

CULTIVO DE *CHLORELLA VULGARIS* EM VINHAÇA FILTRADA

THE GROWTH OF *CHLORELLA VULGARIS* IN FILTERED VINSASSE

Camila Candido

Departamento de Botânica –
Universidade Federal de São
Carlos (UFSCAR) - São Carlos/SP –
Brasil

cacandido90@gmail.com

Lombardi, A.T.

Lima, M.I.S.

RESUMO

A vinhaça é um efluente da produção de etanol e seu descarte acarreta problemas para as usinas sucroalcooleiras. Devido à riqueza em nutrientes, ela é reutilizada no solo no cultivo da cana-de-açúcar, de acordo com limites impostos pela legislação. Considerando que o cultivo de microalgas requer meio rico em nutrientes, a vinhaça pode ser promissora para tal finalidade, excetuando-se seu baixo pH e alta turbidez. A filtragem em argila tipo esmectita e carvão ativado reduziu a turbidez da vinhaça em 65% e elevou o pH de 4,5 para 5,4. O cultivo da alga *Chlorella vulgaris* em concentrações de 20%, 30% e 40% de filtrado diluído em água destilada mostrou que as maiores taxas de crescimento (0,563 - 0,526 dia⁻¹) foram obtidas a 30% - 40%, enquanto não houve crescimento em qualquer concentração testada de vinhaça bruta. Esses resultados são um avanço no uso de resíduos para o cultivo de microalgas.

Palavras chave: microalgas; efluentes; filtragem

ABSTRACT

Sugar cane vinasse is a residue generated from ethanol production and its disposal is a problem for the producers. Due to its high nutrients content, it is used as fertilizer in the soil of the sugarcane crop, according to limits imposed by legislation. Vinasse can be used for the growth of microalgae, but because of its high turbidity and low pH, the growth of photosynthetic organisms is difficult. So, vinasse was treated before its use as microalgae culture medium. Smectite clay and activated carbon were used as filtering agents and resulted in approximately 65% decrease of vinasse turbidity and increased its pH, from pH 4.5 to 5.4. We tested several dilutions of the filtrate and quantified the growth parameters of *Chlorella vulgaris* at vinasse concentrations of 20%, 30% and 40% of the filtrate that was diluted with distilled water. The results showed better growth rates in 30 – 40% vinasse (0.563 – 0.526 day⁻¹); no algae growth was obtained in vinasse in natura. The present results are an advance in the use of a residue produced in large quantity to support microalgae growth.

Keywords: microalgae; effluent; filtering

INTRODUÇÃO

No Brasil, a vinhaça é um resíduo oriundo da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado para a produção de etanol e açúcar pelas indústrias sucroalcooleiras. São produzidos de 12 – 18 L de vinhaça por litro de etanol gerado (EMBRAPA, 2013). Com a expectativa de aumento da produção de álcool no país (BRASIL, 2007), a geração de vinhaça deverá aumentar.

A vinhaça constitui-se em líquido espesso, turvo e com elevada quantidade de material particulado, cujo descarte é controlado pela legislação devido a seu alto poder poluente, que é cerca de cem vezes maior do que o do esgoto doméstico (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). O excesso de matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e grande quantidade de sais são os responsáveis pela carga poluente. Além disso, a temperatura elevada de geração desse resíduo é nociva à fauna, flora, microfauna e microflora das águas receptoras (FREIRE; CORTEZ, 2000) e, por isso, antes de seu descarte ou aplicação, procede-se o resfriamento, que normalmente é feito de modo natural. Com base nessas características, em 29/11/1978, foram criadas as portarias nº 323 e 158 do extinto Ministério do Interior (BRASIL, 1978; BRASIL, 1980) proibindo seu lançamento em corpos d'água e obrigando as indústrias a buscarem por novas formas de descarte.

Esse resíduo é rico em nutrientes minerais como K, Ca e Mg (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007), essenciais ao desenvolvimento vegetal, mas sua composição varia conforme a origem (ROSSETO, 1987), sendo mais nutritiva quando originada do mosto de melaço, em comparação ao mosto de caldo de cana. Por suas propriedades nutritivas e conteúdo de materiais orgânicos, a vinhaça é usada na fertirrigação dos solos de cultivo da própria cana-de-açúcar, beneficiando as usinas (LUDOVICE; VIEIRA; GUIMARÃES, 2005). Entretanto, devido ao potencial poluidor da vinhaça ao solo e lençóis freáticos (JUNQUEIRA *et al.*, 2009), esse uso exige regulamentação e atualmente normas específicas (CETESB, 2015) são obedecidas. Portanto, novas formas para o uso e descarte da vinhaça são necessárias e vêm de encontro à necessidade de produções ecologicamente sustentáveis junto à preservação dos recursos hídricos.

Microalgas fotossintéticas necessitam de nutrientes minerais e luz para seu desenvolvimento, uma vez que é através da fotossíntese que se processa a incorporação do CO₂ em biomassa. Esses microrganismos formam a base de cadeias alimentares em ecossistemas aquáticos e, sendo o alimento natural para peixes e zooplâncton são os produtores desses ecossistemas, com grande importância na aquicultura (LOURENÇO, 2006). As microalgas fotossintéticas são produtoras de ácidos graxos poli-insaturados (FERREIRA *et al.*, 2013; CHIA *et al.* 2013; MINH HIEN *et al.*, 2014) e encontram inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos, assim como alimentos funcionais. Segundo Borowitzka (2014), são também fonte de carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e outras substâncias bioativas. Mas, apesar das várias aplicações, a produção de microalgas padece ainda de elevado custo e sua viabilidade comercial e industrial é restrita a poucas espécies, cujos produtos finais apresentam elevado valor agregado, tal como a microalga *Chlorophyceae Haematococcus pluvialis*, produtora do potente antioxidante carotenóide, a astaxantina (XAVIER *et al.*, 2014).

Uma das maneiras para baixar o custo de cultivos comerciais de microalgas é o uso de efluentes residuais como base para o meio de cultivo. Em pesquisa pioneira, Oliveira (1988) investigou o crescimento de *Chlorella vulgaris* em meio contendo vinhaça, mostrando a viabilidade de cultivo mixotrófico da espécie em culturas com até 0,3% de vinhaça. Mitra *et al.* (2012), usaram a mesma espécie algal e demonstraram sua capacidade mixotrófica em cultivo no sobrenadante de vinhaça oriunda do processamento de milho e em soro de leite de soja. Segundo os autores, o crescimento de *C. vulgaris* foi superior na vinhaça em comparação ao soro de leite de soja, além da porcentagem de lipídeos na biomassa também ser superior na vinhaça, indicando possibilidade de uso desse resíduo para a finalidade de crescimento algal.

Estudos recentes mostram o caráter promissor quanto ao uso de vinhaça para o cultivo de microalgas. Ramirez *et al.* (2014) cultivaram *Scenedesmus sp.* em diferentes concentrações de vinhaça e obtiveram crescimento algal em concentrações de até 40% de vinhaça. Os autores constataram que quanto maior era a concentração de vinhaça, mais

luz e maior temperatura eram requeridas. Colla *et al.* (2014) suplementaram o meio inorgânico Scholösser (SCHOLÖSSER, 1982) com até 5 mg.L⁻¹ de vinhaça oriunda da produção de álcool de beterraba, e obtiveram intensificação da produção de biomassa e da porcentagem proteica da microalga.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a viabilidade do cultivo da microalga *Chlorophyta*, *Chlorella vulgaris* em vinhaça, de modo a aproveitar seu potencial nutritivo para a geração de biomassa rica em biomoléculas e, simultaneamente, minimizar o potencial poluidor do resíduo. Foi utilizada uma técnica de filtração de baixo custo como tratamento prévio da vinhaça. Os resultados mostraram que, melhorando as condições do efluente residual, a microalga foi cultivada com sucesso em vinhaça 30 - 40%, diluída com água destilada e sem o acréscimo de nutrientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamento da vinhaça

A vinhaça utilizada no trabalho foi coletada em final de safra na Usina da Serra – Unidade Cosan, município de Ibaté (SP). Na usina, o efluente é armazenado em tanques a céu aberto até ser utilizado pelas usinas na fertirrigação. Do tanque de armazenamento foi feita a coleta da vinhaça para posterior uso em laboratório.

Nesta pesquisa foram realizados cultivos da microalga *Chlorella vulgaris* em vinhaça filtrada e vinhaça *in natura*. A filtração da vinhaça foi feita usando-se sistemas elaborados com Erlenmeyers de 500 ml sob funil de vidro revestido internamente com papel de filtro. Como materiais adsorventes para a filtração da

vinhaça, foram usados carvão ativado (Synth, Brasil) e argila esmectita. Em um funil foi depositado 56 g (50 mL) de argila esmectita, preenchendo cerca de dois terços da altura do funil e, em outro recipiente, 13 g (50 mL) de carvão ativado, ambos usados na forma em que são comercializados. Após filtração em argila seguida da filtração em carvão, a turbidez do efluente foi quantificada em espectrofotômetro FEMTO Scan® 800 XI (Brasil), visto que quanto menor a turbidez, tanto mais luz será disponibilizada para as microalgas em cultura. Água destilada, transparência de 100%, foi usada para a calibração do espectrofotômetro.

Cultivo da microalga

A cepa de *Chlorella vulgaris* utilizada nos experimentos é mantida no banco de culturas do Laboratório de Biotecnologia de Algas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos e foi isolada de ambiente com alto conteúdo orgânico. A microalga foi cultivada em vinhaça filtrada e diluída em água destilada nas concentrações de 20%, 30% e 40% de vinhaça. As culturas foram mantidas em Erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de vinhaça filtrada e diluída. Os tratamentos foram feitos com 3 réplicas experimentais e os frascos Erlenmeyers foram vedados com tampões de algodão e gaze, os quais permitem a troca gasosa, mas não a passagem de partículas. O cultivo controle foi feito usando-se meio de cultura sintético LC Oligo (AFNOR, 1980). Esse meio é recomendado para cultivo de microalgas unicelulares de água doce em testes de toxicidade laboratoriais (CETESB 1992; IBAMA, 1990). A vinhaça diluída e o

meio LC Oligo, usados como meio de cultura algal, foram submetidos à esterilização em micro-ondas. O procedimento para esterilização constou de aquecimento em forno micro-ondas (Electrolux, Brasil) em potência máxima por 7 min, tempo suficiente para a solução entrar em ebulição e assim permanecer durante dez segundos.

Após a esterilização, os frascos foram deixados em temperatura ambiente (23°C) durante 24 h e, então, inoculados com *C. vulgaris* em fase exponencial de crescimento tendo densidade inicial nos cultivos de 10⁵ células mL⁻¹. Toda manipulação da cultura foi realizada em cabine de fluxo laminar (VECO, Brasil) para evitar a contaminação e somente materiais estéreis entraram em contato com as culturas. Os cultivos foram mantidos em condições de temperatura e luminosidade controladas (23 ± 2°C e 150 µmol fótons

$m^{-2} s^{-1}$). Para o acompanhamento do crescimento algal, amostras foram retiradas a cada dois dias, fixadas com solução de lugol ácido e usadas para contagem de células em câmara de contagem de Fuchs Rosenthal sob microscópio óptico (Biofocus).

Foram elaboradas curvas do crescimento algal em função do tempo experimental, utilizando-se o programa Origin Pro 8.5, através das quais foram obtidos os valores de taxas de crescimento. As taxas de crescimento específicas foram geradas a partir de regressão linear na fase exponencial de crescimento

após plotar-se o logaritmo natural do número de células mL^{-1} na cultura. O coeficiente angular da equação de regressão linear representa a taxa de crescimento específica. Os valores médios das taxas de crescimento para cada tratamento com filtrado de vinhaça, vinhaça bruta e meio LC Oligo foram comparados estatisticamente pelos testes paramétricos ANOVA, que analisa significância entre diversas médias, e Tukey, que compara esses valores médios dois a dois, utilizando-se, para isso, o programa R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a filtragem da vinhaça através da combinação argila esmectita *Kets* seguida de carvão ativado foi positiva para a finalidade de cultivo algal, resultando em clareamento do efluente residual e aumento do pH da vinhaça, que passou de 4,43 para 5,41 após a filtragem. Com a combinação usada nesta pesquisa, obteve-se transparência de cerca 70% no filtrado de vinhaça em comparação com água destilada. De acordo com Marinho *et al.* (2011), o pH 5,41 é próximo ao necessário para o desenvolvimento de *Chlorella vulgaris*, a qual se desenvolve bem em pH neutro ou levemente ácido, com valores entre 5,0 e 7,0.

Segundo Silva e Ferreira (2008), as argilas tipo esmectita organofílicas podem ser utilizadas como

materiais adsorventes, pois exibem elevada capacidade de remover contaminantes hidrofóbicos presentes em soluções aquosas e, por isso são agentes promissores no auxílio do controle ambiental e na redução de lixiviação, fotodegradação e volatilização de herbicidas. As argilas esmectitas são comumente usadas como adsorventes para remoção de p-nitrofenol e p-clorofenol, compostos fenólicos usados na indústria farmacêutica e petroquímica (PAIVA *et al.*, 2008)

As figuras 1, 2 e 3 mostram as curvas de crescimento da microalga no meio de cultura LC Oligo (controle) e vinhaça filtrada e bruta, sendo que a figura 1 apresenta os resultados das vinhaças 20%, a figura 2, das vinhaças 30%, e a figura 3, das vinhaças 40%.

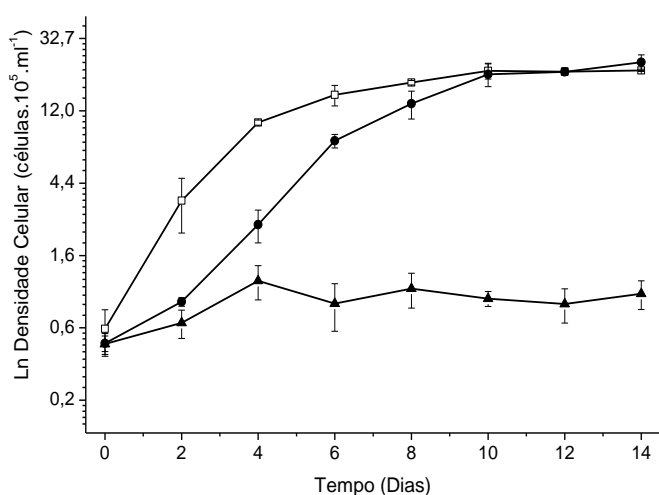


Figura 1: Logaritmo natural (Ln) dos valores médios de densidades celulares de *Chlorella vulgaris* em meio Oligo (Controle) (□), em filtrado de vinhaça 20% (●) e em vinhaça bruta 20% (▲).

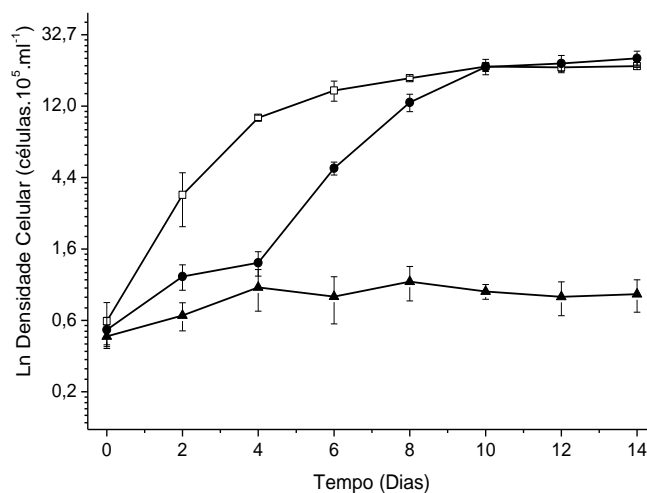


Figura 2: Logaritmo natural (Ln) dos valores médios de densidades celulares de *Chlorella vulgaris* em meio Oligo (Controle) (□), em filtrado de vinhaça 30% (●) e em vinhaça bruta 30% (▲).

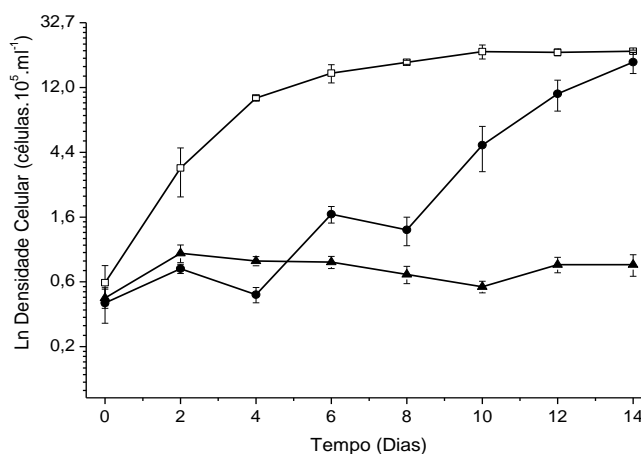


Figura 3: Logaritmo natural (Ln) dos valores médios de densidades celulares de *Chlorella vulgaris* em meio Oligo (Controle) (□), em filtrado de vinhaça 40% (●) e em vinhaça bruta 40% (▲).

A tabela 1 resume os valores médios das taxas de crescimento para cada um dos tratamentos controle, com vinhaça filtrada ou bruta nas concentrações testadas.

Tabela 1: Valores de taxas de crescimento (dia⁻¹) médios com seus respectivos desvios padrões para cada um dos tratamentos com vinhaça tratada ou bruta nas concentrações de 20%, 30% e 40%. Os controles corresponderam a 100% de Meio LC Oligo. Letras maiúsculas sobrescritas iguais indicam ausência de diferença significativa entre os valores.

Tratamento	20%	30%	40%
Meio LC Oligo	0,721 ^A ± 0,082 dia ⁻¹	0,721 ^A ± 0,082 dia ⁻¹	0,721 ^A ± 0,082 dia ⁻¹
Filtrado de Vinhaça	0,556 ^B ± 0,036 dia ⁻¹	0,563 ^B ± 0,014 dia ⁻¹	0,526 ^B ± 0,070 dia ⁻¹
Vinhaça bruta	0,215 ^C ± 0,064 dia ⁻¹	0,166 ^C ± 0,078 dia ⁻¹	0,141 ^C ± 0,026 dia ⁻¹

Esses resultados mostram não haver diferença significativa nas taxas de crescimento para as várias concentrações de vinhaça usadas, mas sim para a densidade final de células. Na vinhaça 30% foi obtida a maior densidade celular no meio de cultura, em comparação com as outras condições testadas. Foi observado que o crescimento da microalga na vinhaça bruta, ainda que diluída, foi 50% menor em comparação com a mesma concentração de vinhaça filtrada. Vários resultados na literatura têm mostrado o crescimento de microalgas em vinhaça diluída. Cultivando *Chlorella vulgaris* em vinhaça diluída (0,1%), Oliveira (1988) mostrou que houve crescimento da espécie nesse meio tanto em condições mixotróficas quanto heterotróficas, havendo melhora dos resultados com adição de ureia como fonte de nitrogênio. Entretanto, segundo a própria autora, essa composição do meio contendo o resíduo, apesar de vantajosa para o crescimento algal, não constitui uma maneira ambientalmente sustentável para o descarte da vinhaça pela baixa concentração utilizada.

Apesar de *Chlorella vulgaris* ser considerada uma espécie robusta (MARCHELLO, 2013), sendo usada para o tratamento de efluente secundário de esgoto doméstico (ALVES, 2011), seu crescimento na vinhaça deu-se majoritariamente após a filtração e diluição do resíduo, concordando com a maioria dos resultados da literatura que indicam necessidade de tratamento prévio desse material. Marques (2013) apresenta um tratamento anaeróbio da vinhaça que otimiza o cultivo algal com a diluição de 25% em comparação à vinhaça sem tratamento. Já Mitra *et al.* (2012) conseguiram realizar o cultivo de *C. vulgaris* em sobrenadante de vinhaça de milho com elevadas quantidades de lipídeos gerados, utilizando para tanto o processo de decantação do material. Coca *et al.* (2014) conseguiram obter crescimento algal da mesma espécie com meio apenas suplementado com vinhaça, utilizando para isso quantidades bastante reduzidas do resíduo, de até 5 g. L⁻¹. Esses resultados confirmam que a vinhaça apresenta um potencial inibidor do crescimento algal devido a sua elevada toxicidade (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

As culturas de *C. vulgaris* mantidas em vinhaça diluída, qualquer que tenha sido sua concentração, apresentaram contaminação por fungos e bactérias, mostrando que a esterilização inicial em micro-ondas foi insuficiente para livrar o meio dos microorganismos heterotróficos. Rica em matéria orgânica, a vinhaça é ideal para o crescimento de microrganismos heterótrofos, já que utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Segundo Paula (2010) os microrganismos heterotróficos modificam a vinhaça tanto em termos qualitativos como quantitativos, pois são degradadores de materiais orgânicos, podendo liberar com isso elementos nutritivos inorgânicos.

Apesar dessa contaminação, constatou-se que o tratamento de filtração proposto neste trabalho possibilitou o crescimento de *C. vulgaris* em concentrações de vinhaça relativamente elevadas (de até 40%), se comparadas com os resultados da literatura aqui apresentados.

CONCLUSÃO

Esta pesquisa apresenta resultados de aplicação de uma técnica simples e de baixo custo de tratamento de vinhaça que possibilita seu uso para o cultivo algal. A filtração da vinhaça por meios porosos com elevada capacidade adsorvente melhorou as condições de turbidez e pH do resíduo, sendo que os melhores resultados foram conseguidos com filtração sequencial através de argila tipo esmectita e carvão ativado. Após diluição do filtrado, atingindo concentração de vinhaça tratada de 30%, deu-se o melhor cultivo e rendimento da microalga. Nessa condição, o rendimento final em 10 dias de cultivo foi de 2,2.10⁶ células.ml⁻¹, com taxa de crescimento de 0,563 dia⁻¹.

REFERÊNCIAS

- AFNOR – Association Française of Normalization. **Essais des eaux**. Determination of inhibition of *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme Experimentale T90-304, 1980.
- ALVES, L.S. **Aplicação de microalgas na remoção de nutrientes de efluente sanitário**. Trabalho de Conclusão do Curso. Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba. 42 p. 2011.
- BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 323, de 29 de novembro de 1978. [Proíbe o lançamento de vinhoto em coleções de água]. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília/ DF. Seção 1, p. 19456, 1978. Disponível em: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/bra14330.pdf>. Acessado em: 15. dez. 2015.
- BRASIL. Ministério do Interior. Portaria nº 158, de 03 de novembro de 1980. [Mantém proibição de lançamento direto ou indireto de vinhoto em qualquer coleção hídrica]. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília/DF. Seção 1, p. 22250, 1980. Disponível em: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/bra14334.pdf>. Acessado em: 15. dez. 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balanço da Cana-de-Açúcar e Agroenergia Nacional**. MAPA/SPA, Brasília, 140 p., 2007.
- BOROWITZKA, M.A. Tyge Christensen Prize 2012. **Phycologia**: v.. 53, n. 6, pp. 657-658, 2014.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. São Paulo: CETESB, 1992.
- CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Vinhaça – critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. 15 p., 3ª ed., 2ª versão, 2015. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/11/2013/11/P4.231_Vinha%C3%A7a_-Crit%C3%A9rios-e-procedimentos-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-no-solo-agr%C3%ADcola-3%C2%AA-Ed-2%C2%AA-VERS%C3%83O.pdf. Acessado em: 15.dez.2015.
- CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELAO, M. D. G. G.; PARRISH, C. C. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, n. 128, pp. 171-182, 2013.
- COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, 2014.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. **Processamento da cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html. Acessado em: 19 mar. 2013.
- FERREIRA, S.P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J.A.V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 36, n. 3, jul. 2013 .
- FREIRE, W. J.; CORTEZ, L. A. B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Guaíba: Agropecuária, 203p., 2000.
- JUNQUEIRA, C. A. R.; MOLINA JUNIOR, V. E.; LOSSARDO, L. F.; FELICIO, B.C.; MOREIRA JUNIOR, O.; MENDES, R. M.; LORANDI, R. Identificação do potencial de contaminação de aquíferos livres por vinhaça na bacia do Ribeirão do Pântano, Descalvado (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 39, n. 3, p. 507-518, setembro de 2009.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Ministério do Interior. Secretaria Especial do Meio Ambiente. Secretaria de Tecnologia e Controle Ambiental. Coordenadoria de Toxicologia Ambiental. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis**. Brasília, p. 351, 1990.
- LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 606 p., 2006.

LUDOVICE, M. T. F.; VIEIRA, D. B.; GUIMARÃES, J. R. Infiltração de Vinhaça em Canal de Terra: Alteração do Teor de Matéria Orgânica e Sais no Solo e na Água, **Sociedade Brasileira de Química**, 2005.

MARCHELLO, A. E. **Cultivo de microalgas e redução de coliformes em efluente de tratamento anaeróbio**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2013.

MARINHO, Y. F.; SANTOS, A. P. F.; VASCONCELOS, R. F. L.; KALAZANS, N. K. F.; NASCIMENTO, R. D. M.; DANTAS, D. M. M.; GÁLVEZ, A. O. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria prima do biodiesel. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Anais**. Recife / PE, 2011.

MARQUES, S. S. I. **Microalgas como matéria-prima para geração de biocombustíveis: uso da vinhaça como alternativa de redução de custos e contribuição à sustentabilidade**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

MINH HIEN, H. T.; TAM, L. T.; THOM, L. T.; HA, N. C.; HANH, L. H.; LAN ANH, H. T.; HONG, D. D. Study on total lipid and free fatty acids extraction from heterotrophic marine microalga *Schizochytrium mangrovei* PQ6. **Journal of Biology**, n. 35, v. 4, pp. 484-493, 2014.

MITRA, D.; VAN LEEUWEN, J. H.; LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. **Algal Research**, n. 1, v. 1, pp. 40-48, 2012.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP – 211 / 11b)**. Dissertação do Programa em Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 1988.

PAIVA, L. D.; MORALES, A. R.; DÍAZ, F. V. Argilas organofílicas: características, metodologias de preparação, compostos de intercalação e técnicas de caracterização. **Cerâmica**, n. 54, v. 330, pp. 213-226, 2008.

PAULA, S. N. C. **Biomonitoramento como instrumento de detecção de contaminantes ambientais**. Monografia do Curso de MBA em Planejamento e Gestão Ambiental. Universidade Veiga de Almeida, Vitória/ ES, 2010.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O.. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian archivment biology technology**, Curitiba , v. 57, n. 5, 2014.

ROSSETTO, A. J. Utilização agronômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: Paranhos, S.B. (ed.). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: **Fundação Cargill**, v.2, p.435-504, 2007.

SCHLÖSSER, U.G. Sammlung von Algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gessellschaft**, v. 95, pp. 181-276, 1982.

SILVA, A. R. V.; FERREIRA, H. C. Esmectitas organofílicas: conceitos, estruturas, propriedades, síntese, usos industriais e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 01-11. 2007.

SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Eng. Agrícola Ambiental**, v.11, n.1, p.108–114, 2007.

XAVIER, E. D. J.; AZEVEDO, J. M.; REIS, A.; TEVES, L.; MOTA, G.; NETO, A. I. Isolamento e seleção de estirpes locais de *Haematococcus pluvialis* Flotow para produção de astaxantina. **Biotecnologia**, n. 35, v. 5, 2014.