b* de 12, e para os demais cultivos observou-se uma relação clorofila *a/b* abaixo de 5.

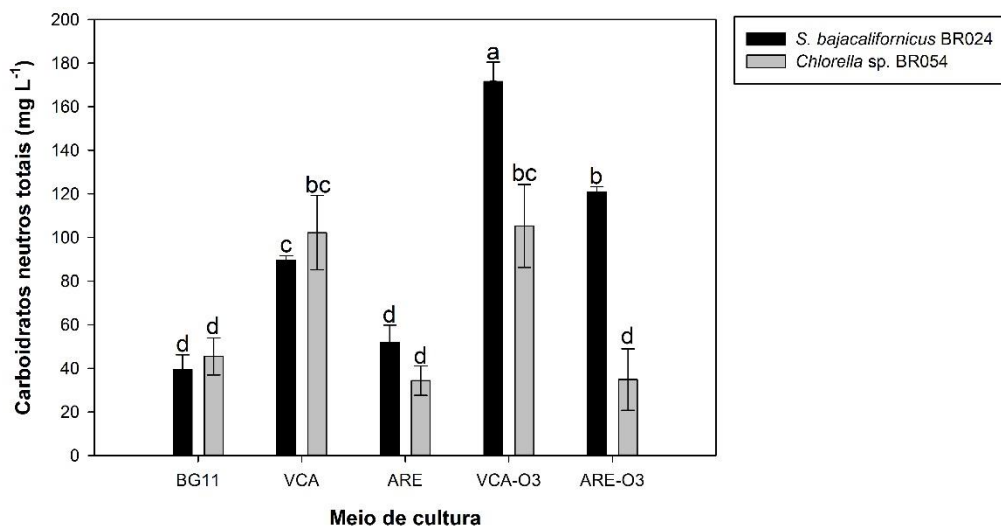


**Figura 19.** Clorofila *a* de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.



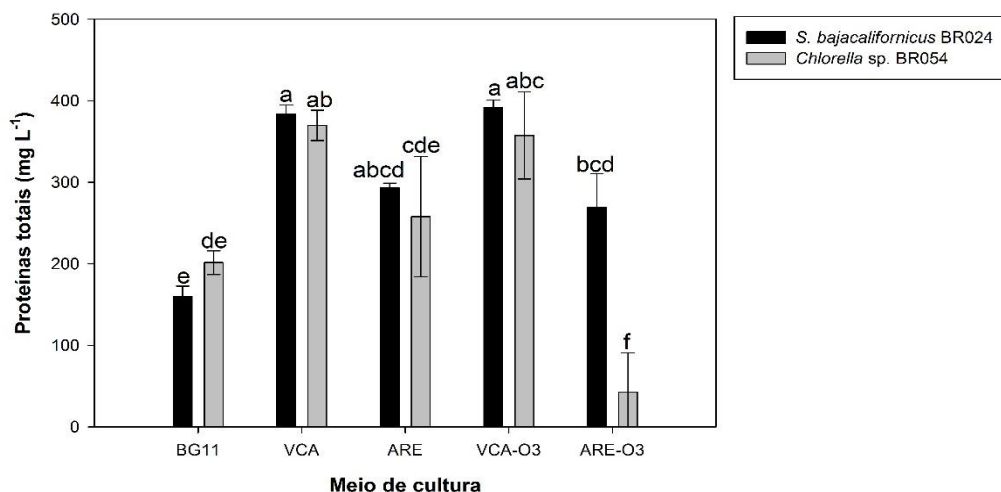
**Figura 20.** Clorofila b de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Observa-se que os cultivos utilizando as duas microalgas resultaram em maiores concentrações de carboidratos neutros totais quando cultivos em VCA e VCA-O<sub>3</sub>. Em geral os cultivos utilizando *S. bajacalifornicus* BR024, que apresentaram maiores valores de carboidratos neutros totais em relação a *Chlorella* sp BR054. Por outro lado, concentrações estatisticamente similares foram observadas nas microalgas cultivadas em ARE, e BG11.



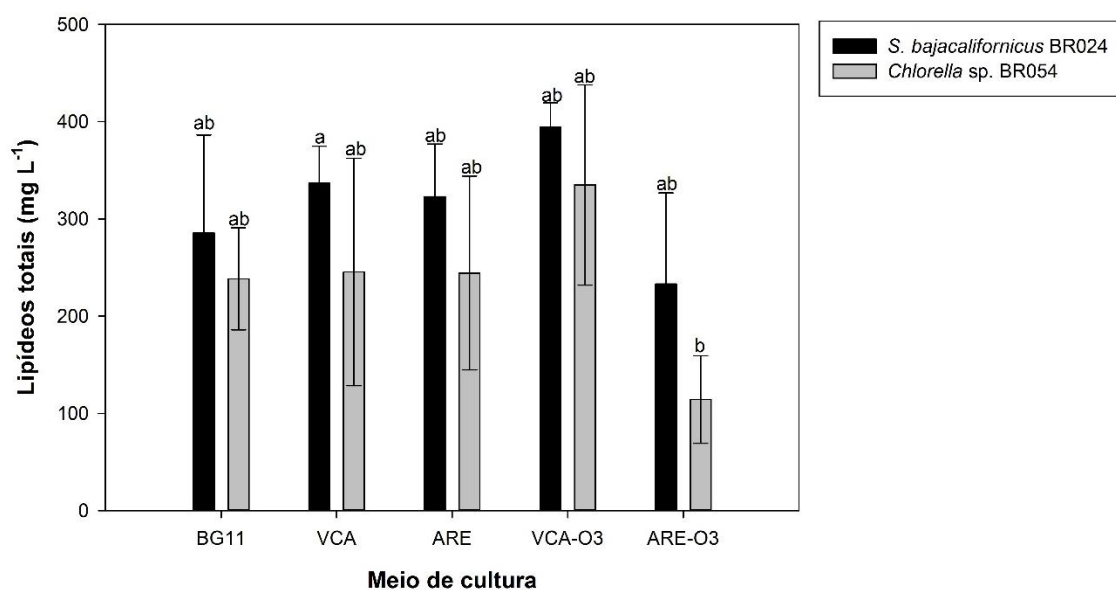
**Figura 21.** Carboidratos neutros totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Observa-se na Figura 22 que as maiores concentrações de proteínas totais para os cultivos com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 não diferiram significativamente quando cultivadas no meio VCA e VCA-O<sub>3</sub>. Em contraposição, no cultivo em BG11 se observou menores concentrações de proteína total, valor que não difere significativamente entre as duas microalgas.



**Figura 22.** Proteínas totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

Para os lipídeos totais (Figura 23), é possível observar que as concentrações observadas nos cultivos utilizando as duas microalgas não diferem significativamente em nenhum dos meios de cultura, devido ao grande erro experimental apresentado.



**Figura 23.** Lipídeos totais de cultivos em BG11, VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, e ARE-O<sub>3</sub> inoculados com *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella sp.* BR054. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

#### 5.4 Discussão

Cultivar microalgas em resíduos agroindustriais implica em contaminações por outros organismos. A prevalência destes contaminantes está relacionado curto tempo de geração que apresentam este microrganismo, como por exemplo o tempo de geração das leveduras, que é em torno de 4 horas (MULLER *et al.*, 2007). Apesar da presença de leveduras e bactérias, esta pesquisa restringiu-se ao estudo da microalga *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella sp.* BR054. Portanto, a composição bioquímica apresentada nesta pesquisa refere-se àquela do consorcio microalga, fungos e bactérias. Como relatado por Candido (2017), o cultivo de *Chlorella vulgaris* em vinhaça de cana-de-açúcar *in natura* e após a biodigestão, foi muito susceptível a contaminação por diversos grupo heterotróficos, sobretudo fungos, bactérias, leveduras, mesmo após tentativas de esterilização.

O uso do ozônio na VCA e ARE foi eficaz na eliminação das leveduras. Além disso, a ozonização promove a clivagem de estruturas moleculares complexas a estruturas menos complexas. Ademias, é importante ressaltar que a eficaz degradação de compostos fenólicos está relacionada com a reação direta com o ozônio molecular (via direta) ao invés da reação com radicais hidroxilas (via indireta). Assim, a ozonização em meios alcalinos está relacionada com a formação de radicais hidroxila. Consequentemente, a fim de maximizar a degradação dos compostos fenólicos, a oxidação deve acontecer em meio ácido. Megahed *et al.* (2018) reportou que o gás ozônio e suas formas radicalares atuam atacando as glicoproteínas e glicolipídios da membrana celular, o que resulta na ruptura da membrana celular. O ataque aos grupos sulfídricos de certas enzimas resulta em perturbação da atividade enzimática celular normal e perda de função. Atacando as bases purinas e pirimidinas dos ácidos nucleicos, ocorrem danos ao DNA.

O processo de ozonização da VCA e ARE teve como consequente a diminuição dos picos de absorvância observados no perfil espectrofotométrico nas Figuras 10 e 11. Especificamente estes picos de absorção estão relacionados a presença de compostos fenólicos e compostos nitrogenados nas vinhaças, e uma maior redução é observada nos 100 primeiros minutos de exposição ao ozônio. Reitera-se que no presente estudo a ozonização das VCA e ARE ocorreram no pH de 4,55 e 4,29, respectivamente, e teve

com resultado uma diminuição de 82 e 89,38 % dos compostos fenólicos para VCA e ARE, respectivamente. Valores similares foram reportados no estudo desenvolvido por Martins *et al.* (2005), que ozonizou 2 L de vinhaça em pH ácido a uma vazão de 8,3 L min<sup>-1</sup> e concentração de 0,034 g O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> durante 120 minutos, onde se verificou a degradação de 81,66 % dos composto fenólicos. Além disso, no estudo realizado por Reis *et al.* (2019) foi verificado uma tendência similar, no qual foi avaliado a ozonização de 250 mL de vinhaça de cana-de-açúcar a uma vazão de 1 L min<sup>-1</sup> e uma concentração de 25 a 30 mg O<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>. Os autores relataram que a completa degradação dos compostos fenólicos ocorreu entre 45 a 60 minutos de exposição ao gás ozônio.

A redução da concentração de compostos fenólicos pela ozonização é benéfica para o crescimento das microalgas *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054, como verificado pelas curvas de crescimento figuras 18 e 19. Papazi *et al.* (2013) demonstraram que os compostos fenólicos são capazes de inibir o crescimento de microalgas ou reduzir o crescimento devido ao aumento do gasto energético dispendido para a biodegradar tais inibidores. No entanto, como reportado por Das *et al.* (2015), a inibição de microalgas depende em maior parte da concentração dos compostos fenólicos. Especificamente, no estudo desenvolvido por Scragg (2006), observou-se que a concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> produziu um inibição de 44,6 % no crescimento de uma cepa de *Chlorella* sp.

Adicionalmente, durante o processo de ozonização de VCA e ARE se observou a diminuição da DBO<sub>5</sub>. Os principais subprodutos formados da oxidação da matéria orgânica são compostos oxigenados de baixa massa molecular, como cetonas, aldeídos e ácidos orgânicos. Consequentemente, o aumento da acidez durante o processo de ozonização está relacionado ao acréscimo de ácidos orgânicos no meio. Evidências similares foram observadas no estudo desenvolvido por HOWELL *et al.*, (2008) durante a ozonização de matéria orgânica presente em fonte de água potável, e no estudo de Ferreira *et al.* (2011) durante a ozonização catalítica para a degradação de fenol. Também se observou a diminuição da DQO no presente estudo, que juntamente com a diminuição observada da DBO<sub>5</sub>, conferiu um aumento na biodegradabilidade da VCA e da ARE em 10,3 e 35 %, respectivamente. No entanto, os valores apresentados neste estudo estão abaixo dos apresentados na literatura, como Aquino e Pires (2016) que obtiveram uma redução de 22,7 % na biodegradabilidade da vinhaça de cana-de-açúcar em pH 4,8 e uma dosagem de ozônio de 0,17 g L<sup>-1</sup>. No trabalho desenvolvido por Siles *et al.* (2011), foi

verificado um aumento de 25 % da biodegradabilidade da vinhaça de cana de açúcar com uma dosagem de 0,34 gO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup>.

Em cultivos mixotróficos, as microalgas obtêm energia tanto da luz como também dos nutrientes orgânicos presentes no meio de cultura. O efeito das duas vias metabólicas (heterotrófica e autotrófica) explica as elevadas produtividades em biomassa obtidas no estudo. Kong *et al.* (2013) avaliaram o crescimento de *Chlorella vulgaris* com glicose e glicerol como fonte de carbono orgânico. Os autores concluíram que no tratamento com 10 g de glicose L<sup>-1</sup> juntamente com 2 g de glicerol L<sup>-1</sup> produziu um cultivo com concentração de massa seca de 2,62 g L<sup>-1</sup>, valor 7,71 vezes maior que o tratamento controle. Tendência similar foi reportada por Kumar *et al.* (2016), que avaliaram o cultivo de *Chlorella sp.* em meio BG11 com suplementação de 1,3 g de glicose L<sup>-1</sup>, 1,30 g<sup>1</sup> de glicerol L<sup>-1</sup>, 1,73 g de acetato de sódio L<sup>-1</sup> e 1,20 g de sacarose L<sup>-1</sup>. No presente estudo foram observadas maiores concentrações de massa seca nos cultivos em VCA e VCA-O<sub>3</sub>, em que *S. bajacalifornicus* BR024 atingiu 3,12 g L<sup>-1</sup> em VCA e 3,9 g L<sup>-1</sup> em VCA-O<sub>3</sub>. Nos cultivos de *Chlorella sp.* BR054, obteve-se 2,65 g L<sup>-1</sup> em VCA e 3,25 g L<sup>-1</sup> em VCA-O<sub>3</sub>, sendo, resultados coerentes aos apresentados na literatura.

Apesar da literatura apresentar relatos de cultivos bem sucedidos de linhagens de microalgas em VCA, observa-se que o uso desta em concentrações elevadas pode inibir o crescimento algal (BARROCAL; GARCI; GONZA, 2010). No entanto, essa tendência não foi evidenciada no presente trabalho, mesmo que as *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella sp.* BR054 cultivadas em 100 % de VCA, VCA-O<sub>3</sub>, ARE e ARE-O<sub>3</sub>. Santana *et al.* (2017) avaliaram o crescimento de *Chlamydomonas biconvexa* e *Micractinium sp.* em 50 % de vinhaça e obtiveram uma concentração de biomassa seca de 0,53 g L<sup>-1</sup>. Adicionalmente, Ramirez *et al.* (2014) reportou uma produção de 0,7 g L<sup>-1</sup> de biomassa seca em *Scenedesmus sp.* em meio sintético suplementado com 50 % de VCA. Ademais, destaca-se que as maiores concentrações de massa seca evidenciadas nos cultivos são justificadas também pela presença de concentrações elevadas de macronutrientes, os quais tiveram suas concentrações reduzidas em mais de 50% após os cultivos. Como relatado por Mattos *et al.* (2016), que cultivaram *Desmodesmus sp.* em vinhaça, foi também observada uma redução na DQO e nitrogênio total em 52,1 e 36,2 % respectivamente. Em adição, Sacristán *et al.* (2013) relataram remoção de fósforo e nitrogênio total em 66 e 94 %, respectivamente, em cultivo de *Scenedesmus accutus* em efluente doméstico após 18 horas de cultivo, que resultou em uma biomassa com 28% de lipídeos.

Tem sido amplamente observado que o teor de clorofila é reduzido em microalgas submetidas a cultivos mixotróficos, quando comparado aos teores verificados em condições autotróficas. Esta diminuição é devida à redução na síntese de clorofila, visto que a energia que a microalga precisa é obtida da respiração ao invés da fotossíntese. Como relatado por Kong *et al.* (2011), o aumento na concentração de glicose para 5 g L<sup>-1</sup> resultou em maior concentração de biomassa e promoveu acúmulo de lipídios, em detrimento da biossíntese de clorofila no cultivo de *Chlorella* sp, corroborando com a tendência observada nos cultivos deste estudo, a exceção do tratamento controle (BG11). Além disso, destaca-se que os cultivos em VCA e VCA-O<sub>3</sub> produziram em geral mais proteínas, lipídeos e carboidratos em comparação com os cultivos em BG11, ARE e ARE-O<sub>3</sub>. Consequentemente, a VCA é mais interessante no cultivo das microalgas

## 5.5 Conclusões

A ozonização da vinhaça de cana de açúcar e água residuária de produção de etanol apresentou-se com uma técnica promissora de pré-tratamento, pois diminuiu a concentração de compostos fenólicos, que são considerados potenciais inibidores de crescimento de microalgas. O tratamento com gás ozônio também aumentou a biodegradabilidade e as concentrações de macronutriente, melhorando assim as condições para o crescimento de microalgas. Além disso, a vinhaça ozonizada apresentou-se como o meio de cultivo mais atrativo devido a maior concentração de lipídeos, carboidrato e proteínas ao final dos cultivos das duas microalgas.

Na avaliação dos parâmetros fotossintético clorofila *a* e *b*, as linhagens de *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp. BR054 mostraram um metabolismo mixotrófico evidenciado pelos baixos teores de clorofila *a* e *b* em contraposição como o tratamento controle BG1. Além disso, o cultivo das microalgas em os meios de cultivo VCA, ARE, VCA-O<sub>3</sub>, ARE-O<sub>3</sub> resultou em uma redução da carga poluidora destes efluentes.

## 5.6 Referências

- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 1st editio ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2005.
- AQUINO, S.; PIRES, E. C. Assessment of ozone as a pretreatment to improve anaerobic digestion of vinasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 279–285, 2016.
- BARROCAL, M.; GARCI, M. T.; GONZA, G. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. v. 27, n. 6, p. 851–856, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. v. 254, p. 248–254, 1976.

CABRERA-DÍAZ, A. et al. Anaerobic digestion of sugarcane vinasse through a methanogenic UASB Reactor Followed by a Packed Bed Reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 4, p. 1127–1145, 2017.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. *Growth of Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 45–53, 2017.

CLESCERL, L.S.; GREENBERG, A.E; EATON, A. D. Standard methods for the examination of water and wastewater part 1000 standard Methods for the Examination of water and wastewater. 1999.

DAS, B.; MANDAL, T. K.; PATRA, S. A comprehensive study on *Chlorella pyrenoidosa* for phenol degradation and its potential applicability as biodiesel feedstock and animal feed. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 5, p. 1382–1401, 2015.

DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus sp.* **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465–9473, 2016.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FERNIE, A. R. et al. Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate : fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, p. 250–263, 2001.

FU, S. F. et al. Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, n. 189, p. 81–86, 2017.

FUENTES, J. L. et al. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. **Marine Drugs**, v. 14, n. 5, 2016.

KONG, W. et al. The characteristics of biomass production , lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 55, p. 11620–11630, 2011.

KONG, W. B. et al. Effect of glycerol and glucose on the enhancement of biomass, lipid and soluble carbohydrate production by *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 62–69, 2013.

KUMAR, A. et al. Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from *Chlorella spp.* **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–12, 2016.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MARTIN, M. A. et al. Estimating the selectivity of ozone in the removal of polyphenols from vinasse. **Journal of chemical and biotechnology**, v. 438, n. August 2004, p. 433–438, 2005.

- MASUKO, T. et al. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Analytical Biochemistry**, v. 339, n. 1, p. 69–72, 2005.
- MEGAHED, A.; ALDRIDGE, B.; LOWE, J. The microbial killing capacity of aqueous and gaseous ozone on different surfaces contaminated with dairy cattle manure. **Plos one**, p. 1–22, 2018.
- MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, p. 12–25, 2009.
- MULLER, J. L. et al. Em Fermentador Por Batelada Tipo Air Lift E Shaker. **Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 688–693, 2007.
- MURPHY, J. .; RILEY, J. . A modified single solution for the determination of phosphate in natural waters. **Marine Biology Association**, v. 27, p. 31–36, 1962.
- PAPAZI, A.; KOTZABASIS, K. Correction: “Rational” Management of Dichlorophenols Biodegradation by the Microalga *Scenedesmus obliquus*. **PLoS ONE** 8, 2013.
- POSADAS, E. et al. Microalgae cultivation in wastewater. **Microalgae-based biofuels and bioproducts**, p. 67–91, 1 jan. 2017.
- RAVINDRAN, B. et al. Microalgae potential and multiple roles-current progress and future prospects-an overview. **Sustainability (Switzerland)**, v. 8, n. 12, p. 1–16, 2016.
- REIS, C. E. R. et al. Vinasse treatment within the sugarcane-ethanol industry using Ozone combined with anaerobic and aerobic microbial processes. 2019.
- RITCHIE, R. J. Universal *chlorophyll* equations for estimating *chlorophylls a, b, c,* and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. **Photosynthetica**, v. 46, n. 1, p. 115–126, 2008.
- ROMANHOLO FERREIRA, L. F. et al. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 132–137, 2011.
- SACRISTÁN DE ALVA, M. et al. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 744–748, 2013.
- SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 1 mar. 2017.
- SANTOS, J. E. **Difusão e cinética de decomposição do ozônio no processo de fumigação de grãos de milho (Zea mays)**. 2008. Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- SCRAGG, A. H. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella* VT-1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 796–799, 2006.
- SILES, J. A. et al. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, n. 1–3, p. 247–253, 15 abr. 2011.
- SIDDIQUI, Mohamed S.; AMY, Gary L.; MURPHY, Brian D.. Ozone enhanced removal

of natural organic matter from drinking water sources. **Water Research**, [s.l.], v. 31, n. 12, p.3098-3106, dez. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354\(97\)00130-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0043-1354(97)00130-9).

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. A Practical handbook of seawater analysis. **A practical handbook of seawater analysis**, v. 167, p. 185, 1972.

TAN, X. B. et al. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 17–30, 2018. UNITED-NATIONS.

**World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100.**  
Acesso em: 20 janeiro. 2019

YANG, L. et al. Improve the biodegradability of post-hydrothermal liquefaction wastewater with ozone: Conversion of phenols and N-heterocyclic compounds. **Water Science and Technology**, v. 2017, n. 1, p. 248–255, 2018.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho demonstrou que é possível utilizar a VCA a ARE como fonte de nutrientes de baixo custo para o cultivo de microalgas do filo *Chlorophyta*. O baixo pH e os altos níveis de matéria orgânica presentes na VCA e ARE podem limitar o crescimento de algumas microalgas. Consequentemente, avaliação da toxicidade nas linhagens foi indispensável para determinar as microalgas mais robustas. Os cultivos de microalgas em VCA e ARE mostraram claramente que apenas algumas linhagens de microalgas foram capazes de mostrar altas taxas de crescimento mesmo com ajuste de pH. Assim, os gêneros *Chorella* e *Scenedesmus* se desatracaram, e as linhagens *S. bajacalifornicus* BR024 e *Chlorella* sp BR054 apresentaram as maiores taxas de crescimento específico.

Os maiores valores de biomassa, carboidratos neutros, proteínas foram obtidos quando as microalgas *Chlorella* sp. BR054 e *S. bajacalifornicus* BR024 foram cultivadas em VCA-O<sub>3</sub>. Conclui-se que a ozonização aumentou a biodegradabilidade e diminuiu significativamente a concentração de compostos fenólicos, propiciando assim melhores condições para as microalgas. Além disso, o crescimento das microalgas *S. bajacalifornicus* BR024, *Chlorella* sp BR054 em vinhaça reduziu os teores de amônio, fosfato nitrato, DBO<sub>5</sub>, DQO, contribuindo para melhorar a qualidade do efluente. No entanto, os efluentes não podem ser descartados no corpo hídrico devido que em não atenderam a remoção de mínimo 60% DBO<sub>5</sub> descrita na resolução CONAMA N430.

O cultivo da microalga em vinhaça mostra-se uma alternativa promissora, possibilitando reduzir os custos de produção da biomassa microalgal e contribuindo para valorização e melhoria da qualidade deste abundante resíduo da indústria sucroalcooleira. Além disso, é importante ressaltar que o aumento de escala do cultivo é um passo essencial para integrar o cultivo de microalgas ao setor de etanol. No entanto, em cultivos em grande aumentar os parâmetros não poderão ser facilmente controlados, o que tornara indispensável o uso de uma linhagem de microalga que não sejam susceptíveis a vários no meio de cultivo e que seja competitiva contra contaminantes. Consequentemente, este é um grande desafio ao se trabalhar com um meio de cultivo com alta carga orgânica (DBO<sub>5</sub> e DQO) que promove o crescimento de contaminantes heterotróficos.

## ANEXO I Composição dos meios de cultura usados no estudo.

Tabela A1. Composição dos meios de cultura BG-11 e BBM

Sal Inorgânica	Meios de cultura (g L <sup>-1</sup> )	
	BG-11	BBM
NaNO <sub>3</sub>	1,500000	0,250000
Na <sub>2</sub> Mg EDTA. 2H <sub>2</sub> O	0,001000	0,001000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>5</sub> [Fe(C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> ]	0,006000	0,006000
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O	0,006000	0,006000
CaCL <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036000	0,061000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075000	0,075000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,020000	0,075000
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,020000	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,002860	0,014860
MnCL <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,001900	0,001400
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,000222	0,008800
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,000080	0,001600
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,000050	0,000050
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,000018	0,000018
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,175000
NaCL		0,025