



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

Avaliação bioquímica da biomassa de microalgas cultivadas em vinhaça

Mariana Machado de Castro

Brasília/DF

2024



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

Avaliação bioquímica da biomassa de microalgas cultivadas em vinhaça

Aluna: Mariana Machado de Castro

Orientador: Dr. Thomas Christopher Rhys Williams

Coorientador: Dr. Luiz Fernando Roncaratti Junior

**Dissertação apresentada à Universidade
de Brasília como requisito para obtenção
do título de Mestre em Botânica pelo
Programa de Pós Graduação em Botânica.**

Brasília/DF

2024

“São as perguntas que não sabemos responder que mais nos ensinam. Elas nos ensinam a pensar. Se você dá uma resposta a um homem, tudo o que ele ganha é um fato qualquer. Mas, se você lhe der uma pergunta, ele procurará suas próprias respostas.”

- **Patrick Rothfuss, O Temor do Sábio**

Agradecimentos

Agradeço

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, pelo respeito e compreensão dedicados ao longo desses meses e por tornar esse período de aprendizado algo maravilhoso de se viver; à Dra. Christina Cleo Vinson Williams, pela ajuda fornecida e pelos momentos compartilhados no laboratório; aos pesquisadores Dr. Luiz Fernando Roncaratti Júnior e Dra. Letícia Jungmann Cançado, pela colaboração e por auxiliarem no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio e financiamento da pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, Bruno Val e Letícia Barbosa, por dividirem comigo as rotinas do laboratório, pela ajuda durante as dificuldades encontradas nos experimentos e pelos sorrisos e conversas compartilhadas durante esses anos. À Alessa Bembom, por ajudar a me adaptar em um ambiente desconhecido e por sempre alegrar os momentos difíceis.

Aos estagiários Clara Katharina, Maria Eduarda Chaves, Ana Luísa Kruschewsky, João Vítor Vieira, Leonardo Coutinho da Silva, Márcio Marques de Paula, Arianne Leandro Souto e Lucas Gasparotto de Castro, pela ajuda e dedicação nos meses que compartilhamos no laboratório e pela amizade que construímos nesse tempo. Vocês trouxeram eficiência e alegria ao nosso ambiente de trabalho.

Aos meus amigos, pelas palavras positivas e por sempre me estimularem a trilhar esse caminho. Em especial à minha melhor amiga, Anna Eduarda, que compartilhou comigo as alegrias, mas também todos os momentos difíceis, agradeço por sempre estar ao meu lado e por acreditar em mim, principalmente quando eu não o fazia.

À minha família, pelo companheirismo, por sempre torcerem por mim e me ajudarem a trilhar o caminho que eu escolhi, mesmo a frente de obstáculos e imprevistos. Especialmente aos meus pais, Maria e Edson, por serem meus pilares e minha inspiração de vida, agradeço por todo o carinho e amor dedicado a mim. Minha maior alegria é poder compartilhar cada vitória ao lado de vocês.

Resumo

Sendo um dos maiores produtores agrícolas do mundo, o Brasil é um dos países que mais gera resíduos agroindustriais, como a vinhaça, gerada nos diversos processos da indústria sucroalcooleira. Esta quando descartada de maneira inadequada, pode gerar diversos impactos negativos, principalmente aos recursos hídricos. Acontece que a alta carga de material orgânico e mineral da vinhaça que pode trazer prejuízos para o meio ambiente, também é uma fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas, sendo possível associar a biorremediação desse efluente com a produção de compostos de interesse, através da biomassa gerada por estes microrganismos. Com isso em mente, neste estudo foram analisados o crescimento em vinhaça e a biomassa gerada de 10 cepas de microalgas da Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicadas à Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa Agroenergia (DF, Brasil), a fim de selecionar aquelas com o melhor desempenho tendo este resíduo como cultivo. Após essa etapa, procurou-se avaliar o impacto que a vinhaça tem sob a produção, quantitativa e qualitativa, de biomassa de 4 cepas, realizando um crescimento comparativo entre ela e o meio sintético BG11, em dois sistemas de cultivo e quantidade de volume diferentes. Na triagem com as 10 cepas, todas demonstraram um bom crescimento em vinhaça, sendo observadas pequenas diferenças na análise bioquímica de suas biomassas, mas que geralmente são esperadas quando se analisam espécies diferentes. Em relação aos crescimentos comparativos, enquanto as análises de pigmentos e ácidos graxos das biomassas das microalgas cultivadas em um volume de 10 mL demonstraram que a vinhaça não gerou nenhum impacto, positivo ou negativo, sob a produção destas moléculas, diferentes mudanças são notadas quando se analisa a biomassa produzida no cultivo de 1 L, como por exemplo no crescimento, no rendimento da biomassa, no diâmetro celular e nas moléculas de interesse analisadas (ácidos graxos e pigmentos), indicando que tanto a alteração da composição da vinhaça como das condições de cultivo possam ter tido um impacto significativo no desenvolvimento das microalgas nesse resíduo. A análise de auxinas incrementa esses resultados, demonstrando que esses microrganismos possuem potencial para produzir moléculas fitorreguladoras e que essa produção pode ser afetada diretamente pela vinhaça, por sua composição e pelo sistema de cultivo em que ela é aplicada.

Palavras-chaves: microalgas; vinhaça; biorrefinarias; ácidos graxos; pigmentos; auxina.

Abstract

As one of the largest agricultural producers in the world, Brazil is one of the countries that generates the most agro-industrial waste, such as vinasse, generated in the various processes of the sugar and alcohol industry, and which, when discarded inappropriately, can generate several negative impacts, mainly on water resources. It turns out that the high load of organic and mineral material in vinasse, which can cause harm to the environment, is also a source of nutrients for the growth of microalgae, making it possible to associate the bioremediation of this effluent with the production of compounds of interest, through biomass generated by these microorganisms. With this in mind, in this study the growth in vinasse and the biomass generated from 10 strains of microalgae from the Collection of Microorganisms and Microalgae Applied to Agroenergy and Biorefineries, from Embrapa Agroenergia (DF, Brazil), were analyzed in order to select those with the better performance during cultivation using this residue. After this stage, the objective was to evaluate the impact that vinasse has on the quantitative and qualitative production of biomass from 4 strains, carrying out comparative growth between vinasse and the synthetic medium BG11, in two different cultivation systems and volumes. In screening the 10 strains, all demonstrated good growth in vinasse, with small differences being observed in the biochemical analysis of their biomass, but these are generally expected when analyzing different species. Regarding comparative growth, while analyses of pigments and fatty acids from microalgae biomass grown in a volume of 10 mL demonstrated that vinasse did not generate any impact, positive or negative, on the production of these molecules, alterations are noted when analysing the biomass produced in the 1 L cultures, including in growth, biomass yield, cell diameter and the molecules of interest analyzed (fatty acids and pigments), indicating that both the change in the composition of the vinasse and the conditions of cultivation may have had a significant impact on the development of microalgae in this residue. Auxin analysis adds to these results, demonstrating that these microorganisms have the potential to produce phyto regulatory molecules and that this production can be directly affected by vinasse, its composition and the cultivation system in which it is applied.

Keywords: microalgae; vinasse; biorefineries; fatty acids; pigments; auxin.

Lista de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de algas com uma diversidade de formatos.....	17
Figura 2. Ilustração da árvore filogenética destacando os diferentes grupos de algas.....	18
Figura 3. Cultivo de microalgas em fotobiorreatores.....	20
Figura 4. Fotos das 10 cepas de microalgas analisadas.....	36
Figura 5. Modelo de cultivo utilizado para a triagem das 10 cepas de microalgas em vinhaça.....	39
Figura 6. Modelo de cultivo utilizado para o crescimento comparativo em vinhaça e BG11 das 4 cepas de microalgas selecionadas.	40
Figura 7. Modelo de cultivo utilizado para o crescimento comparativo realizado em 1L de meio.....	42
Figura 8. Curva de crescimento de 10 cepas de microalgas em vinhaça durante 29 dias.....	47
Figura 9. Produtividade de biomassa de microalgas resultante da triagem em vinhaça, após 4 semanas de cultivo.....	48
Figura 10. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça.	49
Figura 11. Perfil de ácidos graxos das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça segundo a presença ou não de insaturações.....	51
Figura 12. Curva de crescimento, baseada no número de células, de 4 cepas de microalgas (LBA 6, LBA 39, LBA 40, LBA 47) em vinhaça e BG11, cultivadas em um sistema de 10 mL de cultivo por 24 dias.....	54
Figura 13. Comparação do rendimento da biomassa seca em g/L de 4 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça e BG11, em um sistema de 10 mL de cultivo.....	55
Figura 14. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em BG11 e vinhaça, em um sistema de 10 mL de cultivo.....	56
Figura 15. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas, cultivadas em um sistema de 10 mL de cultivo, segundo a presença ou não de insaturações.....	58
Figura 16. Curva de crescimento, baseada no número de células, de 4 cepas de microalgas (LBA 6, LBA 39, LBA 40, LBA 47) cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11, por 21 dias	60
Figura 17. Comparação do rendimento da biomassa seca de 4 microalgas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11.....	61
Figura 18. Comparação do rendimento da biomassa seca de 4 microalgas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11, após correção dos valores relativos aos cultivos em vinhaça.....	62

Figura 19.Comparação do tamanho celular da LBA 39 cultivada em 1 L de meio (BG11 e vinhaça), no dia inicial (A) e final (B) do cultivo.....	63
Figura 20.Variação do diâmetro celular de 4 cepas de microalgas cultivadas em 1L de vinhaça e BG11 (controle).	64
Figura 21. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em BG11 e vinhaça, em um sistema de 1 L de cultivo	65
Figura 22. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas cultivadas em 1 L de meio, segundo a presença ou não de insaturações.....	66
Figura 23. Curvas de calibração com diferentes concentrações dos padrões de ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB).....	69
Figura 24. Teor de duas auxinas (AIA e AIB) extraídas das 4 cepas de microalgas cultivadas em 1 L de BG11 e vinhaça.....	70
Figura 25. Análise do rendimento de biomassa seca (g/L) entre os dois crescimentos comparativos realizados (10 mL de cultivo e 1 L de cultivo).....	71
Figura 26. Comparação do rendimento da massa seca obtida na análise de ácidos graxos das 4 cepas de microalgas cultivadas em diferentes volumes (10 mL e 1 L).....	72
Figura 27. Comparação do teor de clorofila <i>a</i> e <i>b</i> entre os cultivos comparativos realizados (10 mL e 1 L).....	73
Figura 28. Comparação do teor de carotenoides entre os cultivos comparativos realizados (10 mL e 1 L).....	74

Lista de tabelas

Tabela 1: Cepas de microalgas utilizadas nas análises.....	35
Tabela 2. Composição do meio BG11 utilizado para o cultivo das microalgas.....	36
Tabela 3. Composição dos parâmetros físico-químicos da vinhaça coletada no dia 29/10/2021.....	37
Tabela 4. Composição dos parâmetros físico-químicos da vinhaça coletada no dia 02/06/2023.....	38
Tabela 5. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em vinhaça.....	47
Tabela 6. Perfil de ácidos graxos de 10 cepas de microalgas crescidas em vinhaça (% do total de FAMES).....	50
Tabela 7. Teor médio de pigmentos extraídos das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça.....	52
Tabela 8. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em 10 mL de vinhaça e BG11.....	53
Tabela 9. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça e BG11 (% do total de FAMES), em um sistema de 10 mL de cultivo.....	57
Tabela 10. Teor de pigmentos extraídos das 4 cepas de microalgas cultivadas em 10 mL de BG11 e vinhaça	59
Tabela 11. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11.....	60
Tabela 12. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas (% do total de FAMES), cultivadas em vinhaça e BG11 em um sistema de 1 L de cultivo.....	67
Tabela 13. Teor de pigmentos extraídos das 4 cepas de microalgas crescidas em BG11 e vinhaça.....	68
Tabela 14. Comparação da % de ácidos graxos saturados e insaturados das 4 cepas de microalgas cultivadas em diferentes volumes (10 mL e 1 L).....	72

Lista de equações

Equação 1. Cálculo da densidade celular do cultivo através da Câmara de Neubauer.....	41
Equação 2. Cálculo da concentração de clorofila a.....	44
Equação 3. Cálculo da concentração de clorofila b.....	44
Equação 4. Cálculo da concentração de carotenoides.....	44

Sumário

1. Introdução Geral.....	13
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Algas.....	16
2.2. Compostos de interesse produzidos pelas microalgas.....	20
2.2.1. Pigmentos.....	20
2.2.2. Ácidos Graxos.....	22
2.2.3. Fitohormônios.....	25
2.3. Atividade biológica das microalgas aplicada na agricultura.....	27
2.4. Vinhaça e a indústria canavieira.....	29
2.5. Biorrefinarias	31
3. Hipótese.....	34
4. Objetivos.....	34
5. Materiais e Métodos.....	35
5.1. Cepas de microalgas.....	35
5.2. Composição da vinhaça.....	37
5.3. Tipos de cultivos e seus respectivos objetivos.....	38
5.3.1. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça.....	39
5.3.1.1. Coleta da biomassa.....	40
5.3.2. Análise do impacto da vinhaça sob o crescimento e produção de biomassa de 4 cepas de microalgas.....	40
5.3.3. Análise do aumento do volume de cultivo sob o crescimento e produção de biomassa de quatro cepas de microalgas.....	41
5.3.3.1. Coleta da biomassa.....	42
5.4. Esterificação/Transesterificação <i>in situ</i> para análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	43
5.5. Extração e análise de pigmentos por espectrofotometria.....	43
5.6. Extração e análise de auxinas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	44
5.7. Análise estatística.....	46
6. Resultados.....	46
6.1. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça.....	46

6.1.1. Curva de crescimento e produção de biomassa.....	46
6.1.2. Análise da produção e do perfil de ácidos graxos.....	48
6.1.3. Análise da produção de pigmentos.....	52
6.2. Análise do impacto da vinhaça sob o crescimento e composição da biomassa de microalgas.....	52
6.2.1. Curva de crescimento e produção de biomassa.....	53
6.2.2. Análise da produção e perfil de ácidos graxos.....	55
6.2.3. Análise da produção de pigmentos.....	59
6.3. Análise do cultivo em maior escala de microalgas em vinhaça.....	59
6.3.1. Curva de crescimento e produção de biomassa.....	59
6.3.2. Análise do perfil de ácidos graxos.....	65
6.3.3. Análise da produção de pigmentos.....	68
6.3.4. Análise da produção e quantificação de duas auxinas (AIA e AIB).....	68
6.4. Comparação dos cultivos realizados em 10 mL e 1 L de BG11 e vinhaça.....	70
6.4.1. Análise da curva de crescimento e rendimento da biomassa seca	70
6.4.2. Análise do perfil de ácidos graxos.....	71
6.4.3. Análise de pigmentos.....	
7. Discussão.....	74
7.1. Análise do crescimento de 10 espécies microalgas em vinhaça.....	74
7.2. Análise bioquímica da biomassa cultivada em vinhaça.....	75
7.3. Efeito da vinhaça sob o crescimento e a biomassa de 4 cepas de microalgas quando comparado com o meio sintético.....	77
7.4. Efeito do escalonamento do cultivo e da composição da vinhaça sob o crescimento e o rendimento da biomassa das microalgas.....	80
7.5. Análise da relação entre o perfil lipídico dos dois crescimentos comparativos e o efeito do escalonamento e da privação de nitrogênio no cultivo das microalgas.....	82
7.6. Efeito da intensidade luminosa sob o acumulo de pigmentos na biomassa das microalgas.....	85
7.7. Análise da produção de duas auxinas por quatro espécies de microalgas.....	87
7.8. Análise teórica da atividade estimulante das microalgas.....	89
8. Conclusões.....	91
9. Bibliografia.....	93

1. Introdução Geral

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, sendo um dos países que mais gera resíduos agroindustriais que muitas vezes são descartados de maneira inadequada, gerando impactos negativos, principalmente para os recursos hídricos e outros ambientes aquáticos. Dentre esses resíduos, vale destacar a vinhaça, um subproduto gerado pela destilação do caldo da cana de açúcar na produção de etanol e conhecida por ser um líquido ácido, de cor escura e rica em matéria orgânica, apresentando em sua composição macronutrientes como nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), e micronutrientes como boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn) (Carpanez et al., 2022). A geração de etanol a partir da cana-de-açúcar traz diversos benefícios econômicos para o país, uma vez que a indústria sucroalcooleira gera um grande número de empregos no Brasil, além de movimentar a economia interna, visto que esse material vegetal pode ser utilizado como matéria-prima não somente para a produção de combustível, mas também de outros produtos como açúcar e aguardentes, que também são bastante consumidos no país (Fonseca, 2014). Contudo, é preciso também analisar o impacto da produção e do descarte dos resíduos gerados por essa indústria, já que devido à sua alta taxa de matéria orgânica, pH baixo e altos níveis de demanda bioquímica de oxigênio, a vinhaça é considerada uma substância poluente, aproximadamente 100 vezes mais que o esgoto doméstico (Christofolletti et al.; 2013), sendo responsável por provocar a proliferação indesejada de microrganismos, além de ser altamente tóxica para os animais aquáticos e sua cor escura dificultar a penetração da luz nesses ambientes, prejudicando a realização de fotossíntese dos organismos autotróficos.

Muitas vezes, a vinhaça é reutilizada na aplicação do solo para aumentar sua fertilidade, até mesmo das próprias plantações de cana-de-açúcar, devido a alta presença de nutrientes em sua composição, como cálcio (Ca), potássio (K) e magnésio (Mg) e ao seu alto teor de matéria orgânica. Entretanto, estudos já mostraram que, apesar dos efeitos positivos sobre a produtividade, essa prática pode levar a alterações físicas, químicas e bioquímicas nas propriedades do solo. Dentre diversas consequências são relatadas o aumento do consumo de oxigênio e a eutrofização do solo, através da diminuição do seu potencial redox por microsítios anaeróbios resultantes da adição inadequada de matéria orgânica desse resíduo; alteração dos ciclos do nitrogênio e do carbono; indução de deficiência de micronutrientes,

além da contaminação do solo e águas subterrâneas, principalmente por sais, metais e sólidos dissolvidos (Moran-Salazar et al., 2016).

É estimado que para cada litro de etanol produzido no Brasil são gerados de 10 a 15 litros de vinhaça (Moraes et al., 2015) e, de acordo com o boletim do 2º levantamento da safra 2022/23 de cana de açúcar de agosto de 2022 da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, 2013-) o Brasil produziu, até o momento registrado, um volume estimado de 572.874,9 mil toneladas de cana-de-açúcar e 25,83 bilhões de litros de etanol à base dessa matéria prima, totalizando somente nessa parcial mais de 260 bilhões de litros de vinhaça gerado. Como já mencionado, o impacto que esse resíduo tem sob o meio ambiente quando descartado e/ou usado de forma inadequada é imenso. Portanto é necessário procurar alternativas sustentáveis para o direcionamento desse material produzido.

A alta carga de material orgânico e mineral da vinhaça que pode trazer prejuízos para o meio ambiente, também é uma fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas, organismos fotossintetizantes presentes em grande quantidade em ambientes aquáticos. Ao serem cultivadas em águas residuais ou meios contaminados com esse resíduo, algumas espécies de algas têm a capacidade de remover nutrientes e outros materiais orgânicos em excesso do ambiente contaminado e concomitantemente, sequestrar o gás carbônico atmosférico (CO₂) para favorecer seu crescimento (Silambarasan et al. 2021). Esse tratamento de efluentes tem se mostrado vantajoso, pois apresenta benefícios para o meio ambiente, um menor custo operacional e a biomassa algal gerada pode ser redirecionada para a produção de biocombustíveis e biofertilizantes. Um exemplo dessa aplicação pode ser visto no trabalho de Santana et al. (2017), onde foram analisadas diferentes linhagens de microalgas quanto a sua capacidade de crescimento em vinhaça de cana-de-açúcar e também a absorção de nutrientes durante o seu cultivo. Os resultados mostraram que duas cepas, uma do gênero *Micractinium* e uma de *Chlamydomonas biconvexa*, foram capazes de crescer em todas as formulações de meios testadas, que consistiram em vinhaça bruta em diferentes concentrações e condições ambientais, como controle de luminosidade e contaminação de microrganismos. Além disso, a composição da biomassa dessas duas cepas mostrou grandes rendimentos de proteínas e carboidratos que podem ser úteis na aplicação industrial destacando o potencial que resíduos agroindustriais possuem no cultivo de microalgas para a produção de energia e bioprodutos, além da biorremediação de águas contaminadas.

Outro aspecto econômico e ecológico em relação ao Brasil é a constante utilização de fertilizantes na produção agrícola, pois aumentam o rendimento e evitam a disseminação de pragas no cultivo. Porém, quando utilizados de forma frequente e intensiva muitos desses produtos químicos tendem a trazer prejuízos, principalmente ambientais, como a deterioração do solo e poluição de lençóis freáticos (Silva et al., 2021). Somado a isso, há o fato de que o acúmulo de resíduos desses produtos nos alimentos pode trazer prejuízos também à saúde humana, além dos riscos de exposição excessiva para aqueles que os manuseiam (Basso, Siqueira, Richards; 2021). Ainda há o grande custo associado ao uso desses produtos químicos, já que o Brasil é dependente da importação de insumos de outros países, como demonstrado em uma reportagem da CNN com dados fornecidos pela Associação Nacional para Difusão de Adubos (Anda), onde de 1998 até 2021, nota-se um aumento de 440% na importação de fertilizantes no país (Ghiraldelli e Salma, 2022). Por essas razões, é importante procurar alternativas mais seguras e sustentáveis para a fertilização do solo e que não tragam o mesmo impacto ambiental. Uma resposta para esse problema é a utilização de biofertilizantes, produtos biologicamente ativos que são compostos por nutrientes básicos, vitaminas, enzimas e, principalmente, fitohormônios, substâncias responsáveis por diversas funções no crescimento e desenvolvimento vegetal (Fontenelle, 2017).

Demonstrando serem menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana, além de terem um menor custo associado, os biofertilizantes têm sido cada vez mais estudados na área agrícola, sendo que desde 2010 o interesse na área desses produtos tem aumentado, com o Brasil inserido entre os cinco principais países do mundo com o maior número de publicações relacionadas a biofertilizantes durante o período de 2010 e 2019 (Velayudhan, Singh and Srinivasa, 2021). Uma abordagem que vem crescendo visando a produção sustentável dessas substâncias e também de biocombustíveis é a implementação de biorrefinarias de algas, já que a biomassa algal é uma fonte rica de nutrientes e o cultivo desses organismos pode ser feito de formas diversificadas, podendo ser realizado em laboratórios e até mesmo em águas residuais como foi mencionado ou ampliado em escala industrial (Khan et al., 2019). Além de ser uma fonte sustentável de matéria orgânica e energia, as biorrefinarias trazem benefícios tanto para a saúde humana quanto para a conservação ambiental, podendo serem observados os efeitos do seu uso na recuperação de ambientes aquáticos poluídos, na atenuação das mudanças climáticas e na diminuição dos efeitos dos gases do efeito estufa (Khan et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, as microalgas além de atuarem na biorremediação de águas contaminadas também podem ser utilizadas para gerarem bioprodutos de forma mais sustentável, como os biofertilizantes. Diversos estudos já demonstraram o potencial que espécies de algas possuem para serem utilizadas na produção de biofertilizante, por exemplo *Chlorella vulgaris* já atuou na melhoria da fertilidade do solo aumentando a produtividade de *Hibiscus esculentus* (Agwa, Ogugbue, and Williams, 2017), assim como foi mostrado que espécies de diferentes gêneros, como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlorococcum* e *Spirogyra*, melhoraram a produtividade e o rendimento da cultura de trigo quando comparadas à dose recomendada de fertilizante NPK (Renuka et al., 2016). Tendo esse potencial em mente e os estudos que apoiam cientificamente a utilização de microalgas em diferentes setores da economia, é de grande importância que mais pesquisas sejam conduzidas acerca da análise e seleção de cepas com potencial para a produção de moléculas de interesse, principalmente em cultivos alternativos, como a vinhaça. Pensando nisso, o objetivo geral dessa dissertação é avaliar o crescimento de 10 cepas de microalgas em cultivo com vinhaça quanto à produção de pigmentos, ácidos graxos e duas auxinas, com foco na identificação desses compostos e no efeito que este resíduo tem sobre eles.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Algas

Dominando o ambiente marinho e os habitats de água doce, as algas são um grupo de organismos fotossintetizantes, sendo portanto, produtoras de oxigênio (O₂) nos ambientes em que elas ocorrem, com uma ampla diversidade taxonômica e morfológica, abrangendo indivíduos eucariontes e também procariontes como as cianobactérias (Figura 1). A maioria se apresenta em forma microscópica, embora existam espécies que atinjam tamanhos maiores, como os kelps, um agregado de algas que formam florestas submersas responsáveis por abrigar, proteger e/ou fornecer alimento para algumas espécies marinhas (Evert and Eichhorn, 2014). Ecologicamente falando, as algas possuem papéis de destaque por serem a base da cadeia alimentar, principalmente em ambientes aquáticos, além do fato que algumas espécies são conhecidas por serem organismos pioneiros, ou seja, elas são as primeiras a chegarem no ambiente, modificando-o a ponto de permitir a sobrevivência de outros indivíduos no local.



Figura 1. Diferentes tipos de algas com uma diversidade de formatos. Fonte: Andrei Savitsky, Wikimedia Commons

O termo “algas” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica por Lineu, no clássico *Species plantarum*, mas atualmente é considerado um termo de uso popular, sem muito valor taxonômico, visto que abrange diversas linhagens não diretamente relacionadas umas às outras (Judd et al., 2009). De forma geral, há apenas um grupo de algas de origem procarionte, as cianobactérias (no passado denominadas algas azuis), com aproximadamente 2000 espécies distribuídas em cerca de 150 gêneros; enquanto os outros grupos de algas estão incluídos no domínio Eukarya (Figura 2). Dos principais grupos desses microrganismos, vale destacar as Rhodophyta, ou algas vermelhas, conhecidas por serem fonte de ágar e polissacarídeos, que são amplamente utilizados como espessantes ou geleificantes no ramo alimentício; as diatomáceas (Bacillariophyta), algas capazes de colonizarem praticamente todos os meios aquáticos e muito utilizadas como bioindicadores da qualidade de águas continentais e na reconstituição de paleoambientes; os dinoflagelados (Dinophyta), grupo diverso que abrange espécies que vivem em simbiose com outros organismos, como os corais, outras que produzem substâncias tóxicas que podem levar ao desenvolvimento do fenômeno conhecido como “marés vermelhas”, e até exemplos bioluminescentes que utilizam esta característica como estratégia de defesa contra predadores (Franceschini et al., 2009).

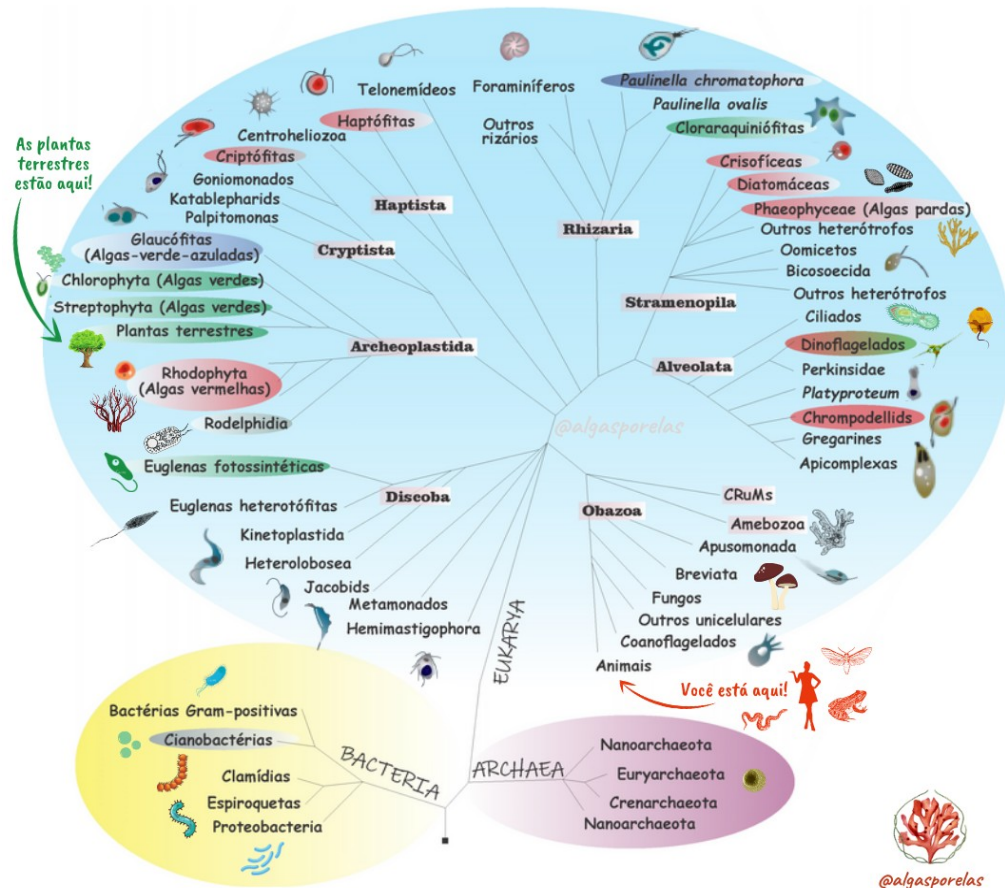


Figura 2. Ilustração da árvore filogenética destacando os diferentes grupos de algas. Fonte: [Árvore da Vida Algas por elas](#)

Já as algas verdes (Chlorophyta), grupo foco do presente trabalho, estão diretamente ligadas às Embryophytas (plantas terrestres) e, junto com elas, formam o clado conhecido como Viridiplantae, que abrange mais de 300.000 espécies descritas e é sustentado por características químicas e morfológicas como a produção de clorofila *b* em adição à clorofila *a* e a perda de ficobilinas que estão presentes em cianobactérias, glaucófitas e algas vermelhas (Judd et al., 2009). Falando especificamente do grupo das algas verdes, ele abrange cerca de 17.000 espécies, distribuídas principalmente em ambientes marinhos e de água doce, embora haja espécies que habitam os solos e outras que se encontram em associações simbióticas com diferentes organismos, por exemplo, com os fungos formando os líquens (Evert and Eichhorn, 2014). Como mencionado anteriormente, esse grupo apresenta os pigmentos clorofila *a* e *b*, o que confere a elas a coloração esverdeada, amido

no interior de seus plastídios como material de reserva, uma sinapomorfia das Viridiplantae e parede celular composta principalmente por celulose e hemicelulose (Franceschini et al., 2009). Essas algas podem ser utilizadas como fonte de alimento, principalmente por fornecerem vitaminas, sais e outros nutrientes importantes à dieta humana, mas também existem diferentes estudos que mostram a sua eficiência como um sistema de captura de CO₂, o que leva a redução dos impactos negativos dos gases de efeito estufa e do aquecimento global. Por exemplo, no trabalho de Yang et al. (2020), a espécie *Clorella pyrenoidosa* demonstrou potencial como uma alternativa sustentável para o sequestro de CO₂, obtendo uma taxa de captura desse gás de 82,15% quando cultivada em efluente não tratado e de 91,59% quando cultivada em efluente tratado. O cultivo de microalgas também tem sido alvos de estudos recentes no desenvolvimento de produtos de interesse como biocombustíveis e biofertilizantes e de tecnologias de recuperação de ambientes contaminados (Chandra et al., 2021; Hamidian et al., 2022; Hussain et al., 2020), principalmente com o descarte inapropriado de efluentes industriais, tópicos estes que serão discutidos mais a frente.

As microalgas podem ser encontradas em ambientes naturais principalmente aquáticos, como mencionado, mas também podem ser cultivadas de maneira artificial, em laboratórios e também em grande escala, nas indústrias (Pinto, Ferreira, Tasic, 2021). Existem três formas de crescimento que esses organismos podem ser submetidos de acordo com seu metabolismo e do objetivo final da produção: cultivo autotrófico, onde as microalgas através da fotossíntese são capazes de absorver luz solar e CO₂ da atmosfera e convertê-los em energia e compostos orgânicos para o seu crescimento; heterotrófico, onde esses organismos utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono; e mixotrófico, onde a fonte de energia é obtida da luz e de CO₂, além de através de compostos orgânicos e inorgânicos (Franco et al., 2013). Os dois principais tipos de cultivo feitos são em sistema aberto, onde as espécies de interesse crescem em tanques e até mesmo lago/lagoas a céu aberto, que apesar de garantirem um grande volume de produção não tornam possível controlar as condições ambientais do cultivo assim como as possíveis contaminações. Diferente do cultivo em sistema fechado, principalmente representado por fotobiorreatores, onde as algas crescem em um ambiente mais estéril, geralmente sob controle de condições importantes para seu crescimento, como luminosidade, pH do meio e concentração de nutrientes e CO₂ (Figura 3). Vale destacar que a produtividade de

microalgas tende a superar a das plantas vascularizadas, já que quando cultivadas elas apresentam uma menor variação sazonal e os processos de extração de produtos envolvendo esses organismos geralmente são mais simples, o que faz com que a exploração de sua biomassa gere moléculas e matérias-primas abundantes (Morocho-Jácome et al., 2020).



Figura 3. Cultivo de microalgas em fotobiorreatores. Fonte: Grupo de Pesquisa ALG-AD/ Swansea University

2.2. Compostos de interesse produzidos pelas microalgas

2.2.1. Pigmentos

Como dito anteriormente, as microalgas apresentam um grande potencial como fonte de moléculas de interesse e, entre elas, os pigmentos. Além de estarem envolvidos no processo da fotossíntese, essas moléculas apresentam uma ampla importância comercial uma vez que são utilizadas em diferentes indústrias, como alimentícia, farmacêutica e cosmética. Os três principais grupos de pigmentos encontrados nas microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas.

As ficobilinas são pigmentos proteicos solúveis em água, constituídos por polipeptídeos portadores de cromóforos com subunidades α e β , localizados nos ficobilissomos supramoleculares presentes na superfície externa da membrana do tilacóide, podendo ser divididos em 3 classes de acordo com sua cor e espectro de

absorção: ficoeritrina de cor vermelha (565 – 575 nm), ficocianina de cor azul (615-640 nm) e aloficoaianina também de cor azul (650-655 nm) (Silva et al., 2020). *Spirulina* (*Arthrospira*) sp. e *Porphyridium* sp. são duas espécies de cianobactérias conhecidas por serem fontes de produção comercial de ficobilinas, principalmente de ficocianina, que são amplamente utilizadas como corante natural em alimentos e bebidas, sendo aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) desde 2013 para esse fim e também na área farmacêutica devido às suas atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígenas, e na formulação de cosméticos, como batons, delineadores, sombras e perfumes (Silva et al., 2020).

Clorofilas são os principais pigmentos envolvidos na fotossíntese, são solúveis em gordura, apresentam em sua estrutura tetrapirróis com uma molécula de magnésio ligado centralmente e são subdivididas em 2 principais grupos: clorofila *a*, pigmento azul/verde com espectro de absorbância 660-665 nm, e clorofila *b*, pigmento verde amarelado com espectro de absorbância 642-652 nm (Silva et al., 2020). Esses dois tipos de pigmentos são encontrados na maioria dos organismos fotossintetizantes existentes, mas em algumas espécies de algas e bactérias fotossintetizantes é possível também encontrar clorofila *c*, *d* e *f*. As espécies do filo Chlorophyta geralmente são registradas como boas fontes de extração desses pigmentos que podem ser aplicados na produção de cosméticos e produtos de higiene, nas indústrias alimentícias graças a sua alta pigmentação verde e, principalmente, na área da saúde, devido as suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antimutagênica (Morocho-Jácome et al., 2020).

Carotenoides são pigmentos tetraterpenóides solúveis em gordura, podendo ser classificados em dois tipos de acordo com sua estrutura química: carotenoides oxigenados, comumente conhecidos como xantofilas, com oxigênio presente como grupos hidroxila ou grupos oxi; e carotenoides de hidrocarbonetos, conhecidos simplesmente como carotenos (Ambati et al., 2019). Os carotenoides podem também ser primários, são aqueles encontrados na estrutura celular atuando como pigmento acessório da fotossíntese e secundários, quando são produzidos em grandes níveis pelo organismo em resposta a algum estímulo ambiental, atuando como uma resposta protetora e adaptativa. Esses pigmentos são conhecidos principalmente pela sua ação na saúde humana, possuindo propriedades de proteção contra a luz ultravioleta, antioxidante, antibacteriana, atividades benéficas em doenças como câncer, úlceras,

diabetes, doenças degenerativas e cardiovasculares, além de atuarem em atividades biológicas como regulação da transcrição gênica, atividade pró-vitamina A, e alteração da função imunológica (Ambati et al., 2019). Os carotenoides são utilizados também na produção de rações, alimentos e na indústria cosmética, sendo cianobactérias e clorofíceas dois grupos de algas conhecidos como fonte dessas moléculas (Ambati et al., 2019).

A produção de pigmentos pelas microalgas pode ser afetada por diferentes fatores, principalmente ambientais, sendo luz e temperatura os fatores mais importantes destes. Além de atuar diretamente na produção fotossintética desses organismos, os diferentes espectros de luz também afetam a composição relativa do pigmento, enquanto a intensidade e o tipo de luz influenciam no controle do acúmulo dessas moléculas nas células das algas (Begum et al., 2016). Já a temperatura é capaz de modificar os processos metabólicos e a composição bioquímica das células, sendo que cada cepa de microalga possui uma temperatura ideal de crescimento e tolerância levando a situações de estresse quando uma mudança extrema nesse fator ocorre, o que também influencia diretamente na síntese e acúmulo de pigmentos (Begum et al., 2016). Além disso, a degradação ou redução de pigmentos fotossintéticos, como a clorofila *a* e *b*, é considerada uma resposta de estresse comum tanto em microalgas quanto em plantas, por exemplo, quando maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio se acumulam em células sob estresse oxidativo induzido por algum fator exógeno, isso pode levar a diminuição da eficiência fotossintética pela peroxidação dos lipídios dos tilacoides e a degradação do complexo do fotossistema II (Nezafatian et al., 2023).

2.2.2. Ácidos Graxos

Atualmente, as microalgas também são exploradas como fonte de energia devido, principalmente, à extração de lipídios da sua biomassa. Esse grupo de moléculas orgânicas é formado por vários compostos quimicamente diversos, mas que possuem a insolubilidade em água como característica comum entre si, e é conhecido por desempenhar diferentes papéis em funções biológicas, como na estrutura de membranas e no armazenamento de energia, podendo também atuar como sinalizadores, cofatores e mensageiros intracelulares (Nelson & Cox, 2014). Nas microalgas, os triacilgliceróis (TAG) são conhecidos como os principais lipídios de reserva, os glicerolipídios

(glicoglicerolípídios e fosfoglicerolípídios) como os principais acil lipídios da membrana celular destes microrganismos e dois galactolípídios, o monogalactosildiacilglicerol (MGDG) e digalactosildiacilglicerol (DGDG), como os lipídios estruturais do cloroplasto (Khozin-Goldberg, 2016).

Em algumas algas é possível observar um alto teor de lipídios celulares quando estas são submetidas a algum estresse ambiental. No trabalho de Rodolfi et al. (2009), foi feito o crescimento e seleção de 30 cepas de microalgas de acordo com a melhor eficiência na produção de óleo e destas, 4 foram selecionadas, duas espécies marinhas e duas de água doce, para o crescimento sob privação de nitrogênio a fim de analisar o impacto que essa condição tinha sob a produção de lipídios desses organismos. Nas duas espécies de água doce, a privação desse nutriente levou a interrupção do crescimento em até sete dias e não afetou o conteúdo lipídico das cepas, porém em *Nannochloropsis* sp., uma das espécies marinhas, apesar da produtividade diminuir lentamente nos três primeiros dias, a partir do segundo dia quando o nitrogênio do meio foi esgotado, o conteúdo lipídico da biomassa aumentou mais de 45%, atingindo até o final do experimento o correspondente a cerca de 50% da biomassa seca, mostrando que essa cepa respondeu à privação de nitrogênio com um aumento considerável de seu teor de lipídios, sendo os ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico e oleico os que apresentaram maior aumento.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, cujo tamanho pode ir de 4 a 36 carbonos e sua variedade em organismos vivos pode ser determinada pela diferença entre o tamanho da sua cadeia, sendo classificados como ácidos graxos de cadeia curta, ácidos graxos de cadeia média, ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia muito longa; de acordo com a presença ou não de ligações duplas, sua localização e quantidade (Maltsev & Maltseva, 2021). Aqueles ácidos graxos que não possuem nenhuma insaturação em sua cadeia recebem o nome de saturados, enquanto os insaturados apresentam essas ligações duplas, podendo ser monoinsaturados (MUFAs, do inglês Monounsaturated Fatty Acids) quando há apenas uma insaturação em sua cadeia, e poliinsaturados, quando há duas ou mais ligações desse tipo (PUFAs, do inglês Polyunsaturated Fatty Acids).

Esses compostos são estudados devido as suas aplicações industriais, sendo explorados na produção de biodiesel que atualmente é produzido principalmente a partir de óleos vegetais, como óleo de soja, dendê e girassol. Contudo, a rápida expansão desse mercado levantou a preocupação acerca do impacto que o uso desses materiais vegetais para a produção de biocombustível pode ter sobre os preços das commodities no sistema alimentar mundial e também a importância de se procurar novas fontes de ácidos graxos a fim de se evitar essa possível competição, além de auxiliar nas questões ambientais, visto que monoculturas, especialmente de soja e dendê, trazem consigo o uso intenso de agroquímicos e também o desmatamento de áreas naturais (Subramaniam et al., 2010). Dentre as opções existentes, o uso de microrganismos como as microalgas tem ganhado destaque, visto que elas possuem uma maior eficiência fotossintética, crescem rapidamente sem a necessidade de terra arável e apresentam um conteúdo lipídico relativamente alto, variando de 1 a 70%, mas podendo existir exceções que atinjam até 90% do peso seco sob certas condições (Subramaniam et al., 2010).

Além da produção de energia, certas classes de ácidos graxos são indicadas na dieta humana devido aos seus benefícios para a saúde. Do grupo ômega 6 vale destacar o ácido linoleico (C18:2), muito comum em óleos vegetais e que quando ingerido é subsequentemente convertido por enzimas no fígado em outros PUFA's do mesmo grupo, porém de cadeia mais longa, como o ácido araquidônico (C20:4) que acredita-se desempenhar um papel na obesidade e na produção enzimática *in vivo* de prostoglandinas pró-inflamatórias e outros mediadores e reguladores de respostas inflamatórias (Ahmad et al., 2017). No grupo ômega 3, está presente o ácido alfa-linolênico, um ácido graxo considerado essencial que é convertido em diversos outros PUFA's de cadeia longa quando ingerido, como o ácido estearidônico (C18:4), ácido eicosapentaenóico (C20:5) e o ácido docosahexaenóico (C22:6) (Ahmad et al., 2017). Os ácidos ômega 3 são conhecidos por serem componentes estruturais importantes das membranas celulares humanas, principalmente das células neuronais, e estudos demonstram que seu consumo regular pode levar à redução principalmente de doenças cardiovasculares (Singh et al., 2017). O ácido alfa-linolênico possui um isômero, o ácido gamalinolênico, que pertence ao grupo dos ácidos ômega 6 e que também demonstrou em estudos possuir características benéficas para a saúde humana (Kapoor e Huang, 2006).

Diferentes espécies de algas sintetizam diferentes tipos de ácidos graxos e a produção e o acúmulo desses lipídios são influenciados pelas condições do cultivo, como intensidade de luz, pH, presença de fontes de carbono orgânico, concentração de oxigênio dissolvido, dióxido de carbono e nutrientes, além de também depender da fase de crescimento das células (Subramaniam et al., 2010). Como a flutuação em condições ambientais pode levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, as microalgas assim como outros microrganismos fotossintéticos apresentam diferentes mecanismos para evitar os impactos causados por essas moléculas, entre eles a maior produção de PUFA's, já que esse grupo de ácidos graxos demonstram ter um papel na proteção à célula contra danos oxidativos (Singh et al., 2017).

2.2.3. Fitohormônios

O crescimento e desenvolvimento dos organismos dependem de uma série de fatores como nutrientes, água e no caso dos fotossintetizantes, luz do sol. Para que esse desenvolvimento ocorra de maneira eficiente, a fisiologia é regulada e coordenada por moléculas responsáveis pela comunicação entre as diferentes células e tecidos, produzindo respostas fisiológicas específicas. No caso das plantas e algas verdes, essas moléculas recebem o nome de fitohormônios e podem atuar tanto como agentes estimuladores, como inibitórios (Evert and Eichhorn, 2014). Com maior procura por substâncias bioestimuladoras para aumentar a produtividade agrícola e diminuir o uso de agroquímicos, esses compostos têm sido vistos como uma alternativa eficiente para potencializar o crescimento e desenvolvimento das plantas cultivadas e promover a resistência contra pragas. Os principais fitohormônios conhecidos por atuarem na regulação do desenvolvimento vegetal são giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinosteroides e as auxinas, grupo que foi analisado neste trabalho (Evert and Eichhorn, 2014).

As auxinas são conhecidas por atuarem na divisão e expansão celular, exercendo efeitos diretos na mitose, na transição das células da dormência para o estado ativo, na estimulação da respiração e da tolerância a fatores ambientais adversos, além de influenciar positivamente os processos biossintéticos e controlar processos como o crescimento de células, a formação de tecido vascular e o desenvolvimento de raízes (Han et al., 2018). A principal auxina de ocorrência natural é o ácido indol 3-acético

(AIA), sintetizado principalmente nos cloroplastos, além de ter alguns dos precursores de sua biossíntese produzidos pela rota da síntese do triptofano.

As giberelinas são fitohormônios que, nas plantas, atuam no alongamento de caule, na floração precoce e na indução da quebra de dormência de sementes; enquanto as citocininas atuam na estimulação da divisão celular, na promoção da biogênese e diferenciação do cloroplasto, no atraso da senescência foliar e na inibição do meristema apical da raiz (Han et al., 2018). Já o etileno é um fitohormônio encontrado na forma de gás e é conhecido por regular processos fisiológicos nas plantas, como o crescimento, desenvolvimento, envelhecimento e tolerância a fatores ambientais de estresses bióticos (Han et al., 2018). Já o ácido abscísico (ABA) induz fechamento dos estômatos, envelhecimento e filoptose (queda excessiva de folhas), também mantém a dormência de gemas e sementes e dificulta a síntese de nucleotídeos e proteínas (Han et al., 2018). Os brassinosteroides atuam em processos de resistência ao estresse abiótico e no desenvolvimento fisiológicos das plantas, como alongamento celular, expansão foliar, fotomorfogênese, processos de desenvolvimento estomático e também das flores, (Sharma et al., 2022).

Dois fitohormônios conhecidos, principalmente por atuar na defesa das plantas, são o ácido jasmônico e o ácido salicílico. O ácido jasmônico atua na proteção contra patógenos e agentes herbívoros, ou em condições de estresses abióticos, como seca, salinidade e radiação UV (Stirk & Van Staden, 2014). Já o ácido salicílico tem um papel essencial no desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida, uma resposta geralmente desenvolvida a um ataque localizado, provocado por bactérias, fungos ou vírus patogênicos, que permite que outras porções das plantas fiquem providas de proteção contra os mesmos patógenos ou outros agentes (Evert and Eichhorn, 2014).

São vários os estudos que buscam mostrar como os fitohormônios podem ser aplicados na agricultura, estimulando o crescimento das culturas, regulando certas condições de estresse e trazendo uma maior qualidade nutritiva para a produção. Um exemplo disso é a manipulação endógena ou a aplicação exógena dos diferentes hormônios vegetais já mencionados, como auxina, giberelina, ácido abscísico, citocininas, etileno, brassinosteróides e ácido jasmônico, para a recuperação das plantas afetadas pelo estresse de alta temperatura (Jha, Nayyar and Siddique, 2021). Esse é um problema grave que nos últimos anos vem ocorrendo com mais frequência e pode afetar

todo o ciclo de vida da planta, incluindo processos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos, o que acaba por gerar, muitas vezes, grandes perdas de produtividade na cultura. A aplicação de vários fitohormônios no cultivo de espécies pode, portanto, melhorar o desempenho da planta, através da proteção dos principais processos fisiológicos, da diminuição da fotoinibição e da peroxidação lipídica, do estímulo dos mecanismos antioxidantes e da regulação de várias vias reguladoras biológicas e dos processos relacionados a esse estresse (Jha, Nayyar and Siddique, 2021).

As microalgas são consideradas uma boa fonte natural de fitohormônios, principalmente pelo seu cultivo diversificado e crescimento rápido, de modo que sua biomassa muitas vezes é selecionada para ser aplicada em cultivos agrícolas como bioestimulante. Estudos mostram que desses compostos foram identificados auxinas, ácido abscísico, citocininas, etileno e giberelinas em várias linhagens de algas, e que esses organismos também podem produzir outros metabólitos como compostos fenólicos, terpenóides, ácidos graxos livres, polissacarídeos e carotenoides que, assim como os hormônios, já foram identificados como promotores de crescimento de plantas (Gonçalves, 2021). Essa diversidade de metabólitos afeta positivamente a produção das plantações em diferentes níveis, já que eles podem induzir maior produtividade das culturas através da melhoria da qualidade do solo e da proteção contra condições de estresse biótico e abiótico, além de estimular o crescimento vegetal (Gonçalves, 2021).

2.3. Atividade biológica das microalgas aplicada na agricultura

Propriedades biocidas utilizadas no controle biológico de pragas, capacidade de fixar nitrogênio de maneira eficiente, produção de hormônios de crescimento e outras moléculas que podem atuar tanto na melhoria das características nutricionais de frutos e grãos quanto na produtividade da planta; todos estes são alguns dos benefícios que a utilização de algas na produção agrícola pode trazer (Renuka et al., 2018). É possível observar aplicações da utilização desses organismos na agricultura através de diferentes produtos que estão sendo desenvolvidos a partir de experimentos de base, como no caso da reconhecida patente verde brasileira obtida pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), através da pesquisa desenvolvida na produção de um biofertilizante cuja base é a biomassa hidrolisada da microalga *Arthrospira sp.* (Bropp, 2020). Apesar de ainda estar em desenvolvimento e não ter sido lançado no mercado, a equipe da UFPR demonstrou através de bioensaios que a

biomassa desse microrganismo é uma ótima fonte proteica e atuou benéficamente na produção e cultivo de alfaces orgânicas, o que resultou no registro de patente expedido no pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Inpi), ligado ao Ministério da Economia. Desse exemplo, é possível notar como os estudos desenvolvidos a nível laboratorial são importantes para fornecer uma base promissora para o futuro escalonamento e comercialização desses produtos.

Um outro exemplo de estudo que analisa o potencial da aplicação benéfica das microalgas na agricultura é o trabalho de Kholssi et al. (2019) que investiga o efeito de aplicações da espécie *Chlorella sorokiniana* no crescimento do trigo, avaliando a sua capacidade fitoestimulante. Dos 4 tratamentos utilizados (biomassa algal coletada, meio utilizado para cultivo das algas após colheita da biomassa, microalgas ressuspensas em meio novo e apenas meio BG11 (controle)), a solução contendo o meio utilizado na cultura da *C. sorokiniana*, quando comparada com o controle, demonstrou o maior efeito positivo no aumento da germinação das sementes de trigo e no peso e tamanho médio das raízes, caules e biomassa vegetal das plântulas, com diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o controle. Apesar de todas soluções apresentarem resultados positivos de estimulação em relação ao controle, o fato da solução de melhor desempenho ser aquela contendo o meio que foi utilizado para cultivo da referida microalga indica que os nutrientes e substâncias extracelulares excretados pelas algas no filtrado exerceram papel importante aos efeitos benéficos no crescimento das plantas.

Outro exemplo da ação de microalgas no crescimento e desenvolvimento vegetal é a pesquisa de Plaza et al. (2018), onde foi estudado o efeito da pulverização foliar com os extratos hidrolisados das microalgas *Scenedesmus* sp. e *Arthrospira* sp. no crescimento de *Petunia x hybrida*, uma planta comumente utilizada na ornamentação e cultivo de jardins. Com esse trabalho foi possível observar que a aplicação foliar dos hidrolisados, principalmente de *Scenedesmus*, aumentou o número de flores, folhas e brotações e também aumentou a concentração foliar de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Esses efeitos promotores de crescimento estão relacionados à ação direta ou indireta dos fitohormônios presentes nos extratos das microalgas, o que pode ser observado no fato de que *Scenedesmus* apresentou maior concentração de citocininas, giberelinas, auxinas, ácido salicílico e ácido abscísico em comparação com *Arthrospira* e o tratamento com seu extrato resultou em um grande número de flores, brotos e folhas. Isso

porque as citocininas promovem o desenvolvimento dos botões florais e as giberelinas estão associadas a processos como desenvolvimento de órgãos florais, tempo reduzido de floração e aumento do número de flores (Plaza et al., 2018).

2.4. Vinhaça e a indústria canavieira

A cana de açúcar é uma cultura que tem uma grande importância histórica no Brasil, tendo seu uso relatado desde os tempos coloniais e sendo atualmente uma das maiores culturas brasileiras, desempenhando um papel fundamental na economia do país. Desde o século XVI, a indústria canavieira tem tido destaque como uma das peças importantes para o desenvolvimento da indústria brasileira, sendo o açúcar um dos primeiros produtos agrícolas exportado em larga escala para a Europa, o que auxiliou na integração do Brasil no mercado mundial e estabeleceu o país atualmente como um dos maiores produtores não somente de açúcar, mas também de etanol e da própria cana (Gilio & de Moraes, 2016). O crescimento nacional da produção de etanol foi estimulado pelo PROÁLCOOL (Programa Nacional do Alcool), lançado na década de 70, visando estimular a substituição em larga escala do petróleo pelo etanol, e também pelo aumento da procura mundial por fontes alternativas de energia e combustível, que gerem menos impacto ao meio ambiente. (Andrade, Carvalho, Souza; 2010).

O processo de produção de uma usina de cana-de-açúcar no Brasil é similar em quase todas as instalações encontradas pelo país e segue os seguintes passos (Raízen, 2022): 1. Após a colheita, a cana-de-açúcar é lavada e processada, momento onde as fibras desta planta são abertas. 2. Após processamento, a cana é moída por rolos trituradores, separando o caldo contendo sacarose das fibras, gerando nesse processo o bagaço que geralmente é utilizado na geração de energia da usina, através da sua queima nas caldeiras que gera vapor pressurizado de água que aciona as turbinas responsáveis pela energia elétrica do local. 3. O caldo obtido no passo anterior é então tratado para correção da sua acidez e eliminação das impurezas, através do processo de decantação, onde as impurezas floculadas no tratamento são precipitadas formando o lodo ou torta de filtro, que é reutilizada na lavoura como adubo, já que é fonte de fósforo e nutrientes orgânicos. 4. O caldo tratado é então transportado para evaporadores, onde a concentração de água é reduzida, formando um líquido concentrado, que recebe o nome de xarope ou melaço. 5. Esse melaço segue para o cozimento, onde mais uma vez será reduzida a concentração de

água da sua composição, formando os cristais de açúcar, através da precipitação da sacarose. 6. Essa mistura segue para centrífugas, onde os cristais de açúcar são separados do melaço (formando o mel), depois são secos e resfriados e, após um tratamento de segurança e qualidade, são embalados e levados para distribuição. 7. O mel, rico em glicose e frutose não cristalizadas, segue para a etapa de fermentação na qual é misturado a um fermento composto por leveduras, responsáveis por quebrar as moléculas de sacarose, produzindo etanol e gás carbônico, resultando no chamado vinho fermentado, que apresenta aproximadamente 10% de etanol em sua composição. 8. Após centrifugação para separar o vinho do fermento, que é tratado e reutilizado no processo, o vinho segue para a destilação, etapa responsável por separar o etanol de outros compostos por diferença de volatilidade. 9. O resíduo gerado pelo vinho livre do álcool recebe o nome de vinhaça e é reutilizada como fertilizante no campo. 10. Com a destilação obtém-se o álcool hidratado, que passa por um processo de desidratação para produção do álcool anidro, que é então armazenado em enormes tanques até ser transportados para as distribuidoras.

Associada a essa alta produtividade industrial está também a geração de resíduos, que podem impactar o meio ambiente de diferentes formas e em diferentes escalas. Nas usinas de açúcar, o principal resíduo produzido é a vinhaça, resultante da destilação do caldo ou do melaço fermentado da cana-de-açúcar para obtenção do etanol, caracterizada pela alta demanda química e biológica de oxigênio, pH ácido, odor forte, altas concentrações de nutrientes, sulfato e potássio e escurecimento intenso devido à presença de melanoidinas (Carpanez et al., 2022). Devido a essas características, a produção de etanol, açúcares e outros derivados deveria ser associada a técnicas de tratamentos e/ou reutilização segura desse resíduo. A fertirrigação é uma das abordagens mais praticada para o manejo da vinhaça no Brasil, já que ela pode levar ao aumento da produtividade das culturas sem necessitar da implementação de tecnologias complexas e de alto custo. Apesar de ser demonstrado que essa prática pode trazer benefícios a curto prazo, sua aplicação constante tende a acarretar diversos efeitos negativos sobre os solos, recursos hídricos e culturas devido às características poluentes da vinhaça (Fuess et al., 2017). Somado a isso, o alto conteúdo orgânico biodegradável que geralmente é encontrado na vinhaça faz com que ela seja considerada um subproduto altamente energético da cadeia produtiva do etanol; dessa forma a fertirrigação levaria também à perda dessa bioenergia.

Outra opção são os processos biológicos como alternativas para redução da carga orgânica da vinhaça. Como já mencionado, a vinhaça pode ser utilizada no cultivo de microalgas, devido a sua alta carga de matéria orgânica e nutrientes, mas também pode ser aplicada a biorreatores de membrana, que combinam o processo de biodegradação por microrganismos anaeróbicos e aeróbicos com o processo de separação por membranas e é conhecido por apresentar menor prejuízo, ter maior robustez em caso de flutuações na qualidade do afluente e promover a retenção completa de microrganismos (Moreira et al., 2022). Nessa metodologia, o tratamento anaeróbio apresenta vantagens como alta capacidade de degradar substâncias resilientes, produz menor volume de lodo e requer menor consumo de energia; porém, esses processos são sensíveis a flutuações na carga orgânica, baixo pH, apresentam crescimento lento de microrganismos e os efluentes tratados ainda apresentam alto teor de cor e não atendem aos padrões de lançamento em cursos d'água, necessitando muitas vezes um pós-tratamento, muitas vezes um tratamento aeróbio (Moreira et al., 2022). Já o tratamento aeróbio da vinhaça vem ganhando espaço por ser capaz de tratar grandes volumes de efluentes, apresentando maior robustez às flutuações de carga orgânica comumente observadas na vinhaça. Porém, esse tipo de tratamento tem alto consumo de energia com aeração e produz muito lodo.

Sendo através do cultivo de microalgas ou da biodegradação através dos biorreatores de membrana, os processos biológicos trazem diversas vantagens no reaproveitamento do efluente, podendo gerar energia e outros produtos, como biofertilizantes, e até matérias-primas, movimentando e apoiando assim, a economia circular, conceito que procura vincular o desenvolvimento econômico ao uso adequado dos recursos presentes.

2.5. Biorrefinarias

Analisando projeções futuras em relação ao aumento da população mundial nos próximos anos, estima-se que é possível chegar a 9 bilhões de pessoas residindo no planeta até 2030, sendo necessário começar a pensar nos impactos que esse aumento pode vir a trazer e também a desenvolver alternativas sustentáveis e acessíveis de fonte de alimentos, a fim de se evitar uma maior escassez de comida e aumento da desnutrição populacional (Chandrasekhar et al., 2022). Além desses pontos, há também o agravamento de uma questão crítica que já é enfrentada pelo mundo, que é a alta produção de dióxido de carbono, águas residuais e resíduos agroindustriais. É nesse contexto, que surge o debate

acerca das biorrefinarias que são instalações de porte industrial responsáveis pela conversão de biomassa na produção de combustíveis, eletricidade, além de outros produtos com alto valor agregado. O conceito “Biorrefinaria” vem da estrutura de refinarias de petróleo, que produzem diferentes tipos de combustíveis e produtos a partir do petróleo bruto.

O objetivo principal das operações que ocorrem em uma biorrefinaria é separar e recuperar os componentes necessários de um mesmo lote de biomassa, de forma a gerar produtos comerciais intactos, através da combinação de diferentes esquemas de processo e equipamentos, apresentando a capacidade de produzir várias commodities e aumentar assim o valor da matéria-prima de biomassa (Siddiki et al., 2022). Entre as opções como candidatos para biorrefinaria estão as microalgas, consideradas um recurso sustentável de biomassa, capazes de gerar, através da sua conversão, energia e também diversos produtos valiosos para a economia da sociedade, como biocombustíveis, cosméticos, biofertilizantes, produtos farmacêuticos, bioplásticos, alimentos e rações (Okeke et al., 2022). Além do potencial das microalgas para síntese energética e química a partir de recursos renováveis em processos bioquímicos, há também a vantagem delas não representarem uma ameaça à segurança alimentar ou questões agrícolas, por não competirem com as plantas cultivadas (Sharma et al., 2018).

Os processos de cultivo, colheita de microalgas, ruptura celular da biomassa e a extração de compostos estão entre as etapas envolvidas nas biorrefinarias baseadas em microalgas (Chandrasekhar et al., 2022). Para o desenvolvimento de um processo bem-sucedido, é preciso selecionar as melhores técnicas dentro dos processos upstream e downstream de uma biorrefinaria de microalgas, sendo o primeiro formado por quatro elementos principais: a escolha da cepa para o cultivo, o fornecimento de CO₂, os suplementos nutricionais (aqueles que fornecem os parâmetros vitais para o crescimento da espécie, ex. fontes de fósforo e nitrogênio) e a intensidade de luz (Bhattacharya e Goswami, 2020). Já os processos downstream estão ligados às estratégias de extração e filtração para obtenção das melhores misturas de microalgas, procurando o equilíbrio entre técnicas que sejam simples e que não tenham um alto custo associado, mas que consigam gerar compostos ideais, sem trazer um alto dano às diferentes partes da biomassa extraída.

Ao estabelecer um cultivo de microalgas, é preciso adaptar as condições de crescimento em relação ao objetivo final da pesquisa, a fim de se conseguir extrair o

máximo de biomassa da cultura, tanto em quantidade quanto em qualidade. De forma geral, os principais fatores necessários para se estabelecer um bom cultivo de microalgas é o mesmo entre as espécies, sendo esses o grupo de nutrientes essenciais (ex. N, P, K) e o fornecimento de fontes de luz e carbono orgânico ou inorgânico; mas associado a esses pontos há condições que podem ser modificadas e que inclusive variam entre diferentes cepas e podem levar a um melhor crescimento e maior rendimento de biomassa, como ajuste de temperatura e oxigênio do ambiente e do pH e salinidade do meio utilizado para o cultivo (Bhattacharya e Goswami, 2020). O tipo de cultivo também influencia diretamente a resposta do crescimento, por exemplo, cultivos em áreas abertas, como lagoas ou tanques, são mais baratos, mas também são mais suscetíveis a contaminações, enquanto o uso de biorreatores trazem um maior controle às condições de cultivo. O meio utilizado no crescimento também é um fator importante no resultado final, visto que além de meios comerciais já conhecidos, é possível utilizar fontes alternativas para crescer as microalgas, como água marinha, resíduos industriais e águas contaminadas, nessas duas últimas opções sendo possível explorar uma dupla vantagem de produção de biomassa e também remediação do local contaminado (Pessoa et al., 2022).

A colheita de microalgas geralmente é feita através da centrifugação, principalmente no caso de biorreatores, um método bem estabelecido, mas que pode acabar sendo dispendioso, principalmente no caso de grandes volumes, como os encontrados nos cultivos abertos. Nesse caso, muitas vezes utiliza-se também a floculação como um processo de baixo custo, onde antes da colheita, a cultura é concentrada com auxílio de agentes floculantes (Chandrasekhar et al., 2022). Após a colheita, é preciso romper as células das microalgas para assim conseguir acessar os componentes celulares e extrair as moléculas de interesse. Esse rompimento pode ser feito de forma mecânica, sendo através de processos físicos ou térmicos (homogeneização, moagem com esferas (bead beater), choque térmico e osmótico, ultrassom, etc.) e também de forma não mecânica, ou seja, com a utilização de produtos químicos e enzimáticos (catálise, líquido iônico, enzimas biológicas, etc). A maioria das técnicas utilizadas nessa etapa geralmente causam a ruptura completa da célula e são utilizadas visando extrair um composto específico, enquanto outros são danificados no processo (Vanthoor-Koopmans et al., 2013), por isso é preciso pensar no perfil de interesse das moléculas que se deseja obter da biomassa para, assim, escolher a técnica que mais se adéqua na recuperação destas. Apesar de existirem

diferentes boas formas de extrair cada fração da biomassa de microalgas, geralmente baseadas no solvente e método de extração escolhido, para uma biorrefinaria que produz muitos produtos diferentes, é importante procurar alternativas que consigam recuperar mais de um tipo de molécula de interesse.

A fim de estabelecer uma biorrefinaria à base de microalgas muitas etapas e tecnologias precisam ser estabelecidas, por isso para que os produtos e tecnologias gerados desse processo superem a opção mais tradicional, o rendimento e a qualidade devem ser razoavelmente elevados, a fim de se conseguir competir no mercado, sendo preciso investir em alternativas mais acessíveis e naturais em vez das que demandam mais energia (Almomani et al., 2023). Exemplos de tais técnicas incluem o uso de catalisadores de recursos de biomassa residual e o cultivo de microalgas em águas residuais ou resíduos industriais, para combinar a produtividade da biomassa com o tratamento desses resíduos.

3. Hipótese

Se as dez espécies analisadas responderem bem ao crescimento em vinhaça, então a composição da biomassa deve variar entre as diferentes espécies e entre o meio de cultivo sintético e o meio de cultivo formulado a partir de vinhaça.

4. Objetivos

O objetivo geral do projeto é avaliar se as 10 cepas de microalgas selecionadas são capazes de crescer em vinhaça como meio de cultivo, assim como o efeito desse resíduo na sua composição bioquímica, focando no perfil lipídico e de pigmentos. Para alcançá-lo, foram elaborados os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer um cultivo das 10 espécies de microalgas em meio sintético BG11 e em vinhaça, analisando a composição da biomassa para seleção de 4 cepas promissoras;
- Crescer comparativamente as 4 cepas selecionadas em vinhaça e meio sintético BG11 como controle, a fim de se analisar os efeitos do resíduo agroindustrial na composição final da biomassa;

- Realizar o mesmo cultivo comparativo das 4 cepas selecionadas em vinhaça e meio sintético, mas ampliando o volume da cultura a fim de analisar os efeitos dessa mudança sob a produção da biomassa das microalgas;
- Analisar as 4 cepas cultivadas em maior volume de meio quanto à produção de duas auxinas (ácido indol-3-acético e ácido indol-3-butírico), a fim de investigar se a vinhaça apresenta efeito sob moléculas fitorreguladoras produzidas pelas microalgas.

5. Materiais e Métodos

5.1. Cepas de microalgas

As cepas utilizadas nessa pesquisa pertencem à Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa (Brasília/DF). No total foram analisadas dez linhagens de microalgas (Tabela 1), de 8 famílias e 5 locais de coleta diferentes, selecionadas previamente pela equipe. Algumas dessas cepas já tinham sido estudadas anteriormente e demonstraram potencial para serem cultivadas em vinhaça como meio de cultivo (Santana et al., 2017). Pelas imagens obtidas com o microscópio e o software Zen, observa-se que todas as 10 espécies selecionadas são exemplos de microalgas verdes, unicelulares, com formato cocoide e imóveis (Figura 4).

Tabela 1. Cepas de microalgas utilizadas nas análises

Cepa	Classificação taxonômica	Local de coleta
LBA 006	Família Chlorococcaceae	Fazenda Chapada Imperial, Brasília -DF
LBA 028	Família Selenastraceae	Embrapa Suínos e Aves, Concórdia- SC
LBA 030	Família Scenedesmaceae (<i>Desmodesmus sp</i>)	Embrapa Suínos e Aves, Concórdia- SC
LBA 032	Família Chlorellaceae (<i>Micractinium sp.</i>)	Embrapa Amazônia Oriental, Belém - PA
LBA 039	Família Chlorellaceae (<i>Chlorella sorokiniana</i>)	Fazenda Chapada Imperial, Brasília -DF
LBA 040	Família Chlamydomonadaceae (<i>Chlamydomonas biconvexa</i>)	Usina Jales Machado, Goianésia- GO
LBA 045	Família Chlorococcaceae	Embrapa Pantanal, Corumbá- MS
LBA 046	Família Uronemataceae (<i>Uronema trentonense</i>)	Embrapa Pantanal, Corumbá- MS
LBA 047	Família Dunaliellaceae	Embrapa Pantanal, Corumbá- MS
LBA 048	Família Haematococcaceae	Embrapa Pantanal, Corumbá- MS

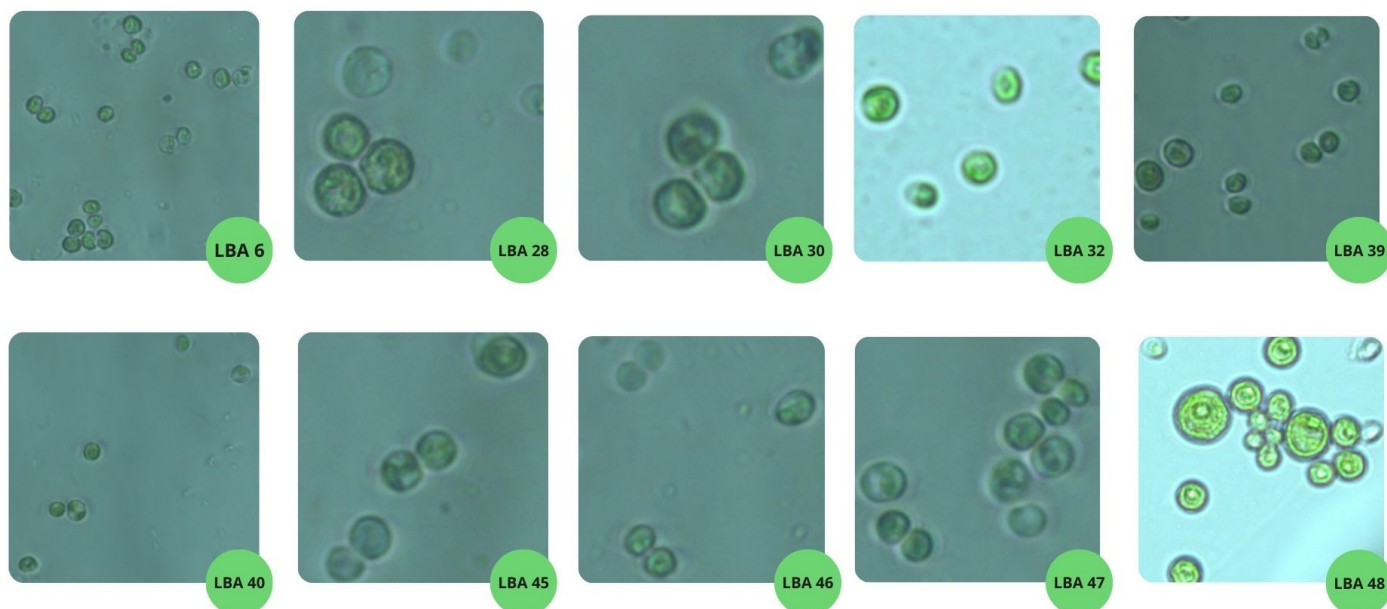


Figura 4. Fotos das 10 cepas de microalgas analisadas. As imagens foram obtidas com auxílio de um microscópio óptico, na magnificação 63X, e um software de aquisição de imagem.

Os cultivos mães foram mantidos em crescimento e repique constante com meio Blue Green 11 (BG11) (Tabela 2), em Erlenmeyers de 250 mL (100 mL de meio e 10 mL de inóculo), sob uma mesa agitadora a 110 rpm, temperatura a 25 °C e intensidade luminosa de $85 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro), gerada por lâmpadas LED branco.

Tabela 2. Composição do meio BG11 utilizado para o cultivo das microalgas

MACRONUTRIENTES	
Reagentes	Concentrações (g L ⁻¹)
NaNO ₃ (Nitrato de sódio)	1,5 g
KH ₂ PO ₄ (Fosfato dipotássico)	0,04
MgSO ₄ 7H ₂ O (Sulfato de Magnésio Heptahidratado)	0,075
EDTA-Na ₂ (sal dissódico)	0,001
CaCl ₂ H ₂ O (Cloreto de cálcio dihidratado)	0,036
C ₆ H ₈ O ₇ + H ₂ O (Ácido cítrico)	0,006
C ₆ H ₈ FeNO ₇ (Citrato de Ferro III Amoniacal)	0,006
Na ₂ CO ₃ (Carbonato de sódio)	0,02

MICRONUTRIENTES	
Reagentes	Concentrações (mg L ⁻¹)
H3BO3 (Ácido bórico)	2,86
CuSO4 5H2O (Sulfato de cobre pentahidratado)	0,079
Co(NO3)2 6H2O (Nitrato de cobalto)	0,0494
MnCl2 4H2O (Cloreto de manganês tetra hidratado)	1,81
ZnSO4 e (Sulfato de zinco heptahidratado)	0,222
Na2MoO4 2H2O (Molibdato de sódio dihidratado)	0,39

5.2. Composição da vinhaça

A vinhaça utilizada nos experimentos foi coletada na usina Jalles Machado em Goianésia (GO), em dois momentos: a primeira coleta foi feita no dia 29/10/2021 e a segunda coleta em 02/06/2023. Ambas as coletas foram feitas no primeiro local de saída da vinhaça, ou seja, logo após a destilação do vinho fermentado, como descrito em 2.4. Uma amostra de cada coleta foi enviada para análise da sua composição, que foi realizada pela empresa Soloquímica e os resultados encontram-se a seguir (Tabela 3 e 4).

A maioria dos experimentos conduzidos nessa dissertação foram realizados utilizando a vinhaça coletada no dia 29/10/2021, apenas o crescimento escalonado foi feito com a vinhaça coletada no dia 02/06/2023.

Tabela 3. Composição dos parâmetros físico-químicos da vinhaça coletada no dia 29/10/2021. LQ se refere ao Limite de Quantificação e CAS às referências da Chemical Abstract Service.

Parâmetros	Resultados (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	CAS	Metodologia
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)	30,2	3	X	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 5210 B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	10,2	3	X	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 5220 B
Nitrogênio Amoniacal (NH3+)	0,28	0,01	7664-41-7	USEPA 3015A, SMEWW 4500 NH3 - C e D
Nitrato (NO3-)	0,228	0,001	14797-55-8	SMEWW 22 ^o ED. 2012, 4110 B
Nitrito (NO2-)	< 0,001	0,001	14797-55-8	SMEWW 22 ^o ED. 2012, 4110 B
Fosfato (PO4 3-)	< 0,001	0,001	14265-44-2	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 4110 PO4 B
Potássio Total (K+)	849,08	0,001	7681-11-0	USEPA 3015A, SMEWW 3120 B

Sólidos Totais	32,105	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Fixos	10,205	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Voláteis	21,9	0,001		SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Suspensos	< 0,001	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 D

Tabela 4. Composição dos parâmetros físico-químicos da vinhaça coletada no dia 02/06/2023. LQ se refere ao Limite de Quantificação e CAS às referências da Chemical Abstract Service.

Parâmetros	Resultados (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	CAS	Metodologia
Demanda bioquímica de oxigênio (DBO)	60,3	3	X	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 5210 B
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	17,7	3	X	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 5220 B
Nitrogênio Amoniacal (NH ₃ ⁺)	0,49	0,01	7664-41-7	USEPA 3015A, SMEWW 4500 NH ₃ - C e D
Nitrato (NO ₃ ⁻)	< 0,001	0,001	14797-55-8	SMEWW 22 ^o ED. 2012, 4110 B
Nitrito (NO ₂ ⁻)	< 0,001	0,001	14797-55-8	SMEWW 22 ^o ED. 2012, 4110 B
Fosfato (PO ₄ 3 ⁻)	< 0,001	0,001	14265-44-2	SMEWW 22 ^a ED. 2012, MÉTODO 4110 PO ₄ B
Potássio Total (K ⁺)	4692,350	0,001	7681-11-0	USEPA 3015A, SMEWW 3120 B
Sólidos Totais	99,695	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Fixos	34,845	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Voláteis	64,850	0,001		SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 B e E
Sólidos Suspensos	< 0,001	0,001	X	SMEWW 22 ^a , APHA, ED. 2012, MÉTODO 2540 D

5.3. Tipos de cultivos e seus respectivos objetivos

Três diferentes condições de cultivo nortearam a pesquisa desenvolvida nesta dissertação. Foi feito inicialmente o crescimento das 10 cepas em vinhaça, a fim de avaliar se todas apresentavam capacidade de crescer nesse resíduo e obter uma perspectiva comparativa da caracterização da biomassa produzida, para então selecionar as cepas com os melhores rendimentos. Em seguida, após a triagem anterior, 4 cepas foram cultivadas em vinhaça e meio comercial BG11, utilizado como controle, com objetivo de verificar se o uso desse resíduo agroindustrial como meio de cultivo traz alterações significativas no crescimento e na biomassa produzida das microalgas. Ambos os experimentos anteriores foram realizados sob

as mesmas quantidades de meio e inóculo, contudo, como é de conhecimento geral que a quantidade de substrato e as condições de cultivo podem influenciar diretamente na reposta do crescimento desses microrganismos, o último crescimento foi realizado com a finalidade de avaliar se vinhaça exerce um impacto significativo no cultivo e produção de biomassa das algas, quando cultivadas em uma escala maior do que a previamente realizada.

Em todas as três condições de cultivo, a biomassa microalgal foi analisada quanto a produção de ácidos graxos e pigmentos. A identificação e quantificação de auxinas da biomassa foi realizada apenas para o material gerado no último cultivo, já que demanda uma quantidade maior de amostra para realizar o protocolo, condição fornecida apenas pelo crescimento realizado em maior escala.

5.3.1. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça

Quando o cultivo mãe das 10 espécies alcançaram uma absorbância de aproximadamente 0,5 em 750 nm, as cepas foram cultivadas em vinhaça bruta autoclavada, com correção do pH de 3,0 para 7.0 (com adição de NaOH, 1M), sob agitação a 110 rpm, temperatura a 25 °C e intensidade luminosa de 85 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro), gerada por lâmpadas LED branco. O cultivo foi realizado em quadruplicatas, em Erlenmeyers de 25 mL com 8 mL de vinhaça autoclavada mais 2 mL de inóculo (Figura 5), com um branco contendo apenas 10 mL de vinhaça, que foi utilizado para zerar o equipamento na análise do crescimento. O monitoramento do cultivo foi realizado 3 vezes na semana, diluindo 50 μL do cultivo em 250 μL de água Milli-Q em uma placa de 96 poços e fazendo a leitura da absorbância a 750 nm.



Figura 5. Modelo de cultivo utilizado para a triagem das 10 cepas de microalgas em vinhaça. Foi feita quadruplicatas para cada cepa analisada.

5.3.1.1. Coleta da biomassa

Após 4 semanas de crescimento, o cultivo em vinhaça foi transferido para tubos falcons de 15 mL e centrifugados a 12000 G por 10 minutos. Terminado esse processo, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 4 mL de água Milli-Q, para lavagem e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação, todo o sobrenadante foi descartado e foi feito o congelamento rápido da biomassa em nitrogênio líquido. Essa biomassa foi então liofilizada por 48 h, para obtenção da massa seca, o conteúdo final foi pesado com auxílio de uma balança de precisão e armazenado em freezer comercial até o momento do seu uso.

5.3.2 Análise do impacto da vinhaça sob o crescimento e produção de biomassa de 4 cepas de microalgas

O crescimento comparativo das 4 cepas, selecionadas após a triagem anterior, foi feito em Erlenmeyers de 25 mL (Figura 6), inoculando 2 mL do cultivo mãe de cada cepa, com densidade óptica de 0,5 em 750 nm, a 8 mL de meio (BG11 ou vinhaça bruta autoclavada, ambos com pH corrigido pra 7,0). As amostras permaneceram sob agitação a 110 rpm, temperatura a 25 °C e intensidade luminosa de 85 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ sob fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro), gerada por lâmpadas LED branco.



Figura 6. Modelo de cultivo utilizado para o crescimento comparativo em vinhaça e BG11 das 4 cepas de microalgas selecionadas, em 10 mL de cultivo. Foi feita quadruplicatas de cada condição para cada cepa analisada

No monitoramento do crescimento, além da leitura da absorbância, foi feita a contagem de células da amostra, com auxílio de uma Câmara de Neubauer sob o microscópio óptico, com magnificação de 20X, diluindo os 300 µL já plaqueados na leitura da absorbância para uma concentração adequada à contagem do dia. O número final de células/mL foi dado pela equação descrita abaixo. A coleta de biomassa foi feita seguindo os mesmos procedimentos e condições relatados anteriormente.

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de células total})}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes analisados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Equação 1. Cálculo da densidade celular do cultivo através da Câmara de Neubauer

5.3.3. Análise do aumento do volume de cultivo sob o crescimento e produção de biomassa de quatro cepas de microalgas

Esse crescimento foi feito em parceria com o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da EMBRAPA Agroenergia, utilizando as mesmas 4 cepas selecionadas anteriormente, só que dessa vez em 1 L de meio. O crescimento foi feito inoculando 30 mL do cultivo mãe de cada cepa a 1 L de meio (BG11 ou vinhaça bruta autoclavada, ambos com pH corrigido pra 7,0), de modo que todas as amostras tiveram a absorbância do seu inóculo inicial na faixa de 0,1-0,2, a 750 nm (seguindo protocolo do laboratório). Para realizar esse cultivo, foram utilizados biorreatores com capacidade de 1 L (figura 7) sobre condições as seguintes condições de cultivo: temperatura controlada a 22 °C, intensidade luminosa de 315 µmol m⁻²s⁻¹ sob fotoperíodo de 12/12 h (claro/escuro) e aeração com fluxo de ar sintético (sem adição de CO₂) comprimido a 3 cc/min. O sistema de iluminação é composto por luzes branca (Lâmpada Led GreenPower TLED W 20W MB 220-240V, 50/60Hz, Philips) e colorida (C4 Green Power LED, C4 Biotecnologia). O fluxo de ar foi filtrado usando um filtro de seringa Nylon Whatman com tamanho de poro de 0,45 µm. No monitoramento do crescimento, foi feita a leitura da absorbância e também a contagem de células da amostra, com auxílio de uma Câmara de Neubauer sob o microscópio óptico, com magnificação de 10X. Cada amostra teve sua foto registrada pelo software Zen e o número total de células do quadrante da câmara foi dado pelo programa Image J e utilizado para obter o número final de células/mL através da equação 1.



Figura 7. Modelo de cultivo utilizado para o crescimento comparativo realizado em 1L de meio. Foi feita quadruplicatas de cada condição para cada cepa analisada.

5.3.3.1. Coleta da biomassa

Ao fim do experimento, o cultivo restante foi transferido para tubos de 800 mL correspondentes à centrífuga Hitachi (modelo CR-22GIII), que foram pesados e tiveram seus pesos ajustados igualmente com água destilada para garantir o balanceamento da centrífuga. A centrifugação foi feita a 10000 G, por 7 min, a 15 °C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2x com 300 mL de água destilada, para remoção do excesso dos resíduos, principalmente da vinhaça e centrifugados novamente. Terminada a lavagem, o pellet foi diluído com um pouco de água destilada, coletado com auxílio de uma espátula e transferido para tubos falcons de 50 mL. Depois de ter os pesos ajustados, os falcons foram centrifugados a 10000 G por 5 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet restante foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido e liofilizado.

5.4 Esterificação/Transesterificação *in situ* para análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi feita com base no protocolo de Rocha et al. (2017), com adaptações. Em um frasco (vial) de vidro de 2 mL, 10 mg da biomassa algal liofilizada foi dissolvida em 0,2 mL de uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) com a subsequente adição de 10 µL do padrão interno (Glyceryl tritridecanoate (10 mg/mL), Sigma-Aldrich, EUA) e a transesterificação *in situ* foi feita com 0,3 mL de HCl em MeOH (5%, v/v). Após 1 h de incubação a 85 °C em um dry block, os ésteres metílicos de ácidos graxos da amostra (FAME, do inglês fatty acid methyl ester) foram extraídos utilizando 1 mL de hexano e, após separados, foram levados para análise no cromatógrafo a gás Agilent 7890-5975 equipado com uma coluna capilar INNOWAX (Agilent Technologies) de 30 m de comprimento. 1 µL da amostra foi injetado em modo split, sendo o hélio o gás de arraste e a temperatura do injetor 250 °C. Um fluxo constante de 1 mL min⁻¹ e um programa de temperatura foram utilizados para separar os FAMES, com início em 70 °C, subindo para 130 °C a 20 °C/min e depois para 260 °C a 10 °C, mantendo a temperatura final por 5 min. A quantificação foi realizada com auxílio do software Agilent ChemStation e as curvas padrão foram construídas usando uma mistura certificada de FAMES corrigindo para a recuperação do padrão interno (padrão Grain FAME Mix, Sigma-Aldrich, EUA).

5.5. Extração e análise de pigmentos por espectrofotometria

A extração de pigmentos foi feita a fim de se caracterizar a biomassa da cultura, através da utilização de solvente orgânico acompanhada de choque térmico e ultrassom, sendo dimetilformamida (DMF) o solvente escolhido, de acordo com o trabalho de Wellburn (1994). Em um tubo Eppendorf de 2 mL, foi pesado 5 mg da biomassa algal com a subsequente adição de 1,5 mL de DMF. Depois de homogeneizado, os tubos foram submetidos a uma sequência de choque térmico para promover o rompimento das células, com o congelamento rápido através do nitrogênio líquido e descongelamento no banho maria a 80 °C (esse processo foi repetido 3 vezes). Após esse procedimento, as amostras foram incubadas em banho ultrassom (SoniClean 6, Sanders Medical) por 25 minutos a 40 °C. Terminado o tempo, os sobrenadantes foram transferidos para cubetas de vidro e analisados no espectrofotômetro Thermo Scientific Evolution 201 Uv-visible, nos seguintes comprimentos de onda: 663.8 nm,

para análise da clorofila *a*, 646.8 nm, para análise da clorofila *b*, e 480 nm, para análise de carotenoides. Para calcular a concentração em µg/mL dos referidos pigmentos, foram utilizadas as equações abaixo, referentes ao uso do reagente DMF, retiradas do artigo de Wellburn (1994). Todos os procedimentos foram feitos com os eppendorfs protegidos por papel alumínio para evitar a foto-oxidação dos pigmentos.

$$\text{Clorofila a (}\mu\text{g/mL): (11,65} \times \text{Abs 663.8) - (2,69} \times \text{Abs 646.8)}$$

Equação 2. Cálculo da concentração de clorofila *a*

$$\text{Clorofila b (}\mu\text{g/mL): (20,81} \times \text{Abs 646.8) - (4,53} \times \text{Abs 663.8)}$$

Equação 3. Cálculo da concentração de clorofila *b*

$$\text{Carotenoide (}\mu\text{g/mL): } \frac{((1000 \times \text{Abs 480 nm}) - (0,89 \times [\text{] Clorofila a}) - (52,02 \times [\text{] Clorofila b}))}{245}$$

Equação 4. Cálculo da concentração de carotenoides

Quanto à escolha do método utilizado, a extração de pigmentos de microalgas geralmente é realizada utilizando o método clássico de mistura da biomassa a um solvente orgânico, formando um extrato onde este reagente é absorvido pela parede celular do organismo, causando ou facilitando a sua ruptura, o que promove a disponibilidade do conteúdo celular no meio para análise (Pagels et al., 2021). Além do uso de solventes, muitas vezes a extração é associada a um tratamento térmico, já que a alteração da temperatura pode tornar a parede celular menos resistente, e também à assistência por ultrassom, na qual a ação de ondas mecânicas resultam no fenômeno de cavitação que atuam facilitando o processo de extração dos elementos de interesse.

5.6. Extração e análise de auxinas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A análise de auxina por cromatografia gasosa foi feita em três etapas, uma visando extrair os compostos de interesse, uma para a limpeza do extrato e a outra para melhorar as propriedades dos compostos extraídos através da derivatização, a fim de se adequar as amostras à análise aplicada. Primeiramente, para a extração, foram pesados 100 mg de

biomassa seca homogeneizada em um tubo de 2 mL e a essa amostra foi adicionado 1 mL da solução extratora gelada (metanol 80%), assim como os padrões internos. 40 µL de Adonitol (BioXtra, Sigma-Aldrich) (0.2 mg/ml) foram utilizados para certificar que a derivatização ocorreu como deveria e dois padrões de fitohormônios pra auxiliar na quantificação (descrita abaixo). Após a adição desses padrões, as amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e em seguida passaram por dois ciclos de 1 minuto cada no moinho de esferas (BioSpec Products) para a ruptura da parede celular (para essa etapa foram utilizadas esferas de 0,5 mm). Terminado os dois ciclos, as amostras foram transferidas para outro tubo de 2 mL e centrifugadas por 10 minutos a 10000 G e 10°C. Finalizado esse processo, 750 µl do sobrenadante foram transferidos para outro tubo e deu início a etapa de limpeza que foi adaptada do método descrito por Lisec et al. (2006).

Aos 750 µl de amostra, foram adicionados 375 µl de clorofórmio e 750 µl de água Milli-Q, ambos gelados, para auxiliar no processo de precipitação das proteínas e separação dos lipídios presentes no extrato. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2.200 G à temperatura ambiente por 10 minutos para separação das fases. Da fase superior obtida após a centrifugação, foram feitas alíquotas de 500 µl em novos tubos, que então foram secadas totalmente em um concentrador a vácuo, por 4 horas. Finalizado esse procedimento, deu início a última etapa, a de derivatização (também adaptada de Lisec et al., 2006), onde às amostras, agora secas, foram adicionados 40 µL de uma solução de piridina, seguida da adição de 70 µL do reagente N-metil-N- [trimetilsilil]trifluoroacetamida (MSTFA). As amostras foram, então, incubadas em banho seco por 30 min a 37 °C e, após esse processo, 100 µL do resultado da reação foram transferidos para frascos (vials) de vidro e seguiram para análise no cromatógrafo a gás Agilent 7890-5975 equipado com uma coluna capilar HP-5MS de 30 m com 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme. 1 µL da amostra foi injetado em modo splitless, sendo o hélio a 0,6 mL min⁻¹ o gás de arraste e a temperatura do injetor 230 °C. Um fluxo constante de 1 mL min⁻¹ e um programa de temperatura foram utilizados para separar os compostos de interesse, com início em 70 °C e programada para subir para 350 °C a 5 °C/min e depois para reduzir a 320 °C a 70 °C/min, mantendo a temperatura final por 5 min. Para os parâmetros da espectrometria de massa, foram ajustados: temperatura da linha de transferência a 250 °C, temperatura do quadrupolo a 150 °C, temperatura do detector MS a 250 °C.

Os espectros foram coletados no modo Selected Ion Monitoring (SIM), onde apenas os íons selecionados são monitorados, neste caso os íons 319.00 e 217.00 para o Adonitol, 202.00, 276.00 e 304.00 para o ácido indol-3-acético (AIA) e 202.00, 215.00 e 347.00 para o ácido indol-3-butírico (AIB). Os fitohormônios de interesse foram identificados utilizando o software Agilent Chemstation, pela comparação dos espectros de massas com os tempos de retenção obtidos de uma solução com os padrões puros das duas auxinas analisadas. A quantificação foi feita utilizando o princípio do Standard Addition Method, sendo feitas duas amostras para cada cepa analisada, uma contendo apenas a biomassa seca e a outra com a adição de uma quantidade conhecida dos padrões de fitohormônios ácido indol-3-acético (Plant Cell Culture, Sigma-Aldrich) e ácido indol-3-butírico (Bioreagent Plant, Sigma-Aldrich) (50 µL na concentração 0.0025 mg/mL), de modo que essa concentração conhecida permitiu determinar a concentração desconhecida das amostras sem adição de padrão.

5.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa BioEstat, com a análise de variância (ANOVA) e o teste de probabilidade de Tukey sendo aplicados para comparar os resultados entre as cepas, e o teste t para comparar o crescimento comparativo de BG11 e vinhaça, sendo o nível de significância para ambos fixado em $p \leq 0,05$.

6. Resultados

6.1. Triagem das dez cepas de microalgas em vinhaça

6.1.1. Curva de crescimento e produção de biomassa

Após 29 dias de cultivo, foi possível observar que todas as 10 cepas de microalgas cresceram em vinhaça (Figura 8), sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre elas, com destaque para 5 cepas: LBA 6, LBA 40, LBA 45, LBA 47 e LBA 48 que apresentaram uma taxa de crescimento específica (μ) acima de 0,06 (Tabela 5).

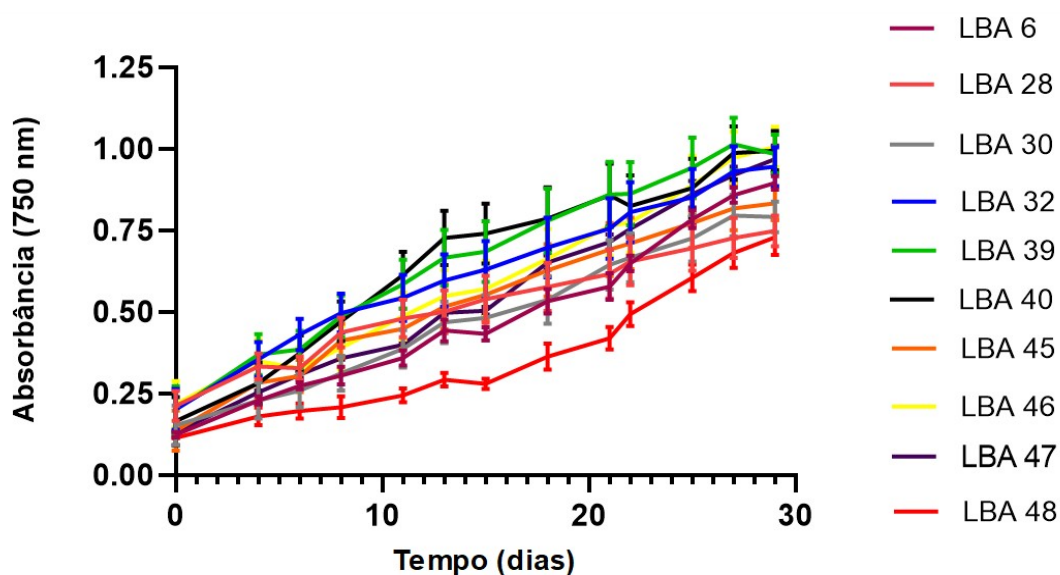


Figura 8. Curva de crescimento resultante da triagem das 10 cepas de microalgas em vinhaça durante 29 dias. O crescimento foi dado pela leitura da absorbância (750 nm) e os valores estão representados pela média $\pm$ erro padrão ($n=4$).

Tabela 5. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em vinhaça. Não foi observada diferença significativa entre as cepas.

Cepas	Taxa de crescimento específica (d^{-1})*
LBA 6	0,068
LBA 28	0,043
LBA 30	0,056
LBA 32	0,053
LBA 39	0,054
LBA 40	0,061
LBA 45	0,062
LBA 46	0,052
LBA 47	0,069
LBA 48	0,064

* a taxa de crescimento específica foi calculada pela fórmula: $\mu_t = \ln X/X_0$, sendo X o valor da absorbância ou da contagem de células do dia final do cultivo, X_0 esse mesmo valor mas do dia inicial do cultivo e t o tempo do crescimento realizado.

Quanto à produção de biomassa seca, todas as cepas apresentaram um teor acima de 3,5 g/L, também sem diferença significativa entre elas (Figura 9) e não mostrando uma correlação direta entre a quantidade obtida e o crescimento demonstrado na curva.

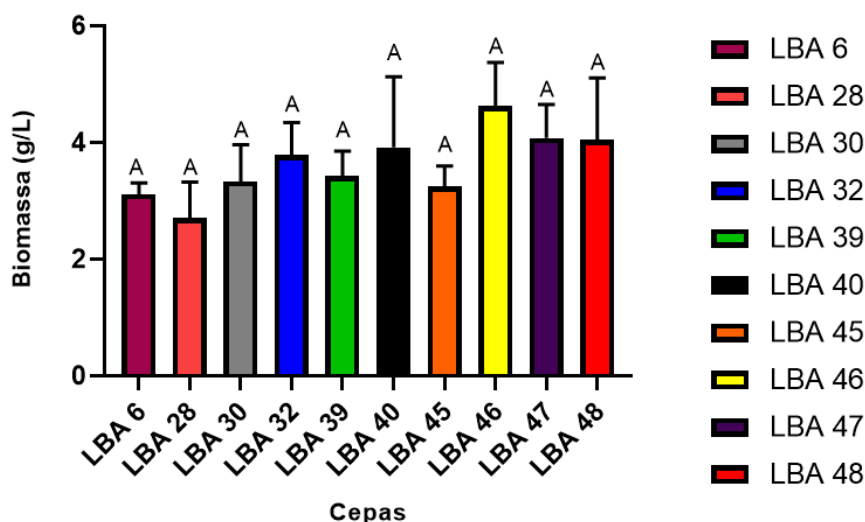


Figura 9. Produtividade de biomassa de microalgas resultante da triagem em vinhaça, após 4 semanas de cultivo. Os valores estão expressos pela média e as barras se referem ao erro padrão (n = 4). Letras diferentes representam a diferença significativa, pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

6.1.2. Análise da produção e do perfil de ácidos graxos

Com a análise cromatográfica, foi possível observar que em relação a % de massa seca de ácidos graxos obtida (ou seja, a quantidade de ácidos graxos acumulado pelo microrganismo), LBA 39 e LBA 40 apresentaram o melhor rendimento, com uma média de 18% cada, seguida pela LBA 6 e LBA 47, com valores médios próximos a 15% (Figura 10). O perfil de ácidos graxos apresentou uma variação mínima entre as 10 cepas de microalgas analisadas, sendo a maioria dos FAMES composta por cadeias de 16 (16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4) e 18 carbonos (18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4) (Tabela 6).

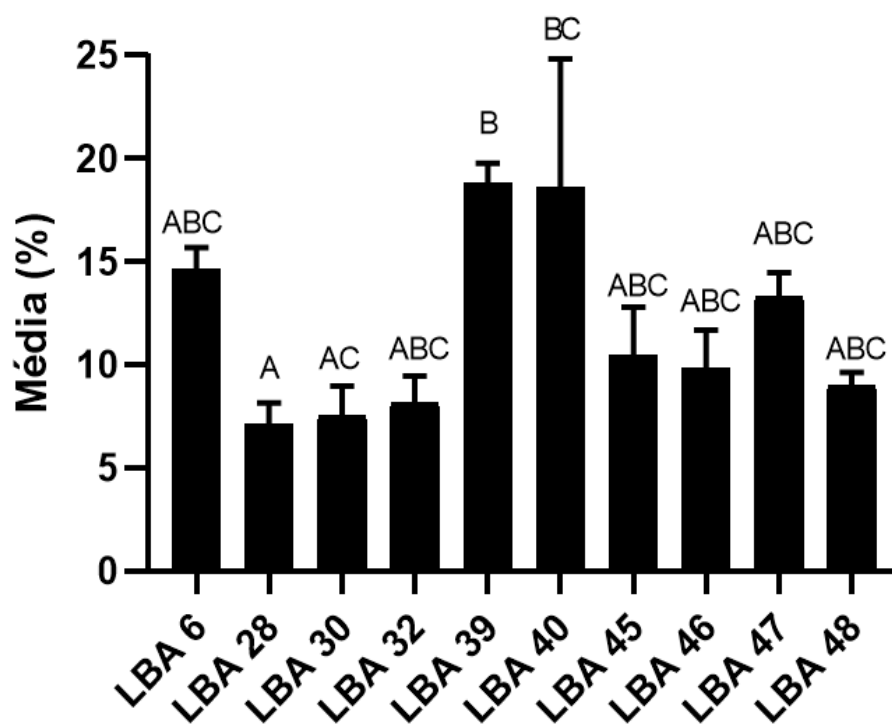


Figura 10. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça. Os valores estão expressos em % média e as barras se referem ao erro padrão ($n = 4$). Letras diferentes representam a diferença significativa, pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos de 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça (% do total de FAMES). Os valores estão representados pela média ± desvio padrão, com as letras ao lado indicando diferença significativa entre as cepas, pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Aqueles que não apresentam letras é porque não houve diferença significativa entre as médias.

Ácidos Graxos	LBA 6	LBA 28	LBA 30	LBA 32	LBA 39	LBA 40	LBA 45	LBA 46	LBA 47	LBA 48
Ácidos Graxos Saturados										
Ácido Palmítico (C16:0)	37,3 ± 3,3 A	38,2 ± 2,9 A	36,7 ± 1,8 A	39,7 ± 1,09 A	29,1 ± 0,5 B	29,2 ± 4,6 B	39,6 ± 1,2 A	36,3 ± 1,9 A	39,6 ± 0,5 A	37,3 ± 2,5 A
Ácido Estearico (C18:0)	1,4 ± 0,2 B	1,3 ± 0,4 B	0,6 ± 0,3 B	1,5 ± 0,5 B	1,1 ± 0,2 B	1,6 ± 0,2 B	1,1 ± 0,2 B	1,7 ± 0,3 B	0,9 ± 0,03 B	0,08 ± 0,1 A
Ácido Eicosanoico (C20:0)	-	-	-	-	0,4 ± 0,05	0,6 ± 0,03 B	0,6 ± 0,03	-	-	-
Ácidos Graxos Monoinsaturados										
Ácido Palmitoleico (C16:1)	2,03 ± 0,1 A	4,5 ± 0,4 BD	5,4 ± 1,2 D	4,9 ± 0,06 C	1,9 ± 0,2 A	2,5 ± 2,2 AB	2,6 ± 0,3 ABC	2,4 ± 1,06 A	2,1 ± 0,2 A	0,06 ± 0,07 A
Ácido Oleico (C18:1)	18,4 ± 1,6 C	5,3 ± 1,5 AB	10,6 ± 2,6 ABC	14,2 ± 2,8 BC	9,8 ± 1,2 ABC	17,7 ± 8,2 C	11,3 ± 0,6 ABC	14,5 ± 2,6 BC	17,8 ± 3,2 C	4,02 ± 4,7 A
Ácidos Graxos Poliinsaturados										
Ácido 7,10-hexadecadienóico (C16:2)	-	0,2 ± 0,4 A	1,8 ± 0,15 AB	0,098 ± 0,1 A	7,3 ± 0,7 D	2,3 ± 0,9 B	-	4,9 ± 0,3 C	0,3 ± 0,2 A	-
Ácido 7,10,13-hexadecatrienóico (C16:3)	0,75 ± 0,2 A	3,4 ± 0,7 BC	12,7 ± 1,4 E	2,7 ± 1,08 B	6,8 ± 0,1 D	2,5 ± 0,5 AB	1,7 ± 0,07 AB	4,9 ± 0,6 C	2,1 ± 0,2 AB	2,3 ± 0,3 AB
Ácido 4,7,10,13 – hexadecatetraenóico (C16:4)	7,82 ± 0,55 ABCD	9,5 ± 0,7 CD	-	8,1 ± 1,5 CD	-	6,3 ± 1,7 ABC	7,2 ± 1,1 ABCD	4,3 ± 0,7 AB	6,3 ± 1,05 ABC	11,01 ± 3,1 D
Ácido linoleico (C18:2)	9,74 ± 6,67 AB	10,7 ± 0,7 ABC	10,5 ± 1,6 ABC	8,5 ± 1,3 A	30,5 ± 0,4 D	15,2 ± 0,6 BC	11,4 ± 0,3 ABC	15,1 ± 0,8 BC	11,02 ± 0,3 ABC	15,5 ± 1,6 C
Ácido α-linolênico (C18:3 - ω-3)	14,42 ± 9,3 AB	21,2 ± 1,1 AB	17,3 ± 0,6 AB	15,7 ± 1,1 AB	12,9 ± 1,3 A	18,1 ± 3,1 AB	17,7 ± 0,2 AB	12,9 ± 1,05 B	14,8 ± 1,7 AB	19,5 ± 3,9 AB
Ácido γ-linolênico (C18:3 - ω-6)	1,93 ± 2,78 A	0,5 ± 0,2 A	0,5 ± 0,08 A	0,4 ± 0,08 A	-	1,06 ± 0,2 A	1,3 ± 0,2 A	0,4 ± 0,1 A	0,8 ± 0,1 A	7,06 ± 0,7 B
Ácido estearidônico (C18:4)	4,72 ± 0,36 BC	4,9 ± 0,6 BC	3,6 ± 0,5 AB	3,9 ± 0,2 ABC	-	3,8 ± 0,9 ABC	5,3 ± 0,7 C	2,5 ± 0,2 A	4,1 ± 0,7 ABC	3,06 ± 0,9 A
% ácidos saturados	38,6 ± 3,5	39,5 ± 3,3	37,3 ± 2,1	41,2 ± 1,5	41,2 ± 1,5	31,5 ± 4,9	41,3 ± 1,4	37,9 ± 2,2	40,5 ± 0,6	37,4 ± 2,6
% ácidos insaturados	59,9 ± 21,7	60,5 ± 6,5	62,6 ± 8,3	58,7 ± 8,2	58,7 ± 8,2	69,4 ± 18,4	58,6 ± 3,5	62,04 ± 7,4	59,5 ± 7,9	62,6 ± 15,6

De forma geral, todas as 10 cepas obtiveram uma % maior de ácidos graxos poliinsaturados em sua composição, seguido de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, sendo este último geralmente metade do valor encontrado nas outras duas classificações (Figura 7). Enquanto ácidos graxos insaturados obtiveram uma variação significativa nos valores entre as cepas, a % de ácidos graxos saturados foi semelhante em quase todas elas, porém com um decréscimo médio de 10% da LBA 39 e LBA 40 em relação as outras oito.

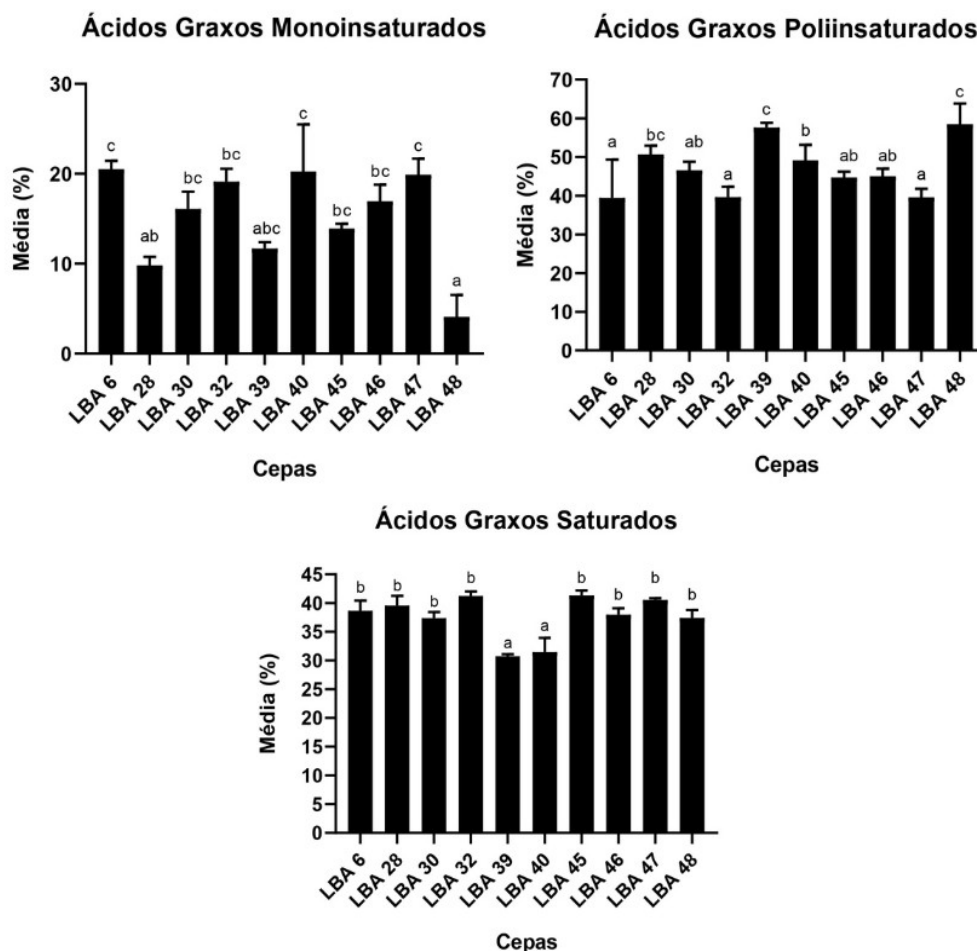


Figura 11. Perfil de ácidos graxos das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça segundo a presença ou não de insaturações. Os valores representam a % média e as barras de erro o erro padrão ($n = 4$) em relação ao total de cada FAME identificado. Letras diferentes representam a diferença significativa entre os valores de FAME medidos para cada cepa, pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

6.1.3. Análise da produção de pigmentos

Os níveis de pigmentos de cada cepa seguiram um mesmo padrão, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) em nenhuma das três análises, com o teor de clorofila *a* variando de 6 a 9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomassa, clorofila *b* de 2 a 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e carotenoides 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Tabela 7).

Tabela 7. Teor médio de pigmentos extraídos das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça. Os valores são expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ biomassa.

Cepas	Clorofila a		Clorofila b		Carotenoides	
	Média	DesvPad	Média	DesvPad	Média	DesvPad
LBA 6	9,85	1,82	4,13	0,98	2,73	0,52
LBA 28	8,53	2,92	3,52	2,92	2,1	0,65
LBA 30	6,5	2,7	3,27	1,28	2,29	1,76
LBA 32	9,44	3,17	6,3	5,84	2,15	0,59
LBA 39	6,9	3,66	3,17	1,8	2,04	1,11
LBA 40	8,78	3,9	3,9	2,6	1,89	0,83
LBA 45	6,05	1,85	2,25	1,96	1,32	0,19
LBA 46	7,26	1,14	2,3	1,45	1,68	0,29
LBA 47	6,67	1,07	3,28	1,8	1,79	0,44
LBA 48	7,04	1,19	3,38	1,78	1,92	0,59

6.2. Análise do impacto da vinhaça sob o crescimento e composição da biomassa de microalgas

A fim de investigar se a vinhaça exerce algum efeito sob a composição da biomassa das microalgas, foi feito o crescimento comparativo de 4 cepas em vinhaça e BG11, meio comercial comumente utilizado para cultivo desses microrganismos. Como não houve diferença significativa na produtividade da biomassa obtida a partir do crescimento das 10 cepas em vinhaça e nem no perfil de pigmentos extraídos, o critério utilizado na seleção das cepas para o crescimento comparativo foi o rendimento da massa seca de ácidos graxos (Figura 10), juntamente com a taxa de crescimento específica obtida no cultivo (Tabela 5). Dessa forma, analisando o conjunto desses dois dados, LBA 6, LBA 39, LBA 40 e LBA 47 foram as 4 cepas utilizadas nos experimentos dessa nova fase.

6.2.1. Curva de crescimento e produção de biomassa

Após 24 dias de cultivo, foi possível observar a existência de uma diferença no crescimento das 4 cepas de microalgas nos dois cultivos feitos, agora monitorado por contagem de células. Na LBA 6 e LBA 40, ao fim do cultivo, as amostras crescidas em BG11 apresentaram uma maior densidade celular, enquanto na LBA 39 e na LBA 47 foram as crescidas em vinhaça que terminaram com essa maior abundância (Figura 12). Em relação à taxa de crescimento específica, todas as cepas apresentaram um maior valor no cultivo realizado em BG11, exceto a LBA 39, cuja taxa de crescimento foi melhor em vinhaça (Tabela 8).

Contudo, exceto pela LBA 39, o crescimento apresentou algumas inconstâncias, como pode ser observado nas curvas de crescimento e não ficou dentro do padrão esperado, principalmente comparando o crescimento em vinhaça com o descrito na primeira parte desta dissertação. Não foi possível determinar o motivo dessas alterações, contudo supõe-se que durante as semanas de cultivo, as microalgas foram submetidas a algum estresse não identificado que levou aos resultados aqui apresentados.

Tabela 8. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em 10 mL de vinhaça e BG11. Não foi observada diferença significativa entre as 4 cepas. Entre os tipos de meio de cultivo foi observada diferença, pelo teste t (5% de probabilidade), com n.s. sendo aquelas que não apresentaram valor significativo estatisticamente.

	LBA 6			LBA 39			LBA 40			LBA 47		
	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t
Taxa de crescimento específica (d ⁻¹)	0,06	-0,001	p = 0,05	0,03	0,05	p = 0,001	0,09	0,05	p = 0,001	0,091	0,06	n.s.

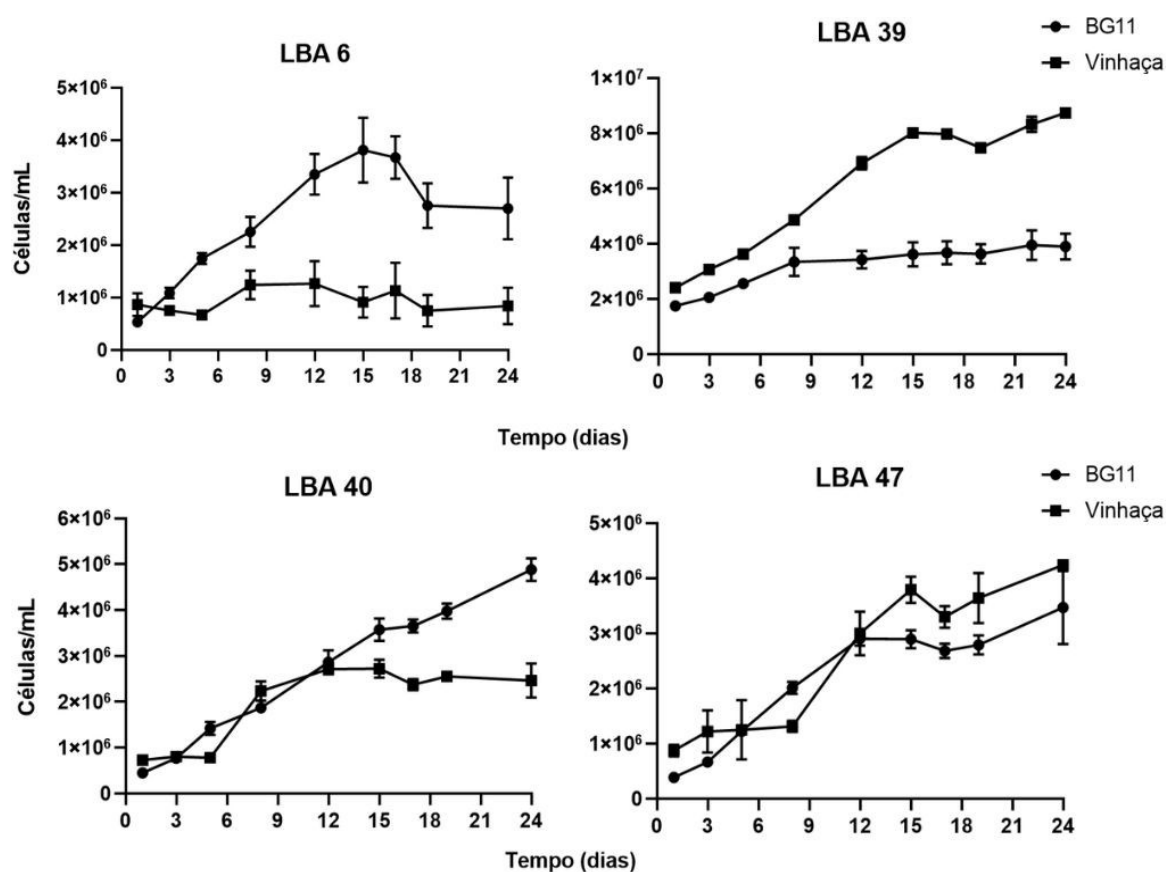


Figura 12. Curva de crescimento, baseada no número de células, de 4 cepas de microalgas (LBA 6, LBA 39, LBA 40, LBA 47) em vinhaça e BG11, cultivadas em um sistema de 10 mL de cultivo por 24 dias. Os valores estão representados pela média $\pm$ erro padrão ($n=4$).

Quanto à produção de biomassa, em todas as 4 cepas o rendimento foi maior no crescimento realizado em vinhaça, havendo diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos quatro grupos quando comparado o rendimento com aquelas crescidas no controle (Figura 13).

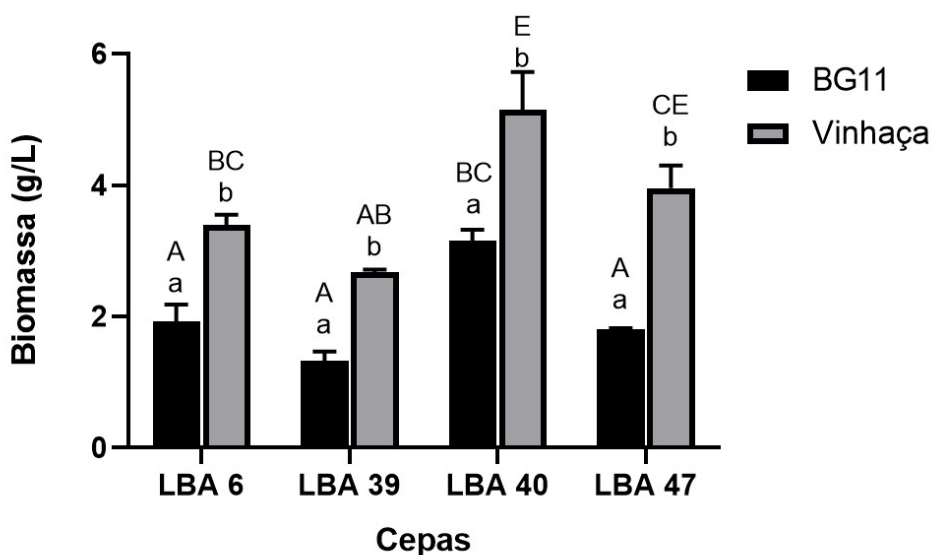


Figura 13. Comparação do rendimento da biomassa seca em g/L de 4 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça e BG11, em um sistema de 10 mL de cultivo. Os valores estão representados pela média e as barras de erro pelo erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

6.2.2. Análise da produção e perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos apresentou uma variação mínima quando comparado os dois crescimentos realizados (cultivo em BG11 e cultivo em vinhaça). Em todas as 4 cepas, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na produtividade de massa seca de ácidos graxos entre os dois tipos de cultivos, com LBA 6 e LBA 40 apresentando um rendimento levemente maior da cultura crescida em BG11, enquanto na LBA 39 e LBA 47 o melhor rendimento foi daquela cultivada em vinhaça (Figura 14).

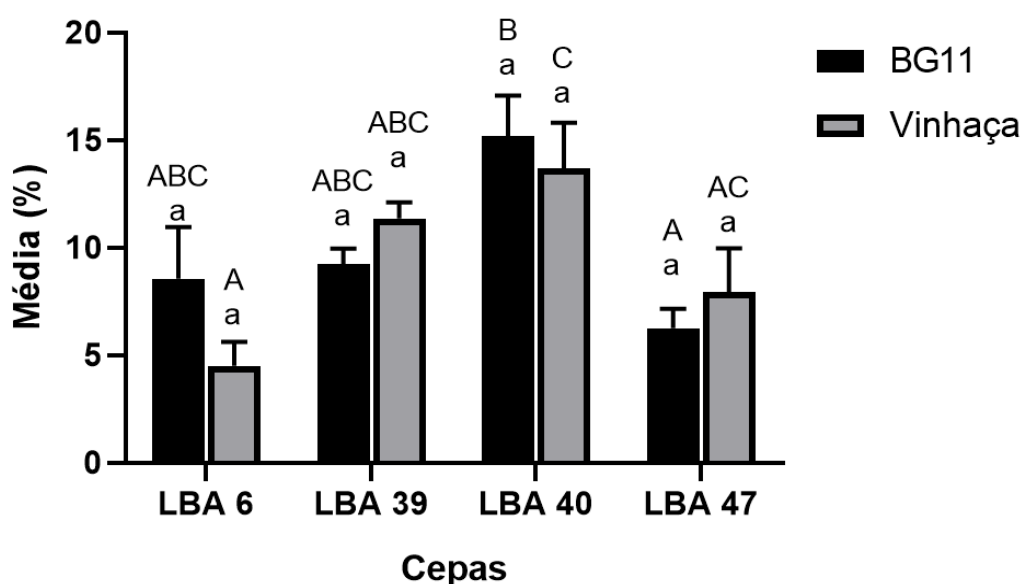


Figura 14. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em BG11 e vinhaça, em um sistema de 10 mL de cultivo. Os valores estão representados pela média e erro padrão (n=4). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

Em ambos os cultivos, a maioria dos ácidos graxos apresentaram novamente cadeias de 16 (16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4) e 18 carbonos (18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4), sendo o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linolênico (C18:3) os de maior prevalência (Tabela 9). Todos os ácidos graxos relatados no cultivo com BG11 também foram identificados na biomassa resultante do cultivo com vinhaça e vice-versa.

Tabela 9. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça e BG11 (% do total de FAMES), em um sistema de 10 mL de cultivo. Os valores estão representados pela média $\pm$ desvio padrão, com n.s sendo nenhuma diferença significativa em relação ao teste t (nível de 5% de probabilidade).

Ácidos Graxos	LBA 6			LBA 39			LBA 40			LBA 47		
	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t
Ácidos Graxos Saturados												
Ácido Palmítico (C16:0)	32,9 $\pm$ 3,4	33,6 $\pm$ 7,2	n.s	31,1 $\pm$ 5,7	28,4 $\pm$ 3,7	n.s	25,5 $\pm$ 2,4	23,8 $\pm$ 1,8	n.s	31,2 $\pm$ 1,4	31,7 $\pm$ 2,4	n.s
Ácido Esteárico (C18:0)	1,8 $\pm$ 1,3	3,4 $\pm$ 0,9	n.s	1,7 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,6	n.s	2,7 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,8	n.s	0,9 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,9	n.s
Ácido Eicosanoico (C20:0)	1,3	0,4 $\pm$ 0,01	n.s	0,7 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2	n.s	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	n.s	-	-	-
Ácidos Graxos Monoinsaturados												
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,9 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 0,4	p = 0,009	1,2 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3	n.s	2,5 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3	n.s	2,3 $\pm$ 0,3	1,6 $\pm$ 1,3	n.s
Ácido Oleico (C18:1)	29,8 $\pm$ 5,09	24,7 $\pm$ 20,9	n.s	10,1 $\pm$ 1,8	12,5 $\pm$ 3,6	n.s	29,2 $\pm$ 1,1	29,5 $\pm$ 1,9	n.s	30,6 $\pm$ 2,4	26,1 $\pm$ 8,07	n.s
Ácidos Graxos Poliinsaturados												
Ácido 7,10-hexadecadienóico (C16:2)	0,05 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,09	p = 0,00005	6,8 $\pm$ 1,7	8,5 $\pm$ 0,8	n.s	2,3 $\pm$ 0,6	2,4 $\pm$ 0,7	n.s	0,07 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,6	n.s
Ácido 7,10,13-hexadecatrienóico (C16:3)	1,7 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,4	n.s	5,3 $\pm$ 1,1	7,1 $\pm$ 1,2	n.s	3,3 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,5	n.s	3,4 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,9	p = 0,04
Ácido 4,7,10,13 – hexadecatetraenóico (C16:4)	6,2 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 3,5	n.s	-	-	-	4,1 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 0,5	n.s	5 $\pm$ 0,8	5,5 $\pm$ 3,07	n.s
Ácido linoleico (C18:2)	5,2 $\pm$ 1,8	9,4 $\pm$ 3,1	n.s	29,8 $\pm$ 3,5	25,06 $\pm$ 2,8	n.s	12,5 $\pm$ 0,8	13,4 $\pm$ 0,4	n.s	6,9 $\pm$ 0,9	11,9 $\pm$ 1,3	p = 0,001
Ácido α -linolênico (C18:3 - ω -3)	16,8 $\pm$ 3,8	14,8 $\pm$ 6,9	n.s	13,1 $\pm$ 2,1	14,2 $\pm$ 2,2	n.s	13,1 $\pm$ 0,8	14,9 $\pm$ 1,8	n.s	14,4 $\pm$ 1,8	16,5 $\pm$ 6,7	n.s
Ácido γ -linolênico (C18:3 - ω -6)	0,3 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,07	n.s	-	-	-	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	n.s	0,6 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,4	n.s
Ácido estearidônico (C18:4)	3,8 $\pm$ 1	1,8 $\pm$ 0,8	p = 0,03	-	-	-	2,9 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,1	p = 0,045	4,3 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 1,3	n.s
% ácidos saturados	35,02 $\pm$ 2,4	37,3 $\pm$ 6,05	n.s	33,5 $\pm$ 6,6	30,8 $\pm$ 4,9	n.s	29,03 $\pm$ 1,5	27,3 $\pm$ 0,7	n.s	32,2 $\pm$ 1,3	32,7 $\pm$ 2,9	n.s
% ácidos insaturados	64,9 $\pm$ 9,5	62,6 $\pm$ 35,8	n.s	66,4 $\pm$ 10,1	69,1 $\pm$ 11,5	n.s	70,9 $\pm$ 1,5	72,7 $\pm$ 0,9	n.s	67,8 $\pm$ 5,5	67,3 $\pm$ 14,6	n.s

Nas quatro cepas analisadas, o teor de ácidos graxos insaturados foi maior do que o de saturados, com uma proporção de aproximadamente 60 para 40%, respectivamente, não sendo observado diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tipos de cultivos (Figura 15).

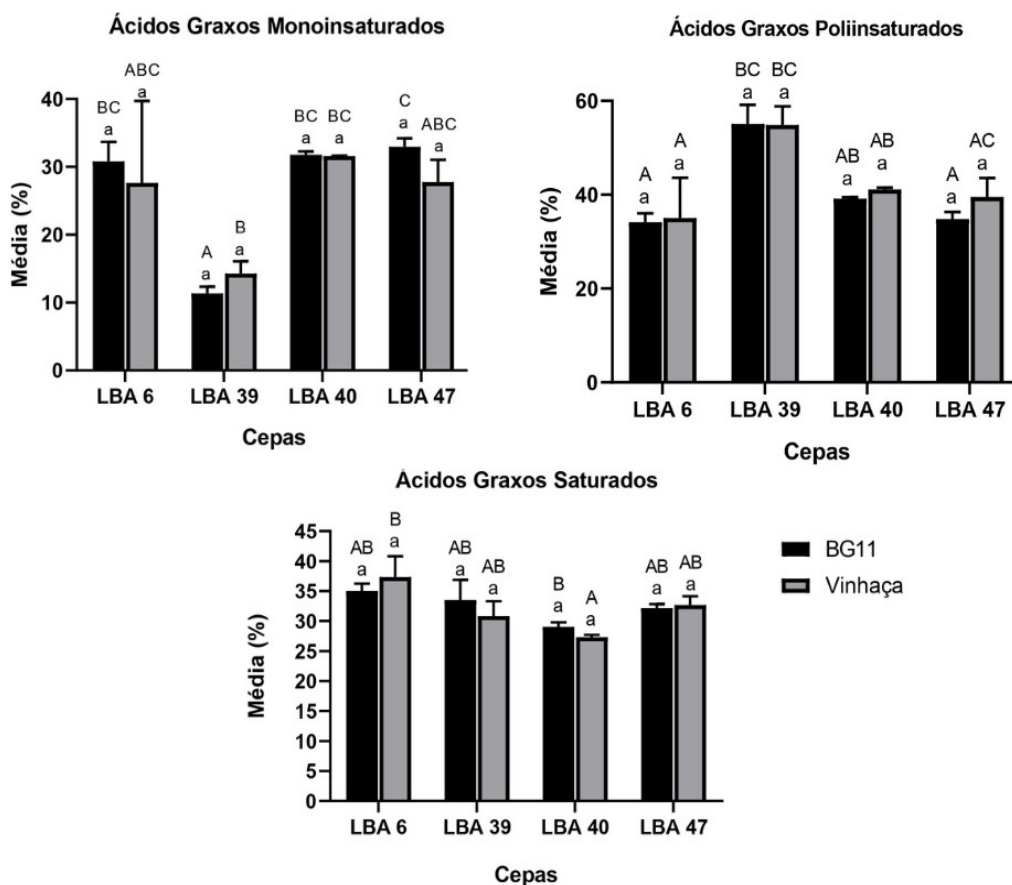


Figura 15. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas, cultivadas em um sistema de 10 mL de cultivo, segundo a presença ou não de insaturações. Os valores estão representados pela média e as barras de erro o erro padrão ($n = 4$), em relação ao total de cada FAME identificado. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

6.2.3. Análise da produção de pigmentos

Nas 4 cepas analisadas, foi observada diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas entre o perfil de pigmentos da biomassa obtida do cultivo da LBA 40 em BG11 e do realizado em vinhaça, tanto para clorofila *a* e *b* quanto para carotenoides, mas apesar dessa redução não houve alteração significativa nas razões de clorofila *a*/clorofila *b* (Clor-*a*/Clor-*b*) e de carotenoides/clorofila (Carot/Clor) (Tabela 10). Já entre as cepas, diferente do observado na triagem em vinhaça, houve algumas diferenças significativas nos níveis de pigmentos observados.

Tabela 10. Teor de pigmentos extraídos das 4 cepas de microalgas cultivadas em 10 mL de BG11 e vinhaça. Os valores são expressos pela média $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomassa). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas, pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey

	LBA 6		LBA 39		LBA 40		LBA 47	
	BG11	Vinhaça	BG11	Vinhaça	BG11	Vinhaça	BG11	Vinhaça
Clorofila <i>a</i>	4,2 $\pm$ 1,42 AC	7,3 $\pm$ 4,46 ABC	13,45 $\pm$ 6,61 B	10,44 $\pm$ 2,3 A	6,67 $\pm$ 0,5 A	1,65 $\pm$ 0,92 C	4,3 $\pm$ 1,34 AC	5,03 $\pm$ 1,9 AC
Clorofila <i>b</i>	1,24 $\pm$ 0,36 A	1,94 $\pm$ 1,18 AB	4,59 $\pm$ 1,95 B	3,75 $\pm$ 0,76 C	2,51 $\pm$ 0,52 AC	0,62 $\pm$ 0,28 A	1,54 $\pm$ 0,64 A	1,53 $\pm$ 0,29 A
Carotenoides	1,49 $\pm$ 0,35 AB	2,1 $\pm$ 0,62 AB	2,84 $\pm$ 1,34 A	2,33 $\pm$ 0,35 AB	2,53 $\pm$ 0,08 AB	0,67 $\pm$ 0,43 B	1,2 $\pm$ 0,32 B	1,26 $\pm$ 0,37 AB
Clor- <i>a</i> /Clor- <i>b</i>	3,38 $\pm$ 0,37	3,75 $\pm$ 0,01	2,89 $\pm$ 0,41	2,78 $\pm$ 0,15	2,71 $\pm$ 0,35	2,6 $\pm$ 0,64	2,93 $\pm$ 0,54	3,19 $\pm$ 0,63
Carot/Clor	0,28 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,04	0,2 $\pm$ 0,04

6.3. Análise do cultivo em maior escala de microalgas em vinhaça

6.3.1. Curva de crescimento e produção de biomassa

Diferente do que foi descrito nos dois cultivos anteriores, nessa etapa da pesquisa foi possível observar que, após os 21 dias de cultivo, todas as 4 cepas selecionadas apresentaram um melhor crescimento no meio BG11 do que no tratamento utilizando vinhaça, embora todas ainda tenham apresentado crescimento nesse resíduo (Figura 16). Similar ao resultado observado nas curvas de contagem de células, as taxas específicas de crescimento de todas as cepas foram maiores também no cultivo realizado em BG11 (Tabela 11), apresentando os valores mais altos entre os 3 tipos de cultivos realizados.

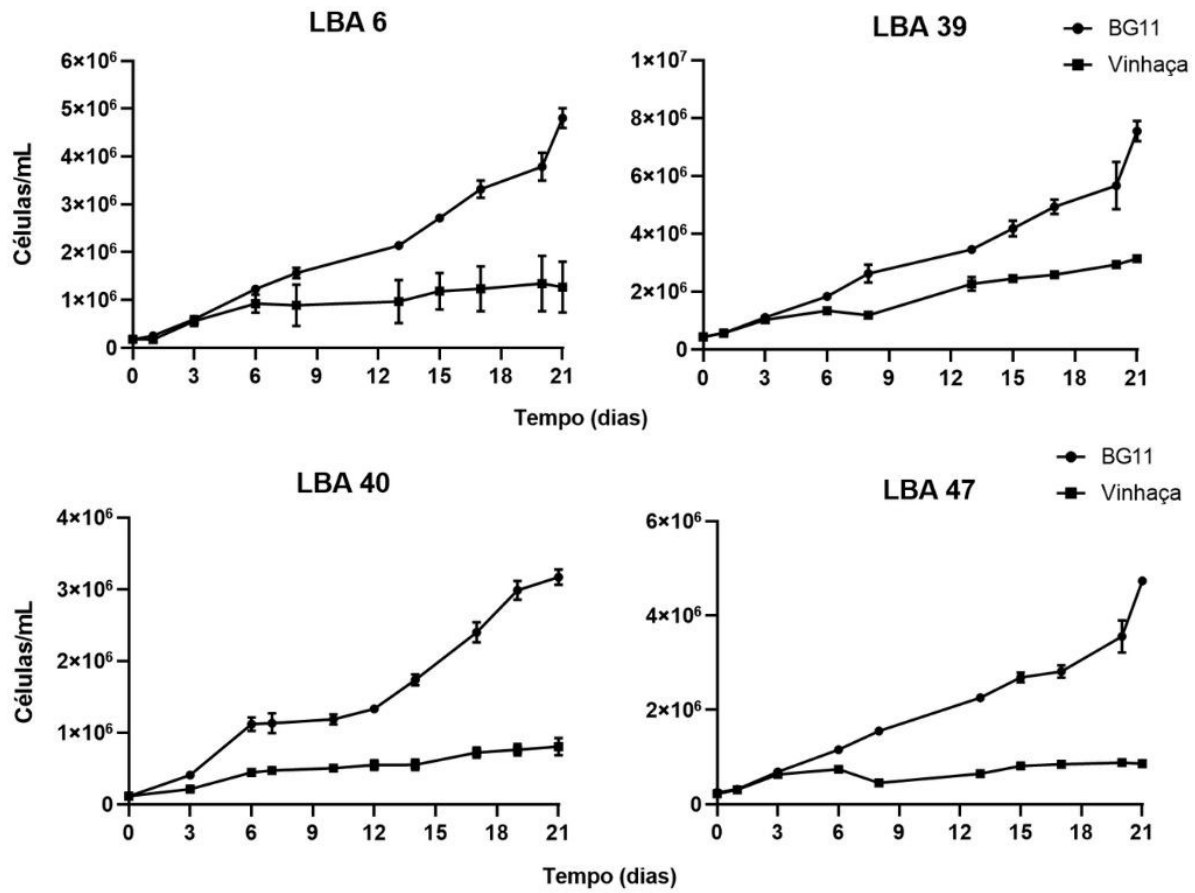


Figura 16. Curva de crescimento, baseada no número de células, de 4 cepas de microalgas (LBA 6, LBA 39, LBA 40, LBA 47) cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11, por 21 dias. Os valores estão representados pela média $\pm$ erro padrão (n=4).

Tabela 11. Taxa de crescimento das cepas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11. Não foi observada diferença significativa entre as 4 cepas. Entre os tipos de meio de cultivo foi observada diferença, pelo teste t (5% de probabilidade).

	LBA 6			LBA 39			LBA 40			LBA 47		
	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t
Taxa de crescimento específica (d ⁻¹)	0,15	0,094	p = 0,01	0,13	0,094	p = 6,3 ⁻⁵	0,15	0,093	p = 0,001	0,13	0,063	p = 9,6 ⁻⁶

Porém em relação a produtividade da biomassa gerada, ao analisar o peso do material liofilizado observou-se que todos os cultivos em vinhaça apresentaram um rendimento maior, alcançando em algumas cepas até mais que o dobro quando comparado com os cultivos em BG11 (Figura 17).

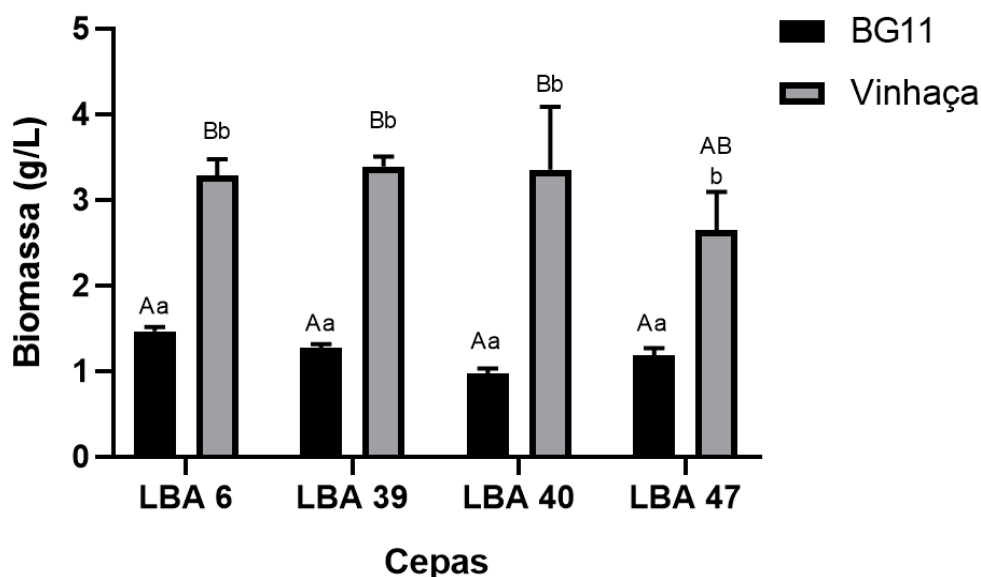


Figura 17. Comparação do rendimento da biomassa seca de 4 microalgas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11. Os valores estão representados pela média e as barras de erro pelo erro padrão (n=4). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

Como observado nas curvas de crescimento, a quantidade de células/mL no dia final do crescimento foi muito maior com o meio sintético e como a biomassa gerada no cultivo em vinhaça foi coletada com uma quantidade significativa de resíduo, mesmo aplicando duas lavagens durante o processo, é possível supor que isso tenha exercido uma interferência na quantificação do rendimento. Para ter um resultado mais próximo do real, 40 mL da mesma vinhaça utilizada no experimento foi centrifugada também sob as mesmas condições, liofilizada e pesada, e uma proporção foi feita para estimar a quantidade de resíduo presente na biomassa seca do crescimento comparativo. O resultado após esse refinamento pode ser observado na Figura 18 (todas as análises bioquímicas da biomassa dessas microalgas apresentadas posteriormente também tiveram seus resultados corrigidos para essa proporção).

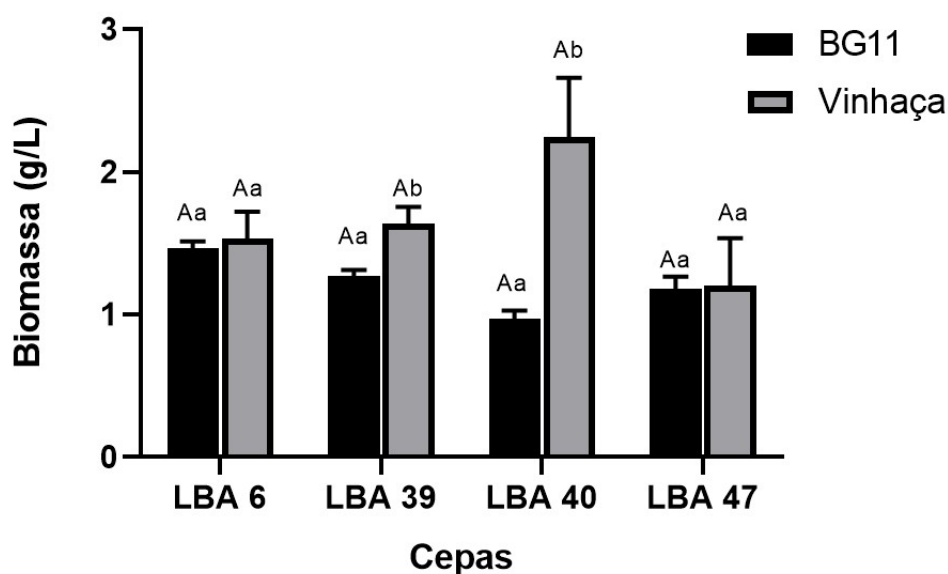


Figura 18. Comparação do rendimento da biomassa seca de 4 microalgas cultivadas em 1 L de vinhaça e BG11, após correção dos valores relativos aos cultivos em vinhaça. Os valores estão representados pela média e as barras de erro pelo erro padrão ($n=4$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

Após essa correção ser feita, foi possível observar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o rendimento de biomassa da LBA 6 e da LBA 47. No caso da LBA 39 e da LBA 40, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), porém com o cultivo em vinhaça apresentando um maior peso em relação ao volume final. A fim de avaliar mais profundamente esse alto rendimento da biomassa cultivada em vinhaça, principalmente quando comparada com o crescimento apresentado na curva de crescimento do meio BG11, foi realizada a análise do diâmetro celular das cepas no primeiro e no último dia de cultivo. Esse procedimento foi feito com as fotos tiradas nos referidos dias do experimento para a contagem de célula (Figura 19) e com auxílio do software ImageJ que possibilitou medir a área das células de cada amostra.

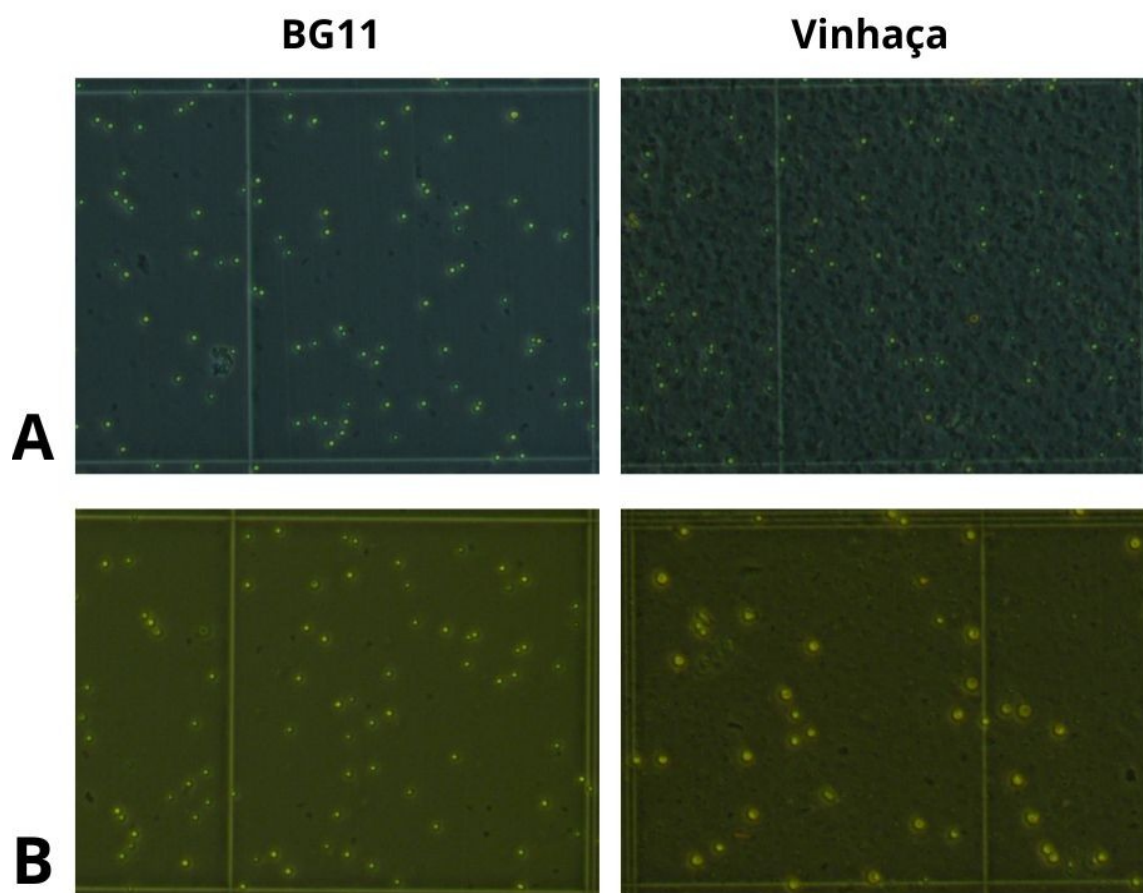


Figura 19. Comparação do tamanho celular da LBA 39 cultivada em 1 L de meio (BG11 e vinhaça), no dia inicial (A) e final (B) do cultivo. Todas as fotos foram tiradas sob a mesma magnificação (10X) no microscópio óptico e tiveram o mesmo zoom aplicado para apresentação nessa dissertação.

Enquanto no dia inicial do cultivo nenhuma das cepas apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre o diâmetro celular nos dois tipos de cultivos, no dia final do experimento, para todas as quatro espécies, as células no cultivo com vinhaça apresentaram maior diâmetro (Figura 20). Em todos os casos, as células cultivadas no meio sintético não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado o início e o fim do crescimento, enquanto as células crescidas em vinhaça sim.

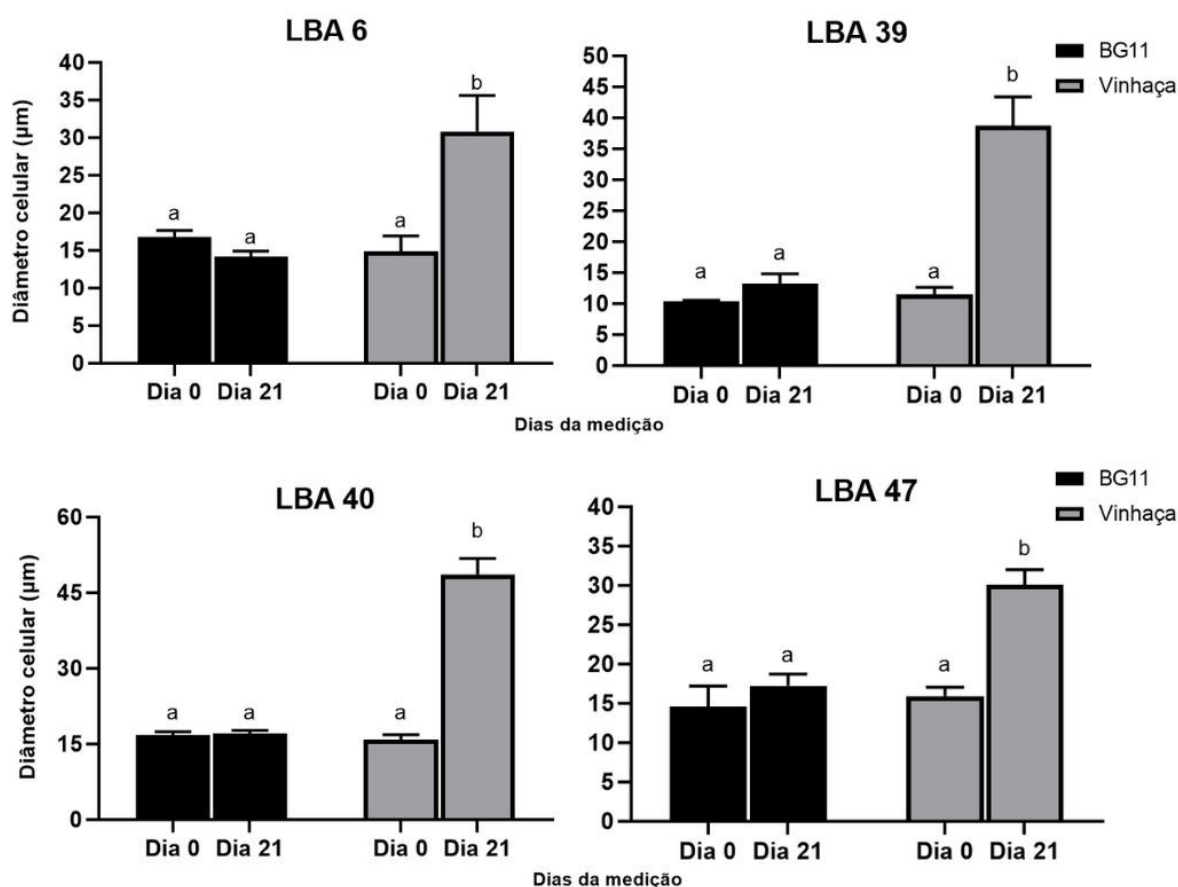


Figura 20. Variação do diâmetro celular de 4 cepas de microalgas cultivadas em 1L de vinhaça e BG11 (controle). A comparação foi feita com registros do dia inicial e final do experimento. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre o dia inicial e final do experimento para o mesmo meio de cultivo (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

Assumindo que as células são esferas, é possível ainda estimar o efeito que o cultivo em vinhaça teve sob o volume celular, com o dia inicial tendo valores médios de $2005,7 \mu\text{m}^3$ (LBA 6), $858 \mu\text{m}^3$ (LBA 39), $2118,7 \mu\text{m}^3$ (LBA 40) e $2169 \mu\text{m}^3$ (LBA 47); enquanto o dia final foi de $18705,1 \mu\text{m}^3$ (LBA 6), $34366,7 \mu\text{m}^3$ (LBA 39), $61629,4 \mu\text{m}^3$ (LBA 40) e $14526,3 \mu\text{m}^3$ (LBA 47). Dessa forma, observa-se uma alta significativa, principalmente na LBA 39 e 40, que chega a apresentar um volume 40 e 30x maior, respectivamente, entre o dia inicial e final do cultivo. Portanto, esse aumento celular nos cultivos em vinhaça pode ser uma das respostas para o rendimento da biomassa seca ser maior com esse meio, apesar da quantidade de células não.

6.3.2. Análise do perfil de ácidos graxos

Após a realização da análise cromatográfica dos cultivos com 1 L de meio, foi possível perceber mais variações significativas quando comparado os dois crescimentos realizados. Na produtividade de massa seca de ácidos graxos, para todas as 4 cepas houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), com as microalgas cultivadas em BG11 apresentando uma maior % em relação àquelas cultivadas em vinhaça, com um aumento triplicado do rendimento (Figura 21) em todos os casos.

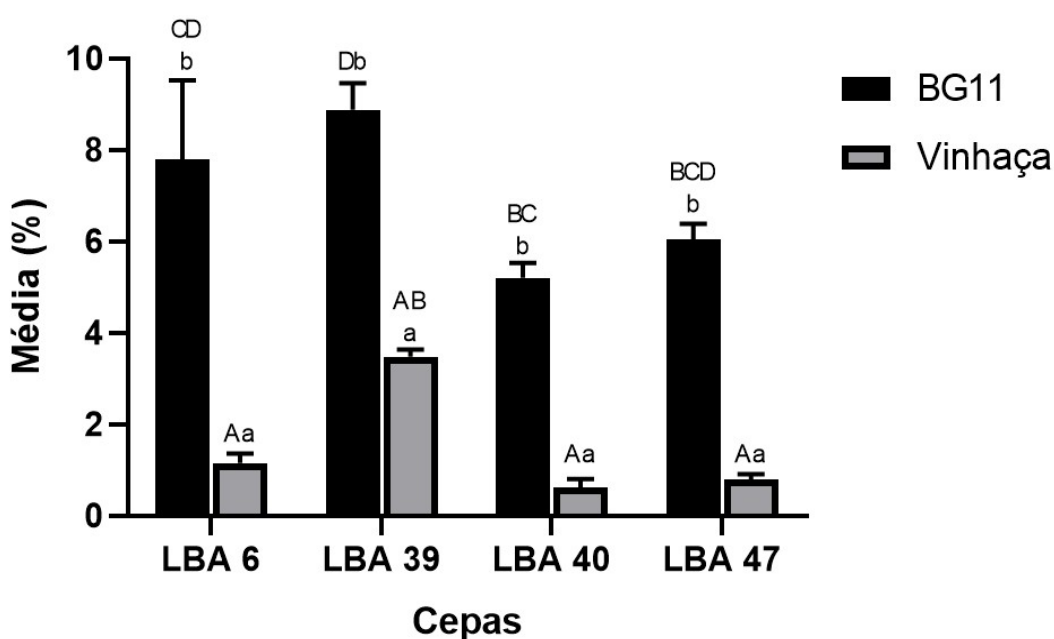


Figura 21. Rendimento médio da % de massa seca de ácidos graxos obtida das 10 cepas de microalgas cultivadas em BG11 e vinhaça, em um sistema de 1 L de cultivo. Os valores estão representados pela média e erro padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

Nas quatro cepas analisadas, o teor de ácidos graxos insaturados foi maior que o de saturados em ambos os cultivos, porém as microalgas cultivadas em BG11 apresentaram um teor de ácidos graxos insaturados relativamente maior do que aquelas cultivadas em vinhaça (Figura 22). Em relação ao perfil de FAMES encontrado, em ambos os cultivos, a maioria dos ácidos graxos apresentaram cadeias de 16 (16:0, 16:1, 16:2, 16:3, 16:4) e 18 carbonos (18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 18:4), característica similar aos resultados apresentados anteriormente, sendo o ácido palmítico (C16:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linolênico (C18:3) os de maior

prevalência novamente, mas com uma adição, pois neste experimento o ácido linoleico (C18:2) também obteve uma alta proporção, principalmente nos cultivos em vinhaça (Tabela 12). Todos os ácidos graxos relatados no cultivo em BG11 também foram identificados nas microalgas cultivadas em vinhaça e vice-versa, entretanto nas cepas LBA 6, LBA 40 e LBA 47 alguns ácidos graxos insaturados, apesar de presentes, ficaram abaixo do limite de detecção.

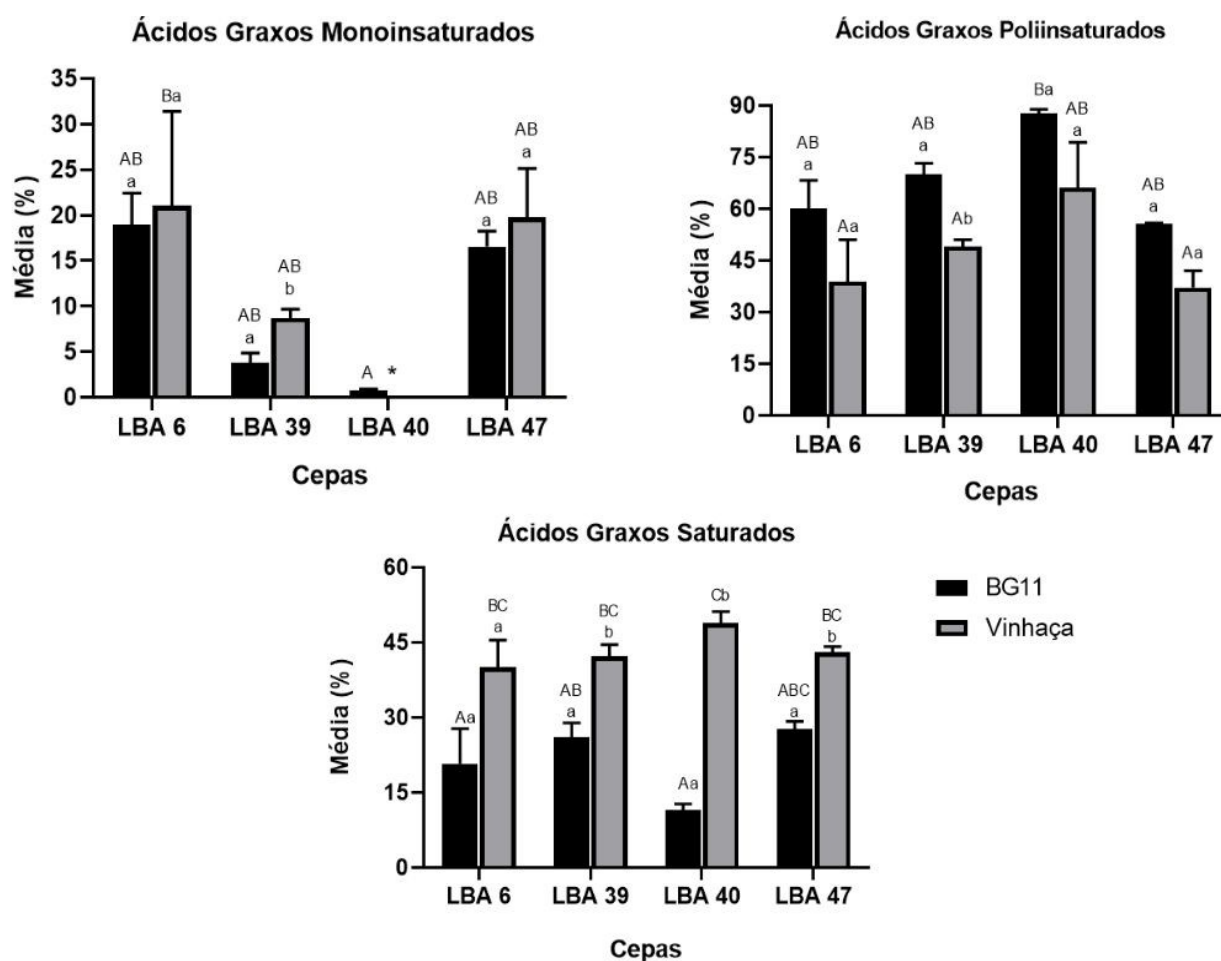


Figura 22. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas cultivadas em 1 L de meio, segundo a presença ou não de insaturações. Os valores estão representados pela média e as barras de erro pelo erro padrão (n = 4), em relação ao total de cada FAME identificado. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade). * indica que houve a presença desse tipo de ácido graxo, mas ficou abaixo do limite de quantificação para a cepa.

Tabela 12. Perfil de ácidos graxos de 4 cepas de microalgas (% do total de FAMES), cultivadas em vinhaça e BG11 em um sistema de 1 L de cultivo. Os valores estão representados pela média $\pm$ desvio padrão. As letras a.q se referem aos FAMES que ficaram abaixo do limite de quantificação e n.s aqueles sem diferença significativa em relação ao teste t (5% de probabilidade).

Ácidos Graxos	LBA 6			LBA 39			LBA 40			LBA 47		
	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t
Ácidos Graxos Saturados												
Ácido Palmítico (C16:0)	20 $\pm$ 13,6	37,7 $\pm$ 9,3	n.s	25,6 $\pm$ 5,1	39,5 $\pm$ 3,9	p = 0,006	11,5 $\pm$ 2,3	46,6 $\pm$ 4,4	p = 0,03	27,3 $\pm$ 2,9	42,3 $\pm$ 1,4	p = 0,004
Ácido Esteárico (C18:0)	0,76 $\pm$ 0,8	3,06 $\pm$ 1,8	p = 0,004	0,5 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,9	p = 0,01	a.q	a.q	-	0,4 $\pm$ 0,07	0,97 $\pm$ 1,2	n.s
Ácido Eicosanoico (C20:0)	0,032 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,04	n.s	0,01	0,03 $\pm$ 0,01	n.s	a.q	2,7 $\pm$ 0,8	-	-	-	-
Ácidos Graxos Monoinsaturados												
Ácido Palmitoleico (C16:1)	1,3 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 2,04	n.s	1,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,6	n.s	0,8 $\pm$ 0,2	a.q	-	1,2 $\pm$ 0,3	5,9 $\pm$ 2,3	n.s
Ácido Oleico (C18:1)	18,3 $\pm$ 6,4	23,3 $\pm$ 18,4	n.s	3,9 $\pm$ 1,5	7,5 $\pm$ 2,4	n.s	a.q	a.q	n.s	15,4 $\pm$ 3	13,8 $\pm$ 8,7	n.s
Ácidos Graxos Poliinsaturados												
Ácido 7,10-hexadecadienóico (C16:2)	0,3 $\pm$ 0,4	a.q	-	11,3 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,8	p = 6,8 ⁻⁶	a.q	a.q	-	0,5 $\pm$ 0,1	a.q	-
Ácido 7,10,13-hexadecatrienóico (C16:3)	4,7 $\pm$ 1,4	a.q	-	10,5 $\pm$ 1,4	1,15 $\pm$ 0,2	p = 7,5 ⁻⁴	0,5 $\pm$ 0,15	a.q	-	6,01 $\pm$ 0,9	a.q	-
Ácido 4,7,10,13 – hexadecatetraenóico (C16:4)	12,45 $\pm$ 3,4	a.q	-	-	-	-	24,8 $\pm$ 1	a.q	n.s	9,9 $\pm$ 0,5	a.q	-
Ácido linoleico (C18:2)	9,9 $\pm$ 2,4	32,3 $\pm$ 16,8	n.s	26,25 $\pm$ 2,2	36,2 $\pm$ 4,3	p = 0,01	10,4 $\pm$ 0,5	56,3 $\pm$ 22,1	n.s	10,3 $\pm$ 1,07	30,3 $\pm$ 8,5	p = 0,05
Ácido α -linolênico (C18:3 - ω -3)	27,56 $\pm$ 7,9	6,6 $\pm$ 4,5	p = 0,006	22,04 $\pm$ 2,6	9,9 $\pm$ 0,5	p = 0,002	49,1 $\pm$ 1,8	9,9 $\pm$ 4,2	p = 0,001	23,5 $\pm$ 2,04	6,9 $\pm$ 1,2	p = 8,4 ⁻⁴
Ácido γ -linolênico (C18:3 - ω -6)	0,4 $\pm$ 0,1	a.q	-	-	-	-	a.q	a.q	-	0,9 $\pm$ 0,3	a.q	-
Ácido estearidônico (C18:4)	4,8 $\pm$ 1,36	a.q	-	-	-	-	2,9 $\pm$ 0,4	a.q	-	4,6 $\pm$ 0,4	a.q	-
% ácidos saturados	20,8 $\pm$ 13,9	37,3 $\pm$ 6,05	n.s	26,1 $\pm$ 5,5	42,2 $\pm$ 4,7	p = 0,004	11,5 $\pm$ 2,3	48,9 $\pm$ 3,9	p = 0,02	27,7 $\pm$ 2,9	43,07 $\pm$ 2,2	p = 0,002
% ácidos insaturados	79,2 $\pm$ 23,03	62,6 $\pm$ 35,8	n.s	73,8 $\pm$ 8,5	57,8 $\pm$ 5,7	n.s	88,4 $\pm$ 2,6	66,2 $\pm$ 26,3	n.s	72,3 $\pm$ 3,8	56,9 $\pm$ 20,4	n.s

6.3.3. Análise da produção de pigmentos

Nas 4 cepas analisadas, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides quando comparados os dois tipos de meio utilizados para o crescimento (Tabela 13). LBA 6, LBA 40 e LBA 47 apresentaram um maior rendimento significativo de todos os 3 pigmentos analisados no cultivo em BG11 (exceto que LBA 40 não apresentou diferença estatística no teor de clorofila *b*), enquanto na LBA 39 o cultivo em vinhaça resultou no maior rendimento dos teores, porém com diferença significativa apenas na análise para clorofila *b*. Na razão clorofila *a*/clorofila *b*, apenas a LBA 40 não apresentou diferença significativa entre os cultivos, enquanto analisando carotenoides/clorofila apenas a LBA 39 apresentou diferença estatística significativa. Analisando os níveis de pigmento entre as cepas, apenas a LBA 40 apresentou diferença significativa em relação às outras três analisadas.

Tabela 13. Teor de pigmentos extraídos das 4 cepas de microalgas crescidas em BG11 e vinhaça. Os valores são expressos pela média $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de biomassa) e n.s sendo nenhuma diferença significativa em relação ao teste t.

	LBA 6			LBA 39			LBA 40			LBA 47		
	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t	BG11	Vinhaça	Teste t
Clorofila <i>a</i>	22,3 $\pm$ 1,5	3,7 $\pm$ 0,5	p = 2,6 ⁻⁶	20,9 $\pm$ 2,8	26,1 $\pm$ 4,6	n.s	18,5 $\pm$ 1,5	1,5 $\pm$ 0,2	p = 1,7 ⁻⁴	18,7 $\pm$ 3,5	4,5 $\pm$ 0,9	p = 2,5 ⁻³
Clorofila <i>b</i>	15,8 $\pm$ 3,6	5,05 $\pm$ 1	p = 4,7 ⁻³	15,3 $\pm$ 2,6	28,2 $\pm$ 6,5	p = 0,02	8,5 $\pm$ 5	1,1 $\pm$ 0,2	n.s	16,5 $\pm$ 4,01	6,4 $\pm$ 1,5	p = 9,9 ⁻³
Carotenoides	4,5 $\pm$ 0,09	0,8 $\pm$ 0,05	p = 1,1 ⁻⁵	3,5 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,7	n.s	4,4 $\pm$ 0,5	0,46 $\pm$ 0,05	p = 4,9 ⁻⁴	3,6 $\pm$ 0,6	0,9 $\pm$ 0,1	p = 1,8 ⁻³
Clor-a/Clor-b	1,5 $\pm$ 0,32	0,7 $\pm$ 0,05	p = 0,02	1,4 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	p = 0,04	2,6 $\pm$ 1	1,3 $\pm$ 0,2	n.s	1,16 $\pm$ 0,17	0,7 $\pm$ 0,03	p = 0,01
Carot/Clor	0,1 $\pm$ 0,02	0,1 $\pm$ 0,01	n.s	0,1 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	p = 0,003	0,2 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,02	n.s	0,1 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,006	n.s

6.3.4. Análise da produção e quantificação de duas auxinas (AIA e AIB)

Para garantir uma boa eficiência do método utilizado para testar estes fitohormônios, foram feitas curvas de calibração para as duas auxinas analisadas (AIA e AIB), comparando a resposta de cada pico com diferentes concentrações dos padrões destes compostos (5 ppm-100 ppm). Observando a Figura 23 é possível observar que foram alcançadas boas correlações lineares para ambos os fitohormônios, com coeficientes de correlação de R^2 variando de 0,994 a 0,996.

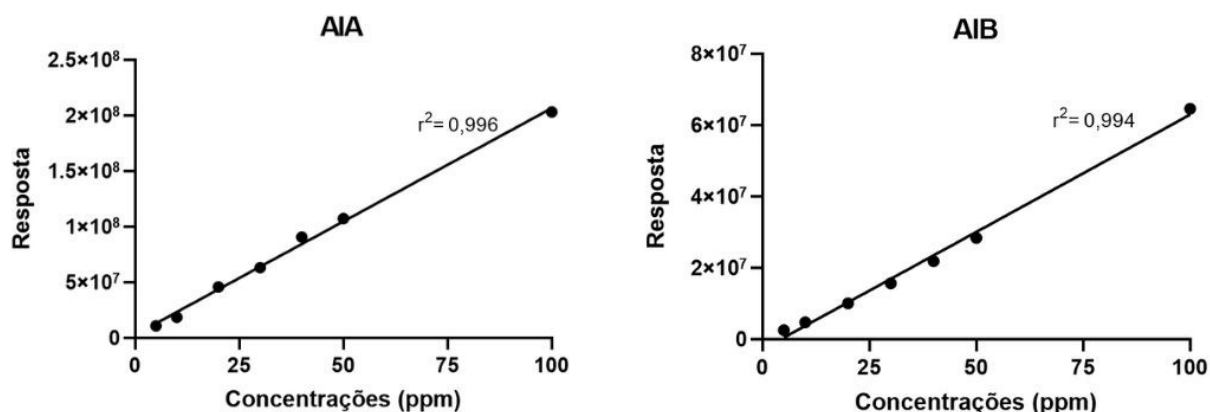


Figura 23. Curvas de calibração com diferentes concentrações dos padrões de ácido indol-3-acético (AIA) e ácido indol-3-butírico (AIB)

Em relação ao teor das duas auxinas analisadas, para todas as 4 cepas testadas, foi possível detectar a presença tanto de ácido indol-3-acético (AIA) quanto de ácido indol-3-butírico (AIB) (Figura 24- para estabilizar a variação dentro dos grupos, os resultados estão apresentados na forma de log de base 10). No caso dos níveis de AIA, houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) em todas as cepas cultivadas em vinhaça quando comparadas com o cultivo em BG11. Para AIB, a LBA 39 apresentou uma queda nos níveis deste fitohormônio quando comparadas as amostras em vinhaça e BG11, enquanto nas outras três cepas todas as amostras cultivadas neste resíduo apresentaram aumento em comparação com o meio sintético, porém com diferença significativa apenas para a LBA 6. Houve também pequenas diferenças estatísticas dos níveis destes dois fitohormônios entre as 4 cepas analisadas.

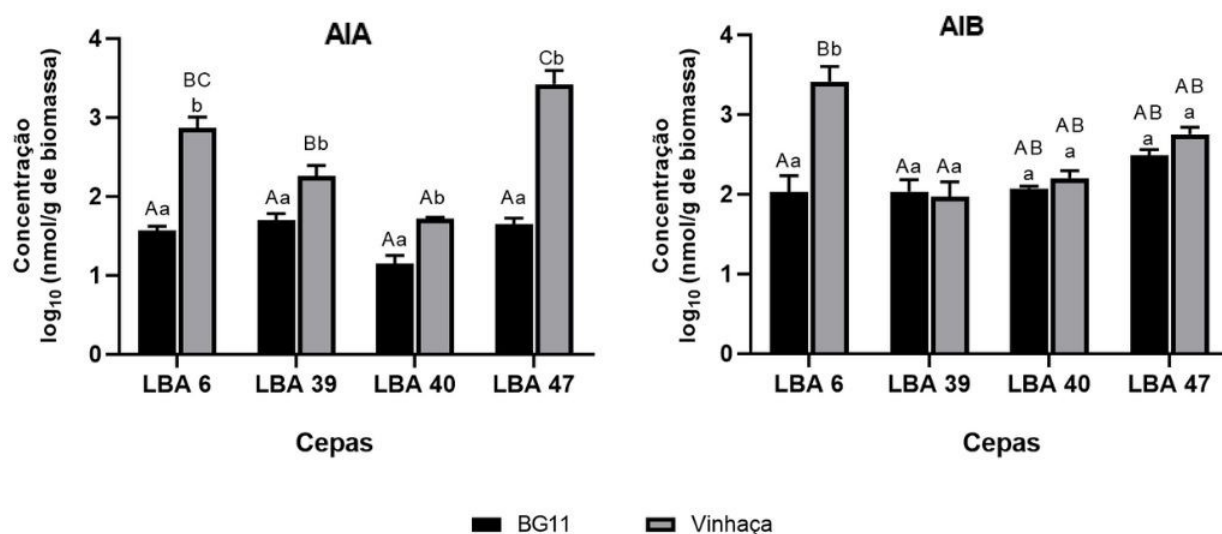


Figura 24. Teor de duas auxinas (AIA e AIB) extraídas das 4 cepas de microalgas cultivadas em 1L de BG11 e vinhaça. Os valores são expressos pela média e as barras de erro pelo erro padrão (log₁₀ (nmol/g de biomassa)). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as médias de diferentes cepas (pela ANOVA com nível de 5% de probabilidade e médias comparadas pelo teste de Tukey) enquanto letras minúsculas indicam diferença significativa entre diferentes meios de cultura (pelo teste t com nível de 5% de probabilidade).

6.4. Comparação dos cultivos realizados em 10 mL e 1 L de BG11 e vinhaça

6.4.1. Análise da curva de crescimento e rendimento da biomassa seca

Enquanto no cultivo com 10 mL, LBA 6 e LBA 40 apresentaram no dia final da análise uma maior quantidade de células no cultivo em BG11 e a LBA 39 e LBA 47 no cultivo em vinhaça, no experimento realizado com 1 L de meio, foi possível observar que o cultivo com BG11 resultou em um melhor crescimento para todas as 4 microalgas analisadas (Figura 12 e Figura 16). Inclusive o cultivo em vinhaça neste último experimento resultou em um baixo crescimento celular e enquanto as cepas cultivadas no controle demonstraram ainda estar em fase de crescimento, aquelas inoculadas em vinhaça aparentaram estar no início da fase estacionária. Em relação a biomassa seca produzida, quando comparamos as culturas no cultivo com 1 L de meio com aquelas cultivadas em 10 mL, percebe-se que as 4 microalgas cultivadas na maior quantidade de vinhaça tiveram uma queda significativa no seu rendimento, algumas reduzindo quase pela metade o valor obtido, enquanto 2 das 4 cepas de BG11 não tiveram diferença significativa entre os dois rendimentos e as 2 que tiveram foi reduções com valor menor do que observado nos cultivos em vinhaça (Figura 25).

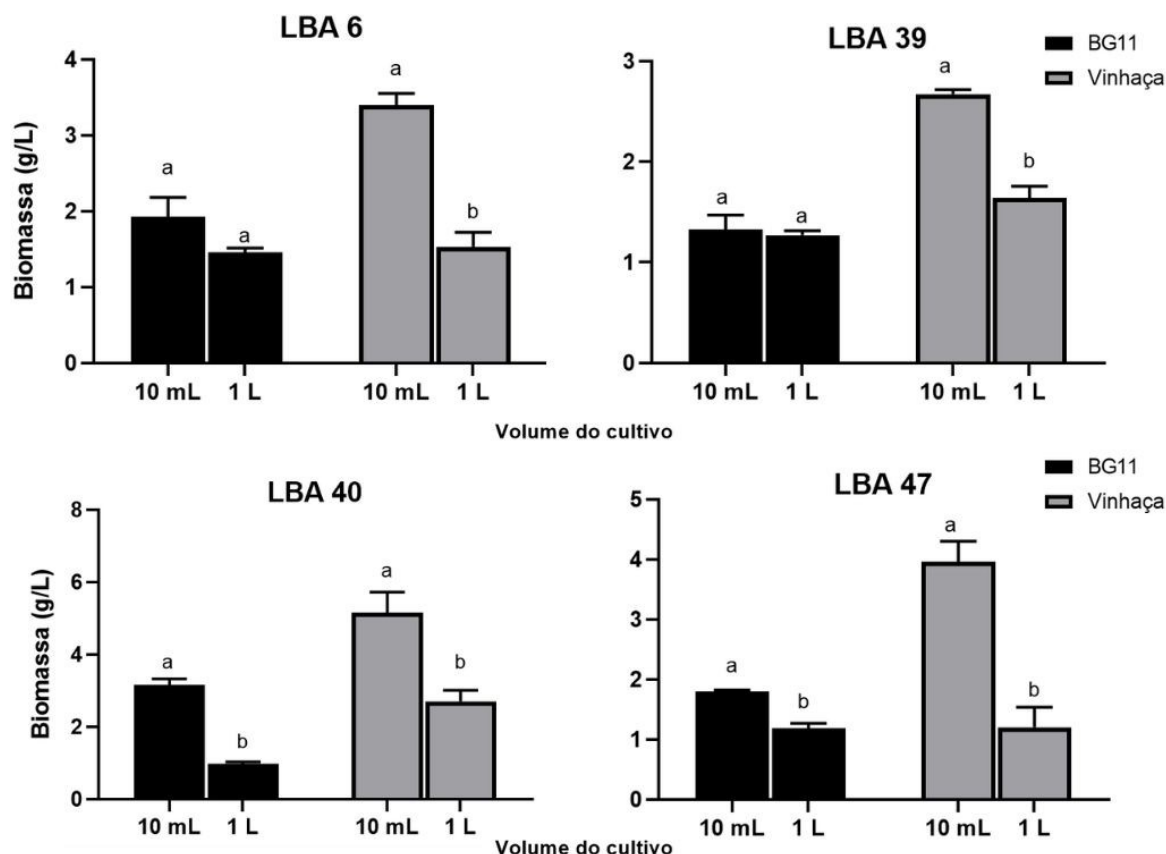


Figura 25. Análise do rendimento de biomassa seca (g/L) entre os dois crescimentos comparativos realizados (10 mL de cultivo e 1 L de cultivo). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre os sistemas de cultivo pelo teste t com nível de 5% de probabilidade.

6.4.2. Análise do perfil de ácidos graxos

Quando comparado a análise de ácidos graxos das 4 cepas selecionadas (LBA 6, LBA 39, LBA 40 e LBA 47), no cultivo com 10 mL e 1L, é possível observar diferenças significativas tanto no rendimento da sua massa seca, quanto no perfil encontrado. Das 4 espécies analisadas, não houve diferença significativa entre o rendimento da massa seca dos dois cultivos realizados em BG11, entretanto quando analisamos o crescimento em vinhaça, todas as cepas tiveram diferença significativa na % FAMES de massa seca gerada, com todas do cultivo de 1 L obtendo um valor inferior ao de 10 mL (Figura 26). Já em relação a proporção de ácidos graxos saturados e insaturados, é possível observar algumas diferenças significativa entre os cultivos, não existindo um padrão entre as cepas analisadas (Tabela 14).

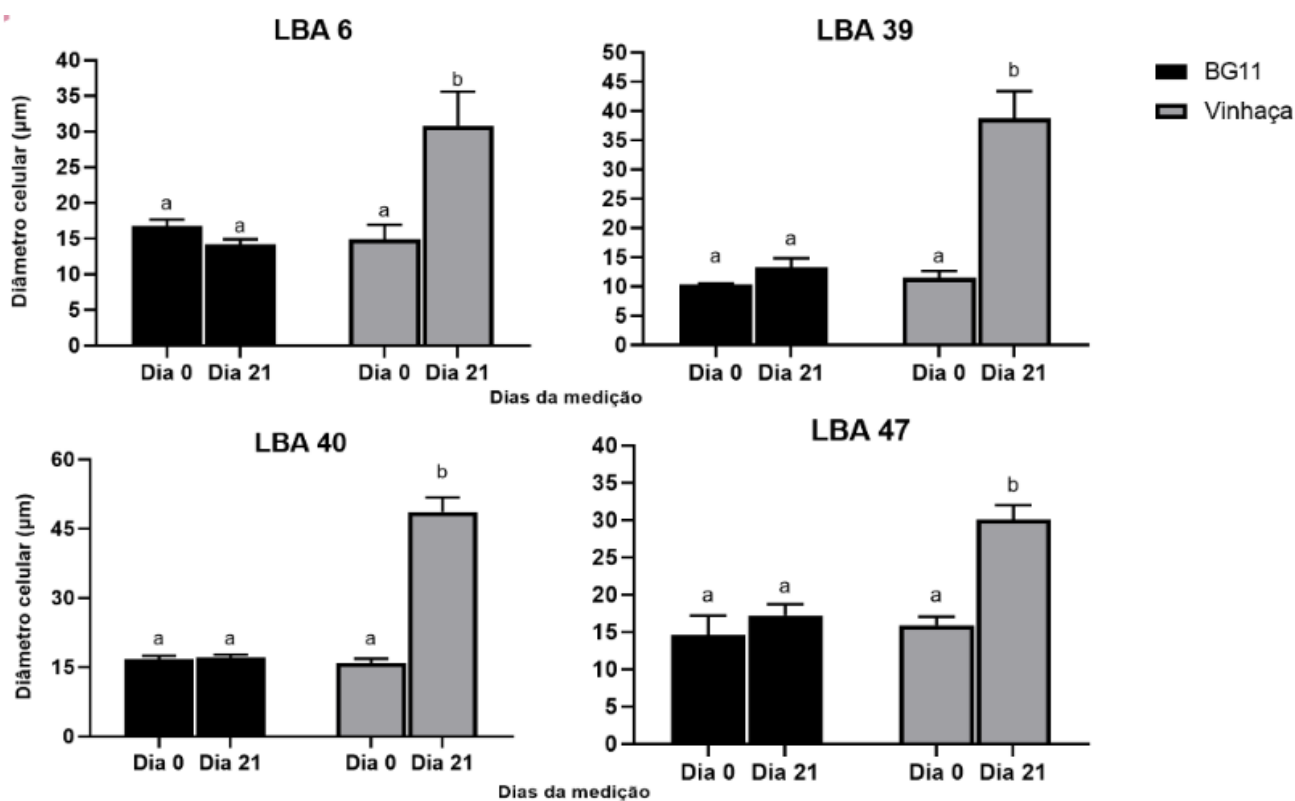


Figura 26. Comparação do rendimento da massa seca de ácidos graxos das 4 cepas de microalgas cultivadas em diferentes volumes (10 mL e 1 L). Os valores estão representados pela média e as barras de erro pelo erro padrão ($n = 4$), com as letras minúsculas indicando diferença significativa entre os sistemas de cultivo pelo teste t com nível de 5% de probabilidade.

Tabela 14. Comparação da % de ácidos graxos saturados e insaturados das 4 cepas de microalgas cultivadas em diferentes volumes (10 mL e 1 L). Os valores estão representados pela média $\pm$ desvio padrão, com n.s sendo nenhuma diferença significativa pelo teste t com nível de 5% de probabilidade.

	BG11						Vinhaça					
	Saturados			Insaturados			Saturados			Insaturados		
	10 mL	1 L	Teste t	10 mL	1 L	Teste t	10 mL	1 L	Teste t	10 mL	1 L	Teste t
LBA 6	35 $\pm$ 2,4	20 $\pm$ 4,6	n.s	64,9 $\pm$ 4,8	79,2 $\pm$ 23	n.s	37,2 $\pm$ 6	40 $\pm$ 9,4	n.s	62,6 $\pm$ 16,7	59,9 $\pm$ 20,4	n.s
LBA 39	33,5 $\pm$ 6,6	26,1 $\pm$ 5,5	n.s	66,4 $\pm$ 10,1	73,8 $\pm$ 8,5	n.s	30,8 $\pm$ 4,9	42,2 $\pm$ 4,7	p = 0,01	69,1 $\pm$ 11,5	57,7 $\pm$ 5,7	n.s
LBA 40	29 $\pm$ 1,5	11,5 $\pm$ 2,3	p = 4,2 ⁻⁵	70,9 $\pm$ 1,5	88,4 $\pm$ 2,6	p = 2,2 ⁻⁵	27,3 $\pm$ 0,7	48,8 $\pm$ 3,9	n.s	72,7 $\pm$ 0,8	66,2 $\pm$ 26,2	n.s
LBA 47	32,2 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 3	n.s	67,8 $\pm$ 2,7	72,2 $\pm$ 3,7	p = 3 ⁻³	32,7 $\pm$ 2,8	43 $\pm$ 2,2	p = 2,5 ⁻³	67,3 $\pm$ 11,2	56,9 $\pm$ 13,2	n.s

6.4.3. Análise de pigmentos

Analisando os dois experimentos de crescimento comparativo realizados (com 10 mL de cultivo e 1 L de cultivo), observa-se que houve um aumento significativo na quantidade de pigmentos acumulados pelas 4 cepas de microalgas quando aumentado o volume de meio utilizado (Figuras 27, 28). No cultivo com BG11, esse aumento pode ser visto em todas as cepas e para todos os três tipos de pigmentos analisados (clorofila *a*, *b* e carotenoides), enquanto nas amostras inoculadas em vinhaça apenas a LBA 39 apresentou este mesmo aumento nas 3 análises. Apesar da LBA 6, 40 e 47 demonstrarem uma queda na concentração de clorofila *a* e carotenoides quando cultivadas em 1 L de vinhaça, em todas as três espécies os níveis de clorofila *b* aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$).

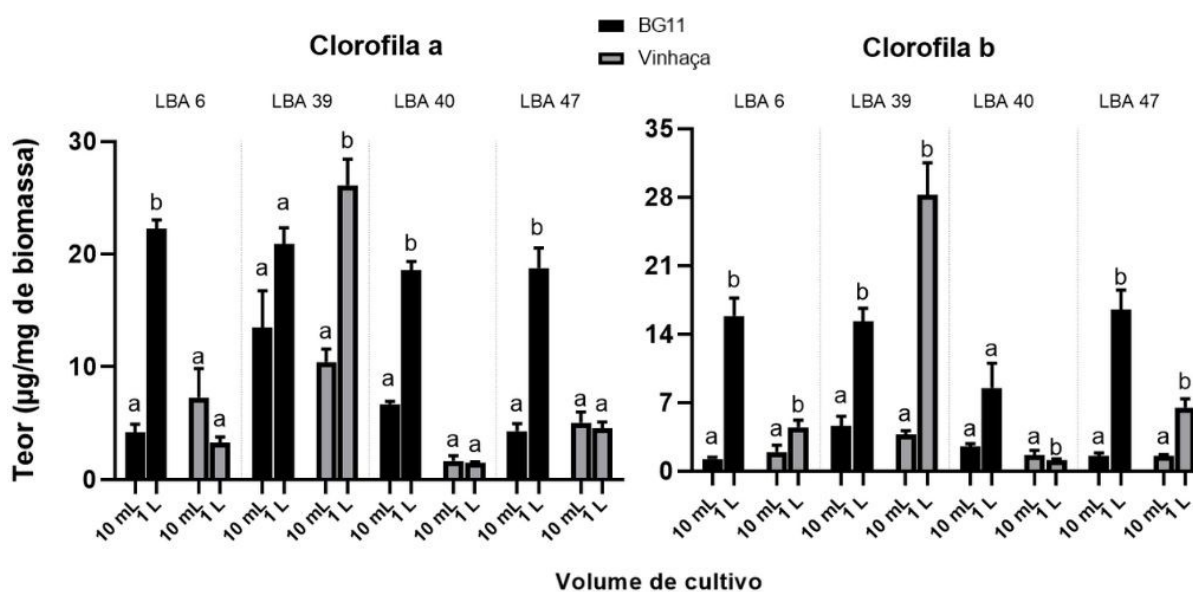


Figura 27. Comparação do teor de clorofila *a* e *b* entre os cultivos comparativos realizados (10 mL e 1 L). Os valores são expressos pela média e as barras de erro pelo erro padrão ($\mu\text{g/mg}$ de biomassa). As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os sistemas de cultivo, de acordo com o teste *t* (5% de probabilidade).

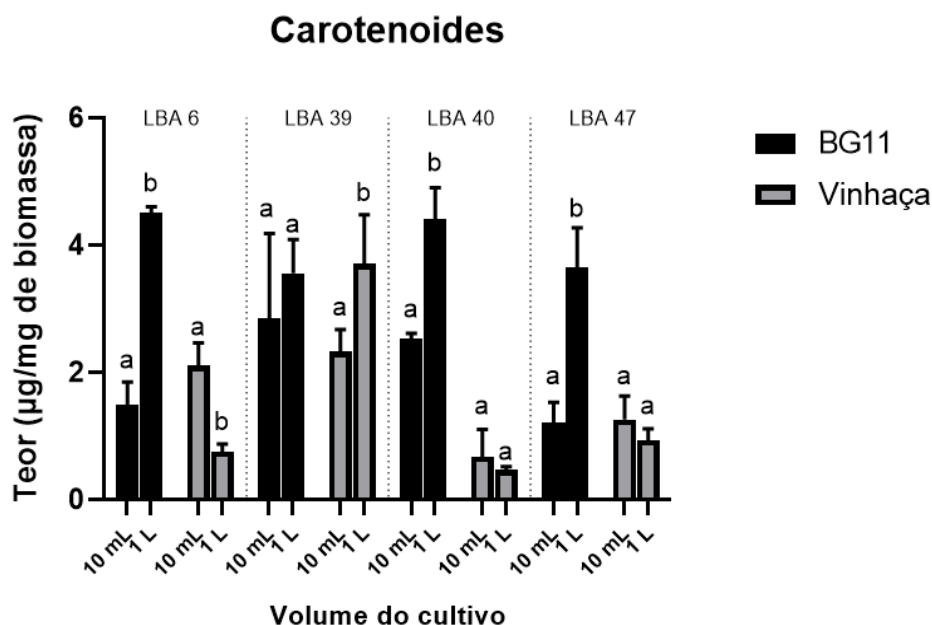


Figura 28. Comparação do teor de carotenoides entre os cultivos comparativos realizados (10 mL e 1 L). Os valores são expressos pela média e as barras de erro pelo erro padrão (µg/mg de biomassa). As letras minúsculas indicam diferença significativa entre os sistemas de cultivo, de acordo com o teste t (5% de probabilidade).

7. Discussão

7.1. Análise do crescimento de 10 espécies microalgas em vinhaça

Analisando alguns estudos já publicados sobre o crescimento de diferentes espécies de microalgas em diversos meios, é possível observar que a curva de crescimento desses organismos geralmente apresenta uma fase de adaptação bem curta, seguida de uma fase exponencial que varia com o tipo de cultivo e o modelo do experimento, mas que usualmente se estende em média entre 5 a 10 dias e às vezes termina com a presença da fase estacionária, embora não seja observada essa última etapa em todos os casos (Rocha et al. (2017); Santana et al. (2017); Ferreira et al. (2021)). Essa resposta pode ser observada também no cultivo de microalgas utilizando vinhaça, havendo trabalhos onde ambas as fases exponencial e estacionária ocorrem e são bem definidas (Trevisan et al., 2020) e também aqueles onde a fase exponencial é predominante em quase todo o período de crescimento (Candido & Lombardi, 2018), similar ao que foi encontrado no experimento realizado nesta presente dissertação. Houve um curto período de adaptação das 10 cepas ao cultivo, mas uma fase estacionária não

foi observada, havendo crescimento até o dia final, embora de forma menos acentuada na última semana de análise. Vale destacar que enquanto a maioria dos estudos realizam um cultivo de 7 a 15 dias, com a fase exponencial durando em média 5 dias, o cultivo deste trabalho foi feito por 29 dias e durante todo o período, exceto na fase de adaptação, a fase exponencial foi ativa.

Outro ponto é que a maioria das curvas de crescimento são feitas através da contagem de células, enquanto neste primeiro momento do trabalho, o crescimento foi mensurado com a leitura da absorbância do cultivo, devido ao maior número de amostras e o tempo prolongado do cultivo. Mesmo assim, é possível perceber com as curvas obtidas que todas as cepas foram capazes de crescer em vinhaça, uma análise já observada para algumas espécies de microalgas em vinhaça. Por exemplo, no trabalho de Falconí et al. (2021), é feita a comparação do crescimento de diferentes espécies de microalgas em meio contendo 50% e 37,5% de vinhaça e águas residuais de biorrefinaria de etanol (com meio sintético como controle), ambas com seu pH inicial (na faixa de 4,3) e também com o pH corrigido para 7. Para as 3 cepas selecionadas (*Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus bajacalifornicus* e *Coelastrella* sp), é possível observar que, em ambos os pH testados, o melhor desempenho de crescimento aconteceu no meio contendo 50% de vinhaça, com a densidade óptica (750 nm) do dia final variando de, aproximadamente, 0,9 a 1,4, valores similares ao crescimento relatado neste estudo.

7.2. Análise bioquímica da biomassa das 10 cepas cultivadas em vinhaça

Analisando de forma geral o perfil lipídico das 10 cepas de microalgas cultivadas em vinhaça, o ácido palmítico (C16:0) e linolênico (C18:3) foram os mais abundantes, resultado semelhante ao que foi encontrado no trabalho de Hernández-García et al. (2019), com a análise do perfil das espécies *Desmodesmus* spp. e *Scenedesmus obliquus* extraídas de um lago alimentado com efluentes resultantes do tratamento de águas residuais, e Cinq-Mars et al. (2018), com um consórcio de algas verdes isolado de um corpo aquático de gerenciamento de águas residuais de uma indústria de laticínios. Em ambos os trabalhos a % do ácido linolênico é similar ao encontrado, diferente do ácido palmítico, já que nos trabalhos citados a % varia em torno de 15 a 25 enquanto nos resultados obtidos nesta dissertação varia de 30 a 40%, mostrando que foi obtido um rendimento maior pelo menos referente a esse composto. Outro ponto diferente é que além de C16:0 e C18:3, o ácido oleico (C18:1) também foi outro ácido

graxo com uma grande abundância relativa em algumas cepas. Também houve grande semelhança entre o perfil de FAMES de acordo com a presença ou não de insaturações encontrado neste trabalho e no de Hernández-García et al. (2019).

Em boa parte dos estudos publicados nos últimos dez anos sobre o perfil lipídico das microalgas é possível observar que ácidos graxos com cadeias de 16 e 18 carbonos saturados estão quase sempre presentes, assim como aqueles com essas mesmas cadeias e com uma ou duas insaturações. O ácido linolênico (C18:3) também é encontrado em boa parte dos trabalhos e na análise feita nesta dissertação foram encontradas as duas formas que esse composto pode apresentar: o ácido alfa-linolênico (Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienóico), que é um ácido graxo essencial do grupo ômega 3, e o ácido gama-linolênico (Ácido (Z,Z,Z)-6,9,12-octadecatrienóico), isômero do ácido descrito anteriormente e também considerado um composto essencial, mas pertencente ao grupo ômega 6. Apesar das microalgas serem conhecidas como uma fonte de ácido eicosapentaenóico (C20:5) e ácido docosahexaenóico (C22:6) (Yen et al., 2013), ambos não foram registrados em nenhuma das 10 cepas analisadas.

Entretanto, ácidos graxos de 16 carbonos com 3 e 4 insaturações, assim como de 18 com 4 insaturações não são tão comumente descritos, principalmente por análises utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Esse foi inclusive um desafio encontrado no presente trabalho, visto que foram identificados não apenas ácidos graxos de 16 e 18 carbonos com três insaturações, mas também com quatro, que não são descritos na mistura certificada de FAMES utilizadas na elaboração da curva de calibração. Por isso, para a análise e quantificação dos ácidos graxos C16:3, C16:4 e C18:4, compostos que além de não constarem nessa mistura também não foram encontrados para comercialização, foi preciso utilizar o fator de resposta obtida para outros FAMES quantificados utilizando os mesmos íons para quantificar estes compostos. No trabalho de Dodds et al. (2005), é possível observar que o perfil dos 3 íons de quantificação mais abundantes dos ácidos graxos de 16 e 18 carbonos com insaturações são semelhantes, muitas vezes sendo 100% correspondentes entre si. Com base nessa relação foi então pressuposto que os ácidos graxos que possuem o mesmo padrão de íons utilizados para a identificação dos compostos na espectrometria de massa possuem também o mesmo fator de resposta gerado na sua quantificação. Dessa forma, o ácido linolênico (C18:3) foi selecionado da lista de ácidos graxos presentes na mistura certificada, já que seu perfil de íons é o mais semelhante aos dos 3 que não estavam presentes nessa lista

(C16:3, C16:4 e C18:4), e o fator de resposta gerado na sua quantificação foi então utilizado para quantificar estes outros 3 FAMES.

Em relação ao perfil de pigmentos, os teores de clorofila *a* e carotenoides encontrados foram semelhantes aos relatados na espécie de microalga verde *Scenedesmus obtusus* no trabalho de Vinitha et al. (2022), principalmente nas 5 cepas que obtiveram valores acima de 8 µg/mg, contudo o teor de clorofila *b*, de forma geral, foi relativamente menor do que o apresentado no referido trabalho. Essa variação é comum, tanto entre as 10 cepas quanto entre elas e a espécie apresentada no artigo, visto que o teor de pigmentos além de variar entre espécies também pode ser alterado de acordo com o ambiente ou as condições de cultivo que esses organismos se encontram.

7.3. Efeito da vinhaça sob o crescimento e a biomassa de 4 cepas de microalgas quando comparado com o meio sintético

Na primeira etapa dos experimentos as cepas já demonstraram capacidade de crescer em vinhaça, aqui no crescimento comparativo com o BG11 esse resíduo se apresentou como um estímulo para o melhor desempenho no acúmulo de biomassa quando comparado com o controle, obtendo-se no cultivo com vinhaça um teor de massa seca similar ao encontrado para essas 4 microalgas no primeiro crescimento relatado. Contudo, a produtividade não demonstrou relação com as curvas de crescimento apresentadas, já que em duas cepas (LBA 6 e LBA 40) as amostras cultivadas em BG11 apresentaram uma maior quantidade celular no dia final de cultivo. Como a coleta da biomassa só foi feita por centrifugação e não houve filtração do material resultante do cultivo, é possível que o resultado do peso seco da biomassa, principalmente das amostras cultivadas em vinhaça, esteja com os valores influenciados pela presença de sais e sólidos vindos deste resíduo.

No caso da LBA 39 e da LBA 47, cepas que apresentaram o melhor desenvolvimento na vinhaça, é possível que este resultado esteja relacionado ao tipo de crescimento realizado por essas microalgas. Pela dinâmica observada nas curvas de crescimento, é provável que as duas cepas analisadas estejam realizando crescimento mixotrófico, ao invés de autotrófico, o que explicaria o seu melhor desempenho na vinhaça, visto que esse resíduo é fonte de diferentes fontes de compostos orgânicos que são incorporadas ao cultivo. Já existem estudos na literatura que contribuem com essa análise, aonde é demonstrado que o cultivo sob condições mixotróficas de diferentes espécies de microalgas verdes, entre elas exemplos do gênero

Chlorella, podem levar a um maior rendimento de biomassa, assim como aumentar o acúmulo de compostos de interesse (Dragone, 2022; Angelini et al., 2024).

Analisando o conjunto de dados gerados da análise de ácidos graxos das 4 cepas cultivadas comparativamente, pode-se dizer que o crescimento nesse resíduo não alterou, nem positivamente nem negativamente, o perfil de ácidos graxos das 4 microalgas quando comparado o crescimento em BG11, meio comercialmente conhecido para o cultivo desses organismos. No trabalho de Santhana et al. (2022), o perfil lipídico da microalga verde *Graesiella emersonii* foi analisado, comparando as possíveis diferenças entre a biomassa resultante do cultivo dessa alga em BG11 (controle) e em extratos aeróbicos e anaeróbicos a base de composto de resíduos de jardim, que foram diluídos em 3 concentrações com meio BG11 (8:2, 6:4, 5:5), caracterizando juntamente com o extrato bruto os oito tratamentos utilizados nesse estudo. Entre todos os tratamentos e o controle houve diferença significativa em termos de teor de lipídios e produtividade, com os ácidos graxos insaturados dominando o perfil de FAMES em todos os cultivos anaeróbicos, sendo o ácido linolênico (C18:3) o mais abundante. Por outro lado, no controle o observado foi que a % de ácidos graxos saturados foi maior que a de insaturados, com 4 dos 7 ácidos graxos com 18 carbonos e insaturações identificados nos tratamentos com vermicomposto não sendo detectados no cultivo a base só de BG11. Portanto, é possível ver que nesse caso o tipo do cultivo alterou os padrões de FAMES produzidos pela microalga, o que não foi observado nas análises com o cultivo a base de vinhaça e BG11, visto que nem o rendimento da massa seca nem a presença/ausência de insaturações sofreu alterações significativas.

Já com o estudo de Zhang et al. (2021) é possível ver que o cultivo em águas residuais bioquímicas de lixiviados de aterros alterou o perfil de FAMES da microalga analisada (*Chlorella vulgaris*), de modo que aquelas cultivadas em meios de águas residuais geralmente apresentaram proporções maiores de ácidos graxos saturados quando comparadas com aquelas que cresceram em meio BG11. Os autores mencionam que esse aumento pode estar relacionado aos fatores de estresse nas águas residuais do lixiviado, como fotoinibição e estresse de metal, que geralmente induzem uma cascata de reações que levam à formação de acetil coenzima A (acetil-CoA), o que resultaria em mais síntese desses ácidos graxos. Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados, foi observado que as suas proporções geralmente diminuiriam no meio baseado em águas residuais em comparação com os níveis encontrados no meio BG11, o que poderia ser explicado pelo estresse de salinidade na

presença de íons metálicos e estresse de fósforo que influenciam a fluidez da membrana celular e a produção das caudas lipídicas poliinsaturadas. Como não foi observada quase nenhuma variabilidade nos valores de ácidos graxos saturados e insaturados quando comparados o perfil de FAMES dos cultivos em BG11 e vinhaça (Tabela 9), é possível supor que a vinhaça não provoca estresse intenso nas cepas analisadas, pelo menos na proporção e no período de cultivo aplicado, podendo proporcionar então uma via de crescimento para esses organismos em uma potencial pesquisa para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação desse resíduo concomitantemente com o aproveitamento da biomassa na extração de ácidos graxos de interesse.

A análise de pigmentos traz uma visão semelhante à discutida para ácidos graxos, já que as diferenças estatísticas encontradas caminham para uma percepção de que não foi gerado estresse intenso nas microalgas ao serem cultivadas em vinhaça, comparado os resultados com o cultivo em BG11. Zhang et al. (2021) mostra que a razão de clorofila *a/b* obtida do cultivo de *Chlorella vulgaris* em águas residuais bioquímicas de lixiviados de aterros com adição de fósforo foi semelhante ao do cultivo em BG11 (controle), com a proporção do controle sendo levemente maior que o das águas residuais em quase todo o período de cultivo. Essa mesma proporção foi observada nas cepas LBA 39 e 40, com a razão clorofila *a/b* sendo maior no cultivo com BG11, enquanto na LBA 6 e 47 o maior teor foi observado no cultivo com vinhaça. O valor do teor observado no artigo do dia 15 até o dia 20 de cultivo foi também semelhante ao obtido nessa dissertação, com uma variação de 2 a 3 µg/mg entre as 4 cepas. Uma teoria do artigo é que as espécies cuja proporção foi maior no cultivo alternativo do que no controle obtiveram um sucesso maior na redução da turbidez do meio, característica presente tanto nas águas residuais de lixiviados quanto na vinhaça, que dificultaria a absorção de luz pelas microalgas, reduzindo a sensibilidade do complexo coletor de luz presente nos cloroplastos desses organismos.

Já na razão carotenoides/clorofila, foi observada uma reposta diferente entre o trabalho de Zhang et al. (2021) e a presente dissertação, visto que no artigo mencionado essa proporção foi maior no cultivo realizado em águas residuais do que no controle, enquanto na presente dissertação, essa proporção foi semelhante ou maior no crescimento com o BG11 em quase todas as cepas, apenas a LBA 40 obteve um teor maior no cultivo com vinhaça, e mesmo assim com uma diferença muito pequena entre os tratamentos. Os autores avaliam que essa maior proporção deve ser uma resposta adaptativa às condições de estresse que a

microalga foi submetida ao ser cultivada em águas residuais, estresse esse que pode induzir a inibição da cadeia de transporte de elétrons desse organismo, levando à produção de radicais livres que induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção de uma maior taxa de carotenoides está listada como um dos mecanismos de defesas das células de microalgas contra o estresse oxidativo, já que essas moléculas são reconhecidas por serem um dos responsáveis pela eliminação do excesso de oxidante. Assim como visto na produção de ácidos graxos saturados e insaturados, aonde não foi observada diferença significativa entre o crescimento em vinhaça e BG11, a pequena diferença entre os dois cultivos, com a maior proporção de carotenoides tendendo para o cultivo em BG11, permite supor que as microalgas não foram submetidas a um grande estresse enquanto estavam sendo cultivadas em vinhaça, nas proporções descritas.

7.4. Efeito do escalonamento do cultivo e da composição da vinhaça sob o crescimento e o rendimento da biomassa das microalgas

No experimento realizado utilizando 1 L de meio, foi possível observar que o cultivo com meio BG11 resultou em um melhor crescimento para todas as 4 cepas selecionadas do que no tratamento utilizando vinhaça, com o cultivo nesse resíduo apresentando um baixo crescimento celular. Essa diferença de crescimento entre o cultivo aqui apresentado e o descrito anteriormente, também comparando o crescimento das mesmas 4 cepas em BG11 e vinhaça só que com 10 mL de cultivo, pode estar relacionada a dois fatores: a quantidade de meio utilizada e a composição da vinhaça.

Como o primeiro crescimento comparativo foi realizado com 10 mL de meio e o segundo com 1 L, é possível que esse escalonamento tenha exercido um efeito sobre o crescimento das microalgas, favorecendo aquele realizado no meio comercial (BG11), com dosagens de nutrientes já acertadas para um bom desenvolvimento desses microrganismos. A vinhaça por outro lado não é um meio previamente estabelecido para o cultivo de microalgas, apesar de já existirem estudos que comprovem seu uso, muitas vezes a variação qualitativa e quantitativa da sua composição pode afetar diretamente o desenvolvimento de microrganismos. É possível observar no tópico 5.2 que enquanto a vinhaça utilizada no primeiro crescimento comparativo (assim como na triagem das 10 cepas) possui quantidades significativas de nitrato, a vinhaça utilizada neste segundo experimento não. Outro ponto em relação a composição é que a vinhaça utilizada no cultivo com 1 L de meio também apresenta

maiores níveis de amônio, composto este que em altas quantidades pode ser tóxico as microalgas.

É importante também citar que boa parte dos íons de nitrato e fosfato disponível para essas cepas durante o seu crescimento foi proveniente do inóculo utilizado, que foi realizado em meio BG11 (Melo, 2024), responsável por fornecer esses nutrientes. Dessa forma, aumentar a quantidade de meio de cultivo de 10 mL para 1 L, mas não manter a mesma proporção de inóculo (20% no cultivo de 10 mL e 3% no cultivo de 1L), faz com que a quantidade de íon de nitrato disponível para este último crescimento seja ainda menor aos cultivos previamente realizados. Como o nitrato é um dos nutrientes determinantes no crescimento das microalgas, é muito provável que essa baixa quantidade tenha afetado o seu crescimento, impedindo que elas alcançassem um bom desenvolvimento como visto anteriormente. Um método para evitar essa alta transferência de nutrientes do cultivo mãe para os experimentos realizados seria lavar o inóculo antes de introduzi-lo ao novo meio

Em relação a biomassa seca produzida, é possível observar uma redução no rendimento quando comparamos as culturas no cultivo com 1 L de meio com aquelas cultivadas em 10 mL, principalmente nas amostras em vinhaça. Isso pode estar relacionado com a redução considerável de nitrato entre as duas vinhaças utilizadas nesses crescimentos, visto que há relatos na literatura sobre o impacto que o estresse da privação de nitrogênio do meio pode trazer para a produção de biomassa pelas microalgas. Por exemplo, no estudo de Naggapan e Kumar (2021), o impacto do cultivo deficiente em nitrogênio foi testado em quatro microalgas (*Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella salina*, *Chlorella minutissima* e *Desmodesmus sp*) e todas as espécies cultivadas no meio privado deste nutriente, ao final do crescimento, tiveram a produção de biomassa afetada negativamente, com seu rendimento sendo menos da metade dos valores obtidos pelas amostras cultivadas com a presença de nitrogênio.

Como a produção da biomassa das 4 cepas analisadas nessa dissertação foi similar na triagem feita inicialmente e nas amostras em vinhaça cultivadas no primeiro crescimento comparativo, ambas utilizando o resíduo da mesma coleta como meio, mas teve uma queda no cultivo com 1 L, que foi realizado com outra vinhaça, esta mais pobre em nitrogênio, é possível supor que a falta deste nutriente tenha então afetado diretamente o rendimento final da biomassa. Embora, seja importante ressaltar, que mesmo não atingindo valores aos cultivos em BG11, estas cepas ainda demonstraram capacidade de crescer em vinhaça durante um

período de tempo, mesmo esta apresentando características em sua composição que dificultariam o seu desenvolvimento.

Outro ponto que pode ter sido influenciado pela privação de nitrogênio no cultivo é o aumento do tamanho celular das cepas cultivadas em vinhaça. Diferentes estudos já mostraram que as condições ambientais possuem um papel importante na determinação do conteúdo celular das microalgas, assim como nas características físicas de suas células, sendo a insuficiência de algum nutriente em seu crescimento, um dos tipos de estresses estudados. No trabalho de Yap et al. (2016), por exemplo, foi investigado o efeito que privação de N exerce no tamanho celular, espessura da parede celular e resistência mecânica de três microalgas (*Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. and *Nannochloropsis* sp). Os autores demonstram que a insuficiência desse nutriente no meio de cultivo resultou no aumento do tamanho médio das células para as três espécies, algumas alcançando aproximadamente um tamanho 25% maior nas culturas depletadas, resultado similar ao presente nessa dissertação, pois, como visto, as cepas cultivadas em 1 L de vinhaça atingiram, no dia final do cultivo, o dobro do diâmetro celular quando comparadas com aquelas cultivadas em BG11. É provável que esse aumento tenha ocorrido, pois a redução da quantidade de nitrogênio disponível pode levar a diminuição das proteínas celulares, o que a longo prazo faz com que as divisões celulares fiquem mais lentas e aumente a mobilização da geração de produtos de armazenamento de energia, como ácidos graxos e carboidratos (Sajjadi et al., 2018). Dessa forma, a quantidade de células do cultivo não aumenta significativamente, mas o tamanho delas sim.

7.5. Análise da relação entre o perfil de ácidos graxos dos crescimentos comparativos e o efeito do escalonamento e da privação de nitrogênio no cultivo das microalgas

Ao confrontar os dois crescimentos comparativos realizados, um com 10 mL de cultivo e outro com 1 L, é possível notar alguns pontos onde há divergência dos resultados da análise bioquímica da biomassa das 4 cepas. Uma dessas diferenças é na produção de ácidos graxos, tanto no rendimento da sua massa seca, quanto no perfil encontrado. Assim como na análise do crescimento e do rendimento da biomassa, essas divergências podem estar relacionadas principalmente a dois fatores: o aumento da quantidade de meio utilizada ou a redução de nitrogênio. Submeter a microalga a algum tipo de estresse durante seu cultivo é uma técnica já utilizada para a obtenção de maiores taxas de ácidos graxos, inclusive muitas espécies de

microalgas são conhecidas por acumular lipídios em resposta ao estresse da privação de nitrogênio, com um aumento predominante, entre todas as classes lipídicas, do triacilglicerol (TAG) (Nagaopan e Kumar, 2020). Isso ocorre pois, ao serem transferidas para um meio deficiente de nitrogênio, a capacidade das microalgas de usar o carbono fixado é alterada da síntese de proteínas e lipídios polares para a produção de carboidratos ou de óleo de armazenamento, impondo, geralmente, três alterações à espécie: diminuição do conteúdo celular da membrana tilacóide, ativação da acil- hidrolase e estimulação da hidrólise de fosfolipídios (Sajjadi et al., 2018). Essas alterações podem levar ao aumento do conteúdo intracelular de acil-CoA de ácidos graxos, enquanto a limitação de nitrogênio ativaria a diacilglicerol aciltransferase, responsável por converter acil-CoA em triglicerídeo (TAG), o que leva ao aumento do conteúdo de lipídios e TAG nas células de microalgas. Já foi sugerido também que, sob efeito da privação de nitrogênio, pode existir uma forte associação entre o metabolismo dos aminoácidos em microalgas, especialmente as vias de arginina, glutamato e ornitina, para a produção de TAGs, através da síntese de *novo* de lipídios (Monteiro; Giraldi; Winck, 2023). Em relação ao perfil lipídico, a resposta ao estresse pela privação de nitrogênio pode variar entre espécies, mas em geral, é comum observar a diminuição do nível médio de insaturação dos ácidos graxos totais, podendo chegar a uma redução de 10 a 38%, dependendo das cepas (Breuer et al., 2012).

Analisando por esses dados, não é possível afirmar uma correlação direta com os resultados aqui obtidos e a literatura apresentada anteriormente. Primeiramente, em relação ao acúmulo de ácidos graxos, pela análise da % massa seca, observa-se que todas as cepas cultivadas em 1 L de vinhaça tiveram uma redução brusca no rendimento quando comparado com o experimento feito em 10 mL de cultivo, ao contrário do que é esperado, visto que a privação de nitrogênio tende a levar ao maior acúmulo de lipídios e não a sua diminuição. Em segundo lugar, o perfil de insaturação e saturação dos ácidos graxos presentes na biomassa analisada mostra que não há diferença significativa entre os níveis de insaturações encontrados nas amostras cultivadas em vinhaça. Outro ponto a se observar é que, enquanto não há muitas diferenças significativas entre os cultivos em vinhaça, os de BG11 sim apresentam uma alteração.

A privação de nitrogênio não é uma questão geralmente analisada no cultivo com BG11, visto que as concentrações de cada nutriente são ajustadas em relação ao aumento do volume deste meio comercial utilizado. Pensando nisso e nos resultados encontrados também das

amostras cultivadas em vinhaça, é possível supor que as alterações observadas podem estar relacionadas ao escalonamento do cultivo e não somente à privação de nitrogênio. No trabalho de Kumaran et al. (2023), o crescimento e a biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* foi analisada em um cultivo com BG11 e outro com o efluente da produção do óleo de palma (POME, do inglês Palm Oil Mill Effluent), ambos inicialmente cultivados em 500-800 mL e depois escalonado para 2 L. Enquanto na presente dissertação o meio BG11 gerou um melhor rendimento da % de lipídios por massa seca nos cultivos de 1 L, no caso do artigo esse resultado foi obtido no cultivo com POME, com valores significativamente maiores do que os obtidos pelas cepas analisadas na vinhaça. Contudo, quando o perfil lipídico do estudo e da análise com 1 L de meio da presente dissertação são comparados é possível encontrar semelhanças nos valores obtidos de alguns FAMES, como por exemplo o ácido palmítico (C16:0), e também na % de ácidos graxos saturados. As % de insaturações não apresentam tal semelhança, mas isso era esperado visto que, além dos relatados no artigo, aqui foram identificados outros 4 tipos de ácidos graxos poliinsaturados. É interessante ressaltar que essas semelhanças são vistas, principalmente, quando aumentamos o volume da vinhaça no cultivo, não sendo possível obter a mesma comparação com o cultivo realizado em 10 mL desse resíduo ou com o meio BG11. O aumento de culturas de algas é geralmente feito por um fator de 10 por etapa, por exemplo de 10 ml para 100 ml, para 1 L para 10 L e assim por diante (Borowitzka e Vonshak, 2017). Esse fator não foi seguido no presente trabalho, o que pode ter levado, entre outros pontos aqui já apresentados, a súbita mudança encontrada entre os cultivos em vinhaça e BG11.

Não é possível chegar a uma conclusão definitiva do que possa ter causado as diferenças observadas em relação ao perfil lipídico das cepas cultivadas em 10 mL e 1 L de meio, principalmente mudanças significativas observadas no cultivo em vinhaça, como o decréscimo do rendimento da massa seca e a baixa concentração, principalmente, de alguns ácidos graxos insaturados, que ficaram abaixo do limite de quantificação do método utilizado. Contudo, diante da discussão aqui apresentada, pode-se supor que o aumento súbito da quantidade de meio e a mudança na composição da vinhaça utilizada para o cultivo tenham um papel significativo nessa diferença. Embora seja importante ressaltar que o comportamento das microalgas em relação a esses dois fatores apresentados pode variar dependendo da espécie, então para ter uma visão melhor do que pode estar levando a essas repostas seria preciso executar experimentos mais aprofundados em relação a composição

bioquímica das biomassas testadas e também a outros fatores do cultivo que possam estar influenciando nessas análises, como a mudança na iluminação e introdução da aeração no sistema.

7.6. Efeito da intensidade luminosa sob o acúmulo de pigmentos na biomassa das microalgas

Assim como foram observadas diferenças entre a produção de ácidos graxos dos dois cultivos comparativos realizados (10 mL e 1 L), houve também mudanças no perfil de pigmentos, tanto para a biomassa coletada do crescimento em vinhaça quanto em BG11. Em razão das diferenças entre esses resultados terem sido observadas em ambos os tipos de meio, com uma resposta forte principalmente no cultivo com BG11, é possível supor que um dos fatores responsável por isso esteja presente no sistema de cultivo, que foi alterado nesse processo de escalonamento. E uma das mudanças mais significativas entre esses dois sistemas é a intensidade luminosa fornecida, que no experimento realizado na UnB, com 10 mL de meio, foi de $85 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (sob um regime de 16/8 h claro/escuro) e no realizado na Embrapa, com 1 L de meio, foi $315 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (sob um regime de 12/12 h claro/escuro). Esse aumento se deve, principalmente, pela presença das lâmpadas coloridas (C4 Green Power LED, C4 Biotecnologia) presentes somente neste último sistema.

São diversos os fatores que podem afetar a produtividade das microalgas e a luz está entre um dos principais, pois é a fonte de energia para a movimentação do metabolismo desses microrganismos. Não existe um valor definido de intensidade de luz ideal para o desenvolvimento de microalgas, já que este é um fator que varia entre espécies e depende de outras variáveis do sistema de cultivo estabelecido, como temperatura e disponibilidade de nutrientes no meio, mas geralmente a produtividade aumenta com o aumento da intensidade da luz, visto que isso leva a maior absorção e utilização da luz pelo aparelho fotossintético (Metsoviti et al., 2020). Contudo, não é possível apenas aumentar infinitamente a intensidade luminosa esperando, assim, também ampliar proporcionalmente o rendimento de biomassa e moléculas de interesse das microalgas. Isso porque, em algum momento, será atingido o ponto de saturação do microrganismo utilizado e, a partir daí, é observado o processo chamado de fotoinibição que ocorre devido à incapacidade de absorção do excesso de luz pelo aparelho fotossintético, o que leva a uma série de reações de fotooxidação dentro nas células (Khoeyi

et al., 2012). Este limite depende das espécies de microalgas e também das condições de cultivo.

No trabalho de Reshma et al. (2021), é possível observar como a questão da intensidade luminosa e o fotoperíodo do sistema de cultivo influenciam diretamente a produção de pigmentos da microalga *Dunaliella salina*. Neste estudo foram analisados o crescimento e biomassa dessa microalga em sistemas de cultivo com intensidade luminosa de 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (sendo este último além do limite de saturação conhecido para essa espécie) e fotoperíodo de 12:12, 18:6, 20:4, 6:18, 24:00 (claro:escuro). Em relação à intensidade da luz, observou-se que a produção de pigmentos foi diretamente proporcional à intensidade luminosa, ou seja, o aumento da intensidade luminosa induziu a maior produção de pigmentos nas células, obtendo os melhores resultados na maior taxa testada (200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Os autores também observam que, após atingir o limite da cultura, o aumento da intensidade de luz não mostrou melhora significativa no crescimento e acúmulo de pigmento para essa microalga. Analisando o fotoperíodo, dos cinco testados, 12:12 (claro:escuro) foi que obteve os resultados mais significativos, demonstrando que o tempo de exposição das microalgas à luz também está correlacionado com o acúmulo de pigmentos.

Comparando os dados desse artigo com os obtidos na presente dissertação, é possível encontrar semelhanças visto que, quando confrontamos os níveis de pigmentos obtidos nos dois crescimentos comparativos realizados, observamos um aumento em todos eles no sistema da Embrapa, especialmente no cultivo em BG11, onde a intensidade luminosa era quase 4 vezes maior que o da UnB. Além da discrepância na intensidade, há a questão do fotoperíodo, que também apresentou diferença entre os dois sistemas, com o da UnB gerando um tempo um pouco maior de exposição à luz quando comparado ao da Embrapa. Uma outra diferença entre esses dois sistemas é o volume da cultura, visto que, à medida que a quantidade de meio é aumentada, surge com maior impacto um problema conhecido como auto-sombreamento (do inglês *self shading*), onde o forte sombreamento mútuo entre as células faz com que a distribuição de luz dentro do biorreator seja heterogênea (Nwoba et al., 2019). Dessa forma, microalgas próximas às zonas de luz estão sujeitas a uma intensidade de luz mais intensa, enquanto células distantes das superfícies de iluminação acabam por serem fotolimitadas (Nwoba et al., 2019). Como no sistema da Embrapa o volume do cultivo é bem maior quando comparado ao da UnB, é possível que a questão do auto-sombreamento tenha tido um efeito mais presente, levando uma maior produção de pigmentos por parte das células das

microalgas mais distantes da fonte luminosa, auxiliando, assim, a maximizar a captação de luz.

Juntos, esses três fatores (intensidade luminosa, fotoperíodo e auto-sombreamento) podem explicar o aumento dos níveis de pigmentos entre os cultivos realizados na UnB e na Embrapa. Em relação aos cultivos em vinhaça, é importante lembrar que a vinhaça utilizada no experimento com 1 L de meio carecia de fontes de nitrogênio, portanto é possível supor que esse aumento nos níveis de pigmentos não tenha sido observado de maneira homogênea nas cepas cultivadas nesse resíduo por causa do estresse causado pela privação desse nutriente. Diferentes estudos já apontaram a relação entre a diminuição da clorofila durante a privação de nitrogênio em diversas espécies, estabelecendo teorias como o fato de que a degradação da clorofila levaria a um melhor aproveitamento do nitrogênio pelas células (já que parte de sua estrutura é formado por átomos de N) e que a redução da clorofila possa ser um meio da célula neutralizar a formação de espécies reativas de oxigênio durante a limitação desse nutriente (Nagappan et al., 2020). Como a LBA 39 foi a cepa que melhor se aclimatou ao cultivo com 1 L de vinhaça e conseguiu obter melhores parâmetros de crescimento, é possível que isso tenha feito com que ela conseguisse obter uma resposta semelhante aos cultivos em BG11 em relação às taxas de pigmentos, afinal a adaptação aos tipos de cultivo e como isso afeta quantitativamente e qualitativamente a biomassa gerada varia entre espécies.

7.7. Análise da produção de duas auxinas por quatro espécies de microalgas

Fitohormônios geralmente são encontrados em microalgas em concentrações muito pequenas e com diferentes estruturas, o que torna a identificação e quantificação desses compostos um desafio, demandando um método analítico com alta sensibilidade e seletividade (Do et al., 2020). Pensando nesses critérios, uma das opções mais utilizadas atualmente para analisar o perfil de fitohormônios em microalgas (e outras espécies) é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High-performance liquid chromatography) acoplada a um espectrômetro de massas como detector. Outra opção de análise, que também traz um método com alta sensibilidade, é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas que já é bem estabelecida para a quantificação de certos fitohormônios, com estudos que comprovam a eficiência da sua utilização, principalmente em espécies de plantas, como a laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Nehela et al., 2016) e a *Medicago truncatula* (Rawlinson et al., 2015).

O protocolo para extração e preparo das amostras para análise foi desenvolvido através de dados da literatura e adaptações de um método de análise de perfil metabólico já previamente estabelecido pela equipe do laboratório da UnB. O modo SIM (Selected Ion Monitoring) foi utilizado para a detecção dos compostos de interesse nas amostras de microalgas, pois testes prévios mostraram dificuldades para se identificar esses dois fitohormônios no modo SCAN/varredura, provavelmente devido a interferências decorrentes da complexidade do extrato da biomassa algal, principalmente daquelas cultivadas em vinhaça.

Em relação aos resultados obtidos, apesar dos níveis de fitohormônios serem algo muito variável de acordo com a espécie e as condições de cultivo, os teores de AIA encontrados na biomassa das cepas cultivadas em BG11 correspondem com trabalhos já publicados, por exemplo em Stirk et al. (2013). Neste estudo, foi testada a presença de diferentes fitohormônios em 24 espécies de microalgas cultivadas em meio comercial, dentre elas algumas pertencentes às mesmas famílias das cepas testadas no presente trabalho e em todas as espécies foi detectado AIA, com níveis variando de $0.50\text{--}71.49\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$, o que se encaixa com os resultados aqui já descritos, visto que nas 4 cepas analisadas os níveis de AIA variaram de $14,9\text{--}52,6\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$. Enquanto AIA é uma das auxinas mais estudadas e existem mais dados acerca da sua quantificação em microalgas, AIB não recebe tanta atenção, portanto seus teores não são tão conhecidos entre diferentes espécies desses microrganismos, contudo sua presença já foi detectada em extratos de macroalgas verdes (Gupta et al., 2011) e também de microalgas (Pichler et al., 2020).

Em relação ao aumento dos níveis de auxina nas amostras cultivadas em vinhaça, é possível observar um desenvolvimento similar no trabalho de Elakbawy et al.(2023), onde foram comparados os níveis de diferentes fitohormônios, entre eles AIA, presentes na microalga verde *Chlorella vulgaris*, quando cultivada em meio comercial (BG11) e também em diferentes concentrações deste meio combinado com águas residuais (incluindo um cultivo com apenas esse resíduo como meio). Os autores mostraram que os níveis desta auxina presente na microalga aumentaram significativamente quando cultivada em um meio composto apenas por água residual, com teores de 0.032 mg/g em comparação com 0.01 mg/g obtido quando cultivada em BG11. Esse resultado é similar ao observado na presente pesquisa, visto que os níveis de ácido indol-3-acético também aumentaram na biomassa das microalgas cultivadas em vinhaça, quando comparado com o meio comercial. Os autores

discutem que por as microalgas serem microrganismos que vivem em habitats complexos, ficando sujeitas a estresse e/ou condições ambientais naturais extremas, elas acabam por desenvolver uma capacidade de adaptação rápida em relação às novas condições ambientais para sobreviver, o que as leva a produzir uma grande variedade de compostos biologicamente ativos que não são encontrados nas mesmas quantidades em organismos semelhantes que vivem em condições normais.

A discussão levantada pelos autores para explicar esse possível aumento também é algo que pode ser pensado para a situação encontrada nesta pesquisa, pois como a vinhaça não é um meio estabelecido para cultivo de microalgas, quaisquer alterações em sua composição, como o caso da diminuição de disponibilidade de fontes de nitrogênio, ou no sistema de cultivo, podem levar as microalgas ao estresse e, conseqüentemente, a uma variabilidade da produção de compostos, como as auxinas, a fim de se adaptar as novas condições de desenvolvimento. Contudo é importante também pensar nas condições de estresse, mas do ponto de vista do meio BG11, pois como a intensidade luminosa utilizada no sistema de cultivo estava em uma faixa relativamente alta ($315 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), é possível que as microalgas no BG11, um meio mais translúcido e portanto mais fácil de absorver a luz, tenham sido submetidas a uma situação de estresse, o que pode levar a um prejuízo na produção de auxinas, que talvez pudesse ter sido maior em um sistema com uma menor intensidade de luz. Dessa forma, neste caso a cor mais escura da vinhaça pode ter favorecido as microalgas em termos de produção desses fitohormônios.

7.8. Análise teórica da atividade estimulante das microalgas

A biomassa das microalgas pode ser utilizada para se obter diversas moléculas de interesse comercial, que podem vir a serem utilizadas para o desenvolvimento de produtos, como biofertilizantes. Hoje, os biofertilizantes de microalgas já são considerados uma alternativa sustentável e ecologicamente correta aos fertilizantes químicos utilizados, não só aumentando a produção agrícola, mas também reduzindo o impacto ambiental (Suchithra et al., 2022). Diferentes estudos já indicaram que as microalgas são fontes de substâncias que auxiliam e promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas, como macro e micronutrientes, auxinas, citocininas, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, proteínas, pigmentos e polissacarídeos (Ronga et al., 2019). Dentre estas, a presença de concentrações razoáveis de fitohormônios é uma das características amplamente procuradas em extratos de

microalgas, visto que essas moléculas são reguladores diretos do crescimento de plantas, o que poderia auxiliar no aumento da produtividade de culturas de interesse.

As 4 cepas analisadas no presente estudo (LBA 6, LBA 39, LBA 40 e LBA 47) demonstraram ser fonte de moléculas de interesse, como pigmentos e diferentes tipos de ácidos graxos, até mesmo de dois tipos de auxinas. Devido à presença dessas substâncias, principalmente desse grupo de fitohormônio, é possível considerar que essas espécies de microalgas possam ter um potencial de atuarem como bioestimulantes. A fim de fazer uma comparação teórica entre os resultados obtidos nesta dissertação e a literatura, foi selecionado o trabalho de Lamb et al. (2023), onde 13 cepas de microalgas dos gêneros *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. e *Desmodesmus* sp., isoladas de diferentes estados brasileiros, foram avaliadas quanto à produção de compostos indólicos, exopolissacarídeos e sideróforos. Aquelas com melhor desenvolvimento e produção de compostos de interesse foram selecionadas para avaliar a atividade bioestimulante do extrato aquoso de sua biomassa em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), com análise da inoculação de sementes e aplicação foliar dos extratos.

Analisando primeiramente a quantificação de compostos indólicos, exceto por 2 cepas que apresentaram quantidades médias de 14 e 52 µg/ mL, todas as amostras analisadas obtiveram teores variando de 0,13 a 4 µg/ mL. Comparando com a quantificação de auxinas descrita no presente estudo, os resultados são semelhantes com os obtidos nas amostras cultivadas em BG11 apresentando teores médios de 3,4 (LBA 6), 3,56 (LBA 39), 2,67 (LBA 40) e 5,86 µg/ mL (LBA 47). Já para as amostras cultivadas em vinhaça, LBA 39 e LBA 40 apresentaram níveis similares ao grupo em BG11, com média de 5,8 e 4,2 µg/ mL, respectivamente; contudo foi observado um aumento nas cepas LBA 6 e LBA 47, com médias de 50,5 e 73,3 µg/ mL, valores parecidos, e até maior no caso da LBA 47, as duas cepas com maiores teores do artigo.

Em relação à potencial atividade bioestimulante, 4 cepas foram selecionadas para análise e os autores mostraram que para germinação das plantas de arroz, nenhum dos extratos aplicados apresentou uma melhora significativa em relação ao controle. Contudo, no crescimento da parte aérea, após 30 dias de aplicação, foi observado que ambas concentrações testadas (0,1 e 0,5 g/L) dos extratos das cepas Syn 16 e Syn 90 estimularam o aumento desse sistema; enquanto na parte radicular, ambas concentrações da cepa Syn 16 também tiveram atividade estimulante, e somente a concentração de 0,1 g/L da cepa Syn 90 estimulou o

crescimento da parte radicular. Em relação ao peso seco da parte aérea, foram observados aumentos de até 36%, com o extrato de Syn 16 na concentração de 0,5 g/L, e de 27 %, com a cepa Syn 90 na concentração de 0,5 g/L. Já o peso seco da raiz foi 43% e 35% maior que o das plantas controle após a aplicação da concentração de 0,5 g/L de Syn 16 e Syn 90, respectivamente. Essas 2 cepas que demonstraram um maior potencial bioestimulante em plantas de arroz, também são as que apresentaram os maiores teores de compostos indólicos, com 52.55 (Syn 16) e 14.81 (Syn 90) $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Comparando os resultados do estudo discutido anteriormente e a quantificação de auxinas das 4 cepas analisadas na presente dissertação, é possível acreditar que essas microalgas possam apresentar potencial para serem aplicadas como bioestimulante, principalmente as cepas LBA 6 e LBA 47 cultivadas em vinhaça, que apresentaram teores similares e até maior aos das duas cepas de destaque no artigo (Syn 16 e 90). É importante ressaltar que no artigo são quantificados compostos indólicos no total, não diferenciando as classes encontradas, enquanto na presente dissertação os valores comparados correspondem somente a soma dos teores de AIA e AIB, portanto é possível que haja mais substâncias nos extratos das cepas testadas no artigo do que nas analisadas pelo presente trabalho. É claro que apenas a presença de compostos indólicos não é o suficiente para garantir que a microalga vá exercer uma atividade bioestimulante sob uma cultura de interesse, sendo necessário realizar quantificações de outras substâncias e até testes similares ao do estudo (germinação, crescimento e peso seco da parte aérea e radicular) para comprovar esse potencial. Contudo, a identificação e detecção dessas substâncias nas cepas são indicadores importantes, pois, como já discutido, auxinas estão entre os grupos de moléculas que exercem papéis fundamentais no desenvolvimento e crescimento das plantas.

8. Conclusões

Como visto no decorrer dessa dissertação, as microalgas são organismos complexos e com um grande potencial como fonte de moléculas de interesse, através da sua biomassa. O seu cultivo em resíduos agroindustriais também tem sido explorado por se mostrar uma alternativa sustentável ao descarte destes, sendo então preciso analisar o impacto que esse cultivo geraria no crescimento destes microrganismos. No presente trabalho, todas as 10 cepas de microalgas verdes analisadas apresentaram capacidade de crescer em vinhaça autoclavada, com pH corrigido para 7, não existindo uma diferença significativa entre os rendimentos da

biomassa seca gerada por elas e com variações já esperadas nas análises de ácidos graxos e pigmentos, comum de se encontrar entre espécies diferentes.

Comparando o desempenho da vinhaça como meio de cultivo com o BG11, meio comercialmente já conhecido para este fim, foi possível perceber que, nas 4 espécies analisadas, o rendimento de massa seca foi maior na biomassa cultivada neste resíduo, mas não houve impacto negativo nem positivo do mesmo em relação a produção de ácidos graxos e pigmentos. Isso indica que, apesar de não ter um aumento na quantidade destes compostos, o que geralmente é procurado pela indústria, as microalgas não foram submetidas a um grande estresse enquanto estavam sendo cultivadas em vinhaça, havendo então um potencial neste resíduo.

Contudo, quando o mesmo crescimento comparativo é realizado, só que dessa vez em 1 L de cultivo e em um sistema diferente, é possível observar que o crescimento em BG11 foi muito superior, gerando em todas as 4 cepas uma maior quantidade celular ao fim do crescimento. Diversas diferenças são observadas também no tamanho do diâmetro celular, no perfil lipídico e na produção de pigmentos, todas indicando que a composição da vinhaça e questões no sistema de cultivo, como luminosidade, podem influenciar diretamente na adaptação ao cultivo e na produção quantitativa e qualitativa de biomassa por essas microalgas.

Em relação a produção e identificação de auxinas, foi possível detectar tanto o ácido indol-3-acético (AIA) quanto de ácido indol-3-butírico (AIB) em todas as cepas e em ambos os meios de cultivo. Aquelas cultivadas em vinhaça demonstraram um maior teor destes fitohormônios, o que pode estar associado ao fato deste meio ser mais suscetível a mudanças bruscas, gerando por consequência um maior estresse as microalgas, o que pode acabar influenciado na produção desses compostos. Comparando com dados da literatura, é possível acreditar que os níveis de auxinas, principalmente nas cepas LBA 6 e 47 cultivadas em vinhaça, possam indicar uma potencial atividade bioestimulante destes microrganismos, sendo necessário realizar testes mais aprofundados para confirmar tal teoria.

De forma geral, é possível perceber que a vinhaça tem sim um potencial para ser utilizada no cultivo de microalgas, associando o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação desse resíduo com a geração de biomassa a fim de se extrair moléculas de interesse e o desenvolvimento de produtos, como biofertilizantes. Entretanto, para esse processo ser viável, é necessário escalonar o volume de vinhaça a uma quantidade proporcional àquela produzida

pela indústria sucroalcooleira, o que, embora possa ser um projeto vantajoso, também se mostra um desafio, pois neste resíduo mudanças que podem parecer pequenas, por exemplo em sua composição, já podem resultar em grandes impactos para as microalgas.

9. Bibliografia

Agwa OK, Ogugbue CJ, Williams EE. Research Article Field Evidence of *Chlorella vulgaris* Potentials as a Biofertilizer for *Hibiscus esculentus*. *Int J Agric Res*. 2017; 12 (4): 181–9.

Ahmad MU et al. *Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications*. 1. ed. Academic Press and AOCS Press, 2017.

Alcantara Jr. P. Espectroscopia molecular. **In:** Curso Física Moderna II – março, 2002, Belém – PA. Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Exatas e Naturais. Departamento de Física. 2002.

Ambati RR, Gogisetty D, Aswathanarayana RG, Ravi S, Bikkina PN, Bo L, Yuepeng S. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59 (12): 1880–902.

Andrade ET, Carvalho SRG, Souza LF. Programa Do Proálcool E O Etanol No Brasil. *Engevista*. 2010; 11(2): 127–36.

Angelini F, Bellini E, Marchetti A, Salvatori G, Villano M, Pontiggia D, et al. Efficient utilization of monosaccharides from agri-food byproducts supports *Chlorella vulgaris* biomass production under mixotrophic conditions. *Algal Res*. 2024; 77:103358. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103358>

Begum H, Yusoff FM, Banerjee S, Khatoon H, Shariff M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016; 56 (13): 2209–22.

Bhattacharya M, Goswami S. Microalgae –A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2020; 25:101580. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101580>

Borowitzka MA, Vonshak A. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *Eur J Phycol.* 2017; 52 (4): 407–18. Available from: <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>

Breuer G, Lamers PP, Martens DE, Draaisma RB, Wijffels RH. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour Technol.* 2012; 124: 217–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>

Bropp, Camille. “À base de microalgas, biofertilizante orgânico mostra caminhos para esse insumo agrícola”. **Ciência UFPR**, 2020. Disponível em: <<https://ciencia.ufpr.br/portal/a-base-de-microalgas-biofertilizante-organico-mostra-caminhos-para-esse-insumo-agricola/>>. Acesso em: 05 de setembro de 2023.

Bustillos Oscar V. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas – GC/MS. *Revista Analytica*, 2020. Disponível em: <<https://revistaanalytica.com.br/a-cromatografia-a-gas-acoplada-a-espectrometria-de-massas-gc-ms/>>.

Candido C, Lombardi AT. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. *Algal Res* [Internet]. 2018; 30: 79–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.005>

Carpanez TG, Moreira VR, Assis IR, Amaral MCS. Sugarcane vinasse as organo-mineral fertilizers feedstock: Opportunities and environmental risks. *Sci Total Environ* [Internet]. 2022; 832:154998. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154998>

Chandra R, Pradhan S, Patel A, Ghosh UK. An approach for dairy wastewater remediation using mixture of microalgae and biodiesel production for sustainable transportation. *J Environ Manage.* 2021; 297:113210. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113210>

Chandrasekhar K, Raj T, Ramanaiah S V., Kumar G, Banu JR, Varjani S, et al. Algae biorefinery: A promising approach to promote microalgae industry and waste utilization. *J Biotechnol* [Internet]. 2022; 345: 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.12.008>

Christofolletti CA, Escher JP, Correia JE, Marinho JFU, Fontanetti CS. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Waste Manag.* 2013; 33 (12): 2752–61.

Cinq-Mars M, Bourdeau N, Marchand P, Desgagné-Penix I, Barnabé S. Characterization of two microalgae consortia grown in industrial wastewater for biomass valorization. *Algal Res.* 2022; 62: 102628.

Correia M, Martins I, Henriques AG, Delgadillo I, Nunes A. FTIR and Raman Spectroscopy Applied to Dementia Diagnosis Through Analysis of Biological Fluids. *J Alzheimer's Dis.* 2016; 52: 801–12.

Davis R, Mauer L. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Curr Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microb Biotechnol A Méndez-Vilas* [Internet]. 2010; 2 (1): 1582–94.

Do TC Van, Tran DT, Le TG, Nguyen QT. Characterization of Endogenous Auxins and Gibberellins Produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under Phototrophic and Mixotrophic Cultivation Modes toward Applications in Microalgal Biorefinery and Crop Research. *J Chem.* 2020; 2020: 1- 11

Dodds ED, McCoy MR, Rea LD, Kennish JM. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. *Lipids.* 2005; 40(4): 419–28.

Dragone G. Challenges and opportunities to increase economic feasibility and sustainability of mixotrophic cultivation of green microalgae of the genus *Chlorella*. *Renew Sustain Energy Rev.* 2022;160:112284. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112284>

Elakbawy WM, Shanab SMM, Shalaby EA. Biological activities and plant growth regulators producing from some microalgae biomass cultivated in different wastewater concentrations. *Biomass Convers Biorefinery*. 2023; 13(9): 8075–88. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01610-x>

Etanol: entenda o que é, para que serve e como é usado no Brasil! **Raízen**, 2022. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/blog/etanol>>. Acesso em: 06 de setembro de 2023.

Evert, Ray Franklin; EICHHORN, Susan E. *Biologia vegetal*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

Falconí JHH, Soares J, Rocha DN, Gomes Marçal Vieira Vaz M, Martins MA. Strain screening and ozone pretreatment for algae farming in wastewaters from sugarcane ethanol biorefinery. *J Clean Prod*. 2021; 282.

Ferreira GF, Ríos Pinto LF, Maciel Filho R, Fregolente L V. Effects of cultivation conditions on *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus* sp. grown in sugarcane agro-industry residues. *Bioresour Technol*. 2021; 342: 125949.

Fonseca, Gabriel de Castro. *Modelagem e simulação de uma destilaria autônoma de produção de etanol de primeira geração (E1G)*. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

FONTENELLE, M. R. *Biofertilizante Hortbio®: propriedades agronômicas e instruções para o uso*. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. 11 p. (Circular Técnica 162)

Franceschini IM, Burliga AL, Reviers BD, Prado JF, Rézig SH. *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. 2009. 1st ed. Porto Alegre: Artmed.

Franco ALC, Lôbo IP, Da Cruz RS, Teixeira CMLL, De Almeida Neto JA, Menezes RS. Biodiesel De Microalgas: Avanços E Desafios. *Quim Nova*. 2013; 36 (3):437–48.

Fuess LT, Rodrigues IJ, Garcia ML. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* [Internet]. 2017; 52(11): 1063–72. Available from: <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1338892>

Gharagozloo PE, Drewry JL, Collins AM, Dempster TA, Choi CY, James SC, et al. Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy*. 2019; 9 (4): 1–22. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/4/192>

Ghiraldelli, Gabriela e Freua, Salma. “Importação de fertilizantes pelo Brasil aumenta 440% de 1998 a 2021”. **CNN Brasil**, 08 jun. 2022. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/business/importacao-de-fertilizantes-pelo-brasil-aumenta-440-de-1998-a-2021/>>. Acesso em: 16 out. 2022.

Gilio L, de Moraes MAFD. Sugarcane industry’s socioeconomic impact in São Paulo, Brazil: A spatial dynamic panel approach. *Energy Econ* [Internet]. 2016; 58: 27–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2016.06.005>

Gonçalves AL. The use of microalgae and cyanobacteria in the improvement of agricultural practices: A review on their biofertilising, biostimulating and biopesticide roles. *Applied Sciences*. 2021; 11.

Hamidian N, Zamani H. Biomass production and nutritional properties of *Chlorella sorokiniana* grown on dairy wastewater. *J Water Process Eng*. 2022; 47:102760. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102760>

Han X, Zeng H, Bartocci P, Fantozzi F, Yan Y. Phytohormones and Effects on Growth and Metabolites of Microalgae: A Review. *Fermentation* [Internet]. 2018; 4 (2): 25.

Hernández-García A, Velásquez-Orta SB, Novelo E, Yáñez-Noguez I, Monje-Ramírez I, Orta Ledesma MT. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019; 174: 435–44.

Hussain F, Shah SZ, Ahmad H, Abubshait SA, Abubshait HA, Laref A, et al. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. *Renew Sustain Energy Rev.* 2021; 137:110603. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>

Jha UC, Nayyar H, Siddique KHM. Role of Phytohormones in Regulating Heat Stress Acclimation in Agricultural Crops. *J Plant Growth Regul.* 2021

JUDD, W.S; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2009. *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3rd ed. Porto Alegre: Artmed.

Kapoor R; Huang YS. Gamma Linolenic Acid: An Antiinflammatory Omega-6 Fatty Acid, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2006; 7 (6): 531-534. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/138920106779116874>

Khan SA, Sharma GK, Malla FA, Kumar A, Rashmi, Gupta N. Microalgae based biofertilizers: A biorefinery approach to phycoremediate wastewater and harvest biodiesel and manure. *J Clean Prod.* 2019; 211:1412–9.

Khoeyi ZA, Seyfabadi J, Ramezanpour Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquac Int.* 2012; 20 (1): 41–9.

Khozin-Goldberg, I. Lipid Metabolism in Microalgae. *In: Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA. The Physiology of Microalgae.* Springer, 2016.p. 413-484

Kumaran M, Palanisamy KM, Bhuyar P, Maniam GP, Rahim MHA, Govindan N. Agriculture of microalgae *Chlorella vulgaris* for polyunsaturated fatty acids (PUFAs) production employing palm oil mill effluents (POME) for future food, wastewater, and energy nexus. *Energy Nexus*. 2023; 9: 100169.

Lamb TI, Berghahn E, Pita FM, de Oliveira Neves L, dos Reis Blasi ÉA, Hofstetter JS, et al. Isolation and selection of microalgae capable of stimulating rice plant development and seed production. *Algal Res*. 2023; 74: 103203.

Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc*. 2006;1 (1): 387–96.

Lu Y and Xu J. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? *Trends Plant Sci*. 2015; 20 (5): 273–82.

Maldaner L, Jardim ICSF. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Sci Chromatogr*. 2012; 4 (3):197–207.

Maltsev Y, Maltseva K. Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 2021; 20(2): 515–547.

Melo, Bruno Costa Val de. Triagem baseada em metabolite footprint de cepas de microalgas para a biorremediação de vinhaça de cana-de-açúcar. 2023. Dissertação (Mestrado em Botânica)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Meng Y, Yao C, Xue S, Yang H. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresour Technol*. 2014; 151: 347–54.

Metsoviti MN, Papapolymerou G, Karapanagiotidis IT, Katsoulas N. Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*. 2020; 9 (1): 1–17.

Monteiro LdFR, Giraldi LA, Winck FV. From Feasting to Fasting: The Arginine Pathway as a Metabolic Switch in Nitrogen-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cells*. 2023; 12(10): 1379. <https://doi.org/10.3390/cells12101379>

Moraes BS, Zaiat M, & Bonomi A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 44: 888–903.

Moran-Salazar RG, Sanchez-Lizarraga AL, Rodriguez-Campos J, Davila-Vazquez G, Marino-Marmolejo EN, Dendooven L, et al. Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *Springerplus*. 2016; 5 (1):1007.

Moreira VR, Carpanez TG, Santos FS dos, Santos LS, Fernandes D dos S, França-Neta LS, et al. Circular economy in biorefineries: Scale-up of anaerobic/aerobic membrane bioreactors for vinasse recycling. *J Clean Prod*. 2022; 377:134448.

Morocho-Jácome AL, Ruscinc N, Martinez RM, de Carvalho JCM, Santos de Almeida T, Rosado C, Costa JG, Velasco MVR, Baby AR. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020; 104 (22): 9513–22.

Nascimento, Ronaldo Ferreira do et al. *Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos*. E-book. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. 334 p. (Estudos da Pós- Graduação). Disponível em: <<http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/39260>>.

Nagappan S, Devendran S, Tsai PC, Jayaraman H, Alagarsamy V, Pugazhendhi A, et al. Metabolomics integrated with transcriptomics and proteomics: Evaluation of systems reaction to nitrogen deficiency stress in microalgae. *Process Biochem*. 2020; 91: 1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.027>

Nagappan S, Kumar G. Investigation of four microalgae in nitrogen deficient synthetic wastewater for biorefinery based biofuel production. *Environ Technol Innov*. 2021; 23: 101572. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101572>

Nehela Y, Hijaz F, Elzaawely AA, El-Zahaby HM, Killiny N. Phytohormone profiling of the sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) leaves and roots using GC-MS-based method. *J Plant Physiol.* 2016; 199: 12–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.005>

Nelson, D.L; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nezafatian E, Farhadian O, Yegdaneh A, Safavi M, Daneshvar E, Bhatnagar A. Enhanced production of bioactive compounds from marine microalgae *Tetraselmis tetraele* under salinity and light stress: A two-stage cultivation strategy. *Bioresour Technol.* 2023;128899. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128899>

Nwoba EG, Parlevliet DA, Laird DW, Alameh K, Moheimani NR. Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. *Algal Res.* 2019; 39: 101433. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101433>

Okeke ES, Ejeromedoghene O, Okoye CO, Ezeorba TPC, Nyaruaba R, Ikechukwu CK, et al. Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. *Energy Convers Manag X* [Internet]. 2022; 16:100323. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecmx.2022.100323>

Pagels F, Pereira RN, Vicente AA, Guedes AC. Extraction of pigments from microalgae and cyanobacteria-a review on current methodologies. *Appl Sci.* 2021; 11 (11): 5187.

Pan YY, Wang ST, Chuang L Te, Chang YW, Chen CNN. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresour Technol.* 2011; 102(22): 10510–7

Parab NDT and Tomar V. Raman Spectroscopy of Algae: A Review. *J Nanomed Nanotechnol.* 2012; 3 (2):131.

Pereira H, Barreira L, Figueiredo F, Custódio L, Vizetto-Duarte C, Polo C, Rešek E, Engelen A, Varela J. Polyunsaturated Fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*. 2012; 10 (9): 1920–35.

Pessôa LC, Cruz EP, Deamici KM, Andrade BB, Carvalho NS, Vieira SR, et al. A review of microalgae-based biorefineries approach for produced water treatment: Barriers, pretreatments, supplementation, and perspectives. *J Environ Chem Eng*. 2022; 10(4): 108096

Pichler G, Stöggli W, Candotto Carniel F, Muggia L, Ametrano CG, Holzinger A, et al. Abundance and Extracellular Release of Phytohormones in Aero-terrestrial Microalgae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) As a Potential Chemical Signaling Source¹. *J Phycol*. 2020 Oct; 56 (5): 1295–307.

Piccollo M, Aceto M, Vitorino T. UV-Vis spectroscopy. *Phys Sci Rev*. 2019; 4 (4):1–14.

Pinto LFR, Ferreira GF, Tasic M. Cultivation techniques. In: Galanakis CM, editor. **Microalgae: Cultivation, Recovery of Compounds and Applications**. Academic Press; 2021. p. 1–33.

Plaza BM, Gómez-Serrano C, Acién-Fernández FG, Jimenez-Becker S. Effect of microalgae hydrolysate foliar application (*Arthrospira platensis* and *Scenedesmus sp.*) on *Petunia x hybrida* growth. *J Appl Phycol*. 2018; 30 (4).

Produção de açúcar: conheça suas etapas e como funciona na Raízen. **Raízen**, 2022. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/blog/producao-acucar>>. Acesso em: 06 de setembro de 2023.

Querido W, Kandel S, Pleshko N. Applications of Vibrational Spectroscopy for Analysis of Connective Tissues. *Molecules*. 2021; 26 (922): 1-31.

Rawlinson C, Kamphuis LG, Gummer JPA, Singh KB, Trengove RD. A rapid method for profiling of volatile and semi-volatile phytohormones using methyl chloroformate derivatisation and GC–MS. *Metabolomics*. 2015; 11(6): 1922–33.

Renuka N, Guldhe A, Prasanna R, Singh P, Bux F. Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol Adv*. 2018; 36 (4): 1255–73.

Renuka N, Prasanna R, Sood A, Ahluwalia AS, Bansal R, Babu S, et al. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environ Sci Pollut Res*. 2016; 23(7): 6608–20.

Reshma R, Chitra Devi K, Dinesh Kumar S, Santhanam P, Perumal P, Krishnaveni N, et al. Enhancement of pigments production in the green microalga *Dunaliella salina* (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresour Technol Reports*. 2021; 14: 100672. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100672>

Rocha RP, Machado M, Vaz MGMV, Vinson CC, Leite M, Richard R, et al. Exploring the metabolic and physiological diversity of native microalgal strains (Chlorophyta) isolated from tropical freshwater reservoirs. *Algal Res*. 2017; 28: 139–50.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2009; 102(1): 100–12.

Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey JL, Guillardme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications. *J Chromatogr A*. 2013; 1292: 2–18.

Romanenko KO, Kosakovskaya IV, Romanenko P. Phytohormones of Microalgae: Biological Role and Involvement in the Regulation of Physiological Processes. Pt II. Cytokinins and Gibberellins. *Int J Algae*. 2016; 18(2):179–201.

Saha M, Rempt M, Grosser K, Pohnert G, Weinberger F. Surface-associated fucoxanthin mediates settlement of bacterial epiphytes on the rockweed *Fucus vesiculosus*. *Biofouling*. 2011; 27 (4):423–33.

Sajjadi B, Chen WY, Raman AAA, Ibrahim S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renew Sustain Energy Rev*. 2018; 97: 200–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>

Santana H, Cereijo CR, Teles VC, Nascimento RC, Fernandes MS, Brunale P, et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresour Technol*. 2017; 228:133 – 140.

Santhana Kumar V, Das Sarkar S, Das BK, Sarkar DJ, Gogoi P, Maurye P, et al. Sustainable biodiesel production from microalgae *Graesiella emersonii* through valorization of garden wastes-based vermicompost. *Sci Total Environ*. 2022; 807: 150995.

Sharma A, Ramakrishnan M, Khanna K, Landi M, Prasad R, Bhardwaj R, Zheng B. Brassinosteroids and metalloids: Regulation of plant biology. *J Hazard Mater*. 2022; 424: 127518.

Siddiki SYA, Mofijur M, Kumar PS, Ahmed SF, Inayat A, Kusumo F, et al. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. *Fuel* [Internet]. 2022; 307:121782. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121782>

Silambarasan S, Logeswari P, Sivaramakrishnan R, Incharoensakdi A, Cornejo P, Kamaraj B, et al. Removal of nutrients from domestic wastewater by microalgae coupled to lipid augmentation for biodiesel production and influence of deoiled algal biomass as biofertilizer for *Solanum lycopersicum* cultivation. *Chemosphere*. 2021; 268:129323.

Silva, Ednaldo Cirino da, et al. O uso de fertilizantes e seus impactos ambientais. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Curso Técnico em Química) - Escola Técnica Estadual Benedito Storani, Jundiaí, 2021.

Silva SC, Ferreira ICFR, Dias MM, Barreiro MF. Microalgae-Derived Pigments: A 10-Year Bibliometric Review and Industry and Market Trend Analysis. *Molecules*. 2020; 25 (15).

Singh R, Parihar P, Singh M, Bajguz A, Kumar J, Singh S, et al. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1–37.

Stirk WA & Van Staden J. Plant Growth Regulators in Seaweeds. *Sea Plants*. 2014; 71: 125–159.

Stirk WA, Ordog V, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Balint P, et al. Auxin and cytokinin relationships in twenty-four microalgae strains. *J Phycol*. 2013; 49 (3):459–67.

Subramaniam R, Dufreche S, Zappi M, Bajpai R. Microbial lipids from renewable resources: Production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010; 37(12): 1271–87.

Suchithra MR, Muniswami DM, Sri MS, Usha R, Rasheeq AA, Preethi BA, et al. Effectiveness of green microalgae as biostimulants and biofertilizer through foliar spray and soil drench method for tomato cultivation. *South African J Bot*. 2022; 146: 740–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.12.022>

Trevisan E, Godoy RFB, Radomski FAD, Crisigiovanni EL, Branco KBZF, Arroyo PA. *Chlorella vulgaris* growth in different biodigested vinasse concentrations: Biomass, pigments and final composition. *Water Sci Technol*. 2020; 82 (6): 1111–1119.

Vanthoor-Koopmans M, Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013; 135:142–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>

Velayudhan PK, Singh A, Srinivasa AK. Exploring the global research trends in biofertilizers: a bibliometric approach. 3 Biotech. 2021;11(6):304.

Vinitha V, Meignanalakshmi S, Tirumurugaan KG, Sarathchandra G, Meenakshi Sundaram S. Enhanced lipid production and analysis of properties of biodiesel produced from freshwater microalgae *Scenedesmus obtusus* ON089666.1. Bioresour Technol Reports [Internet]. 2022: 101286. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101286>

Wellburn AR. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. J Plant Physiol. 1994; 144: 307–13.

Yang Q, Li H, Wang D, Zhang X, Guo X, Pu S, Guo R, Chen J. Utilization of chemical wastewater for CO₂ emission reduction: Purified terephthalic acid (PTA) wastewater-mediated culture of microalgae for CO₂ bio-capture. Appl Energy. 2020; 276.

Yap BHJ, Crawford SA, Dagastine RR, Scales PJ, Martin GJO. Nitrogen deprivation of microalgae: effect on cell size, cell wall thickness, cell strength, and resistance to mechanical disruption. J Ind Microbiol Biotechnol. 2016; 43(12): 1671–80.

Yen HW, Hu IC, Chen CY, Ho SH, Lee DJ, Chang JS. Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. Bioresour Technol [Internet]. 2013; 135: 166–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>

Zhang L, Zhang L, Wu D, Wang L, Yang Z, Yan W, et al. Biochemical wastewater from landfill leachate pretreated by microalgae achieving algae's self-reliant cultivation in full wastewater-recycling chain with desirable lipid productivity. Bioresour Technol [Internet]. 2021; 340:125640. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125640>