



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

VALÉRYA CARNEIRO TELES

**CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DAS MICROALGAS
Micractinium sp. e *Chlamydomonas biconvexa* CULTIVADAS
EM VINHAÇA E CO₂ PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.**

Dissertação de Mestrado

**BRASÍLIA - DF
2016**



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

VALÉRYA CARNEIRO TELES

**CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DAS MICROALGAS
Micractinium sp. e *Chlamydomonas biconvexa* CULTIVADAS EM
VINHAÇA E CO₂ PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Tocantins,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, para obtenção do título
de mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Bruno dos Santos
Alves F. Brasil
Co-orientadora: Dr^a Itânia Pinheiro
Soares

**BRASÍLIA - DF
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

T269c Teles, Valérya Carneiro.

CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DAS MICROALGAS
Micractinium sp. e Chlamydomonas biconvexa CULTIVADAS EM
VINHAÇA E CO₂ PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.. /
Valérya Carneiro Teles. – Gurupi, TO, 2016.

64 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2016.

Orientador: Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Coorientadora : Itânia Pinheiro Soares

1. Fotobiorreatores em placas planas. 2. Bioprodutos. 3.
Composição centesimal. 4. Microalgas. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotec | ppgbiotec@uft.edu.br



Ata de Defesa nº 06/2016

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VALÉRYA CARNEIRO TELES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 19 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 13:30, no Auditório da Embrapa Agroenergia (Brasília-DF), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. BRUNO DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL, da Universidade Federal do Tocantins - UFT, Prof^a. Co-orientadora ITÂNIA PINHEIRO SOARES, da Embrapa Agroenergia, Prof^a. Dr^a. PATRÍCIA VERARDI ABDELNUR, da Embrapa Agroenergia e Prof^a. Dr^a. PATRÍCIA REGINA SOBRAL BRAGA, da Universidade de Brasília - UnB, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VALÉRYA CARNEIRO TELES, intitulada "**Caracterização da biomassa das microalgas *Micractinium* sp. e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em vinhaça e CO₂ para aplicações biotecnológicas**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas ressalvas e correções apontadas pela banca examinadora, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Orientador

Prof^a. Dr^a. Itânia Pinheiro Soares
Embrapa Agroenergia Brasília - DF
Co-Orientadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Verardi Abdelnur
Embrapa Agroenergia Brasília - DF
1^a Examinadora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Regina Sobral Braga
Universidade de Brasília - UnB
2^a Examinadora

Brasília, 19 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Gessiel Newton Schmidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

*Dedico essa obra, à meus pais João e Luciane
e familiares pelos ensinamentos,
apoio e pela motivação.*

*Ao meu namorado, Daniel, pela compreensão
da minha ausência para dedicar-me a academia.*

Agradecimentos

Primeiramente ao Criador, por me conceder o dom da vida, sabedoria e discernimento para execução dessa obra.

Aos meus pais, João Pereira Teles e Luciane Carneiro Barreira Teles pelo incentivo apesar das dificuldades.

A minha irmã Estefânia.

Ao meu tio José Pereira Teles e minha tia Selma Garcia Amaral Teles pelo acolhimento e carinho.

Aos amigos, Livia e Diuliano, pela hospitalidade prestada.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela concessão da bolsa.

A Universidade Federal do Tocantins, que me proporcionou a oportunidade de realização desse curso.

Ao meu orientador Dr. Bruno Brasil por ter me aceitado como sua aluna e pela orientação dada.

A minha co-orientadora Dr^a. Itânia Soares, pelos conselhos e sugestões.

Aos analistas do Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB) da Embrapa Agroenergia, Raquel, Gislaine e José Antônio pela confiança e disponibilidade de ensinar.

Ao analista da Área de Planta Piloto da Embrapa Agroenergia, Diogo Nakai pela ajuda prestada.

Ao pesquisador Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa do Laboratório de Genética e Biotecnologia pela sua disposição em ajudar e pelos ensinamentos.

Aos professores do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, que contribuíram para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos meus amigos que conheci no decorrer do curso, pelos momentos de alegria. A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que aqui pudesse estar.

A gravidade explica os movimentos dos planetas, mas não pode explicar quem colocou os planetas em movimento. Deus governa todas as coisas e sabe tudo que é ou que pode ser feito.

Isaac Newton

RESUMO

As microalgas verdes pertencentes à divisão *Chlorophyta* tem sido amplamente estudadas, visto o seu potencial de aproveitamento biotecnológico. Apresentam vantagens em relação às culturas tradicionais, pois não requerem grandes áreas de cultivo ou terras agricultáveis, podem crescer em ambientes extremos e possuem poucas exigências nutricionais para o seu crescimento. Assim, o uso das microalgas tem despertado o interesse da indústria de alimentos, de energia e farmacêutica como fonte de bioprodutos. O presente estudo foi realizado a fim de caracterizar a biomassa de duas cepas de microalgas depositadas na coleção de micro-organismos e microalgas aplicadas à agronegócios e biorrefinarias da Embrapa: *Micractinium* sp. (Embrapa|LBA32) e *Chlamydomonas biconvexa* (Embrapa|LBA40). Esses micro-organismos foram cultivados em fotobiorreatores de geometria placa plana e agitação *air lift* com injeção de CO₂ em meio de cultivo a base de vinhaça de cana-de-açúcar formulado com vinhaça em duas formulações distintas: vinhaça diluída em água destilada a 50% (V50%) e vinhaça clarificada quimicamente não diluída (VC100%). Como controle foi realizado cultivo em meio sintético padrão, *Bold's Basal Medium* (BBM). Fez-se a caracterização química das biomassas, por meio da quantificação de sólidos totais, cinzas, amido, carboidratos totais, proteína bruta, clorofila a, clorofila b, clorofila total, carotenoides totais, ésteres metílicos, análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio e poder calorífico superior. Também foi realizada análise do perfil de carotenoides. Os resultados obtidos indicaram que as microalgas empregadas nesse trabalho são compostas majoritariamente de proteínas e carboidratos. Para ambas as cepas pôde-se observar aumento na produtividade de biomassa e no teor de proteínas nos cultivos em meio a base de vinhaça em relação ao meio padrão BBM. Por outro lado, houve decréscimo nos teores de carboidratos nestas mesmas condições. A caracterização da composição da biomassa das microalgas cultivadas em vinhaça apresentada neste estudo indicou que há potencial de aproveitamento de biomassa para produção de alimentos, energia elétrica e/ou bioetanol. Estudos futuros deverão objetivar o escalonamento do cultivo, a conversão da biomassa algal em energia e a sua toxicidade para alimentos.

Palavras-chave: Fotobiorreatores em placas planas; Bioprodutos; Composição centesimal e Microalgas.

ABSTRACT

The green microalgae belonging to *Chlorophyta* division has been extensively studied, since the potential of biotechnological exploitation. They have advantages over traditional cultures as it does not require large areas of cultivation or agricultural land, can grow in extreme environments and have few nutritional requirements for growth. Thus, the use of microalgae has aroused the interest of the food industry, energy and pharmaceutical industries as a source of bio-products. This study was conducted in order to characterize the biomass of two microalgae strains deposited in the collection of microorganisms and microalgae applied to Agroenergy and biorefineries Embrapa: *Micractinium* sp. (Embrapa | LBA32) and *Chlamydomonas convexa* (Embrapa | LBA40). These microorganisms were cultivated in photobioreactors flat plate geometry and stirring air lift CO₂ injection in culture medium vinasse base sugarcane formulated with vinasse in two different formulations: dilute vinasse in distilled water 50% (V50%) and clarified vinasse chemically undiluted (VC100%). The control was carried out cultivation in standard synthetic media, *Bold's Basal Medium* (BBM). There was chemical characterization of biomasses, by quantification of total solids, ash, starch, structural carbohydrates, protein, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, total carotenoids, methyl esters, elemental analysis of carbon, hydrogen and nitrogen and gross calorific value. It was also carried out analysis of the carotenoid profile. The results indicate that the microalgae used in this work are composed mostly of protein and carbohydrates. For both strains it was observed increase in biomass productivity and protein content in crops amid vinasse base in relation to the standard medium BBM. Moreover, there was a decrease in total carbohydrate in these same conditions. The characterization of the composition of the biomass of microalgae grown in vinasse presented in this study indicates that there is potential for biomass use for food production, electricity and/or bioethanol. Future studies should aim at scaling cultivation, conversion of algal biomass into energy and its toxicity for food.

Key-words: Photobioreactors in flat plates; Bioproducts; Centesimal composition and Microalgae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ultraestrutura celular de microalgas da divisão <i>Chlorophyta</i>	5
Figura 2 - Sistema de cultivos de microalgas em lagoas abertas (a) e fotobiorreatores (b).....	7
Figura 3 - Esquema geral do conceito de biorrefinarias de algas.....	9
Figura 4 - Localização das zonas produtoras de cana-de-açúcar no Brasil	11
Figura 5 - Emissão de CO ₂ eq. no Brasil em 2012 em cinco setores	13
Figura 6 - Estrutura química das moléculas constituintes do amido: amilose e amilopectina	16
Figura 7 - Estrutura química de alguns carotenoides encontrados e algas	19
Figura 8 - Estrutura das clorofilas e seus respectivos constituintes (a) macrociclo de porfirina; (b) forbina; (c) clorofila a, clorofila b, e uma variante com o grupo metila na posição 3 ser substituído por um grupo formilho	20
Figura 9 - Esquema do processo de transesterificação dos triglicerídeos.....	22
Figura 10 - Observação microscópica de <i>Micractinium sp.</i> (a) e <i>Chlamydomonas biconvexa</i> (b).....	25
Figura 11 - Amostras de biomassas liofilizadas das cepas de microalga em estudo (a) <i>Micractinium sp.</i> dos cultivos em meio BBM, 50% Vinhaça e 100% Vinhaça clarificada da esquerda para a direita (b) <i>Chlamydomonas biconvexa</i> dos cultivos em meio BBM, 50% Vinhaça e 100% Vinhaça clarificada da direita para a esquerda	26
Figura 12 - Sistema montado para a hidrólise enzimática das amostras de algas ...	43
Figura 13 - Amostras de microalgas após reação para determinação de carboidratos	30
Figura 14 - Separação de fases das amostras de microalgas, após adição do reagente hexano. Da esquerda para direita Embrapa LBA 32 cultivadas em meio BBM; 50% Vinhaça e 100% Vinhaça clarificada respectivamente e Embrapa LBA 40 à direita com mesma ordenação	37
Figura 15 - Poder calorífico superior de amostras de microalgas cultivadas em meio BBM, Vinhaça 50% e Vinhaça 100% clarificada	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição proteica de microalgas de diferentes cepas	17
Tabela 2 - Produtividade diária de biomassa de microalgas (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹).....	25
Tabela 3 - Concentração e diluição glicose curva padrão.....	31
Tabela 4 - Gradiente de tempo e temperatura utilizados para a digestão das amostras de microalgas	32
Tabela 5 - Parâmetros usados para destilação das amostras após a digestão	32
Tabela 6 - Condições de titulação	33
Tabela 7 - Gradiente usado na separação cromatográfica dos carotenoides	36
Tabela 8 - Teores de sólidos totais e cinzas de biomassa de duas microalgas (Embrapa LBA32 e Embrapa LBA40) cultivadas em diferentes meios de cultivo contendo vinhaça	38
Tabela 9 - Resultados obtidos em percentagem para amido e suas respectivas produtividades diárias (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹).....	39
Tabela 10 - Resultados obtidos em percentagem de carboidratos totais e suas respectivas produtividades diárias (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹).....	40
Tabela 11 - Resultados encontrados para os teores de proteína bruta e suas respectivas produtividades diárias (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹).....	41
Tabela 12 - Resultados das determinações de clorofila a, clorofila b e clorofilas totais (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹).....	43
Tabela 13 - Resultados da análise de carotenoides totais para duas cepas de microalgas do gênero <i>Micractinium sp.</i> e <i>Chlamydomonas sp.</i> cultivadas em fotobiorreatores	44
Tabela 14 - Resultados da análise elementar de carbono, nitrogênio e oxigênio, percentual em massa	45
Tabela 15 - Resultados dos percentuais em ésteres metílicos de ácidos graxos de microalgas verdes em 3 dias de cultivo.....	47
Tabela 16 - Proporção relativa de cada carotenoide, determinado por UHPLC à 450nm dos extratos de <i>Micractinium sp.</i> e <i>Chlamydomonas biconvexa</i> em 3 diferentes cultivos.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
BBM	<i>Bold's Basal Medium</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsufóxido
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAME	Fatty Acids Methyl Esters
GEE	Gases de efeito estufa
MOPS	3-(N-morfolino) ácido propanossulfônico
MBTH	Cloridrato de 3-Metil-2-Bezotiazolinona Hidrazona
m/v	Razão Massa por volume
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PCS	Poder Calorífico Superior
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SI	Sistema Internacional de Unidades
UV/Vis	Ultravioleta/Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
KJ	Kilojoule
L	Litro
mg	Miligrama
μL	Microlitro
μm	Micrômetros
M	Concentração molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
N	Normalidade
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO GERAL	3
2.1	Objetivos Específicos	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	Microalgas: Aspectos gerais	4
3.1.1	Metabolismo	5
3.1.2	Sistema de Cultivo	6
3.2	Biorrefinaria	7
3.3	Indústrias Sucoenergéticas	9
3.3.1	Vinhaça	11
3.3.2	Dióxido de Carbono	12
3.4	Biomassa como fonte de bioprodutos e energia	13
3.4.1	Carboidratos	14
3.4.1.1	Amido	15
3.4.2	Proteínas	16
3.4.3	Pigmentos	17
3.4.3.1	Carotenoides	18
3.4.3.2	Clorofilas	19
3.4.4	Fração lipídica das microalgas	21
3.4.5	Poder Calorífico	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Biomassa Algal	24
4.2	Análises	25
4.2.1	Determinação de sólidos totais e cinzas	26
4.2.2	Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio	27
4.2.3	Poder calorífico superior (PCS)	27
4.2.4	Teor de amido	28
4.2.5	Determinação de carboidratos totais	29
4.2.6	Determinação de proteína bruta	31

4.2.7	Quantificação de Clorofila a, Clorofila b, e Clorofila Total	33
4.2.8	Determinação de Carotenoides Totais	34
4.2.9	Identificação dos Carotenoides	35
4.2.10	Determinação de Lipídeos Totais como Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos	36
4.3	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Caracterização da biomassa	38
5.1.1	Sólidos e Cinzas.....	38
5.1.2	Amido e Carboidratos totais	39
5.1.3	Proteína bruta.....	41
5.1.4	Clorofila a, Clorofila b e Clorofila total	42
5.1.5	Carotenoides totais.....	44
5.1.6	Análise elementar (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio)	45
5.1.7	Poder calorífico superior.....	46
5.1.8	Ésteres metílicos de ácidos graxos	47
5.1.9	Perfil de carotenoides.....	48
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos questões ambientais atreladas a fatores econômicos têm sido amplamente discutidas, visto a crescente demanda por novas fontes de energia renovável e novos químicos/materiais para diversos segmentos industriais. Nesse contexto, a produção de biomassa de microalgas tem sido demonstrada com uma alternativa para atender à demanda energética e de bioprodutos, visto que apresenta maior produtividade e sustentabilidade se comparada com culturas tradicionais.

As algas pertencem à base da cadeia trófica do ecossistema aquático, sendo designadas como produtores primários de energia. Devido seu aparato fotossintético conseguem metabolizar por meio de luz, CO₂ atmosférico e água, compostos necessários para o seu crescimento e manutenção. Dessa forma esses micro-organismos tem grande relevância para garantir a sustentabilidade do meio ambiente.

Por possuírem habilidade para converter o CO₂ em biomassa durante a sua atividade fotossintética, podem ser empregadas para mitigar as emissões de gases industriais e assim, contribuir para redução do aquecimento global. Em instalações industriais, como usinas e caldeiras, a concentração de dióxido de carbono nos gases emitidos pode atingir aproximadamente 15% (ZHAOA et al., 2011; SALIH, 2011). Deve-se salientar como benefícios, além da remoção de dióxido de carbono do ecossistema, que o cultivo de microalgas não depende de terras utilizadas pela agricultura para produção de gêneros alimentícios; que as microalgas possuem altas taxas de crescimento e que podem se desenvolver em condições ambientais variáveis (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; POKOO-AIKINS et al., 2010).

Dependendo do processo de cultivo utilizado as algas podem apresentar metabolismo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico. Devido a essa ampla capacidade metabólica, esses micro-organismos, possuem versatilidade para produzir insumos alimentares, ração

animal, nutracêuticos e medicamentos (TRENTACOSTE; MARTINEZ; ZENK, 2015).

O crescimento das microalgas depende da disponibilidade de nitrogênio e macronutrientes como fósforo e potássio. Tais minerais são abundantes em efluentes industriais e municipais. Assim, é possível cultivar microalgas em águas residuais ao mesmo tempo em que se proporciona a redução da carga orgânica de forma a minimizar os impactos ambientais além de diminuir custos com insumos para a elaboração do meio de cultivo.

A indústria sucroenergética brasileira possui potencial para a implantação do cultivo de microalgas por meio do aproveitamento de passíveis como vinhaça e CO₂ provenientes das usinas. Assim, o reaproveitamento de resíduos desse setor consiste em uma alternativa de baixo custo para a produção de biomassa algal, visto os elevados custos do meio de cultivo. A vinhaça é um subproduto da fermentação alcoólica, também conhecida como vinho ou vilhoto. Tal efluente tem sido utilizado principalmente para a fertirrigação do solo. No entanto, sabe-se que o uso prolongado, pode causar danos ao solo. Por isso, a vinhaça pode ser melhor destinada, se empregada para a produção em larga escala de biomassa de microalgas. O CO₂, também um resíduo gerado durante a fermentação alcoólica e a queima do bagaço da cana-de-açúcar, consiste em um gás de efeito estufa. Devido a preocupação com sustentabilidade, as indústrias tem sido pressionadas a utilizar mecanismos para a minimização dos impactos ocasionados pela atividade produtiva.

Sendo assim, a motivação para o desenvolvimento desse trabalho consistiu em caracterizar a biomassa de microalgas cultivadas em efluente agroindustrial, a vinhaça com suplementação de dióxido de carbono, visando assim, obter melhor aproveitamento desse passivo ambiental e verificar o potencial de aplicação biotecnológica das cepas estudadas em um conceito de biorrefinarias de microalgas.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar duas cepas de microalgas, denominadas de Embrapa|LBA32 e Embrapa|LBA40, pertencentes as espécies *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* respectivamente, cultivadas em fotobiorreatores em placas planas com duas formulações de meio de cultivo contendo vinhaça: vinhaça diluída a 50% e vinhaça clarificada quimicamente.

2.1 Objetivos Específicos

- Comparar as produtividades de carboidratos totais, amido, proteína bruta, carotenoides totais, clorofila total e ésteres metílicos de ácidos graxos, nas duas espécies de microalgas em meio a base de vinhaça;
- Determinar o teor de carbono, hidrogênio, nitrogênio e o poder calorífico superior presentes nas cepas em diferentes meios de cultivo;
- Identificar os carotenoides presentes na biomassa de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas: Aspectos gerais

As algas estão presentes em ambientes aquáticos, marinhos e continentais, possuem a habilidade de crescer em água salobra e doce ou em ambientes terrestres úmidos. Possuem grande tolerância a variações de temperatura, radiação, turbidez, dióxido de carbono e concentração de oxigênio (ANDRADE et al., 2014).

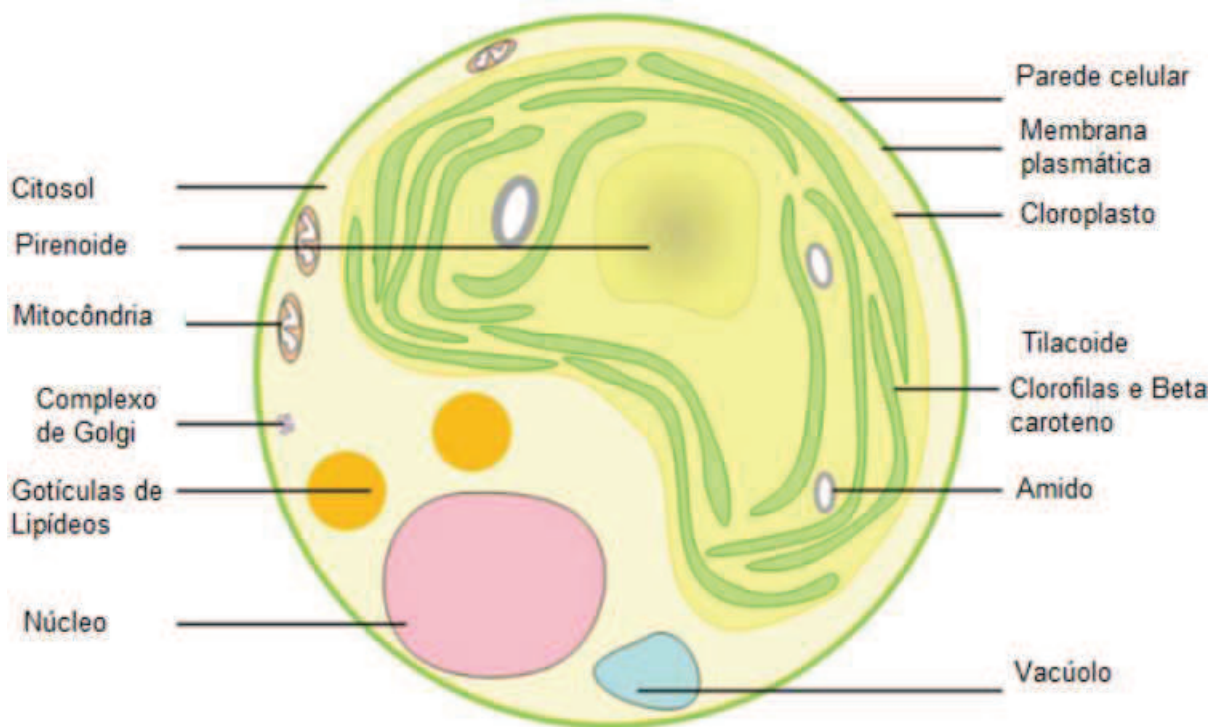
O termo “microalga” refere-se a microrganismos de dois grupos: procariontes e eucariontes. As microalgas procariontes são conhecidas como cianobactérias, cianófitas, algas azuis ou cloroxibactérias. Já as clorófitas ou algas verdes são micro-organismos eucariontes e se diferenciam pela presença de núcleo e organelas envolvidas por membranas. Do ponto de vista, filogenético apresentam ampla diversidade, pois não descendem de um único ancestral (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; BARSANTI et al., 2008).

A estrutura vegetativa principal das microalgas é chamada de talo que possui entre 0,2 μm a 2,0 μm . Apresentam variada morfologia podendo ser encontradas nas formas unicelular, colonial, cenobial, filamentoso e sifonoso (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Quanto à reprodução, podem ocorrer de forma sexuada e/ ou assexuada (LOURENÇO, 2006).

As algas pertencentes à divisão *Chlorophyta*, podem ser encontradas em quase todos os ambientes úmidos (REVIERS, 2010). Microalgas desse grupo possuem células com coloração verde, o que pode ser atribuído à presença de plastídios contendo pigmentos fotossintetizantes como clorofila *a* e clorofila *b* e apresentam como produto de reserva amido (ANDRADE et al., 2014a).

Em comparação com outras culturas, como as oleaginosas, as microalgas têm uma série de vantagens potenciais incluindo a alta produtividade por área e ciclo de crescimento rápido, a utilização de terras não cultiváveis e uma variedade de fontes de água para o cultivo, como por exemplo: águas de ambiente marinho, doce e águas residuais (WU et al., 2012). Na Figura 1 pode ser visualizado um exemplo de ultraestrutura de uma microalga verde.

Figura 1 – Ultraestrutura celular de microalgas da divisão *Chlorophyta*.



Fonte: Pignolet et al. (2013).

3.1.1 Metabolismo

As microalgas possuem uma notável variabilidade metabólica quanto à utilização de fontes de energia e carbono, algumas cepas são capazes de alterar o metabolismo conforme as condições ambientais estabelecidas. Dessa forma podem ser classificadas em quatro grupos de acordo com a obtenção de energia e carbono: fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (YANG; HUA; SHIMIZU, 2000; CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; SCOPARO, 2010).

O mecanismo fotoautotrófico ocorre quando as microalgas utilizam luz como fonte de energia e carbono inorgânico e CO_2 para síntese de energia química, por meio da fotossíntese (HUANG et al., 2010). Algumas espécies de microalgas além de crescerem sob condições fotoautotróficas podem também utilizar carbono orgânico em ambientes com pouca luz. Quando a microalga utiliza carbono orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono, denomina-se cultivo heterotrófico (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

No cultivo mixotrófico, as microalgas realizam fotossíntese e também conseguem assimilar, concomitantemente, compostos orgânicos como fonte de carbono para o crescimento. Isto significa que as microalgas são capazes de sobreviver em circunstâncias tanto fotoautótroficas ou heterotróficas ou ambas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Quando as microalgas requerem luz e utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono o cultivo é chamado de fotoheterotrófico. A principal diferença entre cultivo mixotrófico e fotoheterotrófico consiste que o último necessita de luz como fonte de energia, enquanto o cultivo mixotrófico pode, alternativamente, utilizar compostos orgânicos para esse propósito na ausência de luz. Dessa forma, o cultivo fotoheterotrófico necessita de açúcares e luz ao mesmo tempo (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004).

O cultivo em condições mixotróficas tem sido demonstrado como uma opção versátil, pois utiliza como fonte de energia a luz e compostos orgânicos e, como fonte de carbono, compostos inorgânicos e orgânicos. Pesquisas têm demonstrado que os compostos orgânicos dissolvidos em águas residuais como glicose, ácidos graxos de cadeia curta propiciam o crescimento de microalgas mixotróficas (ZHANG et al., 2014). Portanto, podem ser utilizados como fonte de nutrientes para o cultivo, efluentes agroindustriais como, por exemplo, a vinhaça, proveniente da indústria sucroalcooleira. Tal uso reduz os custos do processo e também contribui para a redução da carga orgânica presente no corpo d' água, por isso pode apresentar-se como uma possibilidade economicamente sustentável para a geração em larga escala de químicos a partir de microalgas (TELES et al., 2015).

3.1.2 Sistema de cultivo

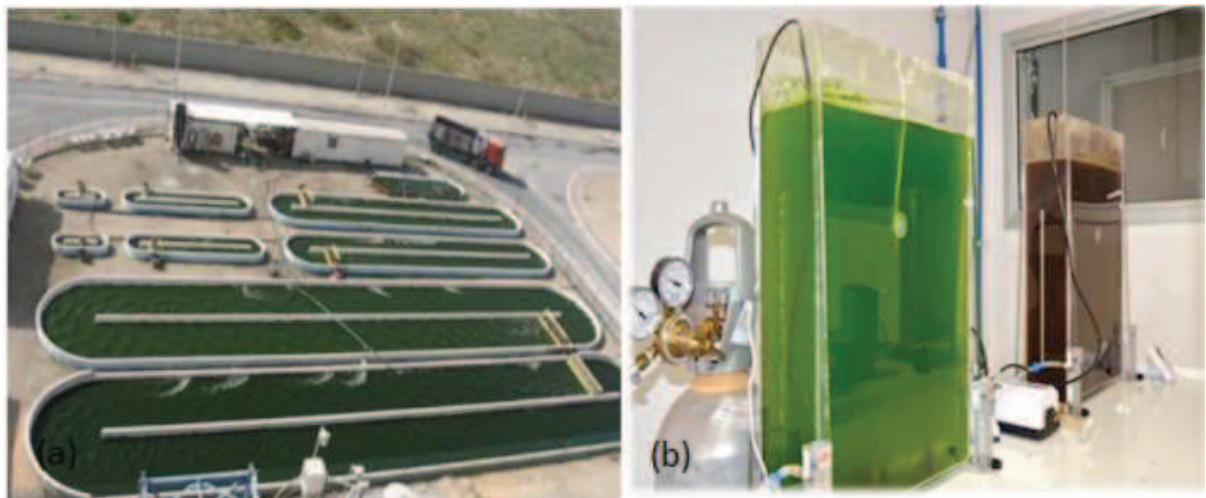
A utilização de tanques abertos para o cultivo de microalgas é o método mais usual. Lagoas abertas possuem diferentes formatos, cada uma tendo certas vantagens e desvantagens. Atualmente tem sido amplamente usadas lagoas do tipo pista de corrida conhecida como *raceway* que são lagoas de grande extensão e pouca profundidade, assim como, tanques circulares e lagoas fechadas (MASOJÍDEK et al., 2008).

Para produção de produtos de maior valor agregado fotobiorreatores fechados são mais promissores, pois o sistema fechado reduz os riscos de contaminação além de exigir menor área de cultivo, minimiza perdas de CO₂, possui fácil adaptação para várias espécies e pode proporcionar alta densidade de biomassa (PULZ, 2001; RICHMOND, 2000). Os fotobiorreatores por possuírem como vantagem menor área ocupada, não compete com terras agricultáveis, dessa forma, não há disputa pelo uso de áreas para a produção de alimentos (SUALI; SARBATLY, 2012).

Logo, o cultivo de cepas de microalgas em sistemas fechados, sob condições determinadas, permite o uso de biomassa para outras aplicações, como para produção de alimentos (HEMPEL; PETRICK; BEHRENDT, 2012).

Na Figura 2 tem-se a ilustração de uma lagoa aberta e de um fotobiorreator.

Figura 2 – Sistema de cultivos de microalgas em lagoas abertas tipo *raceway* (a) e fotobiorreatores fechados de geometria em placas planas (b).



Fonte: La Monica (2008) e Santana (2016).

3.2 Biorrefinarias

O termo biorrefinaria pode ser definido como um processamento sustentável em uma planta industrial que integra etapas de conversão da biomassa para produção de combustíveis, produtos químicos de alto valor agregado e energia (REE; VANNEVELINK, 2007). Isto poderia ser feito por meio do uso de várias tecnologias de uma forma rentável e ambientalmente sustentável. O conceito não é novo, no entanto, ele contribui para tornar a produção de biocombustíveis economicamente viáveis (GOUVEIA, 2011).

De acordo com Nogueira et al. (2008) e Cherubini (2010), compreende um complexo integrado de processos e maquinário capaz de produzir diferentes produtos (combustíveis de transporte, químicos e energia) com base em diferentes biomassas.

O avanço em longo prazo em pesquisas na área de biocombustíveis resultou em quatro classificações quanto ao tipo de biomassa (DEMIRBAS, 2011), a saber: *i)* Biocombustíveis de primeira geração, baseados em culturas agrícolas alimentícias, como milho, soja e cana-de-açúcar; *ii)* Segunda geração, elaborados a partir de biomassa celulósica, culturas não alimentares e resíduos agrícolas (HARUN et al., 2014); *iii)* Na terceira geração utilizam como fonte de biomassa algas, conhecido de forma genérica como combustível de algas; *iv)* Pertencem a quarta geração os biocombustíveis que aplicam técnicas da engenharia genética e engenharia bioquímica como forma de otimizar a eficiência produtiva de micro-organismos (HARUN et al., 2014).

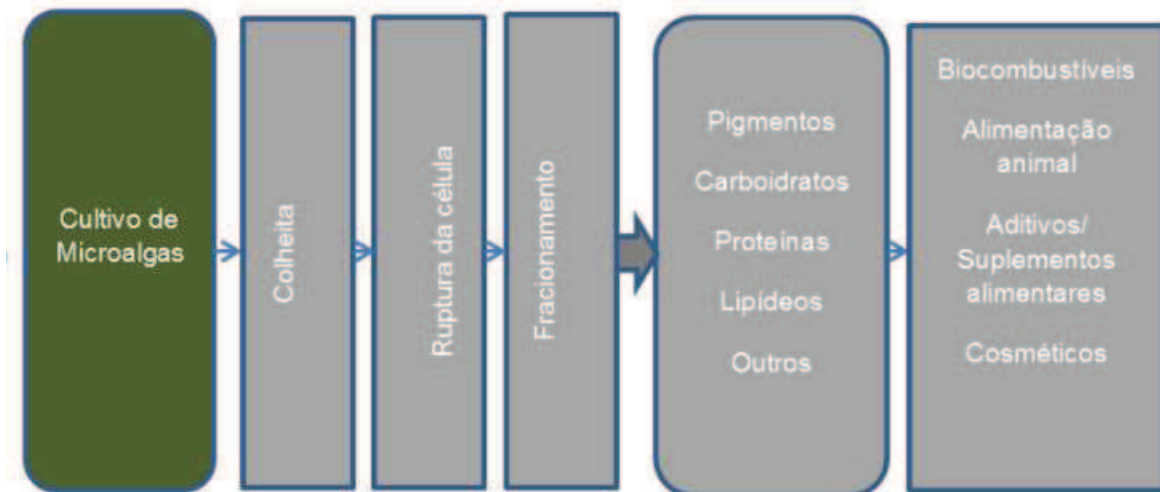
Os custos de produção de energia à base de microalgas ainda são mais elevados do que dos tradicionais combustíveis fósseis, isso se deve pela limitação do uso de recursos hídricos suplementados com elementos essenciais para o crescimento de microalgas como: nitrogênio, fósforo e potássio o que constitui um grande obstáculo para a redução de custos (BEHZADI; FARID, 2007; KOMOLAFE et al., 2014).

Entretanto, foi demonstrado que o processo produtivo de biocombustíveis de algas feitos com insumos comprados seria superior a US\$ 400/barril, mas a integração de infra-estrutura e uso de águas residuais provenientes das próprias usinas poderiam reduzir os custos líquidos da produção de biocombustíveis para menos de US\$ 30/barril. (LUNDQUIST et al., 2010).

Dessa forma, o cultivo de microalgas acoplado ao aproveitamento de águas residuais pode ser ressaltado como uma alternativa promissora e por isso esses micro-organismos têm atraído considerável.

atenção recentemente como uma fonte de matéria-prima energética (BRENNAN; OWENDE, 2010; FENTON; ÓHUALLACHÁIN, 2012). Na Figura 3 está apresentado o esquema de uma biorrefinaria de microalgas.

Figura 3 – Esquema geral do conceito de biorrefinaria de algas.



Fonte: Adaptado de Markou e Nerantzis, (2013).

Para aproveitar melhor a potencial sinergia entre o aproveitamento de águas residuais e a produção de biocombustíveis de algas, é necessário que as cepas de algas tenham maior crescimento em condições mixotróficas, porque águas residuais geralmente contêm quantidades significativas de matéria orgânica. Além disso, algas que crescem bem em condições de pouca luz também são vantajosas para o cultivo em águas residuais, as quais geralmente apresentam maior turbidez reduzindo a penetração da luz (ZHOU et al., 2015). A integração da produção de biomassa de algas com tratamento de águas residuais é hoje reconhecida como a solução mais provável para apoiar economicamente esta indústria (OLGUIN, 2012).

3.3 Indústrias Sucroenergéticas

O setor de açúcar e álcool é de suma importância em função das grandes áreas cultivadas e do processo de expansão da demanda por biocombustíveis no país e no mundo. Dadas as características naturais de seu território, bem como a larga experiência agrícola e industrial no setor

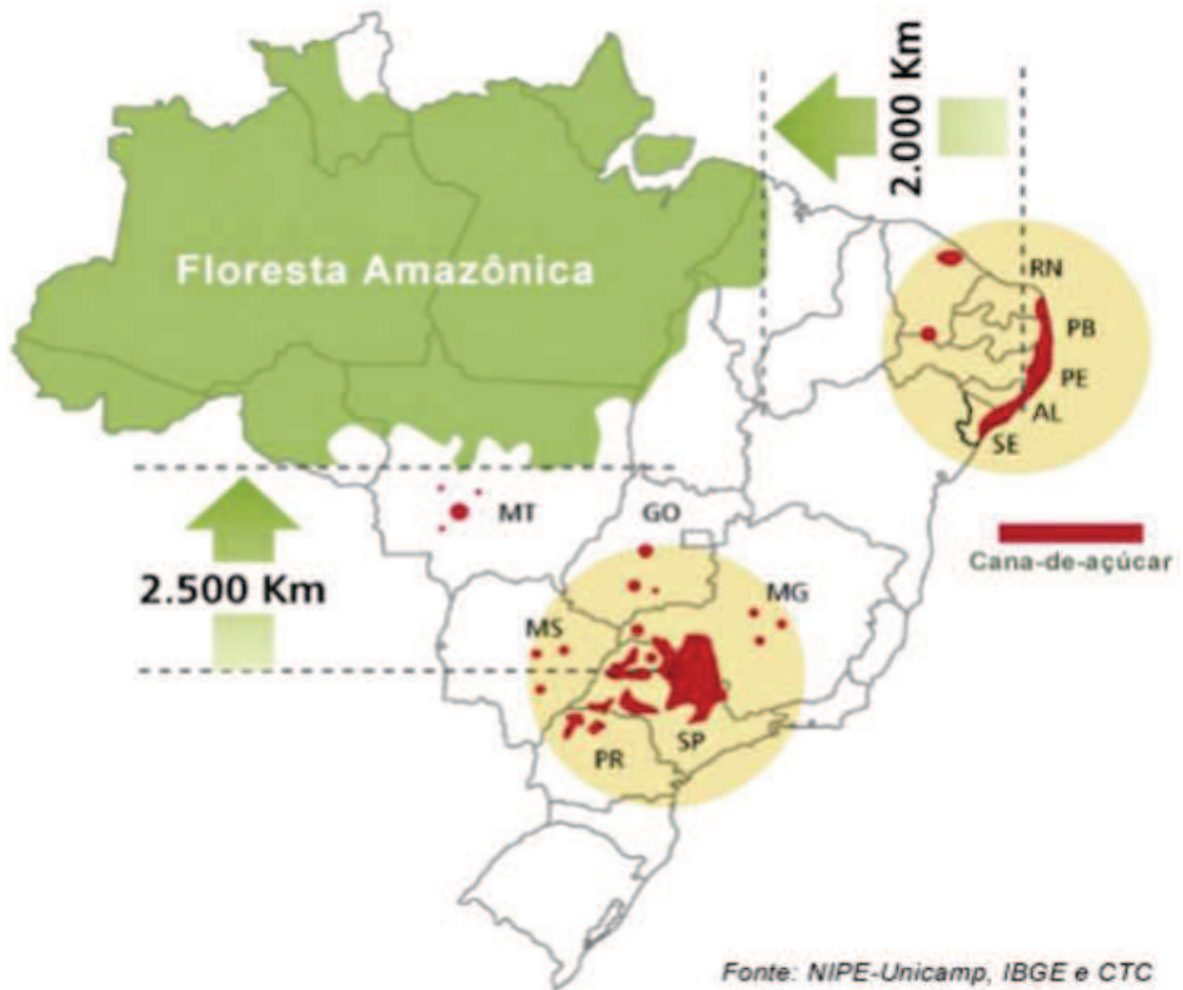
sucroenergético, o Brasil apresenta condições bastante favoráveis para se manter como um dos líderes mundiais na produção de etanol (BNDES, 2014).

O Brasil deverá produzir na safra de 2015/2016, 655,16 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em cerca de 8,95 milhões de hectares. A projeção é que a produção do país tenha um incremento de 3,2% em relação à safra passada que só não é maior em razão da pequena redução de área plantada no país e a queda na produtividade nos canaviais de São Paulo, maior estado produtor devido um impacto hídrico da safra passada (CONAB, 2015).

A área cultivada no Brasil com cana-de-açúcar que deverá ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16 é de 8.954,8 mil hectares. São Paulo, maior produtor, possui 51,8% (4.648,2 mil hectares), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil hectares), Minas Gerais com 8% (715,3 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 8% (713,7 mil hectares), Paraná com 6,8% (613,4 mil hectares), Alagoas com 4,2% (380,3 mil hectares), Pernambuco com 3,1% (273,4 mil hectares) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil hectares).

Estes oito estados são responsáveis por 94,7% da produção nacional. Na Figura 4 pode-se observar o mapa da localização da produção de cana-de-açúcar no Brasil (CONAB, 2015).

Figura 4 – Localização das zonas produtoras de cana-de-açúcar no Brasil.



A produção de etanol total consolidou-se em 28,66 bilhões de litros na safra 2014/15 e está estimada em 28,52 bilhões de litros para safra 2015/16, uma redução de 139,69 milhões de litros, ou 0,5% (CONAB, 2015).

3.3.1 Vinhaça

A vinhaça, também denominada restilo ou vinhoto trata-se de uma água residuária resultante do processo produtivo do etanol, gerada durante a etapa de destilação da mistura alcoólica derivado da fermentação. Trata-se de um efluente que apresenta elevada concentração de matéria orgânica, concentrações significativas de macro e micronutrientes, bem como características ácidas e corrosivas (GARCIA; FUESS, 2012).

De acordo com Menezes (1980), BNDES e CGEE (2008) a partir de uma tonelada de cana-de-açúcar são produzidos aproximadamente 70 a 90 litros de etanol, acarretando a geração de 800 a 1.000 litros de vinhaça. Estima-se que para cada litro de etanol são produzidos entre dez e dezoito litros de vinhaça (ROSSETTO; SANTIAGO, 2015).

A vinhaça tem sido amplamente usada para a fertirrigação de canaviais, entretanto, essa prática tem sido associada com a depreciação das características de fertilidade do solo no médio/longo prazo (CABELLO; SCOGNAMIGLIO; TERÁN, 2009). Além disso por apresentarem nutrientes sob a forma de nitrogênio e fósforo, os efluentes de destilarias podem ocasionar à eutrofização dos corpos d' água (MOHANA et al., 2009; SATYAWALI; BALAKRISHNAN, 2008).

3.3.2 Dióxido de carbono

Desde o começo da revolução industrial, em meados do século XVIII, a liberação de gases de efeito estufa (GEE) provenientes de atividades antropogênicas ocasionou em um significativo aumento nas concentrações de dióxido de carbono (CO₂) atmosférico (KUMAR; PRAJAPATI, 2010).

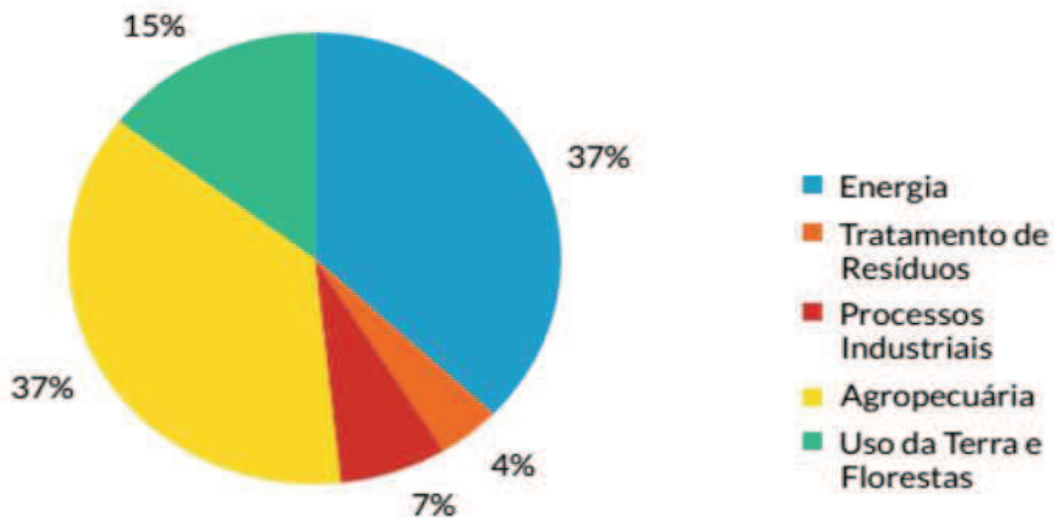
As emissões de CO₂ provenientes da queima de combustíveis de origem fóssil e processos industriais contribuíram com aproximadamente 78% do aumento das emissões totais de gases de efeito estufa entre 1970-2010 (PACHAURI; MEYER, 2014).

No mundo, a eliminação de CO₂ da combustão de combustíveis fósseis e de processos industriais aumentou em 2013 para o novo recorde de 35,3 bilhões de toneladas (OLIVIER et al., 2014.).

Em 2012 a emissão total de dióxido de carbono no Brasil foi estimada em 1.203.424 ¹Gg CO₂ eq, referentes há cinco setores denominados: energia, processos industriais, agropecuária, uso da terra e florestas e tratamento de resíduos. O setor de processos industriais, no qual a indústria sucroalcooleira pertence foi responsável por 85.365 Gg CO₂ eq. Na Figura 5 observa-se o percentual de emissão de dióxido de carbono por cada um dos cinco setores (BRASIL, 2014).

¹Gg CO₂ eq: milhares de toneladas de equivalente de dióxido de carbono, proveniente da métrica usual do Potencial de Aquecimento Global (Global Warming Potential – GWP) atualmente utilizada para inventários nacionais como fator de ponderação para se chegar à essa unidade comum.

Figura 5 – Emissão de CO₂ eq. no Brasil em 2012 em cinco setores.



Fonte: Brasil (2014).

As microalgas são micro-organismos que apresentam elevadas taxas de crescimento e fixação de CO₂ em comparação com mecanismos convencionais de captura de dióxido de carbono como, por exemplo: florestas, agricultura e plantas aquáticas (LI et al., 2008). Portanto, possuem potencial de uso para a remoção de CO₂, usando a energia solar com eficiência até 10 vezes maior do que a de plantas terrestres (SINGH; AHLUWALIA, 2013).

Estima-se que a fixação de carbono por cultivos de microalgas em condições ótimas estaria em torno de 11 a 36 toneladas de C ha/ano, o que representa uma produtividade de aproximadamente três a treze vezes os valores obtidos pelo reflorestamento, cerca 3 a 4 toneladas C ha/ano (BORGES et al., 2007).

3.4 Biomassa algal como fonte de bioprodutos e energia

As microalgas constituem uma importante fonte de biomoléculas, com uma ampla gama de destinações podendo ser aproveitadas para o uso comercial. Esses organismos são capazes de produzir proteínas, lipídeos, vitaminas, pigmentos e outras moléculas como suplementos de saúde, alimentação humana e animal, cosméticos e para a produção de energia

(RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013; BARRA et al., 2014).

A composição química da biomassa de microalgas baseia-se majoritariamente nas frações de pigmentos, carboidratos, proteínas e lipídeos. Esse conteúdo sofre alterações de acordo com o gênero, espécie ou estirpe (ANDRADE et al., 2014c). Segundo Valenzuela-Espinoza; Núñez-Cebrero (2002), o teor de proteínas é superior na fase exponencial de crescimento e na fase estacionária tem-se um aumento dos carboidratos.

3.4.1 Carboidratos

O termo “carboidratos” refere-se a ambos os monômeros e polímeros de açúcares e derivados de açúcar, tais como os ácidos urônicos e açúcares aminados. Os polímeros podem ter enorme diversidade de pesos moleculares, dependendo do grau de polimerização, mas coletivamente constituem a maior fração em fontes de biomassa tipicamente terrestres (SAEMAN; BUBL; HARRIS, 1945).

Do ponto de vista químico, podem ser conceituados como polihidroxialdeídos, polihidroxiacetonas, polihidroxiálcoois, polihidroxiácidos unidos por ligações hemiacetálicas (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007). A composição elementar geral, $(C_x(H_2O)_y)$, demonstra que as moléculas apresentam átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio na mesma proporção que ocorrem na água. No entanto, a grande maioria dos carboidratos produzidos por organismos vivos não têm essa fórmula empírica simples. Em vez disso, a maior parte dos carboidratos encontrados na natureza é sob a forma de oligossacáridos ou polissacarídeos. Os compostos de baixo peso molecular são muitas vezes obtidos por despolimerização de polímeros naturais (FENNEMA, 1996).

Os carboidratos em microalgas verdes podem ser encontrados na parede celular rígida à base de celulose, sendo seu principal composto de armazenamento, o amido. Algumas algas vermelhas e dinoflagelados também utilizam o amido como carboidrato de reserva. Algas marrons e diatomáceas, por exemplo, podem acumular carboidratos, tais como laminarina, manitol ou fucoidina como fonte energética (U.S. DOE, 2010).

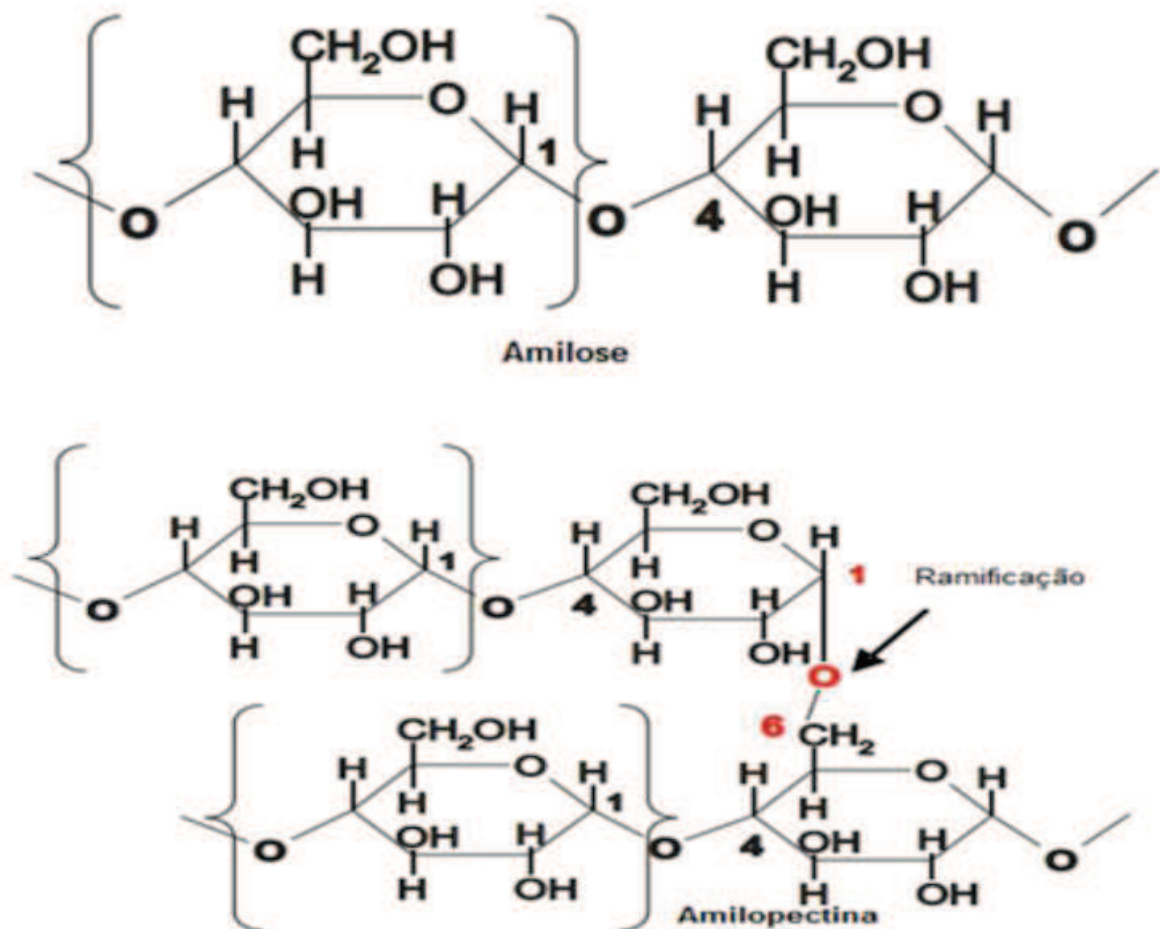
Os polissacarídeos de algas podem ser hidrolisados para açúcares redutores, que têm grande aplicação na produção de bioetanol (FU et al., 2010; SUN; CHENG, 2002).

As algas por sua composição com elevado teor em carboidratos em algumas espécies, constituem uma opção para a produção de bioetanol. Os carboidratos em algas podem ser encontrados na parede celular celulósica, isenta de lignina e hemicelulose em seu conteúdo e no citoplasma, o amido como principal fonte (ROSENBERG et al., 2008; SUBHADRA, 2010). Além disso, uma vez que os carboidratos de microalgas contenham principalmente hexoses, os problemas associados com a fermentação de pentose podem ser essencialmente eliminados, o que proporciona maior rendimento na produção de bioetanol (SIAUT et al., 2011).

3.4.1.1 Amido

Amido possui características químicas e físicas únicas e sua qualidade nutricional o diferencia de todos os outros carboidratos. O amido é o único carboidrato que ocorre naturalmente como partículas ou grânulos. Os grânulos de amido são relativamente densos e ligeiramente insolúveis em água fria. A estrutura química do amido é composta por dois polímeros: um polissacarídeo essencialmente linear chamado de amilose, e um polissacarídeo altamente ramificado chamado de amilopectina (FENNEMA, 1996). Na Figura 6 tem-se a estrutura dos dois polímeros.

Figura 6 – Estrutura química das moléculas constituintes do amido: amilose e amilopectina.



Fonte: Adaptado de Pinheiro et al. (2005).

3.4.2 Proteínas

As proteínas são polímeros de alto peso molecular, cujas unidades elementares são os aminoácidos, ligados entre si por ligações peptídicas. Estes compostos sofrem mudanças em suas conformações com muita facilidade tornando laborioso seu estudo. Estas macromoléculas biológicas estão relacionadas a várias funções fisiológicas, pois participam da regeneração de tecidos e da catálise das reações químicas de organismos vivos (enzimas ou hormônios), sendo essenciais nas reações imunes e no processo de crescimento e reprodução (BOBBIO; BOBBIO, 1995).

Na biomassa de algas, as proteínas correspondem a um dos principais constituintes, com até 50% do peso seco. Entretanto, esse conteúdo proteico pode mudar drasticamente ao longo de seu ciclo de vida (LAURENS et al., 2014).

Dessa forma, essa fração pode ser ressaltada como fonte promissora para ração animal e suplementos alimentares, pois apresenta alta qualidade nutritiva e pode ser comparada com a de outras proteínas alimentares, devido ao seu perfil e proporção de aminoácidos (BECKER, 2007). Assim, as proteínas desempenham um papel importante em um contexto de biorrefinaria de algas (WILLIAMS; LAURENS, 2010). Na Tabela 1 tem-se a composição de proteínas de algumas microalgas.

Tabela 1 – Composição proteica de microalgas de diferentes espécies.

Alga	Proteína Bruta (%)
<i>Spirulina maxima</i>	44.9
<i>Chlorella vulgaris</i>	38.0
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10.2
<i>Diacronema vlkianum</i>	38.4
<i>Isochrysis galbana</i>	39.6

Fonte: Adaptado de Batista et al. (2013).

3.4.3 Pigmentos

Os pigmentos são compostos químicos coloridos que absorvem e refletem certos comprimentos de onda da luz visível. Pertencem ao sistema fotossintético de microalgas, agindo como captadores de energia por meio da luz. Os principais pigmentos são agrupados em clorofilas, carotenoides e ficobilinas. As clorofilas estão presentes em todas as plantas superiores e algas fotossintéticas, enquanto que os carotenoides estão presentes na maioria das algas e as ficobilinas encontradas em cianobactérias e em algumas algas vermelhas (SPOLAORE et al., 2006).

O teor de pigmentos em microalgas depende das condições de cultivo. Vários pigmentos secundários acumulam quantidades mais elevadas em condições de estresse, enquanto clorofilas, em geral degradam-se sob injúria. Portanto, seu conteúdo na biomassa diminui significativamente (MARKOU; NERANTZIS, 2013).

3.4.3.1 Carotenoides

Os carotenoides são compostos tetraterpenóides (C40) formados pela ligação de oito unidades isoprenóides (C5), exceto na posição central. Os grupos metila centrais estão separados por seis carbonos, ao passo que os demais, por cinco. A característica de maior destaque nestas moléculas é um sistema extenso de duplas ligações conjugadas, onde se observa o grupo cromóforo que confere aos carotenoides as suas cores atraentes (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA; AMAYA- FARFAN, 2008).

Existem duas classes de ocorrência natural dos carotenóides como: carotenos de licopeno, β -caroteno e α -caroteno que são hidrocarbonetos lineares ou ciclizado em uma ou em ambas as extremidades das moléculas e as xantofilas, tais como a astaxantina, cantaxantina, luteína e zeaxantina que são os derivados oxigenados de carotenos (V'LCHEZ et al., 2011). Mais de 600 diferentes carotenoides são conhecidos por estarem presentes na natureza e sua distribuição, estrutura molecular ou a presença de vias de biossíntese específicas têm sido sugeridos como ferramentas úteis para a classificação de algas (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013).

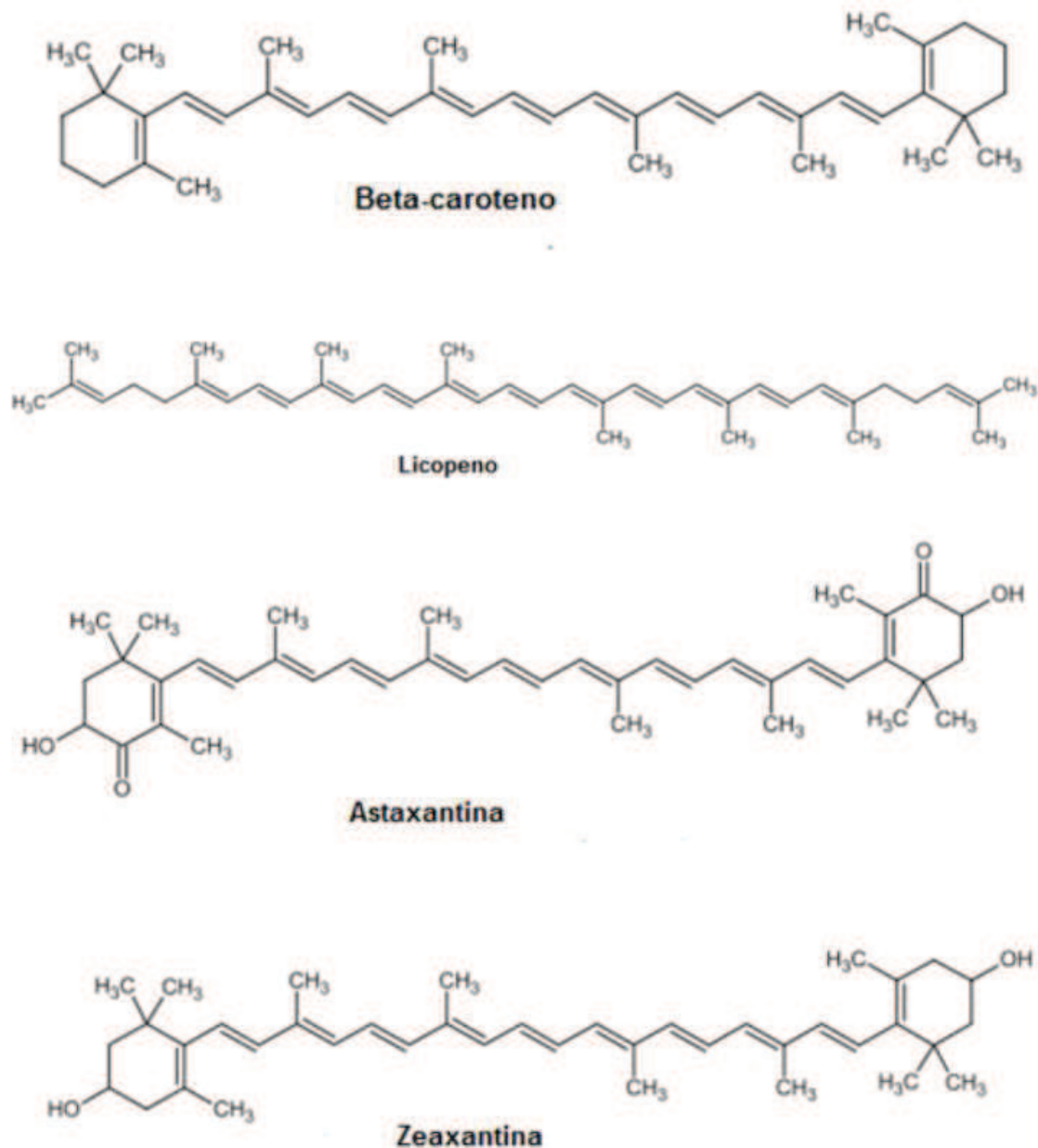
Na maioria das algas verdes os carotenoides são sintetizados dentro dos plastídeos e se acumulam no seu interior (ABURAI et al., 2013). No entanto, algumas microalgas como, por exemplo, *Haematococcus sp.* podem acumular xantofilas em corpos oleosos no citoplasma, fora de plastídios (LEMOINE; SCHOEFS, 2010; GRÜNEWALD; HIRSCHBERG; HAGEN, 2001).

Há crescente interesse em encontrar novos antioxidantes eficazes a partir de fontes naturais, a fim de minimizar danos oxidativos às células vivas e evitar deterioração oxidativa de produtos comercializados como alimentos, produtos farmacêuticos ou cosméticos (VALKO et al., 2006).

Os carotenoides têm sido uma opção promissora, pois se sabe que podem ser utilizados como moléculas antioxidantes. Esses pigmentos têm a capacidade de eliminar os radicais livres, protegendo assim as células e tecidos dos danos oxidativos. Podem ser úteis na prevenção da deterioração dos alimentos durante o processamento e armazenamento e também influenciar a sinalização celular que pode desencadear vias reguladoras sensíveis (RAO et al., 2010).

Na Figura 7 observa-se a estrutura molecular de alguns carotenoides comuns em algas

Figura 7 – Estrutura química de alguns carotenoides encontrados em algas.



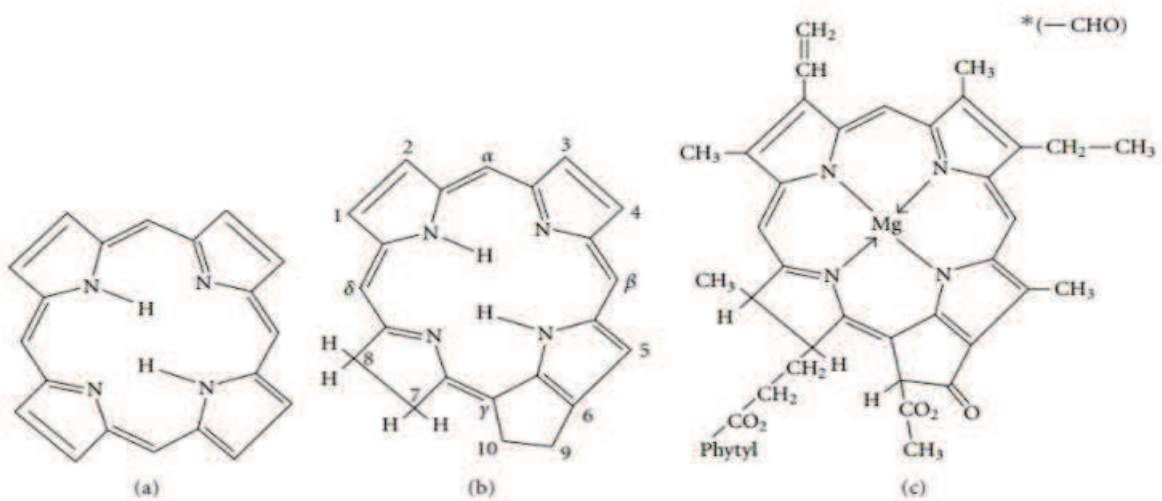
3.4.3.2 Clorofilas

As clorofilas são moléculas estruturalmente complexas, pertencentes à classe das porfirinas, constituídas por quatro anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas e a molécula contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis (ANDRADE et al., 2014).

No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico, sofre esterificação por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente o fitol, conferindo à clorofila caráter hidrofóbico (GROSS, 1991; RÜDIGER, SCHOCH, 1988). Esses pigmentos são de ampla ocorrência no reino vegetal, em algas e em algumas bactérias fotossintéticas (ANDRADE et al., 2014b). Possuem atividade quelante e podem ser utilizadas como auxiliares na recuperação do fígado e tratamento da úlcera (PUOTINEN, 1999).

Estima-se que em condições ótimas de crescimento as microalgas possam acumular até 4% em seu peso seco de clorofila, entretanto para *Chlorella* verificou-se maiores percentuais (NAKANISHI, 2001). Devido à forte coloração verde desses pigmentos e da demanda dos consumidores por alimentos naturais, as clorofilas têm ganhando importância como aditivo alimentar. Isto, por sua vez, tem incentivado as indústrias de alimentos a substituírem pigmentos artificiais por corantes naturais como à base de clorofila. No entanto, devem ser desenvolvidos processos de *downstream* para purificar clorofila a e b a partir de algas (HARUN et al., 2010). Na Figura 8 podem ser verificadas as estruturas químicas das clorofilas com seus respectivos constituintes.

Figura 8 – Estrutura das clorofilas e seus respectivos constituintes (a) macrociclo de porfirina; (b) forbina. (c) clorofila a, clorofila b é uma variante com o grupo metila na posição 3 ser substituído por um grupo formilo.



Fonte: Humphrey (1980).

3.4.4 Fração lipídica das microalgas

Pertencem ao grupo dos lipídeos o conjunto de compostos químicos que ao contrário da maioria dos compostos orgânicos não são caracterizados pelo grupo funcional em comum, mas pelo grau de solubilidade em solventes orgânicos e pouca solubilidade em água (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Os lipídeos são macronutrientes e podem ser classificados em lipídeos simples (neutros), lipídeos compostos e lipídeos derivados. Na primeira classe, há duas subdivisões que correspondem: as gorduras, que são ésteres formados a partir de ácidos graxos e glicerol também conhecidos como glicerídeos e as ceras que são constituídas principalmente por ésteres originários de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa. Os lipídeos compostos, por sua vez, além do grupo éster ligados ao ácido graxo apresentam outros grupamentos químicos, como exemplo tem-se: os fosfolipídeos que são ésteres formados a partir de ácidos graxos, glicerol e ácido fosfórico e outros grupos geralmente nitrogenados. Já os glicolipídeos apresentam em sua estrutura ácidos graxos, grupo nitrogenado e um carboidrato. A terceira classe, os lipídeos derivados são compostos obtidos pela hidrólise dos lipídeos neutros e compostos que apresentam propriedades de lipídeos, como os esteróis, hidrocarbonetos de cadeia longa, carotenoides e vitaminas lipossolúveis (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

Nas microalgas podem ser encontrados como produto de estocagem energética os triacilgliceróis. Os glicolipídeos, por sua vez, são estruturas presentes na parede celular (MOLINA; MEDINA; GIMÉNEZ, 1999). Na fase ótima de crescimento contêm uma pequena quantidade de triglicerídeos, devido à maioria dos recursos serem utilizados para o crescimento celular. No entanto, podem acumular uma quantidade considerável de triglicerídeos no momento da indução de estresse celular (RODOLFI et al., 2009).

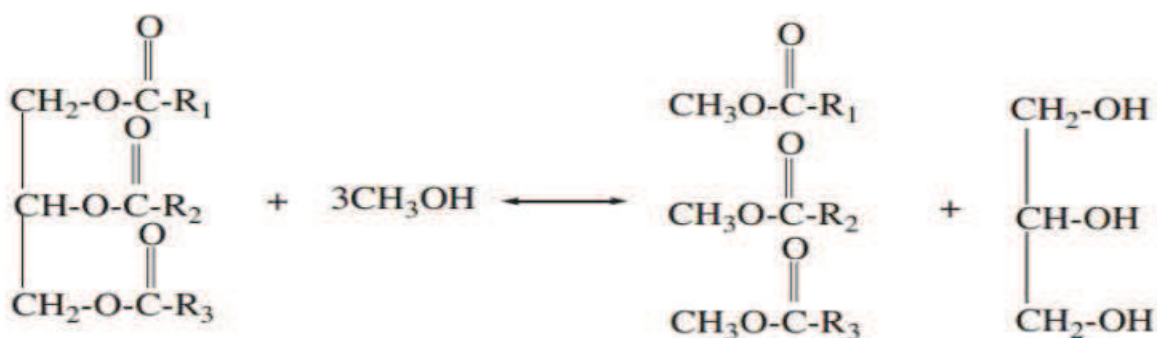
De acordo com D'oca et al. (2011), a composição dos ácidos graxos nas microalgas é variável conforme a cepa, o que proporciona a diferenciação do conteúdo em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

Pode-se ressaltar que apesar da grande variabilidade na constituição dos ácidos graxos, há uma predominância em ácidos graxos insaturados como o palmítoleico, oleico, linoleico e linolênico. Os ácidos graxos saturados, como o palmítico e o esteárico também são encontrados, mas em menor proporção.

Segundo Knothe (2008), os ácidos graxos monoinsaturados são úteis para produção do biodiesel. Entretanto, as microalgas podem conter em sua composição ácidos graxos poliinsaturados que devem estar presentes em concentração moderada no biodiesel, devido à baixa estabilidade oxidativa (KNOTHE, 2011).

A produção comercial de biodiesel ou éster metílico do ácido graxo (FAME) envolve a transesterificação por uso de catalisador alcalino de triglicerídeos encontrado em culturas oleaginosas com metanol. No entanto, a demanda para essas culturas como uma fonte de alimento juntamente com a disponibilidade finita de terras aráveis, faz o seu cultivo para os biocombustíveis insustentável (CHISTI, 2007). Na Figura 9 tem-se a representação do processo de transesterificação dos triglicerídeos.

Figura 9 – Esquema do processo de transesterificação dos triglicerídeos.



Fonte: Adaptado de Lam et al. (2010).

3.4.5 Poder Calorífico

Conforme Crockford e Knight (1977), muitos calores podem ser determinados pela medida direta, sendo isto válido especialmente para os calores de combustão. Na combustão direta de uma amostra na atmosfera de oxigênio, o calor liberado é determinado mediante processo conveniente.

Normalmente, utiliza-se uma bomba calorimétrica para a determinação do poder calorífico de um material combustível, obtendo-se o poder calorífico

superior, pois a água no combustível é evaporada e condensada durante sua combustão (FONTES, 1994).

Segundo Sturm e Lamer (2011), a combustão direta de biomassa de algas pode ser uma alternativa mais viável de fonte de energia do que a produção de biocombustíveis, especialmente quando a fração lipídica da biomassa seca é baixa. Assim, pode-se evidenciar a aplicabilidade do poder calorífico de microalgas frente ao variável teor de lipídeos e diversidade da composição para produção de energia (CHIA; LOMBARDI; MELAO, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Biomassa algal

As amostras de biomassa algal utilizadas neste trabalho são derivadas de duas cepas de microalgas, *Micractinium sp.* Embrapa|LBA32 e *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa, localizada em Brasília-DF. As amostras foram produzidas em fotobiorreatores tipo placas planas, com sistema de agitação *air lift*, realizados com aeração (60 L/h) com CO₂ a 5%, durante o projeto de Santana (2016).

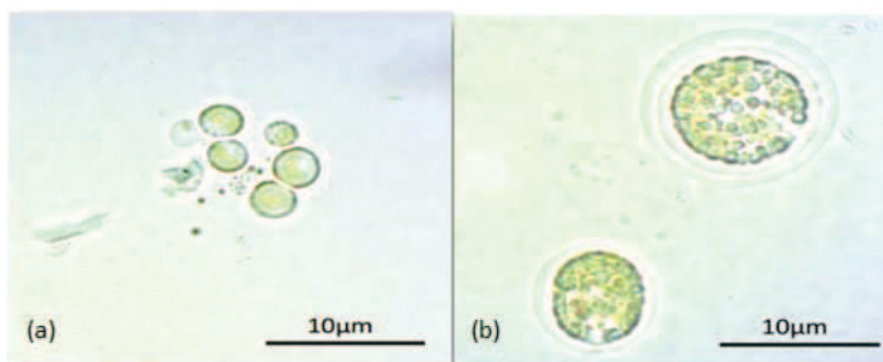
Foram utilizadas duas formulações distintas como meio de cultivo: i) Vinhaça clarificada quimicamente não diluída (100%); ii) Vinhaça bruta diluída em água destilada para a concentração de 50% (Santana, 2016). No procedimento de clarificação da vinhaça foram utilizados 3 g de cal hidratada/L de vinhaça, essa solução foi mantida em repouso por 40 min. Após este período, o material foi centrifugado a 800 x G e o pellet descartado. O pH foi ajustado para 8 por meio da adição de hidróxido de sódio e o material obtido foi autoclavado por 15 minutos a 1 atm. A concentração utilizada foi de 100% no meio de cultivo (Santana, 2016). Como controle foi feito o cultivo em meio *Bold's Basal Medium* (NICHOLS, 1973).

As microalgas foram cultivadas por 72 h, colhidas por centrifugação, lavadas com água destilada e congeladas a -20 °C. Logo após, realizou-se a liofilização da biomassa. Todo o procedimento de cultivo pode ser verificado em Santana (2016). Na Tabela 2 são apresentados os dados de produtividade diária de biomassas obtidas das cepas de microalgas utilizadas nesse estudo. Na Figura 10 são mostradas microscopias ópticas das duas cepas usadas nesse estudo. As biomassas foram liofilizadas e maceradas antes de serem efetuadas as análises da composição centesimal. Em todas as determinações analíticas foram executadas 3 réplicas de cada amostra. Na Figura 11 podem ser observadas as biomassas utilizadas nos métodos analíticos.

Tabela 2. Produtividade diária de biomassa de microalgas ($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)

Amostra	Meio cultivo	Produtividade média biomassa ($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)
	BBM	$0,10 \pm 0,02$
Embrapa	Vinhaça 50%	$0,18 \pm 0,01$
LBA 32	Vinhaça 100%	$0,16 \pm 0,02$
	BBM	$0,13 \pm 0,02$
Embrapa	Vinhaça 50%	$0,18 \pm 0,02$
LBA 40	Vinhaça 100%	$0,22 \pm 0,01$

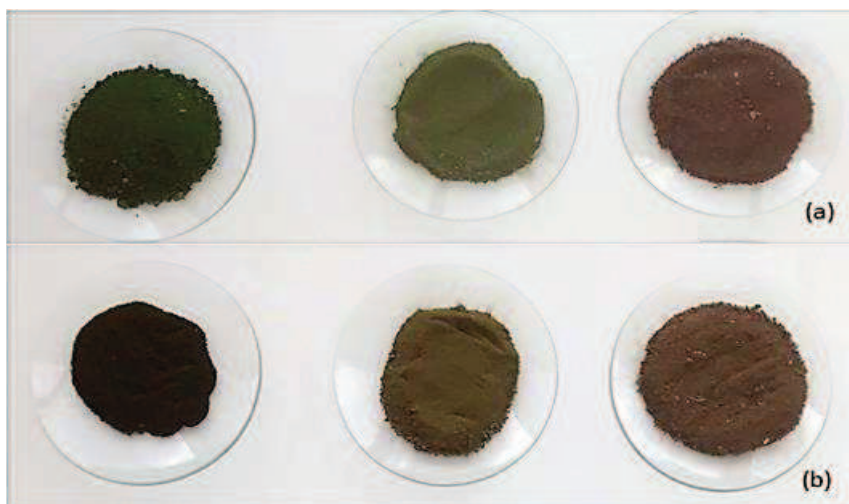
Fonte: Santana (2016).

Figura 10 – Observação microscópica de *Micractinium* sp. (a) e *Chlamydomonas biconvexa* (b).

4.2 Análises

Todas as análises de caracterização da biomassa foram realizadas no Laboratório de Química de Biomassa e Biocombustíveis (LQB) da Embrapa Agroenergia.

Figura 11 – Amostras de biomassas liofilizadas das cepas de microalgas em estudo (a) *Micractinium sp.* dos cultivos em meio BBM, 50% Vinhaça e 100% vinhaça clarificada da esquerda para direita (b) *Chlamydomonas biconvexa* dos cultivos em meio BBM, 50% Vinhaça e 100% vinhaça clarificada da esquerda para direita.



4.2.1 Determinação de sólidos totais e cinzas

O teor de sólidos totais e cinzas foram realizados seguindo metodologia proposta por Wychen e Laurens (2013c), do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), onde foi empregada estufa com ventilação e renovação de ar, marca Marconi, modelo MA03513BX e forno mufla microprocessado, marca Quimis, modelo Q318S24. Os dados obtidos foram determinados por gravimetria em balança analítica da marca Shimadzu, modelo AUX320 até peso constante. Pesou-se aproximadamente 100,0 mg de amostra em cada uma das réplicas a serem analisadas

Foram necessários 24 h de secagem à 60 °C. Os teores de sólidos totais foram calculados de acordo a equação 4.1 e o peso seco das amostras na equação 4.2.

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{\text{Massa (cadinho+amostra inicial)} - \text{Massa cadinho}}{\text{Massa amostra final}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Peso seco} = \frac{\text{Massa amostra seca} \times \% \text{ Sólidos totais}}{100} \quad (4.2)$$

A partir das amostras obtidas de sólidos totais, foi feita a análise de cinzas. As biomassas secas foram incineradas à 575 °C em forno tipo Mufla por 3 h. Ao término do processo, os cadinhos foram retirados e arrefecidos à temperatura ambiente em dessecadores e pesados. Os cálculos dos teores de cinzas foram obtidos a partir da equação 4.3:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{Massa cadinho + cinzas} - \text{Massa cadinho}}{\text{Peso seco amostra}} \times 100 \quad (4.3)$$

4.2.2 Determinação de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

A análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio foi executada conforme norma D5373 – 14 (ASTM, 2014). Como padrão de calibração foi utilizado a acetanilida. As amostras previamente secas em estufa ventilada a 105 °C foram analisadas em analisador elementar CHNS/O Perkin Elmer, modelo PE2400. As amostras de microalgas foram pesadas em ultramicrobalança AD6, acoplada ao próprio equipamento, a faixa de massa utilizada foi entre 20,0 mg e 30,0 mg. Os dados alcançados foram expressos em % de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

4.2.3 Poder calorífico superior (PCS)

O poder calorífico superior foi determinado de acordo com norma D5865-13 (ASTM, 2013). O procedimento iniciou-se com a confecção de cápsulas das amostras de microalgas em triplicata a partir da prensagem em prensa para pastilhador, marca Shimadzu, modelo SSP-10A. Foi feita uma adaptação em relação à quantidade de amostra e por isso as pastilhas pesadas apresentaram entre 200,0 mg e 400,0 mg de biomassa algal.

As cápsulas produzidas foram acondicionadas em cadinhos de aço inox previamente tarados e pesados em balança analítica.

O PCS da biomassa algal foi analisado por meio de bomba calorimétrica, marca LECO Corporation, modelo AC600.

A calibração da bomba calorimétrica foi realizada com material de referência, ácido benzoico. Para esse estudo as pastilhas de ácido benzoico apresentam PCS conhecido de 6317,0±9,0 cal/g.

Os dados foram obtidos em cal/g, entretanto foram transformados para a unidade SI KJ/kg.

4.2.4 Teor de amido

A fração de amido foi determinada utilizando protocolo de Sluiter e Sluiter (2008) do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Aproximadamente 0,100 g de algas liofilizadas foram pesadas em balança analítica. As massas foram transferidas para tubos de centrifuga de 50 mL com barras magnéticas. Adicionou-se 0,2 mL de etanol absoluto e logo foram homogeneizadas em vórtex. Após esse procedimento inseriu-se 2 mL de dimetilsufóxido (DMSO) e novamente foi promovida a mistura.

Os tubos foram colocados em béquer de vidro com água a 100 °C, previamente sobreposto em agitador magnético com aquecimento por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 2,9 mL do tampão MOPS (pH 7,0), 0,2 mL de α -amilase, 4 mL da solução tampão de acetato de sódio pH 4,5 e 0,1 mL de amiloglucosidase no tubo de centrifuga.

Promoveu-se uma intensa agitação e logo os tubos foram dispostos em banho com água à 50 °C e assim permaneceram, por 30 minutos. Após o aquecimento os tubos foram então centrifugados, em centrifuga de bancada ventilada à 3000 rpm por 10 min. Na Figura 12 pode ser observado o sistema montado para a hidrólise enzimática.

Figura 12 – Sistema montado para a hidrólise enzimática das amostras de algas.



Para a análise cromatográfica, foi empregado Cromatógrafo Líquido UHPLC, marca Agilent, modelo Infinity 1290, empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad, Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm), temperatura da coluna 45 °C, detector de índice de refração. Como fase móvel foi utilizada solução de 0,01 N de ácido sulfúrico previamente desgaseificada, fluxo de eluente: 0,6 mL/min e volume de injeção de 10 µL. As amostras foram filtradas em filtro de membrana PVDF com 0,22 µm de poro.

A quantificação do amido foi realizada por padronização externa, por meio de curvas analíticas construídas com seis pontos com padrão analítico de glicose.

4.2.5 Determinação de carboidratos totais

A quantificação dos carboidratos totais foi feita seguindo metodologia recomendada por Wychen e Laurens (2013a) do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Nesse experimento foram pesadas por volta de 25,0 mg das amostras de biomassa algal e transferidas para tubos de vidro para autoclave de 10 mL. Foram adicionados 250 µL de H₂SO₄ 72% em cada tubo e promoveu-se a homogeneização. Os tubos foram conduzidos ao banho-maria à 30 °C por 1 hora. Houve constante mistura da amostra com auxílio de bastão de teflon a cada 5 e 10 minutos durante o período de permanência no banho, com cuidado para que os sólidos permanecessem na parte inferior do tubo, imerso em ácido sulfúrico.

Após 1 h do banho, retirou-se todos os tubos e foi adicionado 7 mL de água destilada em cada tubo. Após a adição da água promoveu-se a agitação em vortex. Após essa etapa, os tubos foram colocados em autoclave vertical, marca Primatec, modelo CS, por 1 h a 121 °C.

Ao término do tempo de permanência na autoclave, as amostras foram retiradas e arrefecidas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 h. Alíquotas de 3 mL do hidrolisado foram transferidas para tubos de centrifuga para realização da neutralização com carbonato de cálcio na faixa de pH entre 6,0 e 8,0. Foi realizada a separação do agente usado na neutralização por meio da centrifugação dos tubos em centrifuga de bancada refrigerada, marca Hermle, modelo Z360K à 14.000 rpm por 5 min.

Foi realizada a filtração dos sobrenadantes obtidos, por meio de seringa descartável e de filtro de membrana de nylon de 0,2 μm para remover todos os sólidos e precipitados remanescentes. Os filtrados obtidos foram transferidos para tubos de autoclave onde inseriu-se em cada tubo, 500 μL de solução de cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) e homogeneizou-se.

Imediatamente foi feito o aquecimento dos tubos, em banho a 80 °C por 15 minutos. Após o tempo de reação, foi adicionado 1 mL de solução férrica ainda no bloco digestor desligado e promoveu-se a mistura. Aguardou-se 15 minutos para a dissolução do reagente e arrefecimento das amostras à temperatura ambiente. Na Figura 13, podem ser visualizados os tubos ao final da reação.

Figura 13 – Amostras de microalgas após reação para determinação de carboidratos.



Foram adicionados nos respectivos tubos 2,5 mL de água ultrapura e promoveu-se a mistura. A partir das alíquotas recolhidas, foram feitas leituras em espectrofotômetro ultravioleta-visível, marca Agilent, modelo Cary 60 no comprimento de onda de 620,0 nm. O mesmo procedimento após a etapa da hidrólise, foi feito para a construção da curva padrão de glicose, cada ponto da curva foi realizado em 4 réplicas. Foram elaboradas diluições, a partir de uma solução estoque de glicose com concentração conhecida para obter-se cada um dos pontos da curva analítica. Na Tabela 3 podem ser observadas as concentrações utilizadas em cada ponto da curva.

Tabela 3 – Concentração e diluição da glicose para curva padrão.

[Solução estoque glicose] (mg/mL)	Diluição (estoque + água) µL	[Glicose] final (g/mL)
0,25	0 + 500	0
0,25	20 + 480	0,0100
0,25	30 + 470	0,0150
0,25	50 + 450	0,0250
0,25	75 + 425	0,0375
0,25	100 + 400	0,0500

A quantificação dos carboidratos foi obtida pelas equações 4.4; 4.5 e 4.6.

$$\text{Peso seco} = \frac{\text{Massa amostra} \times \% \text{ Sólidos totais}}{100} \quad (4.4)$$

$$\text{Monossacarídeos totais (mg)} = \text{Monossacarídeos (mg/mL)} \times \text{Volume final (mL)} \quad (4.5)$$

$$\% \text{ Carboidratos totais} = \left(\frac{\text{Monossacarídeos totais (mg)}}{\text{Peso seco amostra (mg)}} \right) \times 100 \quad (4.6)$$

4.2.6 Determinação de proteína bruta

A análise de proteína bruta (método Kjeldahl) foi realizada por meio de protocolo proposto pela (AOAC, 1990). Foi usado como fator de conversão de nitrogênio para proteína 4,78, conforme proposto para microalgas por (LOURENÇO et al., 2004).

Para a digestão, destilação e titulação foi utilizado o sistema automático de nitrogênio Kjeldahl, marca Büchi, modelo K-370. Foram pesados em balança analítica cerca de 100,0 mg de amostra em papel manteiga e as massas registradas. O papel foi dobrado cuidadosamente e transferido para o tubo de digestão.

Três brancos foram adicionados. Adicionou-se nos tubos, aproximadamente 2000,0 mg de catalisador composto por 90,1% de sulfato

de sódio, 9,0% de sulfato de cobre e 0,9% de selenito de sódio e 5 mL de H₂SO₄ concentrado foram inseridos aos tubos de digestão. As amostras foram digeridas no bloco digestor utilizando a seguinte rampa de temperatura (Tabela 4).

Tabela 4 – Gradiente de tempo e temperatura utilizados para a digestão das amostras de microalgas.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1. Evaporação da água	100	5
2. Carbonização	150	10
3. Controle da espumação	250	25
4. Digestão	038	180
5. Resfriamento	ambiente	60

Antes de iniciar a destilação das amostras, foram adicionados 10 mL de água destilada aos tubos e agitados até completa dissolução.

Na destilação foi utilizada solução de hidróxido e sódio 32% (m/v) e água destilada. Já na titulação empregou-se solução de ácido bórico 4% (m/v). As condições de destilação programadas podem ser visualizadas na Tabela 5:

Tabela 5 – Parâmetros usados para destilação das amostras após a digestão.

Parâmetros	Condições
Tempo de reação	5 s
Tempo de destilação	240 s
Poder de vapor	100%
Volume de H ₂ O	10 mL
Volume de NaOH 32%	35 mL
Volume de H ₃ BO ₃ 4%	60 mL

A titulação, que ocorre automaticamente após a destilação foi programada com as condições (Tabela 6).

Tabela 6 – Condições de titulação para as ambas amostras de microalgas.

Parâmetros	Condições
Concentração do H ₂ SO ₄	0,05 M
Tempo mínimo	5 s
Volume máximo	40 mL
Tipo de titulação	startpoint

O teor de nitrogênio total (%N) foi determinado pela equação 4.7.

$$\% N = \frac{(Volume_{amostra} - Volume_{branco}) \times M_{titulante} \times 0,028}{Massa_{amostra}} \quad (4.7)$$

O teor de proteína bruta (%PB) foi determinado pela equação 4.8.

$$\%PB = \% N \times N \text{ fator} \quad (4.8)$$

4.2.7 Quantificação de Clorofila a, Clorofila b e Clorofila Total

Foi utilizada a metodologia proposta por Porra, Thompson e Kriedemann (1989). A extração das clorofilas foi feita com reagente N,N-dimetilformamida (DMF).

Foram pesadas aproximadamente 20,0 mg de amostras previamente liofilizadas em microtubos âmbar, contendo pérolas de vidro de 2,5 mm de diâmetro. A extração foi feita pela adição de 1 mL do reagente extrator e logo a maceração foi realizada em moinho de bolas, marca BioSpec, modelo Mini-beadbeater por 10 min. Os extratos obtidos foram centrifugados em centrífuga de bancada refrigerada a 5 °C e 9.000 rpm por 10 min e transferidos para balões volumétricos.

A operação de lavagem foi repetida até que não houvesse coloração no sobrenadante, não excedendo um volume máximo de 5 mL. Todo o procedimento foi feito em sala escura, evitando assim, a incidência de luz na amostra. Além disso, executou-se uma purga com nitrogênio para minimizar a fotodegradação e oxidação dos pigmentos clorofílicos.

A determinação dos teores de clorofilas foram realizadas por espectroscopia, por meio de Espectrofotômetro Ultravioleta/Visível da marca Agilent modelo Cary 60UV-Vis. Os valores de absorbância considerados foram nos comprimentos de onda de 646,8nm e 663,8nm de acordo com o que foi proposto nas equações de Porra et al. (1989). As equações 4.9 e 4.11 representam a clorofila a, clorofila b e clorofila total (a+b).

$$\text{Clorofila a} = 12,00A_{663,8} - 3,11A_{646,8} \quad (4.9)$$

$$\text{Clorofila b} = 20,78A_{646,8} - 4,88A_{663,8} \quad (4.10)$$

$$\text{Clorofila a + b} = 17,67A_{646,8} - 7,12A_{663,8} \quad (4.11)$$

4.2.8 Determinação de Carotenoides Totais

Procedeu-se a análise seguindo o protocolo de Porra, Thompson e Kriedemann (1989) adaptado por Huang e Cheung (2011). Foi utilizada como solução extratora, acetona 90%.

Foram pesadas aproximadamente 100,0 mg de biomassa dos cultivos em meio BBM e 500,0 g das cepas cultivadas nas duas formulações de vinhaça. Com a biomassa mensurada, procedeu-se com a adição de acetona 90%. Todas as replicatas foram colocadas em ultrassom para sonicação por 15 min e logo após foi feita purga com nitrogênio em cada frasco de vidro. Os extratos foram armazenados com proteção a luminosidade a 4 °C por 24 h. Todo o procedimento foi realizado em sala escura, evitando assim, a incidência de luz na amostra. Além disso, todos os frascos e tubos utilizados foram envolvidos em papel alumínio para minimizar a fotodegradação e oxidação dos pigmentos.

Após a retirada dos tubos da geladeira, foi promovida a agitação dos mesmos e em seguida o extrato foi centrifugado em centrífuga de bancada refrigerada a 5 °C e 9.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e a partir desses extratos foram obtidas as leituras no espectrofotômetro. Foi realizada a varredura das amostras entre 300 e 700 nm e leitura nos

comprimentos de onda de 440,5; 646,6 e 663,6 nm. O conteúdo de carotenoides totais foi calculado de acordo com a equação 4.12.

$$\text{Carotenoides totais}_{mg/g} = \frac{4,69 A^{440,5} - 4,74 A^{646,6} - 1,96 A^{663,6} (mg/L)}{\text{Concentração da amostra}_{g/L}} \quad (4.12)$$

4.2.9 Identificação dos Carotenoides

A extração dos carotenoides da biomassa das microalgas foi realizada conforme metodologia proposta por Gentili e Carretti (2011), Garcia-Gonzalez et al. (2005). Foram pesadas cerca de 100,0 mg das amostras previamente liofilizadas, em balança analítica e dispostas em microtubos âmbar, onde se procedeu com a extração utilizando 3 mL de etanol/hexano (2:1) (v/v) contendo 0,1 % (m/v) butilhidroxitolueno (BHT). Adicionou-se 2 mL de água destilada e 4 mL de hexano e promoveu-se uma intensa homogeneização. Logo após, realizou-se a centrifugação a 10.000 x G por 5 minutos.

O hexano ficou na fase superior onde foi separada uma alíquota de 4 mL desse extrato e então foi evaporado em concentrador de amostras, marca Labconco; Modelo: Centrivap à vácuo 25 °C.

Os extratos secos foram reconstituídos em C₂H₃N:CH₃OH:C₅H₁₂O (70:20:10 v/v/v) butílico e 2 µL foi injetado em um Cromatógrafo Líquido de Ultra Eficiência - UHPLC.

A separação foi realizada em um sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência UPLC ACQUITY H-Class (Waters, MS Technologies, UK) com coluna de fase reversa ACQUITY BEH C₁₈ 2.1 x 150 mm x 1,7 µm (Waters Miliford, MA) e pré-coluna. O detector utilizado foi o arranjo de diodos (PDA) e monitoramento em 450 nm. Utilizou-se eluição por gradiente e fase móvel constituída de: A: H₂O 100%; B: C₂H₃N:CH₃OH:C₅H₁₂O (70:20:10 v/v/v) e C: NH₄HCO₂ 10 mM. O gradiente utilizado encontra-se na Tabela 7. A temperatura da coluna foi de 45 °C e da amostra de 15 °C.

Todas as soluções foram filtradas em filtro de membrana Nylon 0,22 µm. Foram utilizados seis padrões de carotenoides, fucoxantina, astaxantina, zeaxantina, β- criptoxantina, licopeno e β-caroteno, todos com elevada pureza.

A identificação dos carotenoides foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos espectros UV/Vis obtidos pelos padrões analíticos.

Tabela 7 – Gradiente usado na separação cromatográfica dos carotenoides.

Tempo (min)	Vazão FM (mL/ min)	A (% v/v)	B (% v/v)	C (% v/v)
Inicial	0,50	0,00	60,00	40,00
4,00	0,50	0,00	75,00	25,00
12,00	0,50	0,00	100,00	0,00
16,00	0,50	0,00	60,00	40,00
20,00	0,50	0,00	60,00	40,00

4.2.10 Determinação de Lipídeos Totais como Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A transesterificação *in situ*, de lipídeos de algas foi realizada adotando metodologia proposta por Wychen e Laurens (2013b) do National Renewable Energy Laboratory (NREL). Foram pesadas cerca de 10,0mg de biomassa algal e inseridos 20 μ L de éster metílico tridecanoato de etila, 200 μ L clorofórmio:metanol (2: 1, v / v) e 300 μ L de ácido clorídrico 0,6 M em metanol. A catálise ácida foi feita em bloco seco a 85 °C por 1 hora. Após o resfriamento dos frascos foram inseridos 1 mL de hexano grau HPLC e em seguida, feita a homogeneização. Foi então, aguardada a separação de fases por 1 hora. Alíquotas de 200 μ L da fase orgânica de cada um dos frascos foram recolhidas e transferidas para outros frascos contendo 5 μ L do padrão interno pentadecano.

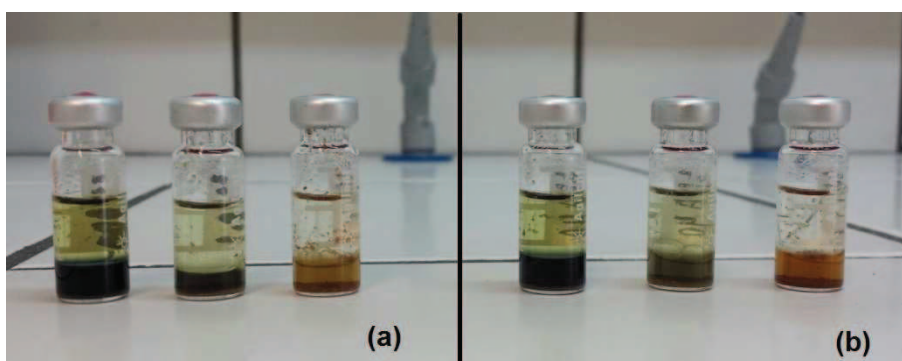
Para a identificação dos ésteres metílicos foi empregado padrão FAME mix (C4:C24) com 37 compostos da Sigma Aldrich. As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso, marca Shimadzu®, modelo GC-2010 Plus AF com injetor split/splitless e com detector de ionização em chamas (FID). Foi utilizada coluna capilar HP-88 (60 m x 0,250 mm x 0,20 μ m). Apesar de haver indicação de uso pela metodologia da coluna DB-Wax (30mx 0,25 mm x 0,25 μ m), não foi possível separar os compostos e por isso empregou-se a coluna HP-88. O gás de arraste utilizado foi hélio.

O volume de injeção foi de 1 μL . O forno foi programado para trabalhar com gradiente de temperatura de 140 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, 100 – 240 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C}$ por minuto, permanecendo a 240 $^{\circ}\text{C}$ por 33 minutos; temperatura do injetor e detector de 260 $^{\circ}\text{C}$. A partir dos cromatogramas obtidos, foram feitas as somatórias de todos os ésteres metílicos identificados sendo os resultados expressos em %Ésteres metílicos, conforme equação 4.13.

$$\text{Teor de éster} = \left(\frac{(\sum A) - A_{\text{padrão interno}}}{A_{\text{padrão interno}}} \right) \times \frac{\text{Massa}_{\text{padrão interno}}}{\text{Massa}_{\text{amostra}}} \quad (4.13)$$

Na Figura 14, podem ser visualizadas a separação de fases das amostras transesterificadas.

Figura 14 – Separação de fases das amostras de microalgas, após adição do reagente hexano. (a) Embrapa LBA|32 cultivadas em meio BBM; 50% Vinhaça e 100% Vinhaça clarificada respectivamente e (b) Embrapa LBA|40 à direita com mesma ordenação.



4.3 Análise estatística

As condições experimentais avaliadas foram feitas em triplicata. Os resultados dos valores amostrais são expressos como valores médios \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas por análise de variância (teste Tukey), com nível de significância de 95%, por meio do software ASSISTAT versão 7.7 beta (SILVA, 2015).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da biomassa

A caracterização química, quanto ao teor de sólidos totais, cinzas, amido, carboidratos totais, proteína bruta, clorofila total, clorofila a, clorofila b, carotenoides totais, análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, poder calorífico superior e ésteres metílicos das biomassas das microalgas estudadas, *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa*, são apresentadas no tópico 5.1.1. Os resultados apresentados foram calculados em base seca.

5.1.1 Sólidos e Cinzas

Na Tabela 8 são apresentados os valores obtidos de sólidos totais e cinzas da biomassa das duas cepas de microalgas (Embrapa |LBA32 e Embrapa |LBA40) nas 3 formulações de meio de cultivo (BBM, vinhaça diluída (50%) e vinhaça clarificada (100%)).

Tabela 8 – Teores de sólidos totais e cinzas de biomassa das duas microalgas (Embrapa |LBA32 e Embrapa |LBA40) cultivadas em diferentes meios de cultivo contendo vinhaça.

Amostra	Meio cultivo	Sólidos totais %	Cinzas %
Embrapa LBA32	BBM	99,10±0,50 _{ab}	3,21±0,30 _c
	Vinhaça 50%	99,00±0,26 _{ab}	6,01±0,15 _{ab}
	Vinhaça 100%	99,87±0,51 _a	5,83±0,36 _{ab}
Embrapa LBA40	BBM	96,71±0,20 _c	5,44±0,28 _b
	Vinhaça 50%	98,84±0,76 _{ab}	6,09±0,54 _{ab}
	Vinhaça 100%	98,40±0,66 _b	6,67±0,31 _a

*Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com significância <0,05.

Foram observados teores de sólidos totais entre $(96,71 \pm 0,20)$ e $(99,87 \pm 0,5)$ %. A amostra com maior umidade foi a amostra designada como Embrapa |LBA40 em cultivo em meio BBM. Tang et al. (2016), ao avaliarem o conteúdo de umidade em microalga do gênero *Nannochloropsis*, verificaram um fração de 3,1% de umidade. Dado similar ao encontrado na biomassa da amostra Embrapa |LBA40 em meio de cultivo padrão BBM que foi de 3,29%.

Já o teor de cinzas variou entre $3,21 \pm 0,30$ e $6,67 \pm 0,31$. Pode-se ressaltar que ambas cepas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* apresentaram menor percentual de cinzas quando cultivadas em meio de cultivo BBM comparado aos cultivos em vinhaça. Liu et al. (2015), ao realizar a incineração da microalga *Isochrysis zhangjiangensis* a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ por meio da análise termogravimétrica, obtiveram um teor de 5,37% de cinzas, dados semelhantes aos encontrados (Tabela 8).

5.1.2 Amido e Carboidratos totais

Na Tabela 9 e 10 podem ser conferidos os dados obtidos das determinações de teor de amido e carboidratos totais com suas respectivas produtividades diárias ($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$).

Tabela 9 – Resultados obtidos em percentagem para amido e suas respectivas produtividades diárias ($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$).

Amostra	Meio cultivo	Amido%	Pr. Média* Amido
Embrapa LBA32	BBM	$21,63 \pm 0,30_a$	$21,87 \pm 0,16$
	Vinhaça 50%	$7,93 \pm 0,66_b$	$14,10 \pm 0,34$
	Vinhaça 100%	$1,74 \pm 0,94_d$	$2,86 \pm 0,48$
Embrapa LBA40	BBM	$9,61 \pm 0,17_b$	$12,71 \pm 0,10$
	Vinhaça 50%	$2,25 \pm 0,59_{cd}$	$4,1 \pm 0,31$
	Vinhaça 100%	$3,77 \pm 0,76_c$	$8,38 \pm 0,39$

Pr. Média*: Produtividade média ($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$); Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com $p < 0,05$.

Tabela 10 – Resultados obtidos em percentagem de carboidratos totais e suas respectivas produtividades diárias (mg. L⁻¹. dia⁻¹).

Amostra	Meio cultivo	C.T*%	Pr. Média C.T**
Embrapa LBA32	BBM	28,21±0,24 _f	28,52±0,13
	Vinhaça 50%	17,55±0,12 _d	31,20±0,07
	Vinhaça 100%	21,79±0,36 _b	35,83±0,19
Embrapa LBA40	BBM	31,61±0,18 _a	41,80±0,10
	Vinhaça 50%	13,5±0,76 _c	24,60±0,39
	Vinhaça 100%	11,71±0,15 _e	26,02±0,08

C.T%**: Carboidratos totais; Pr. Média*: Produtividade média (mg. L⁻¹. dia⁻¹); Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com p<0,05.

De acordo com os teores obtidos da análise de amido, pode-se afirmar que a amostra com maior percentual foi a Embrapa|LBA32, cultivada em meio padrão BBM. A amostra com menor percentual de amido foi a biomassa de *Micractinium sp.* em meio de cultivo formulado com vinhaça 100% clarificada. Halfhide et al. (2014), ao trabalharem com cepas mistas de algas selvagens encontraram um teor de amido de 9,30%. Dado semelhante ao verificado nesse estudo para amostra de *Chlamydomonas biconvexa* cultivada em meio padrão. Para as produtividades diárias de amido, observou-se um aumento na amostra designada como Embrapa|LBA32 em cultivo BBM e menor para Embrapa|LBA32 cultivada em formulação com vinhaça 100%. Conforme análise estatística, observou-se diferenças significativas entre os teores de amido dos três cultivos da cepa de *Micractinium sp.*

Quanto ao teor de carboidratos totais, pode-se ressaltar que a amostra com maior conteúdo foi a Embrapa|LBA40 em meio de cultura BBM. O valor mínimo encontrado na fração de carboidratos totais foi verificado na amostra Embrapa|LBA40 cultivada em meio vinhaça 50% (Tabela 10). Para os dados de produtividade diária de carboidratos, pode-se inferir que foi maior para a amostra Embrapa|LBA40 em cultivo em meio BBM (41,80 mg. L⁻¹. dia⁻¹), entretanto na amostra Embrapa|LBA32 em cultivo contendo vinhaça 100% foi observado valores plausíveis de produtividade diária de carboidratos totais.

Guihéneuf e Stengel (2015), ao avaliarem a microalga vermelha *Porphyridium purpureum* relataram em seu estudo 31,0% de carboidratos totais. Dado de carboidratos totais semelhante ao verificado para a cepa Embrapa |LBA40 cultivada em BBM.

Costanzo et al. (2016), ao cultivarem as cepas de microalgas verdes *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella minutíssima* e *Scenedesmus bijuga*, verificaram um teor de 17% de carboidratos, valor parecido com o encontrado nesse trabalho de carboidratos totais para o gênero de *Micractinium sp.* cultivada em vinhaça diluída (50%) que foi de 17,55%. Lavanya et al. (2016) verificaram um teor de carboidratos de 22,0% ao avaliarem o conteúdo da alga marinha *Tetraselmis sp.*, valor correlato ao encontrado nesse estudo para carboidratos totais (21,79%) na amostra Embrapa |LBA32 em meio de cultura formulado a partir de vinhaça clarificada (100%).

5.1.3 Proteína Bruta

A Tabela 11 apresenta os valores médios de proteína bruta das cepas de microalgas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* designadas como Embrapa|LBA32 e Embrapa|LBA40 em três formulações de meio de cultivo *Bold's Basal*, vinhaça diluída (50%) e vinhaça clarificada 100%.

Tabela 11 – Resultados encontrados para os teores de proteína bruta e suas respectivas produtividades diárias (mg. L⁻¹. dia⁻¹).

Amostra	Meio cultivo	Proteína Bruta %	Produtividade Média P.B* (mg. L ⁻¹ . dia ⁻¹)
Embrapa LBA32	BBM	34,03±0,10 _c	34,41±0,06
	Vinhaça 50%	39,50±0,47 _b	70,22±0,24
	Vinhaça 100%	39,62±0,09 _b	65,15±0,06
Embrapa LBA40	BBM	30,96±0,17 _d	40,94±0,10
	Vinhaça 50%	41,68±0,35 _a	75,95±0,19
	Vinhaça 100%	39,92±0,60 _b	88,71±0,31

P.B*: Proteína Bruta; Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com probabilidade <0,05.

Entre os cultivos da cepa de *Micractinium sp.*, a amostra cultivada em meio BBM diferiu estatisticamente das demais a nível de significância de 5%, com teor médio de proteína bruta de 34,03%. Na amostra designada como Embrapa |LBA40 tem-se diferenças significativas entre os 3 meios de cultura avaliados.

Em relação ao percentual, a amostra Embrapa|LBA40 em vinhaça diluída 50% apresentou maior teor (41,68%). Cabanelas et al. (2015), obtiveram um percentual de proteína na microalga verde *B. braunii* de 40,7%, dado similar ao encontrado nesse estudo.

Markou, Iconomou e Muylaert (2016), ao trabalharem com a cianobactéria *Arthrospira platensis* cultivada em meio formulado com cama de aviário diluído em 20 vezes, após 9 dias de cultivo, obtiveram uma fração de 39,5% de proteína, similar ao expresso nesse trabalho para a amostra Embrapa|LBA32 em meio com vinhaça diluída 50%.

Liu et al. (2015), ao cultivarem a microalga *I. zhangjiangensis* em meio f/2 verificaram um conteúdo de 34,0% de proteína. Ho et al. (2014), ao analisarem o teor de proteína da microalga verde *Desmodesmus sp.* verificaram um percentual de 34,6%. Esses dados corroboram com o teor de proteína da amostra Embrapa|LBA32, cultivada em meio padrão sintético BBM.

No que se refere à produtividade diária de proteína bruta, constatou-se maior produtividade na amostra Embrapa|LBA40, cultivada em meio com vinhaça clarificada 100%. Apesar dessa amostra não apresentar o percentual superior de proteína, tal fato pode ser explicado por sua elevada produtividade de biomassa por dia. Uma produtividade diária de proteína similar à encontrada no cultivo da amostra Embrapa|LBA40 cultivada em vinhaça clarificada 100%, foi verificada no estudo de Sydney et al. (2010), com microalga *Chlorella vulgaris* LEB-104, no qual obtiveram uma produtividade diária de proteína de 85,0 mg. L⁻¹. dia⁻¹.

5.1.4 Clorofila a, Clorofila b e Clorofila total

Nesse estudo foram quantificados os teores de clorofila a, clorofila b e clorofila total presentes na biomassa liofilizada das duas cepas de microalgas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em duas formu-

lações contendo vinhaça (diluída 50% e clarificada 100%) e em meio padrão BBM. Na Tabela 12 são exibidos os resultados obtidos para a fração de clorofila a, clorofila b e clorofila total (mg. g^{-1}).

Tabela 12 – Resultados das determinações de clorofila a, clorofila b e clorofila total (mg. g^{-1})

Amostra	Meio cultivo	Clorofila (mg^{-1})	Clorofila b (mg^{-1})	Clorofila Total (mg. g^{-1})	Produtividade média CL.T*($\text{mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)
Embrapa LBA32	BBM	13,29±0,73 _a	4,85±0,23 _b	18,14±0,96 _a	18,34±0,49
	Vinhaça 50%	2,12±0,19 _c	0,76±0,10 _c	2,88±0,30 _b	5,12±0,16
	Vinhaça 100%	0,51±0,14 _d	0,61±0,01 _c	1,12±0,14 _c	1,84±0,08
Embrapa LBA40	BBM	12,03±0,38 _b	5,76±0,01 _a	17,79±0,37 _a	23,52±0,20
	Vinhaça 50%	1,98±0,26 _c	0,88±0,14 _c	2,86±0,40 _b	5,21±0,21
	Vinhaça 100%	0,20±0,02 _d	0,26±0,04 _d	0,46±0,06 _c	1,02±0,04

CL.T*: Clorofila total; Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com $p < 0,05$.

Observou-se pelo teste de Tukey que o conteúdo de clorofila a, não diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) entre as amostras de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas no mesmo meio de cultivo, exceto para Embrapa|LBA32 e Embrapa|LBA40 em meio BBM. Nielsen et al. (2016), ao analisarem a alga marrom *Saccharina latissima* de águas sublitorâneas da Dinamarca, obtiveram um conteúdo de $0,50 \text{ mg. g}^{-1}$ de clorofila a, dado similar ao encontrado nesse estudo para a amostra Embrapa|LBA32 em vinhaça clarificada 100%.

Para clorofila b, nas amostras das duas cepas de microalgas nos meios de cultivos BBM, vinhaça 50% e vinhaça 100%, verificou-se que não houve diferenças significativas pelo teste de Tukey, exceto para as amostras Embrapa|LBA32 em meio BBM, Embrapa |LBA40 em meio padrão BBM e vinhaça 100%.

Na quantificação de clorofila total, não foi observada diferença significativa entre as amostras designadas como Embrapa|LBA32 e Embrapa|LBA40 considerando os mesmos meios de cultivos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Aburai et al. (2013), ao trabalharem com a cepa *Coelastrella sp.*, verificaram um conteúdo de clorofilas totais de $2,91 \text{ mg.g}^{-1}$. Aburai, Sumida e Abe (2015), ao termino de 23 dias de cultivo de *Scenedesmus sp.* em meio sintético BBM, verificaram um conteúdo de $2,9 \text{ mg. g}^{-1}$ de clorofilas totais.

Esses valores são semelhantes aos encontrados para as duas cepas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* no cultivo em vinhaça 50%.

Em relação à produtividade diária de clorofila total ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$), pode-se afirmar que a amostra Embrapa|LBA40 em meio BBM apresenta maior rendimento para essa fração.

Deve-se salientar que houve um incremento no teor de clorofilas totais em ambas as cepas de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* em meio de cultivo *Bold's Basal* se comparados com os meios de cultura, a base de vinhaça. Este fato poderia ser explicado pelo metabolismo fotoheterotrófico adotado pela microalga como forma de obtenção de energia quando cultivada em vinhaça (SANTANA, 2016). Nesse caso, são empregados como fonte de energia a luz e como fonte de carbono compostos orgânicos.

5.1.5 Carotenoides totais

Na Tabela 13 são apresentados os dados obtidos da análise de carotenoides totais para as duas cepas de microalgas em diferentes cultivos contendo vinhaça (diluída 50% e clarificada 100%) e meio padrão BBM.

Tabela 13 – Resultado da análise de carotenoides totais para duas cepas de microalgas do gênero *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas sp.* cultivadas em fotobiorreatores.

Amostra	Meio cultivo	C.T* ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	Produtividade média C.T* ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)
	BBM	0,67±0,01 _a	0,068±0,02
Embrapa LBA 32	Vinhaça 50%	0,19±0,02 _b	0,034±0,02
	Vinhaça 100%	0,03±0,00 _b	0,005±0,01
	BBM	0,81±0,17 _a	0,107±0,10
Embrapa LBA 40	Vinhaça 50%	0,17±0,02 _b	0,031±0,02
	Vinhaça 100%	0,01±0,00 _b	0,002±0,01

C.T*: Carotenoides totais; Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com $p < 0,05$.

Para o conteúdo de carotenoides totais, não foi observado diferença significativa pelo teste de Tukey entre as duas cepas de microalgas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* considerando os meios de cultivo (BBM, vinhaça diluída 50% e vinhaça clarificada 100%).

Mulders et al. (2014), ao cultivarem a microalga *Chlorella zofingiensis* em meio M-8 modificado, verificaram uma fração de carotenoides secundários (astaxantina, cantaxantina e keto-luteína) $<0,05 \text{ mg. g}^{-1}$, valor parecido com o verificado na amostra Embrapa|LBA32 em cultivo contendo vinhaça clarificada 100%. Goiris et al. (2012), obtiveram um teor de $0,71 \text{ mg. g}^{-1}$ carotenoides totais em *Chlorella spp.* dado semelhante ao encontrado na cepa Embrapa|LBA32 cultivada em meio BBM.

A produtividade superior de carotenoides totais foi verificada na amostra Embrapa|LBA40 em meio de cultura padrão.

Acredita-se que os baixos teores de carotenoides totais confirmados nesse estudo, se devem ao fato desses pigmentos serem acumulados em condições de estresse como, por exemplo, limitação de nutrientes e excesso de luz, o que não ocorreu nas condições de cultivo.

5.1.6 Análise elementar (Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio)

Na Tabela 14 a seguir são apresentados os teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio (%) presentes nas biomassas das microalgas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa*, cultivadas em meio de cultura formulados com vinhaça diluída 50% e vinhaça clarificada 100% e como controle, meio sintético BBM.

Tabela 14 – Resultados da análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio, percentual em massa.

Amostra	Meio cultivo	C %	H %	N %
Embrapa LBA32	BBM	45,63±5,51 _a	8,11±1,09 _a	6,67±0,90 _{bc}
	Vinhaça 50%	42,94±0,54 _a	7,66±0,04 _a	7,24±0,11 _{ab}
	Vinhaça 100%	43,84±0,90 _a	7,80±0,11 _a	7,53±0,17 _{ab}
Embrapa LBA40	BBM	40,28±0,66 _a	7,25±0,17 _a	5,38±0,12 _c
	Vinhaça 50%	44,39±2,65 _a	7,83±0,72 _a	8,12±0,69 _a
	Vinhaça 100%	42,41±0,90 _a	7,62±0,10 _a	7,03±0,10 _{ab}

*Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com $p < 0,05$.

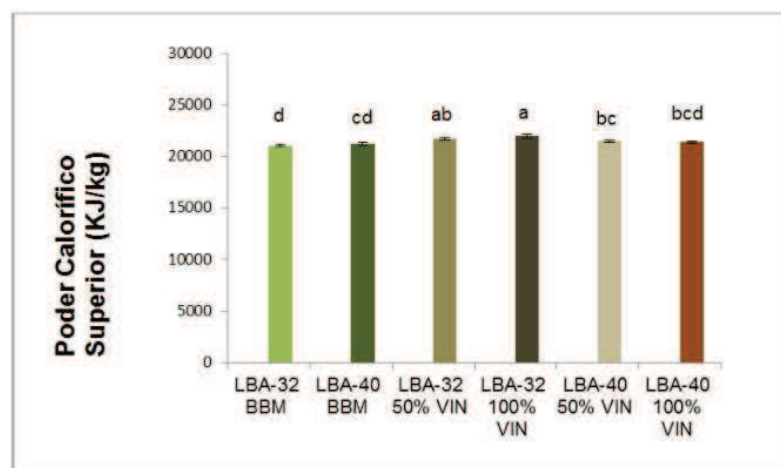
Observou-se pela análise estatística empregada (teste de Tukey $p < 0,05$) que o teor de carbono e hidrogênio não diferiu entre as duas cepas de microalgas verdes *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* nos meios de cultivo: padrão sintético BBM, vinhaça diluída 50% e vinhaça clarificada 100%.

Já o teor de nitrogênio apresentou-se maior nos cultivos a base de vinhaça (Tabela 14), um dado condizente com o maior percentual de proteínas encontrado na biomassa algal produzida nestas mesmas condições (Tabela 11). Liu et al. (2012), ao avaliarem composição elementar da biomassa da cianobactéria *Hapalosiphon sp.* obtiveram um percentual de carbono de 47,94%, hidrogênio 7,44% e nitrogênio 6,45%. Tang et al. (2016), ao realizarem a análise elementar da cepa de cianobactéria do gênero *Spirulina*, obtiveram um teor de carbono de 45,61%, informação aproximada da cepa de *Micractinium sp.* cultivada em meio de cultura BBM.

5.1.7 Poder calorífico superior

São apresentados na Figura 15 os valores de poder calorífico superior (PCS) da biomassa de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* em 3 meios de cultivo, onde o maior valor de PCS, pode ser verificado na amostra designada como Embrapa|LBA32 em meio de cultivo a base de vinhaça clarificada 100%.

Figura 15 – Poder calorífico superior de amostras de microalgas cultivadas em meio BBM, vinhaça 50% e vinhaça 100% clarificada.



Conforme a análise estatística empregada (teste de Tukey $p < 0,05$) pode-se afirmar que não houve variação significativa no valor de poder calorífico superior entre as amostras denominadas Embrapa|LBA32 e Embrapa|LBA40 nos diferentes meios de cultivo.

Valores semelhantes de poder calorífico constatados nesse trabalho, foram encontrados por Halfhide et al. (2014), que ao trabalhar com microalga do gênero *Chlorella* obtiveram poder calorífico de 22,0 a 23,6 MJ/kg para cultivo sob condições axênicas e não axênica, respectivamente.

5.1.8 Ésteres metílicos de ácidos graxos

Entre as amostras de microalgas de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas nos mesmos meios de cultivo, não verificou-se diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) nos teores de FAME (Tabela 14).

A amostra denominada Embrapa|LBA32 cultivada em meio BBM, pode ser evidenciada, como a com maior percentual de ésteres metílicos de ácidos graxos (3,23%). Entretanto a produtividade de ésteres metílicos foi superior na amostra Embrapa|LBA32 em meio de cultura contendo vinhaça 100%. A razão para o maior rendimento de FAME nessa cepa corresponde a maior produtividade de biomassa apresentada por essa cepa no cultivo contendo vinhaça clarificada 100% ($0,18 \pm 0,02 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}$) em relação ao meio padrão BBM ($0,10 \pm 0,02 \text{ mg. L}^{-1} \cdot \text{dia}$).

Tabela 15 – Resultados dos percentuais de ésteres metílicos de ácidos graxos de microalgas verdes em 3 dias de cultivo.

Amostra	Meio cultivo	Ésteres Metílicos%	Produtividade Média Ésteres Metílicos($\text{mg.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)
	BBM	$3,23 \pm 0,55_a$	$3,27 \pm 0,29$
Embrapa LBA 32	Vinhaça 50%	$2,23 \pm 0,44_{ab}$	$3,96 \pm 0,23$
	Vinhaça 100%	$2,51 \pm 1,30_{ab}$	$4,13 \pm 0,66$
	BBM	$2,13 \pm 0,35_{ab}$	$2,82 \pm 0,19$
Embrapa LBA 40	Vinhaça 50%	$1,60 \pm 0,21_{ab}$	$2,92 \pm 0,12$
	Vinhaça 100%	$1,28 \pm 0,07_b$	$2,84 \pm 0,04$

*Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey com $p < 0,05$.

Cabanelas et al. (2015), ao analisarem o conteúdo de ésteres metílicos em microalga verde *B. braunii*, obtiveram um percentual de 3,12%, dado semelhante ao encontrado na amostra Embrapa|LBA32 cultivada em meio BBM. Cho et al. (2016), ao analisarem o conteúdo de FAME em *Dunaliella salina* constataram um teor de 1,48% de ácidos graxos monoinsaturados.

5.1.9 Perfil de carotenoides

A caracterização do perfil de carotenoides presentes nas amostras de biomassa de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em 3 formulações (BBM, 50% vinhaça e 100% vinhaça clarificada), estão apresentadas na Tabela 16 em percentual de área relativa por carotenoide identificado.

Como pode ser observado na Tabela 16 na amostra Embrapa|LBA32 nos cultivos em meio padrão sintético BBM e vinhaça diluída 50% foram observadas maiores áreas relativas para o carotenoide licopeno 71,48% e 66,12%, respectivamente, se comparadas com os demais carotenoides identificados nas amostras. No entanto, para a amostra Embrapa|LBA32 vinhaça clarificada 100% tem-se uma maior área de detecção do carotenoide β -criptoxantina (65,66%) em relação aos outros pigmentos.

Tabela 16 – Proporção relativa de cada carotenoide, determinado por UHPLC à 450 nm dos extratos de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* e em 3 diferentes cultivos.

Carotenoide	% Área Relativa Embrapa LBA32			% Área Relativa Embrapa LBA40		
	BBM	Vinhaça 50%	Vinhaça 100%	BBM	Vinhaça 50%	Vinhaça 100%
Fucoxantina	3,20±0,14	n.d	n.d	3,06±0,68	n.d	n.d
Astaxantina	2,46±0,14	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Zeaxantina	2,42±0,05	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
β -Criptoxantina	n.d	19,70±1,02	65,66±1,02	10,90±1,89	47,68±0,40	n.d
Licopeno	71,48±0,09	66,12±1,80	34,34±1,02	59,59±4,45	20,46±0,76	n.d
β -caroteno	21,24±1,40	15,66±1,50	n.d	26,45±1,88	30,34±0,99	n.d

n.d.: Não detectado.

As amostras Embrapa|LBA40 cultivadas em meio BBM e vinhaça 50% apresentaram diferentes carotenoides com maior área de separação. Tais pigmentos correspondem ao caroteno, licopeno e β -criptoxantina, uma xantina com área de detecção de 59,59% e 47,68% de modo respectivo.

Na amostra Embrapa|LBA40 vinhaça clarificada 100% não foi possível identificar os carotenoides. Possivelmente, a concentração desses compostos na amostra estava abaixo do limite de detecção do instrumento analítico empregado na análise.

6 CONCLUSÃO

A pesquisa possibilitou a caracterização da biomassa de duas cepas de microalgas verdes *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em meio de cultivo alternativo (vinhaça diluída 50% e vinhaça clarificada 100% com suplementação de CO₂ em fotobiorreatores do tipo *air lift*).

Com relação à pesquisa da composição da biomassa das duas cepas de microalgas pode-se inferir que ambas são produtoras de proteína e carboidratos em níveis majoritários, às demais frações: pigmentos (clorofilas e carotenoides) e ésteres metílicos de ácidos graxos apresentaram menores proporções. No entanto, o aproveitamento da fração proteica e de carboidratos presentes na biomassa das microalgas para a produção de insumos para a indústria de alimentos e farmacêutica requer estudos de toxicidade e palatabilidade para assegurar as condições preconizadas pelos órgãos competentes.

De acordo com os dados levantados de produtividade diária dos componentes da biomassa pode-se ressaltar que:

- Embora, a cepa designada como amostra Embrapa|LBA32 em meio de cultivo BBM seja a que se obteve maior rendimento diário de amido (mg. L⁻¹. dia⁻¹), a amostra Embrapa|LBA32 em cultivo com vinhaça diluída 50% também apresentou valores consideráveis de produtividade de amido, sendo este um indicativo de boa fonte para produção de subprodutos como, por exemplo, o bioetanol em larga escala acoplado ao aproveitamento do efluente de usina sucroalcooleira;
- No que diz respeito à produtividade de carboidratos totais, na amostra Embrapa|LBA40 cultivada em meio BBM verificou-se maior capacidade de produção entre as outras amostras analisadas. No entanto a amostra denominada Embrapa|LBA32 em meio contendo vinhaça 100% apresentou valores consideráveis de produtividade diária;
- Quanto à produtividade de proteína bruta, deve-se salientar que a amostra Embrapa|LBA40 cultivada em meio com vinhaça clarificada 100% obteve eficiência superior nesse quesito;

- A produtividade diária de clorofila total e carotenoides totais foi mais elevada na amostra Embrapa|LBA40 cultivada em meio padrão sintético BBM;
- Com relação à produtividade de ésteres metílicos a amostra Embrapa|LBA32 em meio de cultivo formulado com vinhaça 100% clarificada demonstrou maior eficiência produtiva que as demais.

Na análise elementar da biomassa, observou-se que quanto ao teor de carbono, hidrogênio e nitrogênio não houve diferenças significativas entre as duas cepas de *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* nas condições de cultivo: *Bold's basal*, vinhaça diluída 50% e vinhaça clarificada 100%.

Nesse estudo foi verificado também o potencial de produção de energia a partir da combustão da biomassa, no qual pode-se concluir que ambas as cepas de microalgas, independente da condição de cultivo, apresentaram poder calorífico equiparável ao do bagaço de cana-de-açúcar 4511,8 kcal. Kg⁻¹ (PROTÁSIO et al., 2011).

Quanto ao perfil de carotenoides presentes na biomassa de microalgas foi possível identificar os carotenoides: astaxantina, β -caroteno, β -criptoxantina, fucoxantina, licopeno e zeaxantina.

Dessa forma, observou-se pelas pesquisas já realizadas que a biomassa de microalgas apresenta grande potencial de aplicação biotecnológica e seu cultivo pode ser feito acoplado às indústrias em um conceito de biorrefinarias de microalgas, no qual tem-se a produção de subprodutos garantindo assim a agregação de valor dos produtos da cadeia produtiva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTM. *ASTM D5865 13 Standard Test Method for Gross Calorific Value of Coal and Coke*. West Conshohocken, 2011.

ASTM. *ASTM D5373-14 Standard Test Methods for Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Analysis Samples of Coal and Carbon in Analysis Samples of Coal and Coke*. West Conshohocken, 2014.

ABURAI, N. et al. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. *Algal Research*, v. 2, p. 237 – 243, 2013.

ABURAI, N.; SUMIDA, D.; ABE, K. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, v. 8, p. 30 – 36, 2015.

ANDRADE, D. S. et al. Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo. In: _____. LONDRINA: IAPAR, 2014. v. 1, cap. 1, p. 23 – 23.

ANDRADE, D. S. et al. Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo. In: _____. Londrina: IAPAR, 2014. v. 1, cap. 1.

ANDRADE, D. S. et al. Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo. In: _____. Londrina: IAPAR, 2014. v. 1, cap. 6.

ANDRADE, D. S. et al. Microalgas de águas continentais – Potencialidades e desafios do cultivo. In: _____. Londrina: IAPAR, 2014. cap. 6

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. . Décima primeira. Washington D. C., 1990.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL – BNDES. *Guias Socioambientais do BNDES: Setor Sucroenergético*. . Brasília: [s.n.], 2014. Acesso em: 29 nov. 2015. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes/_pt/Galerias/Arquivos/empresa/download/acao/_socioambiental/GuiaSocioAmbienta__Sucroenergetico.pdf>.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL BNDES; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS CGEE. *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Primeira ed. Rio de Janeiro, 2008.

BARRA, L. et al. The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. *Marine Drugs*, v. 12, p. 1641 – 1675, 2014.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General overview. . In:____. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. (Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology), p. 1 – 34.

BARSANTI, L. P. et al. The world of algae. . In:____. [S.I.]: Springer/ NATO Public Diplomacy Division, 2008. (Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection.), p. 1 – 15.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 207 – 210, 2007.

BEHZADI, S.; FARID, M. Review: Examining the use of different feedstock for the production of biodiesel . *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v. 2, p. 480 – 486, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. *Introdução à química de alimentos*. Segunda. São Paulo: Livraria Varela, 1995.

BORGES, L. et al. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. *Atlântica*, Rio Grande, v. 29, n. 1, p. 35 – 46, 2007.

BRASIL. *Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil*. 2014.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – a review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557 – 577, 2010.

CABANELAS, I. T. D. et al. Botryococcus, what to do with it? Effect of nutrient concentration on biorefinery potential. . *Algal Research*, v. 11, p. 43 – 49, 2015.

CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. *Engenharia Ambiental*, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 321 – 338, 2009.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, p. 1412 – 1421, 2010.

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. da G. G. Calorific values of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different phosphorus concentrations. *Phycological Research*, v. 61, p. 286 – 329, 2013.

CHISTI, Y. Research review paper: biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294 – 306, 2007.

CHO, K. et al. Bioflocculation of the oceanic microalga *Dunaliella salina* by the bloomforming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and its effect on biodiesel properties of the biomass. *Bioresource Technology*, v. 202, p. 257 – 261, 2016.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 21 – 34, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2015*. Brasília: [s.n.], 2015. Acesso em: 13 Dez. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\08\13\15\58\44_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf>.

COSTANZO, W. et al. Effect of low temperature hydrothermal liquefaction on catalytic hydrodenitrogenation of algae biocrude and model macromolecules. *Algal Research*, v. 13, p. 53 – 68, 2016.

CROCKFORD, H. D.; KNIGHT, S. B. *Fundamentos de físico-química*. [S.l.]: Livros Técnicos e Científicos, 1977.

D B RODRIGUEZ-AMAYA and M KIMURA and J AMAYA-FARFAN. *Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos*. Brasília, 2008.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, v. 88, p. 3473 – 3480, 2011.

D'OCA, M. G. M. et al. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 1533 – 1538, 2011.

FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. Terceira. New York – U.S.A: Marcel Dekker, 1996.

FENTON, O.; ÓHUALLACHÁIN, D. Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): a review. *Algal Research*, v. 1, p. 49 – 56, 2012.

FONTES, P. J. P. *Auto-suficiência energética em serraria de Pinus e aproveitamento de resíduos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Setembro 1994.

FU, C.-C. et al. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 8750 – 8754, 2010.

- GARCIA-GONZALEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis beta-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, n. 115, p. 81 – 90, 2005.
- GARCIA, M. L.; FUESS, L. T. *Qual o valor da vinhaça? : mitigação de impacto ambiental e recuperação de energia por meio da digestão anaeróbia*. São Paulo, 2012.
- GENTILI, A.; CARRETTI, F. Evaluation of a method based on liquid chromatography- diode array detector-tandem mass spectrometry for a rapid and comprehensive characterization of fat-soluble vitamin and carotenoid profile of selected plant foods. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 684 – 697, 2011.
- GOIRIS, K. et al. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, p. 1477 – 1486, 2012.
- GOUVEIA, L. *Microalgae as a feedstock for biofuels*. Heidelberg, Germany: Springer, 2011.
- GRÜNEWALD, K.; HIRSCHBERG, H.; HAGEN, C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 6023 – 6029, 2001.
- GUIHÉNEUF, F.; STENGEL, D. B. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, v. 10, p. 152 – 163, 2015.
- HALFHIDE, T. et al. Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipids using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Research*, v. 6, p. 152 – 159, 2014.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 3, p. 1037 – 1047, 2010.
- HARUN, R. et al. Algal biomass conversion to bioethanol – a step-by-step assessment. *Biotechnology Journal*, v. 9, p. 73 – 86, 2014.
- HEMPEL, N.; PETRICK, I.; BEHRENDT, F. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, v. 24, p. 1407 – 1418, 2012.
- HUANG, G. H. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v. 87, p. 38 – 46, 2010.

HUANG, J. J.; CHEUNG, P. C. Enhancement of Polyunsaturated Fatty Acids and Total Carotenoid Production in Microalgae by Ultraviolet Band A (UVA, 365 nm) Radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 4629 – 4636, 2011.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 703 – 709, 2013.

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: Optimizing fatty ester (composition to improve fuel properties). *Energy Fuels*, v. 22, p. 1358 – 1364, 2008.

KNOTHE, G. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. Algae: Will algae-derived biodiesel perform? *Green Chemistry*, v. 13, p. 3048 – 3065, 2011.

KOMOLAFE, O. et al. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresource Technology*, v. 154, p. 297 – 304, 2014.

KUMAR, G. S.; PRAJAPATI, S. K. *Agent based modeling of algal production of biofuel*. Chennai, India, 2010.

LAURENS, L. M. L. et al. Strain, biochemistry, and cultivation-dependent measurement variability of algal biomass composition. *Analytical Biochemistry*, v. 452, p. 86 – 95, 2014.

LAVANYA, M. et al. Hydrothermal liquefaction of freshwater and marine algal biomass: A novel approach to produce distillate fuel fractions through blending and co-processing of biocrude with petrocrude. *Bioresource Technology*, v. 203, p. 228 – 235, 2016.

LEMOINE, Y.; SCHOEFS, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, v. 106, p. 155 – 177, 2010.

LIU, J. et al. Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis. *Algal Research*, v. 12, p. 149 – 155, 2015.

LIU, Y.-Q. et al. Investigation on Pyrolysis of Microalgae *Botryococcus braunii* and *Hapalosiphon* sp. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 10320 – 10326, 2012.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações*. São Carlos: Rima, 2006.

LOURENÇO, S. O. et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*, v. 39, p. 17 – 32, 2004.

LUNDQUIST, T. J. et al. *Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production*. [S.l.], 2010.

MARKOU, G.; ICONOMOU, D.; MUYLEAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, v. 13, p. 79 – 84, 2016.

MARKOU, G.; NERANTZIS, E. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, v. 31, p. 1532 – 1542, 2013.

MASOJÍDEK, J. et al. Mass cultivation of fresh water microalgae. In: ____. [S.l.]: Oxford: Academic Press, 2008. (Encyclopedia of Ecology), p. 2226 – 2235.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 217 – 232, 2010.

MENEZES, T. J. B. Etanol: o combustível do Brasil. *Agronômica Ceres*, 1980.

MOHANA, S. et al. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. *Journal of Hazardous Materials*, v. 163, p. 12 – 25, 2009.

MOLINA, G. E.; MEDINA, R. A.; GIMÉNEZ, G. A. Recovery of algal PUFAs. In: _____. London: Taylor & Francis, 1999.

MULDERS, K. J. M. et al. Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*. *Algal Research*, v. 6, p. 8 – 16, 2014.

NAKANISHI, K. *Chlorophyll rich and salt resistant Chlorella*. 2001. European Patent 1, 142,985.

NICHOLS, H. Growth media-freshwater. In: Cambridge: Cambridge University Press, 1973. (Handbook of psychological methods), p. 7 – 24.

NIELSEN, M. M. et al. Variation in biochemical composition of *Saccharina latissima* and *Laminaria digitata* along an estuarine salinity gradient in inner Danish Waters. *Algal Research*, v. 13, p. 235 – 245, 2016.

NOGUEIRA, L. A. H. et al. *Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Primeira. Rio de Janeiro, 2008.

Office of Energy Efficiency and Renewable Energy - DOE UNITED STATES- U.S. Department of Energy. *National Algal Biofuels Technology Roadmap*. 2010. Acesso em: 07 set. 2015.

Disponível em: <https://www1.eere.energy.gov/bioenergy/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf>.

OLGUIN, E. J. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1031 – 1046, 2012.

OLIVIER, J. G. J. et al. *Trends in global CO2 emissions*. [S.l.], 2014.

PACHAURI, R. K.; MEYER, L. A. *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC): Climate Change 2014: Synthesis Report*. [S.l.], 2014.

PIGNOLET, O. et al. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *J. Ind Microbiol Biotechnol*, v. 40, p. 781-796, 2013.

POKOO-AIKINS, G. et al. Design and analysis of biodiesel production from algae grown through carbon sequestration. *Clean Technologies and Environmental Policy*, n. 12, p. 239 – 254, 2010.

PORRA, R.; THOMPSON, W.; KRIEDEMANN, P. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 975, p. 384 – 394, 1989.

PROTÁSIO, T. P. et al. Relação entre o poder calorífico superior e os componentes elementares e minerais da biomassa vegetal. *Brazilian Journal of Forestry Research*, v. 31, n.66, p. 113-122, 2011.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 287 – 293, 2001.

PUOTINEN, C. J. *Herbs for detoxification*. [S.l.]: McGraw-Hill Professional, 1999, p. 25.

RAO, A. R. et al. Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 8553 – 8559, 2010.

RAPOSO, M. F. D. J.; MORAIS, R. M. D.; MORAIS, A. M. D. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Science*, v. 93, p. 479 – 486, 2013.

REE, R.; VANNEVELINK, B. *Status Report Biorefinery*. Wageningen, 2007.

REVIERS, B. D. Natureza e posição das algas na árvore filogenética do mundo vivo. In: . Porto Alegre: Armed, 2010. p. 19–57. (Algas: uma abordagem filogenética e ecológica).

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de alimentos*. Segunda. São Paulo: Editora Blucher, 2007.

RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 441 – 451, 2000.

RODOLFI, L. et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, p. 100 – 112, 2009.

ROSENBERG, J. N. et al. A green light for engineering algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, p. 430 – 436, 2008.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. *Árvore do conhecimento cana-de-açúcar: Adução - resíduos alternativos*. [S.l.], 2015. Acesso em: 19 Nov. 2015.

Disponível em:

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_39_711200516717.html>.

SAEMAN, J. F.; BUBL, J. L.; HARRIS, E. E. Industrial and Engineering Chemistry. In: _____. [S.l.]: Analytical, 1945. v. 17.

SALIH, M. F. Microalgae tolerance to high concentrations of carbon dioxide: a review. *Journal of Environmental Protection*, n. 2, p. 648 – 654, 2011.

SATYAWALI, Y.; BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. *Journal of Environmental Management*, v. 86, p. 481 – 497, 2008.

SANTANA, H. *Isolamento, seleção e caracterização de microalgas com alta produtividade de biomassa em meio de cultivo a base de vinhaça e CO₂*. Dissertação (Mestrado) — Instituto Multidisciplinar em Saúde – Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016. 113f.

SCOPARO, C. H. G. *Remoção de CO₂ em fotobiorreatores utilizando efluentes petroquímicos*. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Engenharia Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010. p. 137.

SIAUT m et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, v. 7, 2011.

SILVA, F. de A. S. Assistat. Versão 7.7 beta (2015). Disponível em: <http://www.assistat.com/indexp.html>.

- SINGH, U. B.; AHLUWALIA, A. S. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, v. 18, p. 73 – 95, 2013.
- SLUITER, A.; SLUITER, J. *Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC - Technical Report NREL/TP-510-42624*. 2008. Acesso em: 29 de setembro de 2015. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42624.pdf>>.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*. [S.I.]: ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 87 – 96, 2006.
- STURM, B. S. M.; LAMER, S. L. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Applied Energy*, v. 88, p. 3499 – 3506, 2011.
- SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 4316 – 4342, 2012.
- SUBHADRA, B. G. Sustainability of algal biofuel production using integrated renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*, v. 38, p. 5892 – 5901, 2010.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, n. 1, 2002.
- SYDNEY, E. B. et al. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5892 – 5896, 2010.
- TANG, X. et al. Element and chemical compounds transfer in bio-crude from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 202, n. 8, 2016.
- TELES, V. C. et al. Caracterização de biomassa da nova espécie de microalga verde *Micractinium* sp. Embrapa|LBA32 quando cultivada em meio à base de vinhaça utilizando fotobiorreatores. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 55., 2015*. GOIÂNIA-GO: [s.n.], 2015.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6ª ed.. ed. [S.I.]: ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.
- TRENTACOSTE, E. M.; MARTINEZ, A. M.; ZENK, T. The place of algae in agriculture: policies for algal biomass production. *Photosynthesis Research*, n. 123, p. 305 – 315, 2015.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; R, M.-N.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone Tlss) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, v. 25, p. 207 – 216, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, p. 1 – 40, 2006.

V´LCHEZ, C. et al. Marine carotenoids: biological functions and commercial applications. *Marine Drugs*, v. 9, p. 319 – 333, 2011.

WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel and biomass feedstocks: review and analysis of the biochemistry, energetics and economics. *Energy & Environmental Science*, v. 3, p. 554 – 590, 2010.

WU, Y. H. et al. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous- starvation cultivation condition. *Bioresource Technology*, v. 112, p. 193 – 198, 2012.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass*. 2013. Acesso em: 06 de junho 2015. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60957.pdf>>.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. *Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification*. 2013. Acesso em: 25 de setembro 2015. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60958.pdf>>.

WYCHEN, S. V.; LAURENS, L. M. L. *Determination of Total Solids and Ash in Algal Biomass*. 2013. Acesso em: 04 de junho 2015. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy14osti/60956.pdf>>.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgae cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark- heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 87 – 102, 2000.

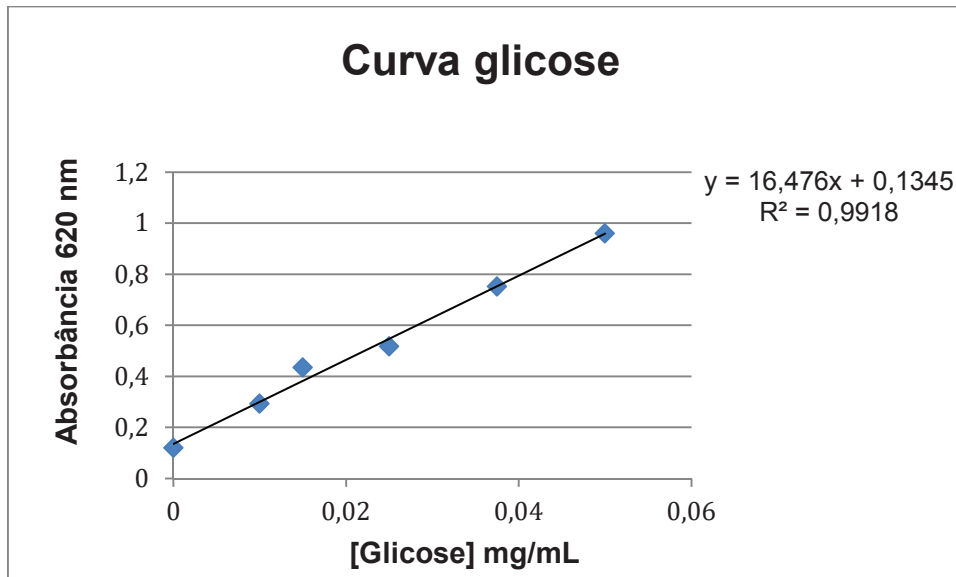
ZHANG, W. et al. Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresource Technology*, v. 173, p. 52 – 58, 2014.

ZHAOA, B. et al. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ xation. *Chemical Engineering Research and Design*, n. 89, p. 1758 – 1762, 2011.

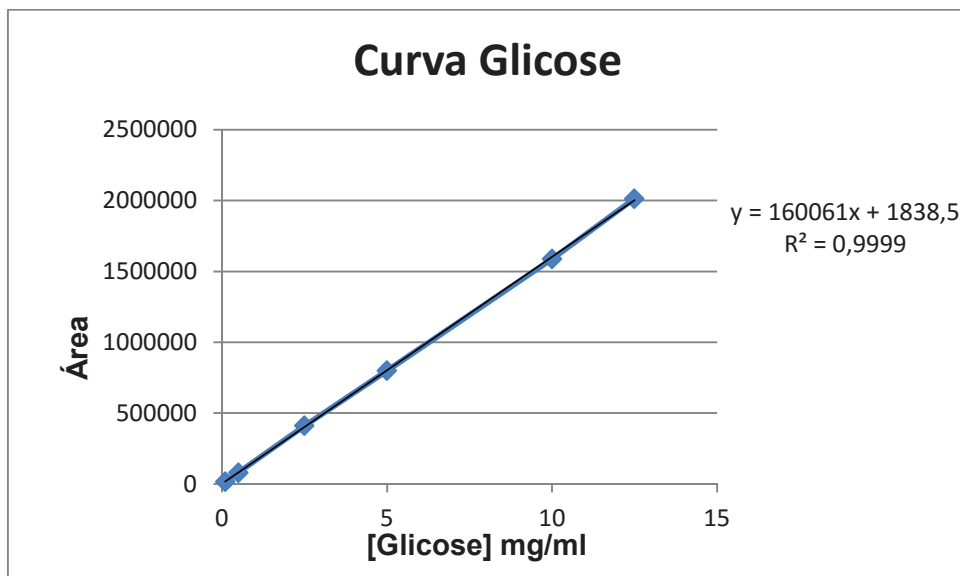
ZHOU, Y. et al. Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain with improved biomass production under low light and mixotrophic conditions. *Algal Research*, v. 11, p. 134 – 147, 2015.

ANEXOS

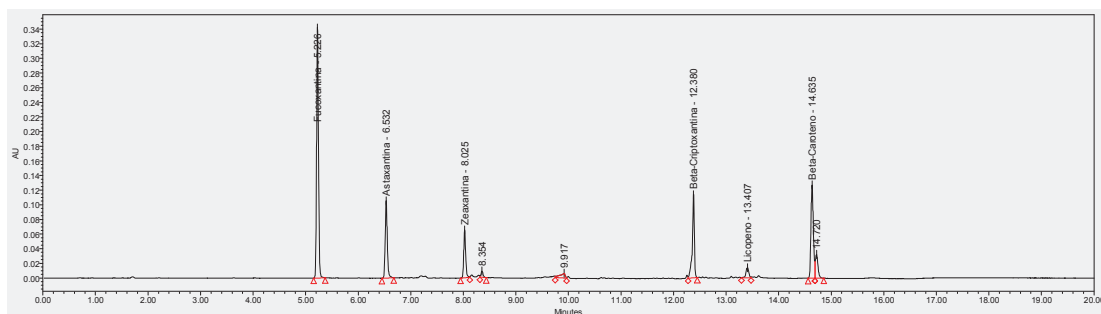
ANEXO: 1. Curva analítica (Análise de carboidratos estruturais).



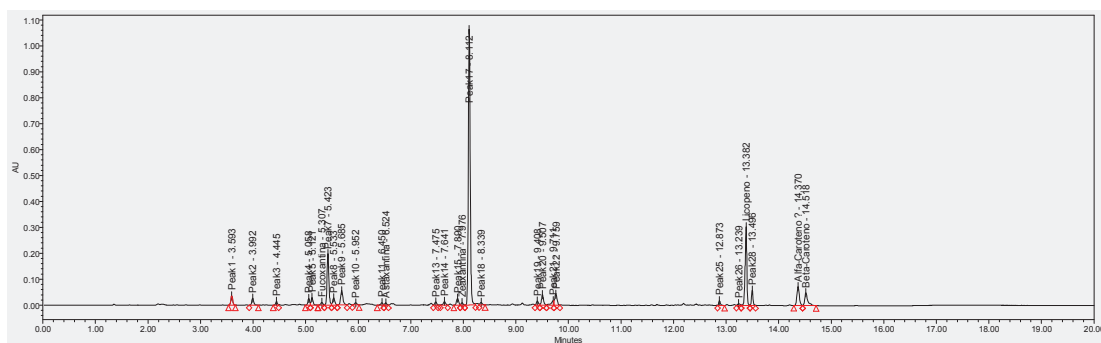
ANEXO: 2 . Curva analítica (Análise Amido).



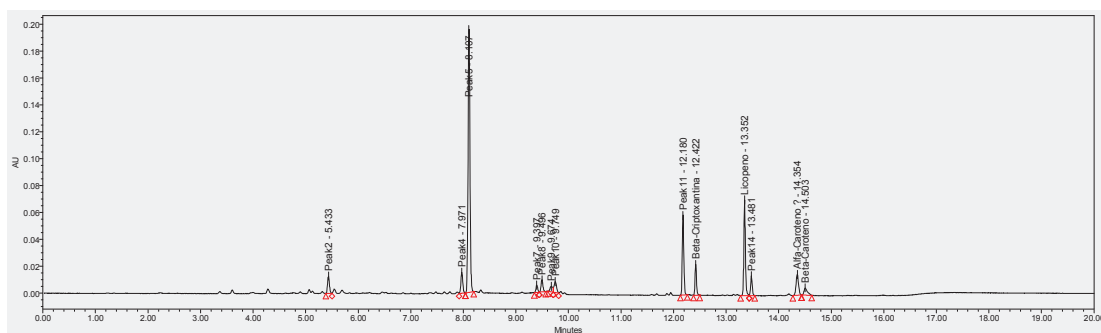
ANEXO 3. Cromatograma típico para a solução-padrão “mix”. Ordem de eluição: 1) fucoxantina; 2) astaxantina; 3) zeaxantina; 4) β -criptoxantina; 5) licopeno; 6) β -caroteno. Tempo total de análise: 20 minutos.



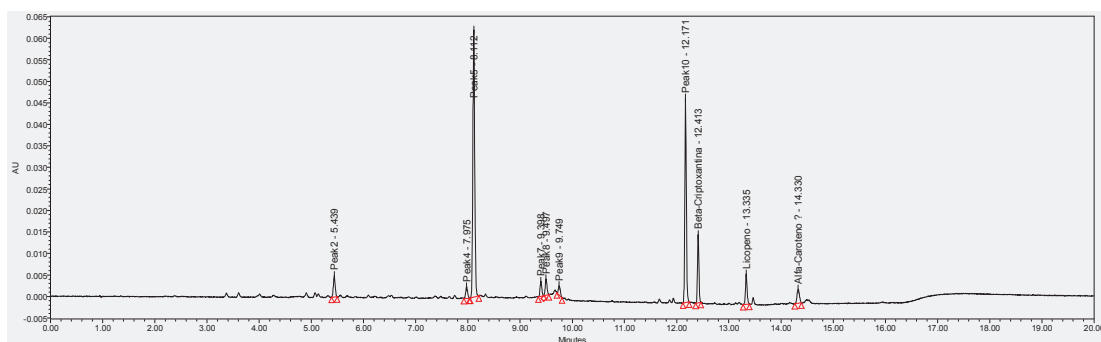
ANEXO 4. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|32 em meio BBM.



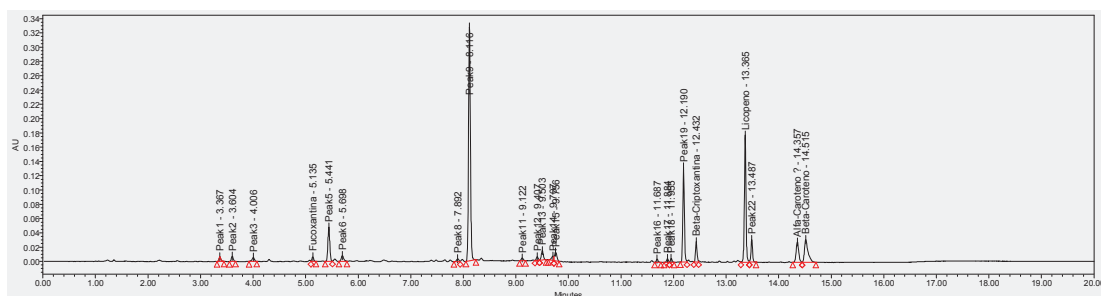
ANEXO 5. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|32 em meio vinhaça 50%.



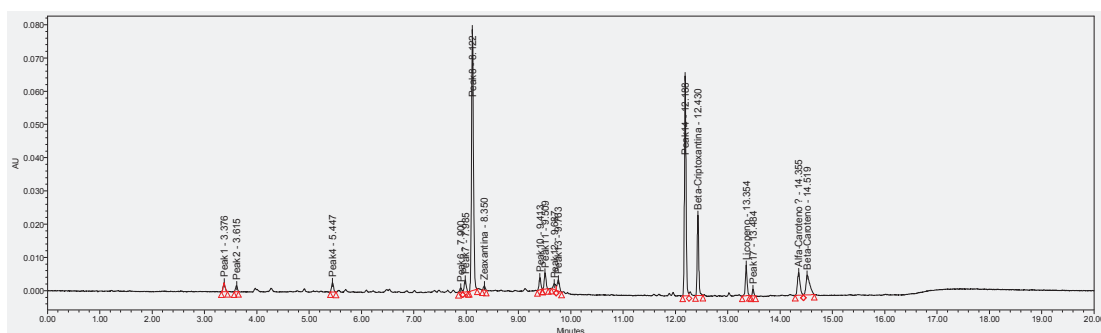
ANEXO 6. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|32 vinhaça clarificada 100%.



ANEXO 7. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|40 em meio BBM.



ANEXO 8. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|40 vinhaça 50%.



ANEXO 9. Cromatograma obtido para a amostra Embrapa LBA|40 em vinhaça clarificada 100%.

