



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM
ENERGIA DA BIOMASSA



FRANCINE PIMENTEL DE ANDRADE

PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL A PARTIR DO SORO DO LEITE
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Rio Largo – AL, 2019

FRANCINE PIMENTEL DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL A PARTIR DO SORO DO LEITE
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Energia da Biomassa, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Energia da Biomassa, sob orientação da Professora Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida e coorientação do Professor Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva.

Catálogo na fonte Universidade Federal de Alagoas

Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias

Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

A277p Andrade, Francine Pimentel de.

Produção de biomassa microalgal a partir do soro do leite visando a produção de bioetanol. / Francine Pimentel de Andrade. – 2019. 24 f.; il.

Dissertação em Energia da Biomassa (Mestrado Profissional em Energia da Biomassa) – Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2019.

Orientação: Prof^{ra}. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida.

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva.

Inclui bibliografia

1. Tetrademus sp. 2. Remediação. 3. Tratamento de Efluentes. 4. Mixotrofia. I. Título

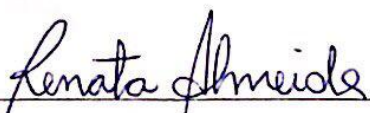
CDU: 620.91: 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

FRANCINE PIMENTEL DE ANDRADE

Produção de biomassa microalgal a partir do soro do leite visando a produção de bioetanol

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Energia da Biomassa da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 06 de agosto de 2019.



Prof^ª. Dra. Renata Maria Rosas Garcia
Almeida (Orientadora)

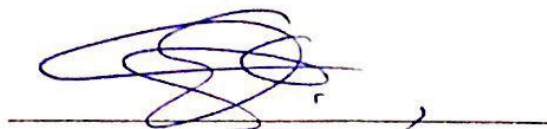


Professor Dr. Carlos Eduardo de Farias
Silva (Coorientador)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de
Amorim (Examinador Externo)



Prof. Dr. Elton Lima Santos (Examinador
Interno)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo direito a vida e a oportunidade de realizar esta importante etapa da minha vida.

Ao meu pai pelo apoio e incentivo de chegar ao fim desta formação. A minha amada mãe que sempre esteve ao meu lado me apoiando e por seu amor incondicional.

Aos meus filhos Loyse e Miguel que mesmo sem compreender a ausência da mãe sempre me receberam com sorrisos e abraços o que me motiva a seguir e lutar pelos meus objetivos sempre.

A Prof^a. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida pela orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador e amigo de longa data Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva pela orientação, paciência, amizade, carinho e dedicação para realização deste trabalho e em inúmeros momentos da minha vida.

A toda equipe do LTBA pelos ensinamentos e apoio nos experimentos.

As minhas amigas Lívia Manuela e Brígida Villar pelo carinho e apoio em momentos de frustração e dificuldades para realização desse trabalho.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta me ajudaram na realização dessa conquista, muito OBRIGADA!

*“Nem tão longe que eu não possa ver
Nem tão perto que eu possa tocar
Nem tão longe que eu não possa crer que um dia chego lá
Nem tão perto que eu possa acreditar que o dia já chegou...”*

(Engenheiros do Hawaii)

RESUMO

Diante do dilema do esgotamento das reservas de petróleo, a necessidade de redução da emissão de gases do efeito estufa (GEE) para a atmosfera, e a preocupação com o lançamento de efluentes urbanos/industriais/agroindustriais devidamente tratados no meio ambiente, muitos pesquisadores tem se concentrado em desenvolver tecnologias viáveis para produção de energia de fontes renováveis e ambientalmente corretas, a chamada energia verde. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade da produção de bioetanol a partir da biomassa da microalga *Tetradismus sp.* LCE-01 produzida através do cultivo mixotrófico em biorreator aberto associado a contaminantes naturais utilizando águas residuais geradas a partir da produção de queijo (soro do leite). As condições de cultivo ocorreram em diferentes concentrações de soro do leite, 0,5, 1, 2 e 4%, e diferentes intensidades de luz (50 e 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), pH básico e agitação constante. O soro do leite foi caracterizado com elevados teores de DQO (cerca de 88.000 mg L^{-1}), Nitrogênio Total (em torno de 1500 mg L^{-1}) e Fósforo (de 1800 mg L^{-1} em forma de fosfato). O aumento da concentração e maior intensidade de luz foram positivos na remoção de DQO (90%) e produção de biomassa (os máximos de peso seco da biomassa atingiram valores entre 500-600 mg L^{-1}). Foi verificado que a presença de bactérias não inibiu o crescimento das microalgas. Melhores taxas de remoção de Nitrogênio Total (80-85%) foram obtidas nos ensaios com menor intensidade de luz. Quase 100% de remoção de Fósforo Total foram alcançados nos ensaios com maior luminosidade e menor concentração. O teor de nitrogênio e fósforo em biomassa variou entre 3-13% e 1-4,5%, respectivamente. A simulação da produtividade máxima de etanol a partir da biomassa de microalga residual (60% de carboidratos) variou entre 6-10 mil $\text{L ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. Os resultados mostraram a alta potencialidade da *Tetradismus sp.* na remediação de efluente lácteo e como matéria prima para produção de bioetanol.

Palavras chaves: *Tetradismus sp.*, Remediação, Tratamento de Efluentes, Mixotrofia.

ABSTRACT

From the dilemma of the depletion of oil reserves, the need to reduce greenhouse gas (GHG) emissions to the atmosphere, and the concern with the release of properly treated urban/ industrial/agro-industrial effluents, many researchers have focused on developing viable technologies for producing energy from renewable and environmentally friendly sources, called green energy. In this context, the focus of this work was to evaluate the potentiality of bioethanol production from the microalgae *Tetradescmus sp.* LCE-01 produced through open bioreactor mixotrophic cultivation associated with natural contaminants using wastewater generated from cheese production (whey). Cultivation conditions occurred at different effluent concentrations, 0.5, 1, 2 and 4% (organic load), and different light intensities (50 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), basic pH and constant agitation. Whey was characterized by high levels of COD (about 88,000 mg L^{-1}), Total Nitrogen (about 1500 mg L^{-1}) and Phosphorus (1800 mg L^{-1} in phosphate form). Increased concentration and higher light intensity were positive in COD removal (90%) and biomass production (maximum dry weight of the biomass reached values between 500-600 mg L^{-1}). It was verified that the presence of bacteria did not inhibit the growth of microalgae. Better of Total Nitrogen removal rates (80-85%) were obtained in lower light intensity assays. Almost 100% of Total Phosphorus removal were achieved in the higher light intensity and lowest concentration assays. Nitrogen and phosphorus content in biomass ranged from 3-13% to 1-4.5%, respectively. The simulation of the maximum ethanol yield from residual microalgae biomass (considering 60% carbohydrate in dry biomass) ranged from 6-10 thousand $\text{L ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$. The results showed the high potentiality of *Tetradescmus sp.* in the remediation of whey and as raw material for bioethanol production.

Keywords: *Tetradescmus*, Remediation, Wastewater Treatment, Mixotrophy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma de obtenção do soro do leite a partir da produção do queijo coalho.	26
Figura 2 – Esquema simplificado de tratamento de águas residuárias pelo consórcio microalga-bactéria.	30
Figura 3 – Sistema de cultivo aberto (<i>open pond</i>).	32
Figura 4 – Sistema de cultivo fechado.	32
Figura 5 - Esquema estrutural simplificado da biomassa lignocelulósica.	41
Figura 6 – Sistema simplificado da sacarificação e fermentação da microalga para produção de etanol.	43
Figura 7 – Imagem de microscópio óptico da microalga <i>Tetrademus sp.</i> LCE-01 com aumento de 1000x.	45
Figura 8 – Esquema do sistema de tratamento utilizado no trabalho.	46
Figura 9 - Curva padrão de DQO.	48
Figura 10 - Curva padrão de Fosfato total.	52
Figura 11 - Curva padrão de Antrona.	54
Figura 12 – Curvas de crescimento de biomassa para <i>Tetrademus sp.</i> ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.	57
Figura 13 – Desempenho da <i>Tetrademus sp.</i> na remoção de DQO ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de DQO para todas as condições de ensaios.	60
Figura 14 - Desempenho da <i>Tetrademus sp.</i> na remoção de Nitrogênio Total ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de Nitrogênio Total para todas as condições de ensaios.	61
Figura 15 - Desempenho da <i>Tetrademus sp.</i> na remoção de Fosfato ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de Fosfato para todas as condições de ensaios.	63
Figura 16 - % de Nitrogênio e Fósforo em biomassa.	65
Figura 17 - Produtividade estima de etanol.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características de alguns tipos de águas residuais.	22
Tabela 2 - Desempenho da remoção de contaminantes em alguns efluentes por microalgas/cianobactérias.....	24
Tabela 3 - Contribuições e desvantagens do uso de um consórcio bactéria-microalga.	31
Tabela 4 - Comparação entre os principais sistemas de cultivo de microalgas.....	33
Tabela 5 – Vantagens e desvantagens das culturas de primeira, segunda e terceira geração para produção de bioetanol.....	42
Tabela 6 – Caracterização do soro de leite.	56
Tabela 7 – Comparação de produtividade entre plantas e microalgas para biocombustíveis.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C – Carbono

cm – centímetro

CO₂ – Dióxido de carbono

d - dia

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FBR/PBR - Fotobiorreator/Photobioreactor

g – grama - unidade de massa, e seus derivados (mg – miligrama, kg – quilograma etc.)

GEE – Gases do Efeito Estufa

h – hora

H – Hidrogênio

H₂ – Gás hidrogênio

J – Joule - unidade de energia e seus derivados (MJ – Megajoule)

L – Litro - unidade de volume e seus derivados (mL – mililitro)

min – minuto

N – Nitrogênio

NH₃⁺ – Amônia

NH₄⁺ – Amônio

NO₂⁻ – Nitrito

NO₃⁻ – Nitrato

NT – Nitrogênio Total

O₂ – Gás oxigênio

P – Fósforo

Pa – Pascal – unidade de pressão

PT – Fósforo Total

rpm – Rotação por minuto

s – segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Microalgas e cianobactérias.....	15
3.1.1 O gênero <i>Tetrademus</i> e alguns exemplos no tratamento de efluentes	16
3.2 Mixotrofia.....	18
3.3 Características das águas residuais e requisitos nutricionais dos microrganismos fotossintéticos	19
3.3.1 Soro do leite	26
3.3.2 Tratamento do soro do leite com microalgas.....	27
3.4 Contaminantes naturais em sistemas abertos de cultivo de microalgas	29
3.4.1 Consórcio bactéria-microalgas	29
3.5 Sistemas de cultivos de microalgas	31
3.6 Técnicas de colheita de microalgas	34
3.7 Produções de biocombustíveis a partir da biomassa microalgal	36
3.7.1 Biodiesel	36
3.7.2 Biogás (Metano)	37
3.7.3 Biobutanol.....	37
3.7.4 Biohidrogênio	38
3.8. Tecnologias para a produção de etanol combustível	40
3.8.1 Biomassas de primeira, segunda e terceira geração para a produção de etanol: diferenças e vantagens	40
3.8.2 Bioquímica da produção de etanol a partir de monossacarídeos	42
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Coleta e armazenagem do soro do leite e microalga	44
4.2 Experimentos	45
4.2.1 Caracterização do Soro do Leite e Análises Antes e Após o Tratamento	46
4.2.2 Peso seco celular.....	47

4.2.3 Demanda Química de Oxigênio - DQO (Método Colorimétrico - Standard Methods 5220 D).....	47
4.2.4 Nitrogênio Total.....	48
4.2.5 Nitrogênio amoniacal.....	50
4.2.6 Fósforo Total	51
4.2.7 Determinação do pH	52
4.2.8 Cálculos da % de N e P removido em biomassa.....	52
4.2.9 Determinação de açúcares totais pelo método de Antrona	53
4.3 Análise de produtividade de etanol máximo a partir do resíduo microbiano	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1 Caracterização físico-química do soro do leite.....	56
5.2 Biomassa produzida.....	57
5.3 Remoção de DQO, NT e PT	59
5.4 Percentagens de N/X e P/X	64
5.5 Determinação do teor de carboidratos e produtividade técnica de etanol por ano a partir de biomassa residual do tratamento de efluentes	66
6. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

A demanda por água potável e o fornecimento de energia são os grandes desafios globais do século. Muitos processos biológicos são propostos para o tratamento de efluentes domésticos, industriais e agroindustriais como a biorremediação usando microrganismos ou o consórcio deles – bactérias, microalgas, fungos e protozoários (lagoas de aeração, lagoas anaeróbicas, biorreatores aeróbicos e anaeróbicos, lodo ativado, filtros biológicos e remoção biológica de nutrientes).

Diante disso, há um interesse crescente na utilização de microalgas para tratar águas residuais, devido sua capacidade de eliminar uma variedade de nutrientes/poluentes presentes, e o uso de sua biomassa residual para produção de biocombustíveis (SALAMA et al., 2017). Por exemplo, o gênero *Tetrademus* tem sido alvo de diversos estudos para o tratamento de águas residuais e produção de biocombustíveis, devido sua boa adaptação, remoção de nutrientes, e produtividade de biomassa microalgal rica em lipídios/carboidratos (KIM et al., 2015; FONTOURA et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; BENTAHAR et al., 2019).

Além disso, as principais causas do elevado custo da produção de biocombustíveis a base de algas são as grandes quantidades de recursos hídricos e nutrientes, como carbono, nitrogênio e fósforo, necessários para o seu cultivo. Assim, as águas residuais podem ser utilizadas como fonte de nutrientes baratas e como recurso para minimizar o uso de águas doces (CHEN et al., 2015).

O soro do leite, subproduto da indústria láctea, é um efluente com elevada concentração de DBO (25.000 – 120.000 mg DBO L⁻¹) e rico em nutrientes (por exemplo, nitrogênio e fósforo), e quando lançado em corpos d'água sem o devido tratamento pode acarretar sérios danos ambientais, por exemplo, eutrofização (OLIVEIRA et al., 2012). O uso desse efluente para cultivo de microalgas mostra-se benéfico para minimizar o uso de água doce, reduzir o custo de adição de nutrientes, a remoção de contaminantes, e produção de biomassa para biorecursos, como combustíveis.

As vantagens de se explorar os organismos fotossintéticos para aplicações industriais, principalmente na área ambiental, são relevantes para alcançar um futuro sustentável desde que eles promovem o ciclo do carbono e, conseqüentemente, a renovação das fontes de carbono. Em adição, a produção de bioenergia deve ser significativamente aumentada para competir com os custos da produção de energia a partir de outras fontes, principalmente os combustíveis baseados no petróleo (CHO et al., 2013). As microalgas representam uma promissora fonte alternativa renovável para produção de biocombustíveis de terceira geração em escala, por produzir volumes de biomassa por área muito maiores que as de biocombustíveis de primeira e segunda geração devido sua rápida taxa de crescimento e comparação com plantas superiores, não competir com o cultivo de alimentos (MAITY et al., 2014), além de reduzir a emissão de CO₂.

Nesse contexto, a combinação do uso de microalgas para o tratamento de soro do leite pode reduzir os custos da produção de biocombustíveis de terceira geração, tornando-o mais viável, além de ser uma fonte promissora de captura de carbono e tornar os efluentes menos prejudiciais para lançamento nos recursos hídricos e solos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudo da viabilidade técnica de produção de etanol a partir da biomassa residual oriunda do tratamento de soro de leite com microalga associada a contaminantes microbianos naturais.

2.2 Específicos

- Tratamento do soro do leite em sistema aberto através do consórcio *Tetrademus sp.*-microrganismos contaminantes (por exemplo, bactérias, leveduras e fungos filamentosos) na remoção de DQO, nitrogênio e fósforo total;
- Avaliação do efeito da concentração de soro no cultivo da biomassa microalgal;
- Verificação do efeito da intensidade luminosa mais adequada que favoreça o cultivo da biomassa microalgal;
- Determinação do teor de carboidratos da biomassa residual do sistema de tratamento;
- Estudo da produção teórica de etanol a partir da biomassa residual de microalga.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A necessidade de diversificação de fontes de biomassa, vê no tratamento de efluentes um novo potencial. Através da utilização de microalgas e cianobactérias, o efluente pode ser tratado e, além disso, gerar biomassa. Essa biomassa, por sua vez, pode conter elevados teores de carboidratos, proteínas e lipídios, e podem ser utilizados para aplicações biotecnológicas como, por exemplo, os biocombustíveis/bioquímicos. Para isso, os microrganismos fotossintetizantes podem contar com a mixotrofia, uma capacidade dos seres fotossintéticos que conseguem, entre outros fatores, utilizar também carbono orgânico, e que será detalhado posteriormente, uma vez que o objetivo do trabalho é tratar um efluente agroindustrial (soro do leite), com remoção de contaminantes.

3.1 Microalgas e cianobactérias

As microalgas são seres autotróficos unicelulares capazes de capturar CO₂ da atmosfera e converter em biomassa, que podem ser aproveitadas para produção de biocombustíveis, através da fotossíntese. São compostas por três bioquímicos básicos: proteínas (30-50%), carboidratos (20-40%) e lipídios (8-15%) (SILVA E BERTUCCO, 2016). A variação bioquímica de diferentes espécies esta relacionada com as condições ambientais a qual estão presentes (BEHERA et al., 2018). A maioria possui hábito planctônico, embora haja espécies bentônicas e terrestres. As cianobactérias (Filo Cyanobacteria ou divisão *Cyanophyta*) são às vezes consideradas microalgas, mesmo sendo de natureza procarionte, por possuírem algumas semelhanças como a atividade fotossintética e por desempenharem o mesmo papel ecológico (TORRES, 2014).

Segundo Jankowska et al. (2017) as microalgas possuem uma ampla faixa de tamanho, podem variar de nano a milímetro, existem como organismos independentes ou em grupos/cadeias. O número estimado de espécies é de aproximadamente 100.000, mas apenas cerca de 35 000 espécies foram identificadas até o momento.

Segundo Karatay et al. (2016) as espécies com alto teor de amido como *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus* e *Tetraselmis* são as mais estudadas para produzir etanol a partir de seus teores elevados de carboidratos.

Em resumo, microalgas são adaptadas para coletar, armazenar ou aumentar a eficiência de utilização dos recursos disponíveis no ambiente. Em geral, dependem de uma fonte suficiente de carbono e luz para realizar fotossíntese, no entanto podem ajustar ou alterar sua estrutura interna, por exemplo, bioquímica e aclimação fisiológica (MATA et al., 2010).

3.1.1 O gênero *Tetradescmus* e alguns exemplos no tratamento de efluentes

A microalga de água doce *Tetradescmus obliquus* (anteriormente conhecida como *Scenedesmus obliquus* ou *Acutodesmus obliquus*) é um membro do Chlorophyceae (Clorófitas ou algas verdes) (CARRERES et al., 2017). É um gênero que tem sido utilizada no tratamento de efluente, no entanto, muito tem-se a percorrer devido as diferentes características, ou seja, diversidade de efluentes agroindustriais e industriais. Em teoria, um efluente com alto teor de proteínas e fósforo, com uma moderada concentração de DQO (geralmente mais inibitória para as microalgas, mas que pode ser consumido devido a mixotrofia) pode ser um meio favorável ao desenvolvimento das microalgas, sendo potencialmente tratado (SILVA et al., 2019). A seguir, alguns estudos são apresentados.

Ferreira et al. (2018) estudaram a capacidade da *Scenedesmus obliquus* de remover nutrientes de diferentes águas residuárias (aves, suínos, bovino, cervejaria, laticínios e industrial urbano). As faixas de remoção dos nutrientes foram de 95-100%, 63-99% e 48-70% para nitrogênio, fósforo e DQO, respectivamente. A maior produtividade de biomassa ocorreu no meio com águas residuárias de cervejaria, 1025 mg L⁻¹ d⁻¹. Todas as m biomassas produzidas apresentaram um alto teor de proteína (31-53%) seguidas por 12-36% de carboidratos e 8-23% de lipídios.

Kim et al., (2015) estudaram o sistema de tratamento UASB seguido de tratamento terciário com microalga. O sistema UASB foi operado com efluente sintético, a temperatura (37°C) e pH ($7 \pm 0,2$) constantes. A digestão anaeróbia reduziu a DQO de 10.000 mg L⁻¹ para 660 mg L⁻¹, sendo as remoções de nitrogênio e fósforo limitadas, de 500 para 273 mg L⁻¹ e de 100 para 58,75 mg L⁻¹, respectivamente. O efluente desse sistema foi usado para o cultivo de microalgas após a centrifugação de 3000 rpm por 5 min e autoclavado. A *Scenedesmus sp.* foi adicionada com uma concentração volumétrica de 10% a um balão de cultura de 250 mL contendo 200 mL do efluente da digestão anaeróbia e cultivada por 23 dias, sob agitação constante de 150 rpm, temperatura a 27°C, luz contínua de 140 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e 2% de CO₂. Nessas condições a produtividade de biomassa foi de 0,37 g L⁻¹ dia⁻¹, e ótimas eficiências de remoção de nitrogênio (>99,19%) e fósforo (98,01%). Um lote de cultivo foi completado dentro de 13 dias, e a produtividade máxima de biomassa foi de 0,74 g L⁻¹ dia⁻¹, o tempo de latência foi literalmente eliminado provavelmente devido ao uso de células de *Scenedesmus sp.* que se encontravam adaptadas.

Fontoura et al., (2017) avaliaram a capacidade de remoção de contaminantes pela microalga *Scenedesmus sp.* cultivada em efluentes de curtume (as concentrações iniciais de nitrogênio amoniacal, fósforo e DBO são 343 mg L⁻¹, 6,6 mg L⁻¹ e 4000 mg L⁻¹, respectivamente). Os cultivos foram realizados em frascos de 1000 mL sob diferentes concentrações de águas residuárias (entre 20% e 100%), diferentes intensidade de luminosidade (entre 80 e 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com ciclo dia/noite 12:12h, a temperatura ambiente (25°C), e constante aeração por borbulhamento de ar comprimido (1 L min⁻¹) no fundo dos frascos, por 24 dias. O cultivo apresentou concentração máxima de biomassa (900 mg L⁻¹) e remoção máxima de nitrogênio amoniacal (85,63%), fósforo (96,78%) e DQO (80,33%) em efluente com concentração de 88,4% e intensidade luminosa de 182,5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A produtividade máxima de biomassa de 200,5 mg L⁻¹ dia⁻¹ foi observada para o ensaio com intensidade luminosa de 200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 60% das águas residuárias. O aumento na concentração de águas residuárias resultou em aumento de biomassa, maior taxa de crescimento específico e maior produtividade de biomassa para ensaios com mesma intensidade de luz. Este comportamento também foi observado em ensaios com a

mesma concentração de águas residuais e maior intensidade luminosa. Alta remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo foram observados em ensaios com maior concentração de efluente de curtume (88,4% e 100%, respectivamente), e também foram observados para o ensaio com maior intensidade luminosa ($200 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Altas concentrações de efluente e intensidades de luz influenciaram positivamente na remoção de DQO.

3.2 Mixotrofia

A mixotrofia é a capacidade que algumas microalgas e cianobactérias têm de crescer tanto com luz, realizar fotossíntese (autotrofia), como a heterotrofia, utilizando fontes carbono orgânico e inorgânico. O cultivo mixotrófico combina as vantagens da autotrofia e heterotrofia e supera as desvantagens da autotrofia, onde a luz solar e o material orgânico não são condições limitantes para o crescimento das microalgas (ZHAN et al., 2017).

As microalgas oferecem vantagens e desvantagens quando aplicadas ao tratamento de águas residuárias a depender das condições de cultivo. Microalgas autotróficas têm o benefício de reduzir emissões de Gases do efeito estufa (GEE), a capacidade de remoção de nitrogênio e fosforo são altas, porém a taxa de crescimento é mais lenta que as microalgas heterotróficas e mixotróficas, necessitam de luz para o crescimento e os custos de cultivo são elevados. O modo mixotrófico proporciona maior produtividade de biomassa e melhor qualidade e quantidade de lipídios, apresenta uma quantidade significativa de açúcares redutores em comparação com autotróficos e heterotróficos. Microalgas heterotróficas e mixotróficas são espécies limitadas e fáceis de serem contaminadas por bactérias devido o uso de compostos orgânicos como fonte carbono (BEHERA et al., 2018).

Kim et al. (2013) investigaram a taxa de crescimento e as taxas de remoção de carbono e outros nutrientes orgânicos utilizando a *Chlorella sosrokiniana* em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas, onde as taxas de crescimento foram de $0,24 \text{ d}^{-1}$, $0,53 \text{ d}^{-1}$ e $0,44 \text{ d}^{-1}$, e as taxas de remoção de nitrogênio foram de $13,1 \text{ mg N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$,

23,9 mg N L⁻¹ d⁻¹ e 19,4 mg N L⁻¹ d⁻¹, e de fósforo foram de 3,4 mg P L⁻¹ d⁻¹, 5,6 mg P L⁻¹ d⁻¹ e 5,1 mg P L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. As taxas foram maiores em condições heterotróficas, porém não foram significativas em comparação ao cultivo mixotrófico, sugerindo que microalgas heterotróficas seriam mais úteis para o tratamento de águas residuais e reduziriam os custos operacionais em comparação com o uso de microalgas autotróficas que requerem luz.

Mirzaei et al. (2016) investigou o crescimento da *Chorella vulgaris* e sua produção lipídica sob condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas utilizando melaço e licor de maceração do milho como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. O máximo peso seco e concentração de lipídios foram obtidos em crescimento mixotrófico, 2,62 g L⁻¹ d⁻¹ e 0,864 g L⁻¹, respectivamente. Para essa condição o peso seco foi 2,5 e 4 vezes maior do que nos cultivos autotrófico e heterotrófico, respectivamente, e a concentração de lipídios foi 170% superior ao crescimento autotrófico e 1200% ao heterotrófico. Assim, verificou-se que o crescimento mixotrófico não é uma simples combinação de crescimento heterotrófico e autotrófico.

Em resumo, para obter resultados satisfatórios de produtividade para aplicação industrial são necessárias grandes quantidades de substrato de carbono orgânico/inorgânico, nutrientes, água e luz (ZHAN et al., 2017), adaptação de biorreatores com baixos custos de operação e processo de conversão/valorização da biomassa.

3.3 Características das águas residuais e requisitos nutricionais dos microrganismos fotossintéticos

Algumas características devem ser levadas em consideração na seleção de cepas de microalgas adequadas para o tratamento de águas residuais e produção de biocombustíveis. Entre elas, alta taxa de crescimento, alta produtividade de biomassa, maior tolerância aos possíveis poluentes - íons metálicos e compostos tóxicos presentes nas águas residuais, alta tolerância a NH₄⁺, altas taxas de geração de O₂, alta capacidade

de consumo e tolerância de CO₂, resistência a stress ambientais e alto teor de lipídios/carboidratos (WANG et al., 2016; BEHERA et al., 2018).

Muitas indústrias produzem grandes quantidades de efluentes em seus processos e o lançamento direto dessas águas residuárias no meio ambiente resulta em sérios problemas de poluição. Setores de laticínios e cervejarias possuem efluentes ricos em proteínas, fosfatos, amônio e/ou nitrato, matadouros produzem altos volumes de águas residuárias com alto nível orgânico (sangue, pele, gordura, etc) e nutrientes. As razões de carbono/nitrogênio (C/N) e nitrogênio/fosforo (N/P) desses efluentes são favoráveis para o cultivo microalgal (FERREIRA et al., 2018).

A disponibilidade dos nutrientes inorgânicos (N e P, por exemplo) juntamente com CO₂ e a absorção de luz são essenciais para o crescimento das microalgas, pois esse conjunto forma a energia bioquímica necessária para as microalgas através da fotossíntese (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2017). A presença de alguns compostos tóxicos como os metais pesados e a mudança na concentração de alguns gases (CO₂, NO_x, SO_x, O₂ e NH₃) podem influenciar significativamente o crescimento das microalgas (JANKOWSKA et al., 2017).

Além disso, para o crescimento ótimo de um cultivo de microalgas fotossintéticas, alguns fatores ambientais devem ser considerados, como a luz, temperatura e pH. A disponibilidade e intensidade de luz altera a produtividade de biomassa e modifica o perfil lipídico variando a quantidade de lipídios monoinsaturados e saturados. O desvio da faixa de temperatura ideal (25 – 35°C para a maioria das microalgas) pode causar morte celular e consequentemente a diminuição da biomassa de microalgas. A faixa de pH de 8 - 9 tem sido relatada como a mais propícia para maioria das espécies de algas e reduzir a competição com outros organismos (BEHERA et al., 2018).

O carbono representa aproximadamente 50% do peso seco da biomassa microalgal, e a eficiência de fixação de CO₂ é de 10 a 50 vezes maior que as de plantas convencionais (SCHNEIDER et al., 2018; ZHENG et al., 2018). Durante a fotoautotrofia as microalgas absorvem o carbono inorgânico dissolvido da água e o

reduz quimicamente usando a energia derivada da fotossíntese, este carbono pode ser usado para produção de lipídios e biomassa. Concentrações excessivamente altas de CO_2 podem diminuir o pH do meio e reduzir a atividade da microalga, dessa forma é importante alcançar um equilíbrio entre o fornecimento e a demanda de CO_2 necessária para o crescimento microalgal (ZHENG et al., 2018).

Outros elementos importantes para a nutrição da microalga são o nitrogênio e o fósforo. O nitrogênio pode ser encontrado principalmente nas formas de NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+ . Algumas espécies de microalgas com taxa de crescimento rápida requerem a amônia como fonte primária de nitrogênio, no entanto, a nutrição com nitrato intermitente pode aumentar o crescimento de microalgas. O fósforo utilizado pode ser proveniente de fosfatos ou superfosfatos, como de sódio e potássio por exemplo. Em efluentes o fósforo esta comumente presente em forma de ortofosfato, porém podem ser encontrados nas formas de pirofosfato, metafosfato e formas orgânicas. As microalgas podem acumular fósforo dentro de suas células e usá-lo quando o fósforo do meio externo acabar, uma característica favorável e vantajosa na remoção de fósforo em efluentes (JANKOWSKA et al., 2017; SILVA et al., 2019).

A Tabela 1 reúne a composição de alguns efluentes em relação as concentrações de DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), Nitrogênio Total, Amônia e Fósforo. Nota-se que efluentes industriais são os que possuem maior DQO e DBO variando entre $0,06 - 1680 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$ e $0,007 - 1307 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$ respectivamente. No entanto, as concentrações de nutrientes como Nitrogênio e Fósforo são mais elevadas nos digestatos, inclusive maiores que em meios de cultura padrão como o BG-11 e f/2 nos quais a concentração de nitrogênio e fósforo variam entre 12,5-250 e 1,5-7 mg/L, respectivamente (SILVA et al., 2019).

Tabela 1 - Características de alguns tipos de águas residuais.

	Efluente	DQO g O₂ L⁻¹	DBO g O₂ L⁻¹	Nitrogênio T mg L⁻¹	Amônia mg L⁻¹	Fósforo mg L⁻¹
Urbano	Efluente da planta de tratamento de efluente de Saint Nazaire, France	0,169	Não informado	65	62	5,4
	Efluente urbano da cidade de La Linea de la Concepcion	0,384	Não informado	54,58	Não informado	12,70
	Efluente da planta de tratamento de efluente de Valladolid	0,259	Não informado	80****	80	14,2
	Efluente de uma estação de tratamento de efluentes na Espanha	151,4	42	92,4	Não informado	Não informado
	Esgoto	12,63	0,050	40****	40	Não informado
	Chorume de um aterro sanitário na Malásia	0,950	0,184	1185****	1185	Não informado
	Água residual da planta de tratamento da cidade de Edimburgo, United Kingdom	0,142	Não informado	Não informado	Não informado	3,2
Industriais	Vinhaça diluída 50% em água	8,93 ± 1,45	3,74 ± 0,20	21,59**	Não detectado*	11,95 ± 0,35
	Vinhaça 100% clarificada	22,65 ± 2,64	9,64 ± 0,69	48,81***	9,25 ± 2,52	18,47 ± 3,29
	Efluente de uma indústria de azeite	0,0572	0,00687	Não informado	Não informado	Não informado
	Esgoto do canal de agricultura Indiano	2,2	0,0024	105,83	21,26	3,162
	Efluente de uma indústria de óleo de palma	100	43,75	1400	80	Não informado
	Soro de queijo	147 ± 7	97 ± 4	805 ± 48	103 ± 9	400 ± 20
	Glicerol	1680 ± 154	1307 ± 360	Não detectado	Não detectado	Não detectado
	Borra de vinho branco	181 ± 11	162 ± 13	219 ± 4	32,2 ± 1,3	150 ± 8
Digestatos	Ultrafiltrado Digestate	1,52 ± 0,03	0,554 ± 0,03	1377 ± 41	1155 ± 35	300 ± 18
	Resíduos Zootécnicos (Líquido Digestate)	14,1	4	1630	1400	716
	Resíduos Vegetais (Líquido Digestate)	22,12	6,41	2890	2000	66
	Resíduos Sólidos Municipais (Líquido Digestate)	19,8	5	3370	2650	24
	Digestato	2,661	Não informado	2667	2276	381
	Digestato obtido do lodo de tratamento	0,715	Não informado	1311	1279	12

*Menor que 5 mg.L⁻¹.** Maioria Nitrato (21,49 mg L⁻¹).*** Maioria Nitrato (39,41 mg L⁻¹).

**** 100% de amônia, não apresentou nitrato e nitrito.

Fonte: SILVA et al. (2019).

A principal desvantagem do tratamento de águas residuárias com microalgas é a dificuldade/inibição que estes microrganismos possuem de crescer em afluentes com elevadas DQO/DBO, no qual são utilizados o máximo de 5000 mg L⁻¹ de DQO, aproximadamente. Sabe-se que as maiorias dos efluentes domésticos e agroindustriais dispõem de uma grande quantidade de fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, o que torna um ambiental ideal para o crescimento de microalgas, e que um dos principais objetivos do tratamento de efluentes é a redução da DQO e outros compostos orgânicos nutricionais. Assim, quando há altas concentrações de DQO e nutrientes em efluentes, geralmente essas águas residuárias são previamente tratadas anaeoribicamente ou diluídas adequadamente para evitar a inibição do crescimento das algas causadas pelas altas taxas de DQO (SILVA et al., 2019).

A Tabela 2 apresenta, em resumo, a eficiência de remoção de DQO, Nitrogênio e Fósforo por diferentes microalgas/cianobactérias e diferentes tipos de efluentes (urbanos, agroindústrias e digestatos).

No entanto, é importante que a presença dos elementos necessários para o bom crescimento das microalgas esteja disponível no efluente em quantidades adequadas, pois caso seja insuficiente ou em excesso, bem como a alteração das condições ambientais apropriadas (temperatura, intensidade de luz e pH, principalmente), podem afetar o crescimento microalgal diretamente.

Tabela 2 - Desempenho da remoção de contaminantes em alguns efluentes por microalgas/cianobactérias.

Tipo	Microalga/Cianobactéria (Condições de Cultivo) pH, temperatura, luz, rotação, aeração/CO ₂ , tempo de cultivo	Tipo de Efluente	Características dos Efluentes			Remoção		
			DQO g O ₂ L ⁻¹	N _t mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	DQO (%)	N _t (%)	P (%)
Urbano	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i> e <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (15-23 °C e 11-14 h de luz – A fluxo de iluminação foi de 5500 lux.	Efluente da planta de Valladolid	0,16	80*****	4,7	56,- 80,5	99	97
	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> <i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella kessleri</i> <i>Chlorella vulgaris</i> <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Botryococcus braunii</i> <i>Neocloris oleabundans</i> <i>Natural algal bloom</i> Aeração de CO ₂ numa taxa de 1 L min ⁻¹ , mantido numa temperatura de 20 ± 3 °C. Intensidade de luz de 90 µmol m ⁻² s ⁻¹ .	Efluente urbano da cidade de La Linea de la Concepcion	0,384	54,58	12,70	Não informado	87- 99	80- 98
	<i>Scenedesmus obliquus</i> Alimentação com gás de concentração de 5,0% CO ₂ a uma taxa de 300 mL min ⁻¹ ; sob iluminação intensa de 40 µmol m ⁻² s ⁻¹ a uma temperatura de 25 °C	Efluente secundário de efluente municipal de Lin'an	Não informado	13	1,1	Não informado	98,8 5	96,8 9
	<i>Scenedesmus obliquus</i> Foram cultivadas a uma temperatura de 25 °C, sob iluminação intensa de 40 µmol m ⁻² s ⁻¹	Efluente municipal simulado	Não informado	25	3	Não informado	99	99
	Consorcio microalga-bactéria Chlorophyta (principalmente <i>Scenedesmus</i> and <i>Chlorella</i>) Reator de manta de lodo de fluxo ascendente hidrolítico, com um tempo de retenção hidráulica de 5h	Efluente municipal da cidade de Barcelona	0,250	50	35	68	60	95
	<i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Chlorella</i> sp., <i>Oocystis</i> sp. Iluminação constante (450 lx), a uma temperatura de 25 ± 2 °C, e uma agitação de 130 rpm	Efluente secundário de efluente municipal de Shiraz	Não informado	190,7	19,11	Não informado	68- 85	82- 100
	<i>Chlorella vulgaris</i> Temperatura de 15 ± 1 °C, um ciclo de dia-noite 12:12, sob iluminação de 100 µmol m ⁻² s ⁻¹	Água residual da cidade de Edimburgo, United Kingdom	0,1461- 0,4282	29*****	3,2	67-78	90	99
Digestato	<i>Arthrospira maxima</i> 24 ± 1 °C, iluminação continua de 200 µmol fótons m ⁻² s ⁻¹	Resíduos Zootécnicos (Líquido Digestate)	14,1	1630	716	Não informado	98,5	90,9
		Resíduos Vegetais (Líquido Digestate)	22,12	2890	66	Não informado	99,5	97,5

(Continua)								
Tipo	Microalga/Cianobactéria (Condições de Cultivo) pH, temperatura, luz, rotação, aeração/CO ₂ , tempo de cultivo	Tipo de Efluente	Características dos Efluentes			Remoção		
			DQO g O ₂ L ⁻¹	N _t mg L ⁻¹	P mg L ⁻¹	DQO (%)	N _t (%)	P (%)
Agroindustrial	<i>Tetrademus obliquus</i> 24 ± 1 °C, iluminação contínua de 200 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹	Resíduos Zootécnicos (Líquido Digestate)	14,1	1630	716	Não inform ado	99,8	96,0
		Resíduos Vegetais (Líquido Digestate)	22,12	2890	66	Não inform ado	99,2	97,5
	<i>Arthrospira platensis</i>	Efluentes da digestão anaeróbica da indústria de frango	0,528- 1,874	88- 313*** *	1,95- 6,94	20-70	98- 99	98- 99
	<i>Chlorella vulgaris</i>	(Líquido Digestate)	0,587- 2,333	98- 373*** *	2,18- 8,28	58-70	95- 99	98- 99
Agroindustrial	<i>Micractinium sp. e</i> <i>Chlamydomonas biconvexa</i> <i>Embrapa LBA#32</i> 3 dias em 12 h/12 h de regime de luz/escuro (intensidade da luz de 400μEm ⁻² s ⁻¹) e temperatura de 37 °C ± 1 °C durante o período de luz e 24 ± 1 °C durante o período escuro. Aeração com 64 L.h ⁻¹ de ar atmosférico suplementado com fornecimento de 5% CO ₂	Vinhaça 50% diluída <i>M. sp.</i>	8,93	21,59*	3,90	-35,27	46,4 1	4,29
		Vinhaça 100% Clarificada <i>M. sp.</i>	22,65	48,81* *	6,02	-18,54	44,8 8	- 3,14
		Vinhaça 50% diluída <i>C. bioconvexa</i>	8,93	21,59*	3,90	-49,83	39,3 7	- 77,2 1
		Vinhaça 100% Clarificada <i>C. bioconvexa</i>	22,65	48,81* *	6,02	-23,53	43,6 2	17,9 7
	<i>Mix 1: Calothrix sp., Lyngbya</i> <i>sp., Ulothrix sp., Chlorella sp.</i> <i>Mix 2: Phormidium sp.,</i> <i>Limnothrix sp., Anabaena sp.,</i> <i>Westiellopsis sp.,</i> <i>Fischerella sp., Spirogyra sp.</i> <i>Mix 3: Chlorella sp.,</i> <i>Scenedesmus sp., Chlorococcum</i> <i>sp., Chroococcus sp.</i> Cultivo de 3 semanas a uma temperatura de 25±2 °C, sob iluminação de 75 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹	<i>Mix 1, Mix</i> <i>2 e Mix 3,</i> sequencialm ente.	2,2	105,83	3,162	72	83	98
			2,2	105,83	3,162	72	83	98
		Esgoto do canal de agricultura Indiano	2,2	105,83	3,162	72	78	98

*Ausência de amônia.

**A maioria de nitrogênio na forma de nitrato.

***Os valores negativos de remoção DQO e P indicam que houve um aumento.

****A maioria de nitrogênio na forma de amônia.

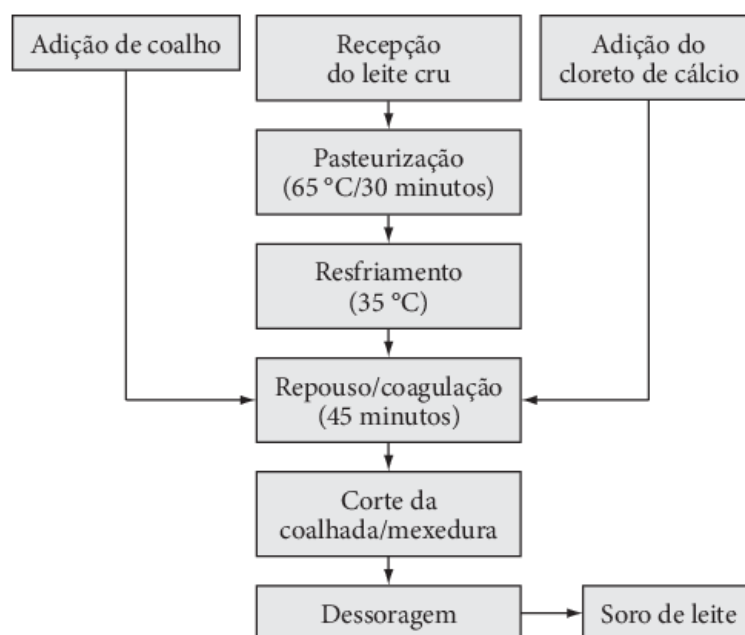
Fonte: SILVA et al. (2019).

3.3.1 Soro do leite

A fabricação do queijo é uma forma de conservação dos componentes do leite transformando-o em um produto com alto valor nutritivo, sabor agradável e menor volume para estocagem e transporte. Nesse processo não há conversão de cem por cento do leite em queijo, tendo como resíduo um derivado chamado soro de leite, podendo gerar de 9 a 12 litros de soro para cada quilo de queijo produzido (GIROTO e PAWLOWSKY, 2001).

O soro do leite é a porção aquosa liberada após a etapa de coagulação no processo convencional de produção do queijo, Figura 1, e contém cerca de metade dos componentes sólidos presentes no leite (lactose, lipídios, minerais, proteínas e vitaminas) (OLIVEIRA et al., 2012). Sua composição varia de acordo a origem do leite (cabra, ovelha ou vaca) e com a técnica de transformação empregada. Dependendo do procedimento usado duas variedades de soro podem ser produzidas: soro ácido ($\text{pH} < 5$) e soro doce ($\text{pH} 6 - 7$) (BENTAHAR et al., 2019).

Figura 1 – Fluxograma de obtenção do soro do leite a partir da produção do queijo coalho.



Fonte: LIRA et al., 2009.

As práticas atuais para o manuseio do soro variam de acordo com o tamanho das instalações de fabricação. Grandes instalações normalmente o utilizam para produção de bens secundários (por exemplo, ricota, proteínas concentradas, etc.) ou alimentos de origem animal. Pequenas instalações o descartam principalmente através dos sistemas de esgoto (cerca de 50% do soro produzido no mundo é descartado dessa maneira) (BENTAHAR et al., 2019).

O soro quando considerado efluente residual é despejado junto com outros efluentes do laticínio, sendo de difícil tratamento pelos métodos convencionais devido a sua alta concentração de DBO (25.000 - 120.000 mg L⁻¹) (OLIVEIRA et al., 2012). O soro do leite também é rico em outros teores de nutrientes (inorgânicos), como amônia e fosfatos, assim sua descarga no meio ambiente pode levar a eutrofização dos corpos d'águas acarretando graves problemas ambientais (BENTAHAR et al., 2019).

3.3.2 Tratamento do soro do leite utilizando microalgas

Atualmente, muitos pesquisadores têm utilizado várias microalgas para o tratamento de efluentes de laticínios. O uso do efluente leiteira para culturas de microalgas é benéfico para minimizar o uso de água doce, reduzir o custo de adição de nutrientes, a remoção do nitrogênio e fósforo, e produção de biomassa para biorrecursos como combustíveis ou subprodutos de alto valor (CHOI, 2016).

Choi (2016) teve como objetivo desenvolver um tratamento eficaz para os nutrientes e a produção de biomassa no efluente de laticínio utilizando a microalga *C. vulgaris*. As microalgas foram cultivadas em meio Jawoski (JM) sob luz de LED, e temperatura ambiente. Um litro do meio de cultura JM com a *C. vulgaris* foi adicionado a 10 L do efluente lácteo, sendo a concentração inicial do inoculo da microalga de $0,367 \pm 0,6$ g L⁻¹. As experiências foram conduzidas a um pH neutro ($7,3 \pm 0,4$) sob um ciclo de 8h no escuro e 16h com luz (cerca de $200 - 220$ umol fótons m⁻² s⁻¹) a uma taxa de agitação de 80 rpm em agitador orbital, e a temperatura foi mantida a 28-32 °C durante 10 dias. As amostras foram arejadas continuamente com uma taxa de 0,5 L min⁻¹ de

CO₂. A biomassa máxima atingida foi de 1,23 g L⁻¹ em 7 dias. Os valores de redução de DBO, DQO, SS, TN e TP foram de 85,61%, 80,62%, 29,10%, 85,47% e 65,96%, respectivamente, em 10 dias.

Tsolcha et al. (2016) avaliou o crescimento da *Cloricystis* utilizando o soro de queijo secundário, previamente tratado anaerobicamente, como substrato. A cultura da microalga foi estudada sob condições não assépticas para avaliar sua capacidade de remoção de DQO, nitrogênio e fosforo (concentrações iniciais de 1100 ± 97 a 7295 ± 80,9 mg L⁻¹, 32,9 ± 0,3 a 102,5 ± 5 mg L⁻¹, e 1,2 ± 0,29 a 44,8 ± 0,34 mg L⁻¹, respectivamente) e produzir biodiesel. No fim do tratamento a DQO, NT e PO₄⁻³ foram reduzidos em até 92,3%, 97,3% e 99,7%, respectivamente, a biomassa da alga variou de 9,2 a 13,4%, o que corresponde a uma produção de biodiesel de 60,8 a 119,5 mg L⁻¹.

Bentahar et al. (2019) utilizaram com sucesso o permeado de soro do leite ácido (subproduto da produção de iogurte tipo grego, pH 3,84 ± 0,03) como meio de cultivo da *Tetrademus obliquus* para produção de biomassa e da enzima β-galactosidase. Foram obtidas concentrações de biomassa até 5 g L⁻¹ e atividades enzimáticas volumétricas até 400 U L⁻¹.

Girard et al. (2014) realizaram o cultivo mixotrófico de microalgas *Tetrademus obliquus* em permeado soro de queijo para produção de biodiesel. Para as condições do estudo observou-se que à medida que o crescimento ocorreu na presença de lactose, houve uma diminuição significativa de sua concentração, enquanto as concentrações de galactose e glicose aumentaram. Apesar da produção de biomassa ser 1,8 a 2,6 vezes maior, as culturas mixotróficas resultaram em menores produtividades de lipídios quando comparadas às culturas de controle fotoautotróficas.

Como se percebe o cultivo de microalgas com soro do leite é já realizado por alguns autores, com culturas axênicas, no entanto visam a remoção dos contaminantes e aplicação da biomassa para produção de biodiesel. Portanto, entender como variáveis ambientais e nutricionais, como por exemplo, a intensidade luminosa e a carga orgânica, foco desse trabalho, podem influenciar no tratamento, produção de biomassa e aplicação da biomassa para produção de bioetanol é algo que precisa ainda de muita investigação.

3.4 Contaminantes naturais em sistemas abertos de cultivo de microalgas

Alguns contaminantes biológicos como zooplânctos, bactérias, outras algas e vírus, podem restringir significativamente o crescimento de microalgas. Em sistemas de cultivo abertos, a grande interface de troca de CO_2 e O_2 entre o ar e a cultura líquida aumenta as chances de contaminação, por exemplo através do contato com aves. Apesar de fotobioreatores fechados poderem reduzir a exposição da cultura com o ambiente externo, grandes volumes de ar devem ser fornecidos para a diluição do CO_2 . A filtração com membrana microporosa é geralmente adotada para a esterilização do ar, porém o vírus no ar não pode ser removido (WANG et al., 2013).

A monocultura em sistemas abertos tem sido bem-sucedida em uma gama limitada de microalgas, através de condições extremas, por exemplo, *Dunaliella* (alta salinidade) e *Spirulina* (alta alcalinidade). Esses processos não são sustentáveis em termos de custos para a produção de biocombustíveis, porém são sustentados pelos altos valores dos produtos não-combustíveis, como pigmentos antioxidantes (MCBRIDE et al., 2014).

Por outro lado, interações cooperativas podem ser estabelecidas por diferentes tipos de microrganismos formando consórcios, por exemplo, consórcios microalgais e microalgais-bacteriano. O uso do policultivo para remoção de nutrientes pode ser muito vantajoso, pois combina microrganismos com diferentes atividades metabólicas e adaptadas a diferentes condições ambientais, o que pode resultar em maiores taxas de absorção de nutrientes e produção de biomassa (GONÇALVES et al., 2017).

3.4.1 Consórcio bactéria-microalgas

O tratamento via consórcio algal-bacteriano, Figura 2, se dá através da fotossíntese, onde o O_2 necessário para a bio-oxidação da matéria orgânica de NH_4^+ por bactérias é fornecido pelas microalgas. Uma eficiente remoção de patógenos ocorre devido as altas concentrações de pH e O_2 no meio ocasionado pela fotossíntese. A

Tabela 3 - Contribuições e desvantagens do uso de um consórcio bactéria-microalga.

Microrganismo	Vantagens	Desvantagens
Alga	Assimilação de CO ₂ a partir do metabolismo bacteriano.	Efeitos algicidas em algumas bactérias.
	Efeitos estimulantes e nutrientes essenciais proveniente do metabolismo bacteriano.	
	Melhoramento da floculação pela associação com bactérias.	
	Essa associação, pode aumentar a produção de biomassa e simultaneamente reduzir os custos referente a aeração.	
	Alta eficiência para remoção de nutrientes, N e P, por exemplo, assim como alta redução de DQO.	
Bactéria	Oxigenação obtida das algas.	Aumento do pH e da temperatura devido a associação ao metabolismo das algas.
	O material orgânico das algas serve como fonte de carbono.	Efeito antibacteriano de algumas algas.

Fonte: SILVA et al. (2019).

3.5 Sistemas de cultivos de microalgas

Existem várias formas de cultivo de microalgas, no qual podem ser amplamente classificadas em duas categorias principais: sistemas abertos (*open ponds*) e sistemas fechados (fotobiorreatores) (Figura 3 e 4). A utilização de fotobiorreatores (FBRs) visa atingir a maior produtividade de um cultivo específico. Sistemas fechados podem ser ajustados para facilitar o controle dos parâmetros, porém sistemas abertos são mais populares devido ao menor custo e alta produtividade (BEHERA et al., 2018, CHEW et al., 2018).

Figura 3 – Sistema de cultivo aberto (*open pond*).



Fonte: BITOG et al. (2009).

Figura 4 – Sistema de cultivo fechado.



Fonte: BITOG et al. (2009).

Sistemas abertos podem ser classificados como naturais (lagos, lagoas) e artificiais ou recipientes. São mais simples e econômicos, porém a falta de controle sobre as condições climáticas e a contaminação por predadores torna difícil operá-lo com a mesma produtividade durante todo o ano (BEHERA et al., 2018), é necessário uma grande área de terra e a má dissolução de CO_2 do ar para a água limita o crescimento de microalgas (ZHOU et al., 2014).

Fotobiorreatores (FBRs) mecanicamente agitados, tubulares (vertical e horizontal), painel plano e iluminados internamente são exemplos de alguns sistemas fechados para cultivo de microalgas (BEHERA et al., 2018, CHEW et al., 2018). Ao contrário das lagoas abertas, fatores essenciais para a viabilidade celular como pH, temperatura e enriquecimento de CO₂ podem ser tratados eficientemente nos sistemas fechados (BEHERA et al., 2018), e uma quantidade maior de espécies de algas podem ser cultivadas em FBRs (ZHOU et al., 2014).

Os FBR's apresentam as maiores vantagens no que diz respeito à padronização e produtividade do processo, enquanto as lagoas dependem muito das condições externas de cultivo. Todavia, estas últimas necessitam de mais custos para o controle dos parâmetros. Na Tabela 4, podem ser vistas as principais considerações e diferenças entre as *open ponds* e os FBR's.

Tabela 4 - Comparação entre os principais sistemas de cultivo de microalgas.

Sistemas de cultura de microalgas	Sistemas abertos (Open ponds)	Sistemas fechados (FBR's)
Controle da contaminação	Difícil	Fácil
Risco de contaminação	Alto	Reduzido
Esterilidade	Não há	Realizável
Controle do processo	Difícil	Fácil
Controle das espécies	Difícil	Fácil
Agitação (mixing)	Muito pobre	Uniforme
Regime de operação	Batelada ou semi-contínuo	Batelada ou semi-contínuo
Espaço requerido	Pbr's ~ ponds	Depende da produtividade
Razão área/volume	Baixo (5 – 10 m ⁻¹)	Alto (20 – 200 m ⁻¹)
Densidade celular	Baixa	Alta
Investimentos	Baixo	Alto
Custos de operação	Baixo	Alto
Capital	Pbr's > ponds	Ponds 3 a 10 vezes mais baratos.
Eficiência na utilização da luz	Pobre	Alta
Controle de temperatura	Difícil	Mais uniforme
Produtividade	Baixo	3 a 5 vezes mais produtivo
Perdas de água	Pbr's ~ ponds	Depende se há resfriamento

(Continua)

Sistemas de cultura de microalgas	Sistemas abertos (Open ponds)	Sistemas fechados (FBR's)
Estresse hidrodinâmico nas algas	Muito baixo	Alto – baixo
Evaporação do meio de cultivo	Alto	Baixo
Controle da transferência de gás	Baixo	Alto
Perdas de CO ₂	Pbr's ~ ponds	Depende do ph, alcalinidade e etc
Inibição por O ₂	Pbr's > ponds	Grande problema em Pbr's
Concentração de biomassa	Pbr's > ponds	3 a 5 vezes maiores
Reprodutibilidade dos parâmetros	Não, depende das condições externas	Possível, depende das condições de controle
Dependência da temperatura	Alta, não há produção em períodos chuvosos	Insignificante há controle eficiente
Período alcançado após o início	Longo, 6-8 semanas	Pequeno, 2-4 semanas
Scale-up	Difícil	Difícil

Fonte: PULZ (2001); MATA et al. (2010).

3.6 Técnicas de colheita de microalgas

A colheita de microalgas trata-se da separação das células do seu meio de crescimento. O método de colheita está relacionado a fisionomia, densidade e tamanho das células, além da especificação do produto final e reuso do meio de cultura. O custo da colheita de microalgas em suspensão diluída é mais caro em comparação com culturas convencionais (SINGH e PATIDAR, 2018). Estima-se que a colheita e desidratação dessa biomassa representam cerca de 20 a 30% do custo total de produção (ALKARAWI et al., 2018).

Atualmente, a colheita de microalgas envolvem métodos mecânicos, químicos, biológicos e baseados em eletricidade. As principais técnicas de separação sólido-líquido disponíveis para colheita de microalgas são: coagulação/floculação, flotação, centrifugação e filtração, e/ou uma combinação dessas técnicas (SINGH e PATIDAR, 2018).

A coagulação/floculação ocorre através da adição de coagulantes/floculantes que causam a aglomeração das células de microalgas, no qual é considerado um método de coleta de baixo custo (FUAD et al., 2018). Esse processo pode ser dividido em três etapas, são elas: mistura entre células microalgais e coagulantes, formação dos flocos e sedimentação (ZHANG et al., 2019). Segundo Markeb et al. (2018), quando água residual é utilizada como meio de cultivo de microalgas, a presença de bactérias no meio aumenta a formação de flocos facilitando a decantação da biomassa por gravidade, podendo atingir uma recuperação de biomassa de 70 a 80%, ou até mesmo de 90% através da reciclagem da biomassa.

A flotação é um processo de separação por gravidades onde bolhas de ar ou gás são usadas para transportar partículas suspensas até a superfície para serem coletadas (FUAD et al., 2018; SINGH e PATIDAR, 2018). Devido a baixa densidade e a capacidade de auto-flutuação de algumas espécies de microalgas, este método torna-se relativamente mais rápido e eficaz em comparação a sedimentação (SINGH e PATIDAR, 2018).

A centrifugação é uma expansão da sedimentação por gravidade, onde a força centrífuga substitui a gravidade para separar as microalgas da fase líquida (SINGH e PATIDAR, 2018). Pode ser aplicada a todas as espécies de microalgas, possui alta taxa de recuperação e livre de produtos químicos. No entanto, quando aplicado em larga escala consumo de energia, tempo de tratamento, manutenção e custo são geralmente altos (FUAD et al., 2018; SINGH e PATIDAR, 2018).

No processo de filtração a suspensão passa por filtros específicos, como membranas, telas ou micro-transitos, operando sob gravidade, pressão ou vácuo. As células não são rompidas, formando uma pasta espessa, e não é necessária a adição de produtos químicos (SINGH e PATIDAR, 2018). Filtração a vácuo, filtração sob pressão, microfiltração, ultrafiltração, filtração em porto morto e filtração de fluxo tangencial são alguns exemplos desse método de colheita (FUAD et al., 2018)

Um bom sistema de colheita de microalgas deve ser eficaz, rápido, apresentar baixo custo de operação, aplicável em diferentes espécies, e capaz de operar

continuamente se necessário. Além disso, o potencial para processar parcialmente a biomassa *in situ* e o enfraquecimento da parede celular antes da conversão em biocombustíveis seriam benefícios adicionais (ALKARAWI et al., 2018).

3.7 Produções de biocombustíveis a partir da biomassa microalgal

Fotossíntese é o processo fundamental para a síntese de todos os biocombustíveis, pela conversão de energia luminosa em biomassa a qual pode conter produtos de armazenamento de carbono, como carboidratos e lipídios, e uma pequena quantidade de H_2 (SILVA E BERTUCCO, 2016). É utilizada pelas cianobactérias, microalgas, algas superiores e plantas, além de outros restritos grupos bacterianos.

As microalgas podem ser usadas para o tratamento de efluentes e consequentemente, geração de biomassa para produzir biocombustíveis (MARKOU et al., 2014). A energia solar armazenada na biomassa pode ser convertida em uma série de combustíveis por rotas termoquímicas e bioquímicas. Processos químicos compreendem a transterificação de lipídios em biodiesel. Processos bioquímicos ocorrem através da fermentação de carboidratos para produção de bioetanol e biohidrogênio, e digestão anaeróbia gerando biogás. Em processos termoquímicos ocorrem a decomposição da biomassa em combustíveis líquidos e gasosos (BEHERA et al., 2018).

3.7.1 Biodiesel

O óleo de microalgas é uma matéria-prima promissora da produção de biodiesel, porém o alto custo para produção do óleo tem dificultado o desenvolvimento desse combustível. Estudos devem ser realizados para reduzir os custos sem causar impactos na produtividade e qualidade do produto (CHEN et al. 2018).

Xu et al. (2006) estudou a produção de biodiesel de alta qualidade a partir da microalga *Chlorella protothecoides* através da reação de transterificação. Aplicou-se

técnica de controle metabólico através do crescimento heterotrófico, alcançando um conteúdo lipídico de 55,2%. As microalgas foram colhidas por centrifugação, a extração do óleo foi realizada com solvente *n*-hexano e o biodiesel obtido por transesterificação ácida. O biodiesel foi caracterizado por um alto valor de aquecimento de 41 MJ kg⁻¹, uma densidade de 0,864 kg L⁻¹ e uma viscosidade de 5,2x10⁻⁴ Pa s⁻¹ (a 40°C).

3.7.2 Biogás (Metano)

O biogás é um dos produtos finais da digestão anaeróbia da matéria orgânica, composta principalmente por CH₄ e CO₂. Muitas aplicações desse combustível requer a purificação de CH₄, assim o uso da microalga é uma nova alternativa biológica para a purificação do metano a partir do biogás (MEIER et al., 2018), devido a presença de CO₂ no biogás ser uma fonte de carbono para o cultivo das microalgas (NGUYEN et al., 2018).

Nguyen et al., (2018) avaliou a capacidade da *Scenedesmus* sp. de assimilar simultaneamente o CO₂ e digerir o efluente a partir de um digestor anaeróbio e a sua capacidade de produção de biomassa. Uma concentração de 5 g DQO L⁻¹ de meio digerido resultou em 1,79 g L⁻¹ de concentração de biomassa microalgal, 69,1% e 98,2% de eficiência na remoção de DQO e fixação de biogás, respectivamente.

3.7.3 Biobutanol

O butanol pode ser produzido a partir de matéria-prima agrícola convencional, no entanto, questões como alimento versus combustível e a presença de componentes recalcitrantes tornam a produção de biobutanol dessas biomassas inviáveis. Microalgas são consideradas matéria-prima promissora para produção de biobutanol devido sua alta taxa de crescimento e teor de carboidratos (KASSIM et al., 2014; WANG et al., 2017).

Para produzir biobutanol a partir da biomassa microalgal ocorrem uma série de processos, são eles: produção de biomassa, pré-tratamento, sacarificação enzimática e fermentação anaeróbica (KASSIM et al., 2014).

Wang et al. (2017) utilizou uma microalga rica em carboidratos, *Neochloris aquatica* CL-M1, adaptada pra crescer em águas residuais da suinocultura. A biomassa obtida com maior concentração ($6,1 \text{ g L}^{-1}$) e teor de carboidratos (50,46%) foi pré-tratada (NaOH 1%) e usada como matéria prima para fermentação de butanol, com concentração inicial de açúcares de $48,7 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $3,4 \text{ g L}^{-1}$ de xilose. O butanol produzido apresentou concentração, rendimento e produtividade de $12,0 \text{ g L}^{-1}$, $0,60 \text{ mol mol}^{-1}$ açúcar, e $0,89 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, mostrando alto potencial da *Neochloris aquatica* CL-M1 para fermentação de butanol.

3.7.4 Biohidrogênio

O hidrogênio possui o maior conteúdo de energia por unidade peso de qualquer combustível conhecido, 142 kJ/kg (FERREIRA et al., 2018). Encontra-se sempre combinado com outros elementos. Existem várias formas de dissociá-lo, por exemplo, a partir de combustíveis fósseis (pirólise, gaseificação e outros), métodos não-biológicos (eletrolise da água, decomposição termoquímica, entre outros), e biológicos (através de microrganismos, processos fotossintéticos, fermentativos e híbrido) (RODRIGUES, 2016).

As microalgas verdes são capazes de produzir H_2 por biofotólise direta e indireta. A biofotólise direta ocorre em presença de luz solar capturada na fotossíntese, o H_2 é diretamente gerado a partir da quebra da molécula de água, com liberação concomitante de O_2 . No processo de biofotólise indireta a geração de H_2 ocorre a partir da quebra da molécula de carboidrato, geralmente glicose, previamente sintetizado pelo sistema biológico em presença de água e de CO_2 absorvido da atmosfera, liberando H_2 e CO_2 (GONÇALVES et al., 2015).

Foi avaliado o potencial da biomassa produzida de *Scenedesmus obliquus* através da fermentação escura para produção de H_2 , obtendo-se 390 e 378 mL H_2 g⁻¹ (em termos de sólidos voláteis) para as biomassas cultivadas em águas residuárias da criação de suínos e aves, respectivamente (FERREIRA et al. 2018).

3.7.5 Bioetanol

De acordo com a definição técnica da Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, etanol é um biocombustível líquido derivado de biomassa renovável, que tem como principal componente o álcool etílico, que pode ser utilizado, diretamente ou mediante alterações, em motores a combustão interna com ignição por centelha, em outras formas de geração de energia ou em indústria petroquímica, podendo ser obtido por rotas tecnológicas distintas (BRASIL, 1997).

Garside (2019) retratou estatisticamente a produção de etanol combustível nos principais países e regiões em 2018. Sendo os Estados Unidos maior produtor com aproximadamente 91 milhões de m³. Com mais de 30 milhões de m³, o Brasil ficou em segundo lugar, seguido da União Europeia e China com produções em cerca de 5 e 4 milhões de m³, respectivamente. O resto do mundo teve uma produção de 7,7 milhões de m³ neste ano, aproximadamente.

Dentre os biocombustíveis disponíveis, o bioetanol destaca-se por apresentar menor toxicidade, ser facilmente biodegradável e emitir menos poluentes. Podendo ser produzido a partir de matérias primas como cana-de-açúcar e beterraba, denominado etanol de primeira geração, a partir de resíduos agroindústrias (biomassa lignocelulósica) (etanol de segunda geração) e, recentemente, utilizando a biomassa microalgal obtém-se o etanol de terceira geração.

As etapas para produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal são: cultivo de biomassa, colheita, pré-tratamento e/ou hidrólise, fermentação e destilação (SILVA et al., 2018). O principal desafio é liberar os açúcares fermentáveis das células de microalgas de forma eficiente, pois a conversão natural da biomassa microalgal em

açúcar fermentável é extremamente lenta devido o material celulósico ser bem protegido pela matriz celular (ELDALATONY et al., 2016).

Na etapa de hidrólise os métodos mais eficientes são os ácidos e enzimáticos. Os ácidos têm a vantagem de não precisar de pré-tratamento, enquanto os enzimáticos necessitam que as células sejam explodidas/abertas de modo a permitir uma adequada acessibilidade as enzimas. A hidrólise enzimática tem sido considerada vantajosa devido sua maior seletividade e baixa produção de hidrolisados tóxicos em comparação a hidrólise ácida. No entanto, muito da etapa de fermentação ainda preciso ser entendido para se consolidar um processo industrial, pois em muitos casos as eficiências de conversão de açúcar para etanol ainda são baixas (ELDALATONY et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Onay (2019) avaliou produção de bioetanol a partir de *Hindakia tetrachotoma* ME03 cultivada em diferentes concentrações de águas residuais num fotobiorreator plano (0%, 25%, 50%, 75% e 100%), e diferentes estratégias de hidrólise (ácida, alcalina e enzimática) para sacarificação da microalga. O teor máximo de bioetanol e o rendimento percentual de biomassa obtidos foram $0,11 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{biomassa}}$ e $94 \pm 2,2\%$, respectivamente, após fermentação de 36h via *Saccharomyces cerevisiae* em 50% das águas residuárias. Hidrólise enzimática com β -glicosidase/celulase + α -amilase tiveram as maiores quantidades de sacarificação com $92,3 \pm 0,9\%$.

3.8. Tecnologias para a produção de etanol combustível

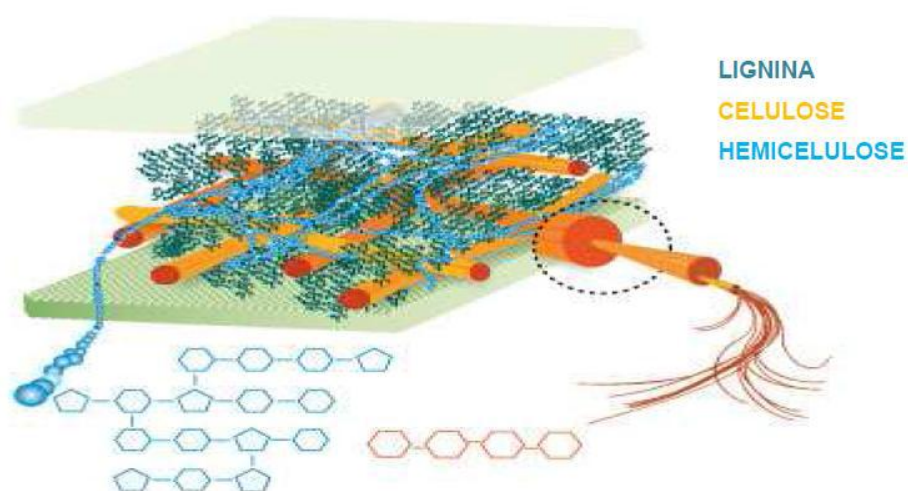
3.8.1 Biomassas de primeira, segunda e terceira geração para a produção de etanol: diferenças e vantagens

O processo convencional de produção de etanol se baseia na fermentação de açúcares presentes em cultura tradicionais como cana-de-açúcar e milho, este procedimento dá origem ao que se denomina de etanol de primeira geração. Entretanto, ao se utilizar resíduos agroindustriais como matéria-prima (biomassas lignocelulósicas, por exemplo, bagaço da cana-de-açúcar e palha do milho), obtém-se o etanol de

segunda geração. O chamado bioetanol de terceira geração utiliza como substrato da fermentação etanólica a biomassa de microalgas/cianobactérias, microrganismos capazes de ostentar produções anuais de carboidratos superiores que biomassas de primeira ou segunda geração.

Biomassas lignocelulósicas, compostas basicamente por 40 a 60% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 15 a 25% de lignina, tem sido considerado uma alternativa bastante promissora na substituição de fontes não renováveis de energia, tanto na produção de energia térmica ou elétrica quanto na produção de combustíveis para veículos automotores. Para a produção de etanol a partir desse tipo de biomassa, busca-se por processos capazes de realizar com eficiência a dissociação do complexo lignina-celulose-hemicelulose, que se associam entre si formando um material de difícil degradabilidade (Figura 5) (SOUZA et al., 2013). A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica compreende geralmente as etapas de pré-tratamento, hidrólise, fermentação, separação da lignina, recuperação e concentração do etanol.

Figura 5 - Esquema estrutural simplificado da biomassa lignocelulósica.



Fonte: BORTALAZZO (2011).

O processo de produção de bioetanol a partir de microalgas é bastante similar ao processo empregado na transformação de materiais lignocelulósicos, não sendo

necessária a etapa de separação de lignina devido a ausência da mesma. A seleção de uma espécie de microalga com a habilidade de produzir altas concentrações de carboidratos ao invés de lipídios como composto de reserva energética é um fator importante para o sucesso do processo produtivo de etanol de terceira geração (KLEIN, 2013).

Algumas vantagens e desvantagens da produção de bioetanol a partir de culturas de primeira, segunda e terceira geração são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens das culturas de primeira, segunda e terceira geração para produção de bioetanol.

Classificação	Vantagens	Desvantagens
1ª Geração	Tecnologia solidificada; Baixos custos de produção.	Uso de grandes extensões de terra; Produção limitada a estações do ano; Necessidade do uso de adubos e agrotóxicos; Competição com alimentos; Redução da biodiversidade do solo, causando erosão; Culturas associadas ao clima.
2ª Geração	Matéria-prima abundante na natureza; Utiliza resíduos agroindustriais como matéria-prima, reciclagem.	Necessário pré-tratamento da biomassa; Dificuldade a sacarificação devido a presença da lignina; Uso de enzimas específicas; Barreiras tecnológicas viáveis para larga produção.
3ª Geração	Não possuem lignina na parede celular; Alta taxa de crescimento em comparação a culturas convencionais; Consumo de CO ₂ , redução de GEE; Pode ser associado ao tratamento de águas residuárias; As microalgas podem ser cultivadas em solos improdutivos, como desertos.	O cultivo de microalgas apresentam custos mais altos e desafios técnicos maiores em comparação ao cultivo de culturas tradicionais; Elevado custo de colheita da biomassa; Excesso ou ausência de nutrientes inorgânicos e condições ambientais favoráveis podem afetar a concentração de carboidratos da biomassa; Contaminação do meio de cultivo por microrganismos indesejáveis; Necessário pré-tratamento da biomassa; Barreiras tecnológicas para produção em larga escala.

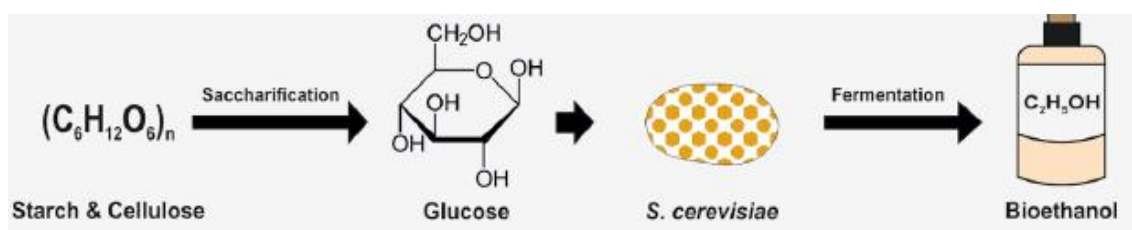
Fonte: Adaptado de SILVA (2014) e KLEIN (2013).

3.8.2 Bioquímica da produção de etanol a partir de monossacarídeos

O processo de obtenção de etanol 2G e 3G envolve a etapa de hidrólise de polissacarídeos em açúcares de cadeias menores (monossacarídeos) que são

fermentescíveis. A etapa seguinte, fermentação, irá converter a glicose (açúcar) em álcool por meio de fermentadores, por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual utiliza os açúcares em seu metabolismo e excreta bioetanol, Figura 6.

Figura 6 – Sistema simplificado da sacarificação e fermentação da microalga para produção de etanol.



Fonte: ONAY (2019).

A hidrólise de microalgas produz uma solução de carboidratos rica em açúcares simples oriundos da quebra das paredes celulares. No entanto, fermentadores tradicionais, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou a bactéria *Zymomonasmobilis*, produzem etanol de forma eficiente a partir hexoses (glicose), não sendo capazes de fermentar pentoses (xilose) (KLEIN, 2013; SILVA, 2014). Neste caso outras cepas de fermentadores são necessárias, como *Pichia stipitis* (também conhecida como *Scheffersomyces stipitis*), *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida shehatae* e *Pacchysolen tannophilus*, embora as taxas de produção de etanol sejam lentas quando comparadas ao sistema de fermentação *Saccharomyces*-glicose (SILVA e BERTUCCO, 2016).

Uma biomassa de microalgas rica em carboidratos (~50%) tem uma produção teórica de bioetanol de cerca de 0,26 g_{etanol}/g_{biomassa} (com base na estequiometria de Gay-Lussac, 1g monômero-glicose produz 0,5111 g_{etanol}), mas a eficiência depende da extração de açúcares e métodos de sacarificação, que não devem degradar os açúcares e garante altas taxas de produção de monômero (SILVA et al., 2019).

4. METODOLOGIA

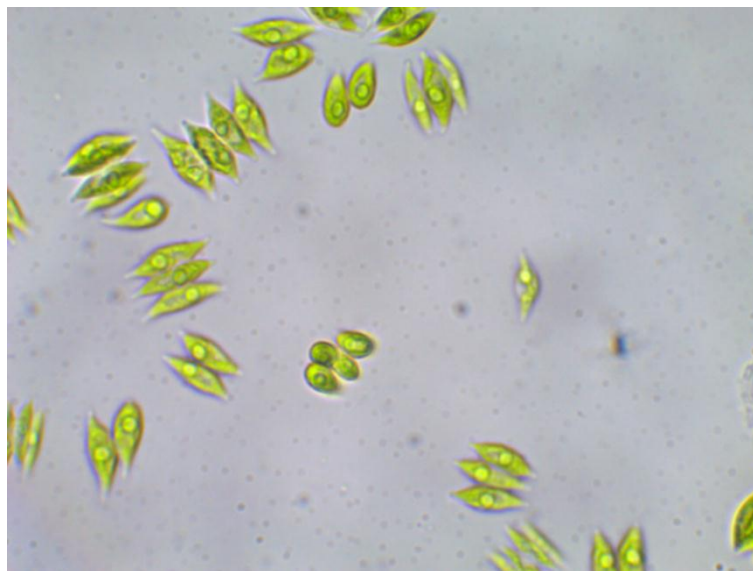
A metodologia consistiu, inicialmente, na coleta do efluente na unidade geradora seguida da sua caracterização, e na seleção da cepa de microalga utilizada. Posteriormente, foi realizada a montagem do biorreator em escala laboratorial, inoculando-os com diferentes concentrações de efluentes. Os tratamentos foram realizados no período de 15 (quinze) dias cada, no qual foram analisados antes, durante e após o tratamento. Por fim, realizou-se a análise de produtividade de etanol máximo a partir da biomassa microalgal produzida.

4.1 Coleta e armazenagem do soro do leite e microalga

O soro do leite foi coletado no Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba (9°34'29.08"S 35°49'15.25"O) em janeiro de 2019, sendo um subproduto da produção de queijo coalho. O mesmo foi conduzido ao Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos (LTBA) no Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, onde passou por um processo de separação de partículas sólidas grosseiras através de centrifugação (3000 rpm e 15 min) para remoção apenas da parte líquida e filtração em papel de filtro qualitativo. Em seguida, o efluente centrifugado e filtrado foi congelado (-12 a -18°C).

A microalga utilizada foi a espécie *Tetrademus sp.* LCE-01, ilustrada na Figura 7, isolada por diluição seriada em meio BG-11 a partir de uma amostra de floração cedida pelo Departamento de Biologia da Universidade Federal de Alagoas. A manutenção da microalga em meio solidificado de ágar nutriente (Kasvi), e em meio líquido para uso como inóculo de BG-11 (*blue-green medium*) (RIPPKA et al., 1973). As concentrações de inóculo nos tanques foram de aproximadamente 20-50 mg/L de peso seco celular, com a finalidade de verificar a adaptabilidade da microalga em manter a dominância e se adaptar a simbiose com os microorganismos contaminantes naturais.

Figura 7 – Imagem de microscópio óptico da microalga *Tetrademus sp.* LCE-01 com aumento de 1000x.



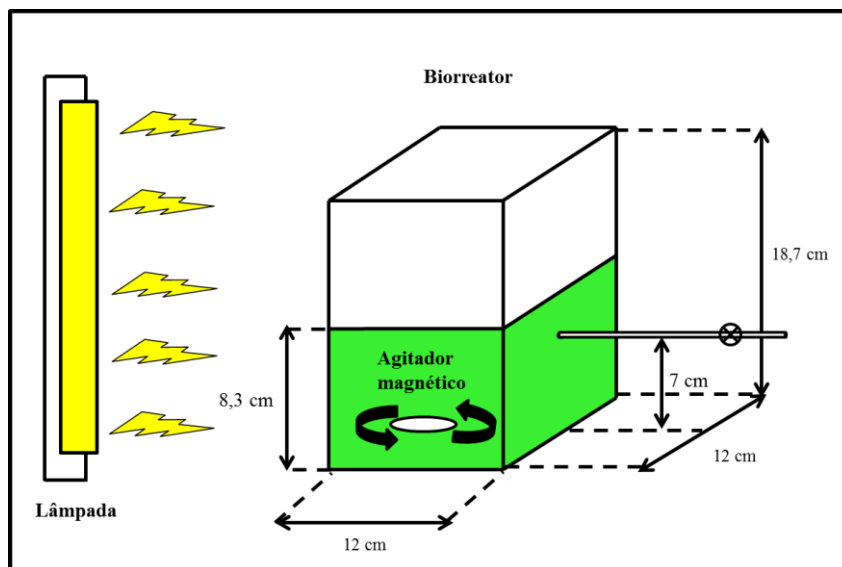
Fonte: AUTOR (2019).

4.2 Experimentos

Os biorreatores foram construídos em vasos de acrílico transparente (PoliControl) com dimensões de 18,7 cm x 12 cm x 12 cm. O volume inicial utilizado em cada experimento foi 1,2 L, no qual se variou a concentração de soro do leite (0,5%, 1%, 2% e 4%), os ensaios foram constantemente agitados magneticamente (SP LABOR), e realizados a temperatura de 30-35 °C.

Os ensaios consistiram em monitorar a influência da intensidade de luz (medida com um radiômetro Delta Ohm 2302.0). Foram utilizados valores de 50 e 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, verificando-se o crescimento da microalga e a remoção dos contaminantes associados, Figura 8.

Figura 8 – Esquema do sistema de tratamento utilizado no trabalho.



Fonte: AUTOR (2019).

4.2.1 Caracterização do Soro do Leite e Análises Antes e Após o Tratamento

Os principais parâmetros utilizados na caracterização dos efluentes foram sólidos totais (por gravimetria), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio total e fósforo total. As amostras após serem coletadas passaram por centrifugação a 9000 rpm por 5 min (ACB Labor Dry-Bloch), para separar a fase sólida (lodo microbiano) da líquida, onde os contaminantes são medidos. Em seguida, principalmente para determinação da DQO, as amostras passaram em filtros de nitrato e nitrato acetato celulose de 0,20 e 0,45 μm , respectivamente; para eliminar eventuais sólidos que possam não ter sido eficientemente removidos na centrifugação e que afetam a análise.

4.2.2 Peso seco celular

Os sólidos separados na etapa de centrifugação foram transferidos para cápsulas previamente aferidas e levadas a estufa a 105°C por 2h, ou até peso constante, em seguida resfriadas em dessecador por 15 minutos e pesados.

Cálculo:

$$\text{Peso seco celular (PS)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{N}{V} \cdot 10^6 \quad (1)$$

Onde:

N = massa do resíduo seco (massa da cápsula com o extrato seco menos a tara da cápsula) em g;

V = volume tomado da amostra, em mL.

4.2.3 Demanda Química de Oxigênio - DQO (Método Colorimétrico - Standard Methods 5220 D)

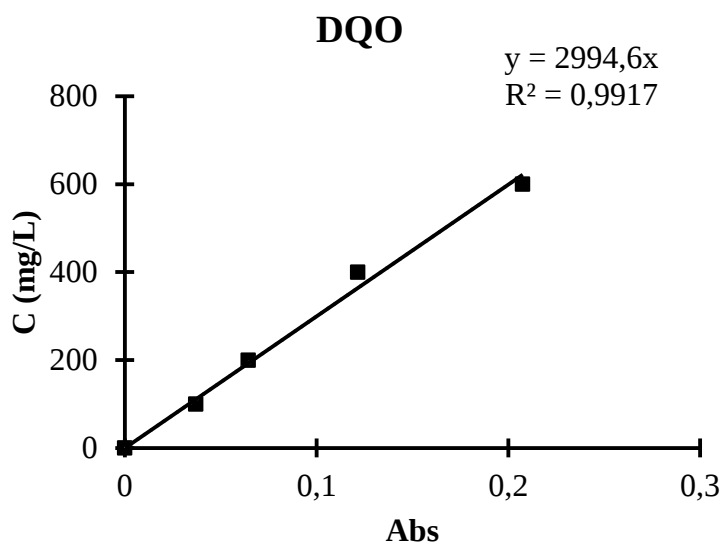
Os tubos de ensaio foram lavados com H₂SO₄ 20% para eliminar interferentes de amostras anteriores. Foram adicionados aos tubos 2,5 mL da amostra previamente filtradas, 1,5 mL da solução de digestão (dicromato de potássio e sulfato de mercúrio) e 3,5 mL do reagente de ácido sulfúrico (sulfato de prata diluído em ácido sulfúrico). Os tubos foram colocados no bloco digestor a 150°C por 2 horas. Após atingir temperatura amente foram realizadas as leituras no espectrofotômetro a 600 nm (Shimadzu, UV-mini 1240). O valor obtido no espectrofotômetro é expresso em mg O₂ L⁻¹ de DQO.

Para preparo da solução de digestão adicionou-se em 125 mL de água destilada 2,554 g de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), previamente seco em estufa a 103°C por 2 horas, 41,75 mL de ácido sulfúrico, 8,325 g de HgSO₄. Após dissolver e esfriar completou-se o volume em balão volumétrico de 250 mL com água destilada.

Reagente de ácido sulfúrico: adicionou 2,03 g de sulfato de prata (Ag_2SO_4) em 200 mL de ácido sulfúrico concentrado. A dissolução completa do sulfato de prata demorou cerca de 24 horas.

Solução padrão de Biftalato de potássio: pesou-se 425,0 mg Bifatalato de potássio, $\text{HOOC}_6\text{H}_4\text{COOK}$, previamente seca em estufa a 120°C por 2 horas, e dissolveu em água destilada até o volume para 1000 mL em balão volumétrico. Esta solução é estável por até 3 meses quando guardada sob refrigeração. Relação teórica entre o biftalato de potássio e a DQO: 1 mg de biftalato de potássio = 1,171 mg O_2 .

Figura 9 - Curva padrão de DQO.



Fonte: AUTOR (2019).

4.2.4 Nitrogênio Total

O procedimento foi baseado no Método de Kjeldahl, consistindo em um processo constituído por 3 etapas, digestão da amostra, destilação e titulação; adaptado para efluentes agroindustriais (IAL, 2005). A primeira etapa consiste na digestão da matéria orgânica no qual foram adicionados 5 mL da amostra, 1g de mistura catalítica

(sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8) e 10 mL de ácido sulfúrico PA, em tubos de Kjeldahl, e em seguida aquecido em bloco digestor (TECNAL, TE007 MP), a temperatura foi elevada suavemente atingindo cerca de 300°C, as amostras digeridas apresentaram coloração incolor ou levemente esverdeada.

Na segunda etapa ocorreu a destilação do nitrogênio. Nos tubos onde ocorreu a digestão, após se resfriarem à temperatura ambiente, foram adicionadas de um pouco de água cuidadosamente, e 2 gotas de fenolftaleína 1% sendo em seguida acoplados no destilador de nitrogênio (TECNAL, TE-0363), inseriu-se NaOH 40% até pH alcalino (mudança da coloração para rosa). Iniciou-se processo de aquecimento da amostra (início do processo de destilação) sendo o destilado coletado em um erlenmeyer de 250 mL contendo ácido bórico. O erlenmeyer continha 25 mL de ácido bórico 4%, 2 gotas do indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas do indicador verde de bromocresol 0,2%. A destilação ocorreu até que se recolheu um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

Por fim, a solução do erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,001 N padronizado até o aparecimento da coloração rosada.

Cálculo:

$$\text{Nitrogênio Total (NT)} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot f_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot 14000}{V} \quad (2)$$

Onde:

V_{HCl} = Volume gasto na titulação com ácido clorídrico;

f = Fator de correção da solução de ácido clorídrico;

N = Normalidade ácido clorídrico;

V = Volume da amostra.

Padronização da solução de ácido clorídrico: Colocou-se certa quantidade de carbonato de sódio (Na_2CO_3 PM=106) em estufa a 100°C por 1 hora, deixou esfriar em dessecador por 15 minutos. Pesou cerca de 0,25g de bicarbonato isento de umidade, dissolveu em água isenta de CO_2 (previamente fervida), adicionou-se 2 gotas de alaranjado de metila. Titulou-se com a solução de HCL até a primeira coloração.

Cálculo:

$$f = \frac{2.m}{0,106.V_{HCl}.N_{HCl}} \quad (3)$$

Onde:

f = Fator de correção da solução de ácido clorídrico;

m = massa do bicarbonato;

V_{HCl} = Volume gasto na titulação com ácido clorídrico;

N = Normalidade ácido clorídrico.

4.2.5 Nitrogênio amoniacal

Para amônia, o procedimento é semelhante, no entanto não há digestão e se utiliza 10 mL da amostra. Na destilação do nitrogênio para determinação de amônia, os tubos com a amostra e adicionados de água destilada até a metade são adicionados de 2 gotas de fenolftaleína 1% e verifica-se se a mesma é alcalina apresentando coloração rósea; caso não, neutralizar com NaOH 40% (poucas gotas) até que atinja a coloração mencionada. Em seguida, são acoplados no destilador de nitrogênio. Inicia-se processo de aquecimento da amostra (início do processo de destilação) sendo o destilado coletado em um erlenmeyer de 250 mL contendo ácido bórico. O erlenmeyer continha 25 mL de ácido bórico 4%, 2 gotas do indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas do indicador verde de bromocresol 0,2%. A destilação ocorreu até que se recolheu um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

Por fim, a solução do erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,001 N padronizado até o aparecimento da coloração rosada.

Cálculo:

$$\text{Nitrogênio amoniacal} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{V_{HCl}.f_{HCl}.N_{HCl}.14000}{V} \quad (4)$$

Onde:

V_{HCl} = Volume gasto na titulação com ácido clorídrico;

f = Fator de correção da solução de ácido clorídrico;

N = Normalidade ácido clorídrico;

V = Volume da amostra.

4.2.6 Fósforo Total

Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de água destilada, 1 mL da amostra e 0,4 mL da solução desenvolvedora de cor, tampou-se os tubos e aguardou-se cerca de 10 min, em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 706 nm (Shimadzu, UV-mini 1240).

Cálculo:

$$\text{Fosfato Total (FT)} (PO_4^{3-}) \left(\frac{mg}{L}\right) = 11,031. \text{Abs. Diluição} \quad (5)$$

Onde:

Abs = Valor da Absorbância obtida em espectrofotômetro;

Diluição = Diluição da amostra.

Para a conversão em fósforo basta multiplicar pela relação entre as massas moleculares de fósforo e fosfato, de 31 e 95 g/mol, consistindo de um fator 31/95.

A solução desenvolvedora de cor foi formada pela seguinte fração das soluções: A = 0,5; B=0,05; C=0,15; D=0,3. Esta solução é estável por 4 horas.

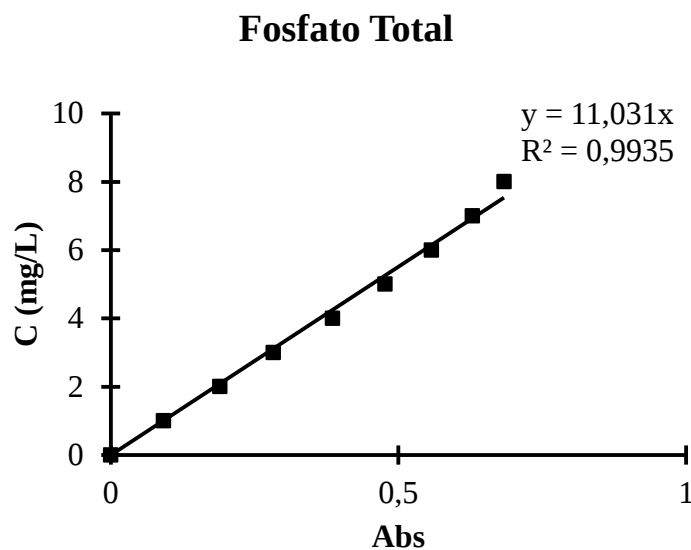
Solução A: ácido sulfúrico 5 N;

Solução B: tartarato misto de antimônio e potássio hemihidratato: 1,3715g de $K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot 1/2H_2O$ para 500 mL de água;

Solução C: mobilidato de amônio: 20 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4.H_2O$ p/ 500mL de água;

Solução D: ácido ascórbico 0,01M, 1,76 g p/ 100 mL de água.

Figura 10 - Curva padrão de Fosfato total.



Fonte: AUTOR (2019).

4.2.7 Determinação do pH

Transferiu-se uma alíquota da amostra para um Becker. Determinou-se o pH com o aparelho previamente aferido (tampões pH 4,0 e pH 7,0), operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante (TECNAL).

4.2.8 Cálculos da % de N e P removido em biomassa

Para o cálculo da porcentagem desses componentes celulares utilizou-se as medidas iniciais e finais dos contaminantes assim como do peso seco obtido. Detalhados nas equações a seguir:

$$\frac{N}{X}(\%) = \frac{(NT_{final} - NT_{inicial})}{(PS_{final} - PS_{inicial})} * 100 \quad (6)$$

Onde:

N/X = porcentagem de nitrogênio em biomassa absorvida durante o tratamento.

NT = nitrogênio total;

PS = peso seco celular.

$$\frac{P}{X} (\%) = \frac{(FT_{final} - FT_{inicial})}{(PS_{final} - PS_{inicial})} * \frac{31}{95} * 100 \quad (7)$$

Onde:

P/X = percentagem de fósforo em biomassa absorvida durante o tratamento;

FT = fósforo total;

PS = peso seco;

31 = massa molecular do fósforo;

95 = massa molecular do fosfato.

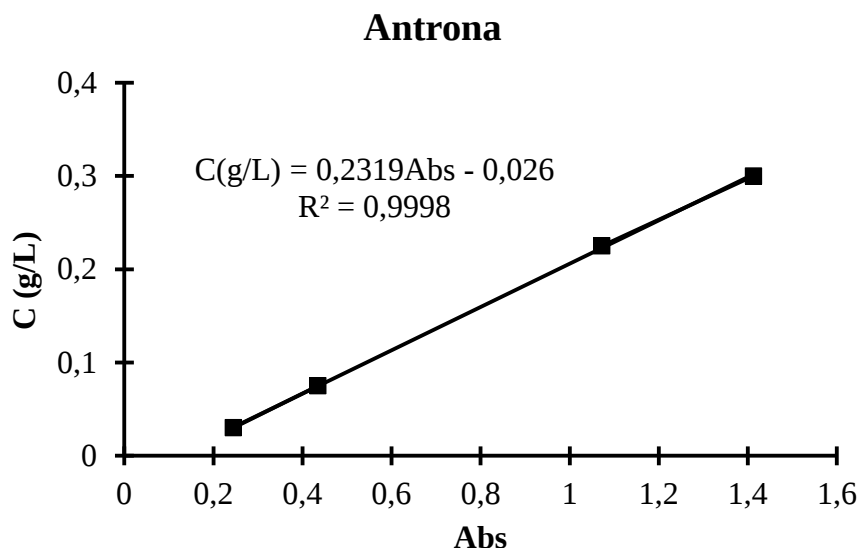
4.2.9 Determinação de açúcares totais pelo método de Antrona

A determinação dos açúcares totais foi feita pelo método espectrofotométrico, adaptada a partir de Trevelyan e Hanrison (1952), que utiliza o reagente de antrona e com medição da absorbância realizada a 625nm. A composição do reagente de Anthrona é feito com mistura de 36 mL de Ácido sulfúrico (H₂SO₄), 14 mL água destilada e utilizando 0,1 g de antrona, completando um volume final de reagente para 50 mL, ou seja, uma solução sulfúrica a 71% com 1g/L de antrona. Com a solução faz-se a reação das amostras com o reagente Anthrona, misturando inicialmente em tubos de ensaio 0,4 ml da amostra, diluídas adequadamente quando necessárias com 3,6 ml do reagente de antrona, em seguida os tubos são levados à banho fervente por 10 min.

Para tal leitura, é necessário o preparo de uma curva padrão de glicose. Foi preparada uma solução de glicose 0,3 g/L (solução mãe), a partir da qual se formulou as diferentes concentrações presente na curva padrão (0,03-0,3 g/L), por diluição.

No Gráfico 3 é apresentada a curva padrão para a reação de antrona, e utilizada no estudo.

Figura 11 - Curva padrão de Antrona.



Fonte: AUTOR (2019).

4.3 Análise de produtividade de etanol máximo a partir do resíduo microbiano

Para avaliar a potencialidade da biomassa de microalgas residual é necessário o cálculo do volume de etanol produzido. Para determinação da concentração de açúcar foi empregado a equação 8.

$$C_{a\acute{c}ucar} \left(\frac{mg}{L} \right) = M_{mb} \cdot \%Carboidratos \quad (8)$$

Onde:

$C_{a\acute{c}ucar}$ = Concentração de açúcar;

M_{mb} = Concentração em massa do consorcio microalga-bactéria.

Após a recuperação da biomassa, os valores da massa de açúcar e massa de açúcar corrigida foram obtidos através das equações 9 e 10. Para tanto, considerou-se um sistema de tratamento com volume útil de 100 m³ e um TDH (tempo de detenção hidráulica) de 15 dias, tempo considerado nos experimentos desse trabalho.

$$M_{açúcar} \left(\frac{Kg}{ano} \right) = \frac{C_{açúcar} \cdot V_{reator}}{TDH} \quad (9)$$

$$M_{açúcar\ corrigida} \left(\frac{Kg}{ano} \right) = M_{açúcar} \cdot 1,1 \quad (10)$$

Onde:

$M_{açúcar}$ = Massa de açúcar;

V_{reator} = Volume de tratamento;

$M_{açúcar\ corrigida}$ = Massa de açúcar corrigida após hidratação dos monossacarídeos presentes em biomassa após a etapa da hidrólise.

As determinações de massa de etanol e o volume de etanol são obtidos a partir das equações 11 e 12, respectivamente.

$$M_{etanol} \left(\frac{Kg}{ano} \right) = M_{açúcar\ corrigida} \cdot 0,5111 \quad (11)$$

$$V_{ETANOL} (L) = \frac{m_{ETANOL}}{Densidade\ do\ etanol} \quad (12)$$

Onde:

0,5111 = estequiometria de Gay-Lussac, 1g monômero-glicose produz 0,5111 g_{etanol};

V_{etanol} = volume de etanol;

Densidade do etanol = 789 Kg.m⁻³ (densidade do álcool etílico hidratado combustível 96°GL a 25°C) (NOVACANA, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nessa seção os resultados obtidos no trabalho foram organizados sequencialmente. Se apresentou a caracterização físico-química do efluente utilizado no tratamento, mostrou-se o % de remoção em biorreator aberto inoculado com *Tetrademus sp.*, no qual também se desenvolvem contaminantes naturais, avaliando-se diferentes cargas orgânicas e intensidade de luz, quantifica-se a biomassa microbiana produzida, determinou-se o % de carboidratos em algumas amostras e calculou-se a produtividade anual de etanol que poderia ser obtida considerando um volume de sistema de tratamento de soro do leite.

5.1 Caracterização físico-química do soro do leite

A caracterização do soro leite, Tabela 6, mostrou elevados teores de DQO, assim como dos nutrientes essenciais para o metabolismo microalgal, Nitrogênio e Fósforo. Estas elevadas concentrações foram confirmadas por Salati et al. (2017), onde obteve $147 \text{ g O}_2 \text{ L}^{-1}$, 805 mg L^{-1} e 400 mg L^{-1} , de DQO, Nitrogênio e Fósforo, respectivamente, para o soro do leite. As diferenças observadas se devem, possivelmente, a diversos fatores agrônômicos, tipo de processamento, entre outros.

Tabela 6 – Caracterização do soro de leite.

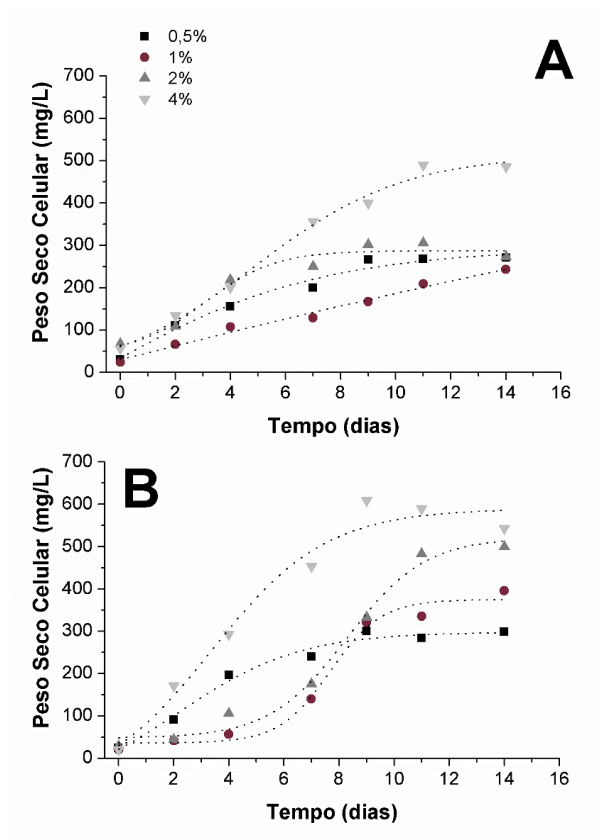
Parâmetro	Soro do Leite
DQO ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)	$87.442,38 \pm 2.695,12$
Nitrogênio total (mg N L^{-1})	$1.518,5 \pm 21,0$
Fosfato ($\text{mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)	$1.827,2 \pm 30,5$ ($601,32 \pm 4,98$, se considerar somente o fósforo)
pH	6,19

Fonte: AUTOR (2019).

5.2 Biomassa produzida

Para microalgas, microrganismos fotoautotróficos, o suprimento de luz influencia fortemente o crescimento celular, assim como foi verificado na Figura 12, onde o crescimento de microalga *Tetrademus sp.* aumentou gradualmente em todas as condições de cultivo, seja pelo aumento da concentração (conseguindo usar a mixotrofia) como pela maior intensidade luminosa ocasionou em uma maior produção de biomassa, mostrando um efeito positivo da intensidade de luz. Os valores de peso seco máximos se situaram entre 500-600 mg L⁻¹. Segundo Choi et al. (2016), o crescimento microbiano de microalgas é proporcional a remoção dos contaminantes, principalmente carbono orgânico, nitrogênio e fósforo.

Figura 12 – Curvas de crescimento de biomassa para *Tetrademus sp.* ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Fonte: AUTOR (2019).

Ho et al. (2012) estudaram o efeito da luminosidade (60 a $540 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na produ\u00e7\u00e3o de biomassa de microalgas *Scenedesmus obliquus* CNW-N. No qual observaram uma rela\u00e7\u00e3o positiva entre intensidade de luz e produtividade de biomassa, antes da fotoinibi\u00e7\u00e3o, que ocorreu na intensidade luminosa de $540 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sendo a produtividade m\u00e1xima de biomassa de $840,56 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ na intensidade luminosa de $420 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ou seja, com um pico de fotoinibi\u00e7\u00e3o, mas como neste trabalho se utilizou intensidades entre 50 - $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provavelmente a esp\u00e9cie usada n\u00e3o sofreu uma interfer\u00eancia negativa da intensidade luminosa.

O cons\u00f3rcio de microalgas-bact\u00e9rias utilizado por Garcia et al. (2019) consistiu principalmente de *Chlorella sp* (isolado de uma esta\u00e7\u00e3o de tratamento de \u00e1guas residuais de latic\u00ednios). Dois n\u00edveis de intensidade de luz foram avaliados (40 e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $12/12\text{h}$). A produtividade m\u00e1xima de biomassa ($105,2 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi obtida sob maior intensidade de luminosa.

Como afirmado anteriormente, a produtividade de microalgas n\u00e3o depende apenas da disponibilidade de carbono, mas tamb\u00e9m de nutrientes, como nitrog\u00eanio e f\u00f3sforo. O qual pode ser confirmado por Salati et al. (2017), onde cultivaram *Chlorella vulgaris* usando soro do queijo ($\text{DBO}_5/\text{DQO} = 0,66 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{NT} = 805 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{P} = 400 \text{ mg L}^{-1}$), borra de vinho branco ($\text{DBO}_5/\text{DQO} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{NT} = 219 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{P} = 180 \text{ mg L}^{-1}$), e glicerol ($\text{DBO}_5/\text{DQO} = 0,78 \text{ mg L}^{-1}$, concentra\u00e7\u00f5es de N e P abaixo dos n\u00edvel detect\u00e1veis, o ultrafiltrado foi utilizado como fonte de N (1377 mg L^{-1}) e P (300 mg L^{-1}), representando menos de 2% C), como fontes de carbono ($2,2 \text{ g C L}^{-1}$), sob condi\u00e7\u00f5es mixotr\u00f3ficas e cultivo cont\u00ednuo (25°C , $\text{pH } 8,4$, aera\u00e7\u00e3o cont\u00ednua de 10 L min^{-1} , $540 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O FBR-SQ, caracterizado com a menor rela\u00e7\u00e3o DBO_5/DQO , apresentou a maior produtividade de biomassa ($2,59 \text{ g L}^{-1}$), seguido pelo FBR-BVB e FBR-G+UF ($1,75$ e $1,654 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente).

Foi relatado anteriormente que a intera\u00e7\u00e3o microalgas e bact\u00e9rias podem resultar em uma s\u00e9rie de mecanismos positivos e/ou negativos, como a troca ou competi\u00e7\u00e3o de recursos, por exemplo. Neste trabalho verifica-se que a presen\u00e7a das bact\u00e9rias n\u00e3o inibiu o crescimento das microalgas. O mesmo foi observado por Sforza et al. (2018), no qual comparou o crescimento do cons\u00f3rcio microalga-bact\u00e9ria em efluente real (*Chlorella*

protothecoides, e bactérias obtidas de lodo ativado) com a monocultura da microalga em efluente real e estéril. Onde o crescimento na presença do consórcio foi semelhante ao da cultura pura, com uma taxa de crescimento específica de $0,76 \text{ d}^{-1}$. Makut et al. (2019) observou uma melhoria significativa no crescimento de microalgas associadas (consórcio composto por duas microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Chlorella sp.* e duas bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter calcoaceticus*), quando compara a microalga isolada.

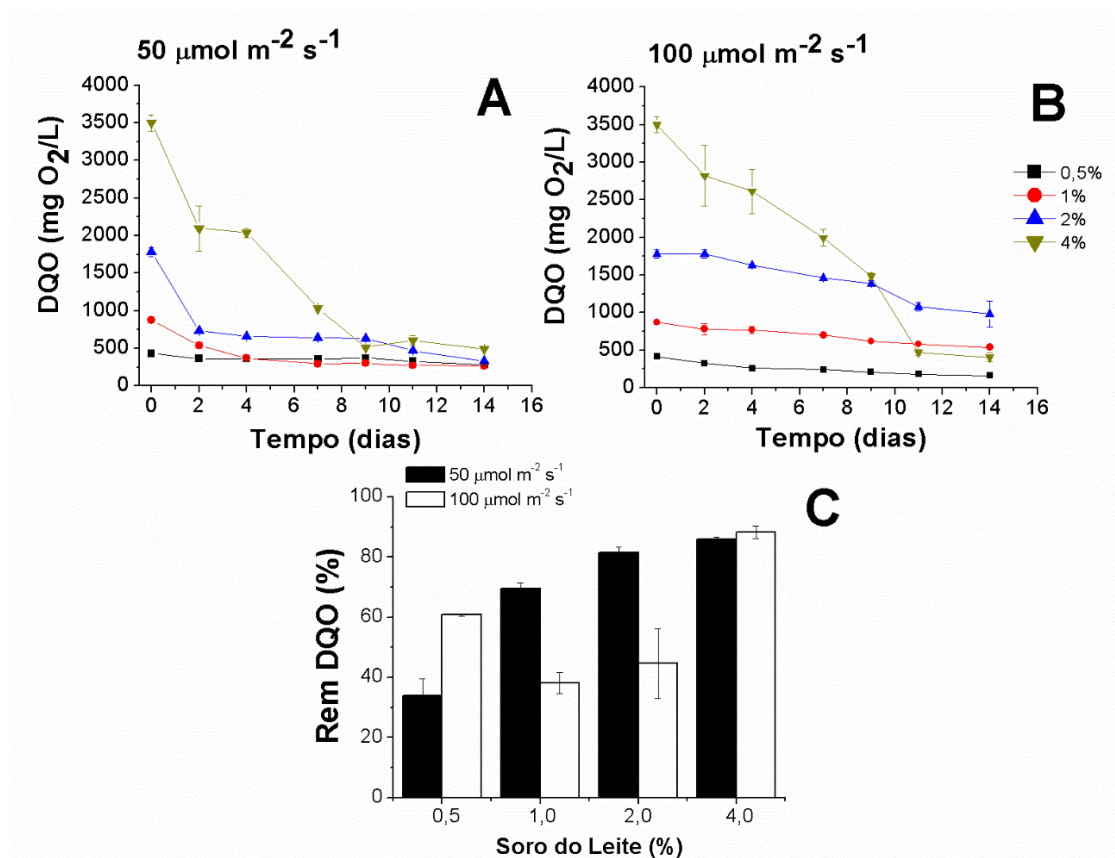
5.3 Remoção de DQO, NT e PT

Nota-se que à medida que a concentração de soro do leite e a intensidade de luz aumentam, a taxa de remoção de DQO também aumenta, exceto para os ensaios com concentrações 1 e 2% e intensidade de luz $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, como mostra a Figura 13. A baixa eficiência de remoção de DQO para esses casos ocorreram, provavelmente, devido o elevado pH do meio ($\text{pH} > 11$), inibindo a atividade bacteriana, consequentemente, prejudicando o tratamento através do consórcio microalgal-bacteriano.

Um exemplo de estudo que avaliou a remoção de DQO, nitrogênio e f\u00f3foro foi realizado com Markou (2015), que cultivou *Chorella vulgaris* em efluente da digest\u00e3o anaer\u00f3bia de granja, rico em am\u00f4nio, ($\text{NH}_4^+-\text{N} = 4315 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{PT} = 96 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{DQO} = 25.821 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Para cultivo inicial a \u00e1gua residual foi dilu\u00edda 100 vezes, utilizando quatro n\u00edveis de alimenta\u00e7\u00e3o em batelada (5, 10, 20 e $30 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), por 12 dias. A *C. vulgaris* apresentou uma fase de lat\u00eancia at\u00e9 o dia 4, em seguida o seu crescimento foi desimpedido em todas as culturas. A densidade final da biomassa foi semelhante para todas as condi\u00e7\u00f5es de cultivo, exceto $5 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, atingindo 1407 ± 8 , 1526 ± 6 , 1522 ± 42 e $1433 \pm 98 \text{ mg L}^{-1}$, para 5, 1, 20 e $30 \text{ mg-N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. A adi\u00e7\u00e3o de \u00e1guas residuais ao meio de cultivo resulta em uma diminui\u00e7\u00e3o da penetra\u00e7\u00e3o da luz, consequentemente, na diminui\u00e7\u00e3o da taxa fotossint\u00e9tica. Para esse estudo, em os todos cultivos a densidade de biomassa n\u00e3o foram muito diferentes, mostrando que a absorva\u00e7\u00e3o de luz n\u00e3o teve influ\u00eancia significativa, provavelmente devido a presen\u00e7a de

compostos orgânicos que podem ser absorvidos pelas microalgas mixotroficamente. A remoção de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ e PT foram superiores a 95%. A remoção de DQO foi maior a medida que o nível de adição de efluente aumento, atingindo remoções em cerca de 75%.

Figura 13 – Desempenho da *Tetrademus sp.* na remoção de DQO ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de DQO para todas as condições de ensaios.



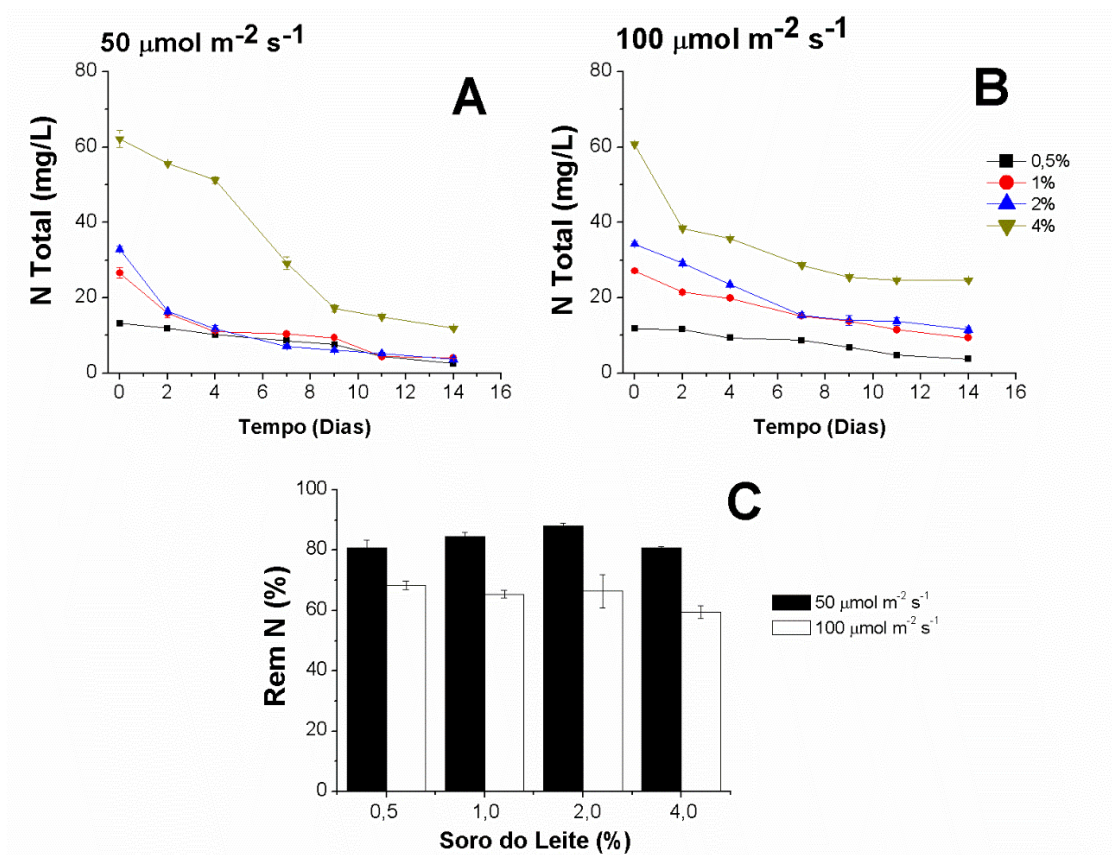
Fonte: AUTOR (2019).

Percebe-se que o consórcio foi eficiente na remoção da DQO e constitui-se de uma alternativa para o tratamento de efluentes. Shen et al. (2017) avaliaram o tratamento de efluente sintético através do consórcio microalgal-bacteriano (*Chlorella vulgaris* - *Pseudomonas putida*), sob condições de cultura em batelada. A alta remoção de DQO (97%), amônia (100%) e fósforo (100%), demonstram que o tratamento através

do consórcio é capaz de remover simultaneamente contaminantes das águas residuais em um único reator.

As melhores taxas de remoção de NT foram obtidas nos ensaios com menor intensidade luminosa ($50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com uma variação de 80-85%, com queda substancial das concentrações para níveis inferiores a 20 mg/L (Figura 14A-C).

Figura 14 - Desempenho da *Tetrademus sp.* na remoção de Nitrogênio Total ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de Nitrogênio Total para todas as condições de ensaios.



Fonte: AUTOR (2019).

A capacidade dos consórcios *Chorella vulgares* – *Bacillus licheniformis* e *Microcystis aeruginosa* – *Bacillus licheniformis* (razões 1:0-3) para recuperar DQO, NT

e PT de efluente sintético foram avaliados, em um período de 10 dias (JI et al., 2018). Maiores proporções de bactérias resultaram em um decréscimo mais rápido de nutrientes, com os melhores resultados na proporção 1:3. O sistema simbiótico *Chorella vulgares* – *Bacillus licheniformis* apresentou melhores remoções de DQO (86%), NT (89%), e PT (80%), o consórcio *Microcystis aeruginosa* – *Bacillus licheniformis* também apresentou boa remoção de DQO, NT e PT (65, 69 e 71%, respectivamente). Ambos os resultados indicaram que houve uma boa sinergia dos sistemas simbióticos para remoção dos contaminantes. Resultados semelhantes de remoção de DQO, nitrogênio total e fósforo, 88,82%, 84,87% e 82,25%, respectivamente, foram obtidos por Ji et al. (2019) para o tratamento de águas residuais municipais pelo consórcio *Chorella vulgares* – *Bacillus licheniformis*.

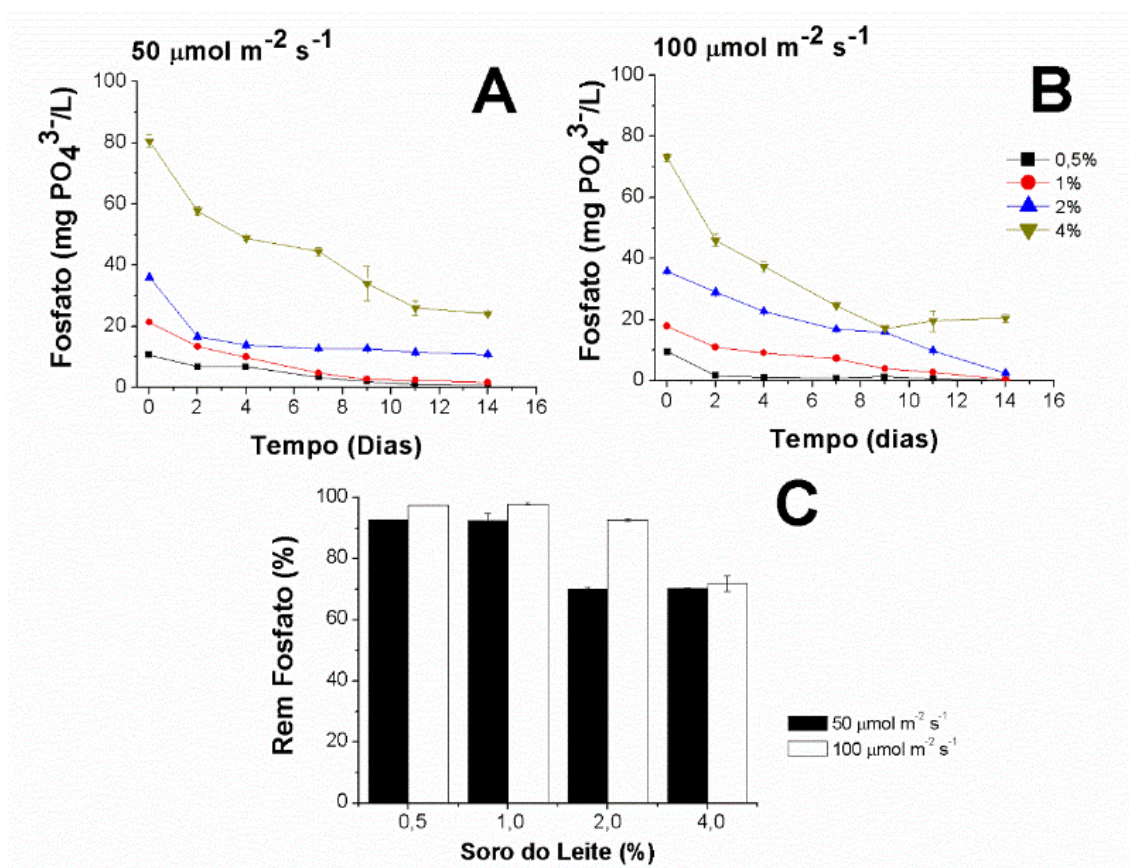
As melhores taxas de remoção de PT foram obtidas nos ensaios com maior intensidade luminosa ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e menores concentrações de soro do leite, alcançando uma remoção de quase 100%, com queda substancial das concentrações nos primeiros 10 dias de cultivo (Figura 15A-C).

Outro exemplo, foi o trabalho de Camejo et al. (2019), que avaliaram o efeito da luminosidade em cultura mista de microalgas (*Scenedesmus* e *Chorella*, e a presença de algumas diatomáceas, bactérias e cianobactérias em menores quantidades), para remediação de um efluente real ($\text{DQO} = 92 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{N} = 56,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{P} = 6,5 \text{ mg L}^{-1}$). Foram utilizadas três diferentes intensidades de luz (0, 150 e $300 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes duração e hora do dia da aplicação da luz, em um total de 8 experimentos. As melhores taxas de recuperação de nutrientes (86% para N e 84% para P) e produtividade de biomassa ($100 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foram alcançadas no ensaio com maior fluxo de fótons líquidos. No entanto, a maior irradiância também foi responsável por menor produtividade de biomassa ($23 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$). Os dados obtidos sugerem que o desempenho das microalgas não dependia da hora do dia em que a luz foi aplicada ou do comprimento dos fotoperíodos, mas do fluxo de fótons líquidos (intensidade luminosa).

Maiores taxas de remoção estão associadas a maior intensidade luminosa, pois o requerimento energético e estrutural de grupos fosfatos (NADPH, ATP, Ácidos

nucleicos etc.) são requeridos para um maior crescimento e maior fotossíntese realizada (SILVA e SFORZA, 2016).

Figura 15 - Desempenho da *Tetrademus sp.* na remoção de Fosfato ao longo do tempo em ensaios sob diferentes concentrações de soro do leite (%) e intensidade luminosa: (A) 50 e (B) 100 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (C) Percentual de remoção de Fosfato para todas as condições de ensaios.



Da mesma maneira, Sforza et al. (2018) exploraram as interações específicas entre a microalga *Chorella prothothecoides* e a bactéria *Brevundimonas diminuta* (isolada de lodo ativado) para melhorar a remoção de nutrientes de efluente real ($\text{NT} = 22 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{TP} = 3,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{DQO} = 225 \text{ mg L}^{-1}$). Verificou-se que a presença de *B. diminuta* aumentou a taxa de crescimento de microalgas até 5 vezes, e uma promissora

remoção simultânea de DQO, NT e PT, cerca de 92, 80 e 71%, respectivamente. Em baixa luminosidade, a presença de bactérias resultou em uma maior concentração de CO₂, o que impediu parcialmente a capacidade de microalgas de explorar o carbono orgânico.

Com os resultados exibidos, assim como a literatura discutida, percebe-se a potencialidade de remoção de DQO, nitrogênio e fósforo, alcançando % de remoção máximos em torno de 90, 98 e 80%, respectivamente.

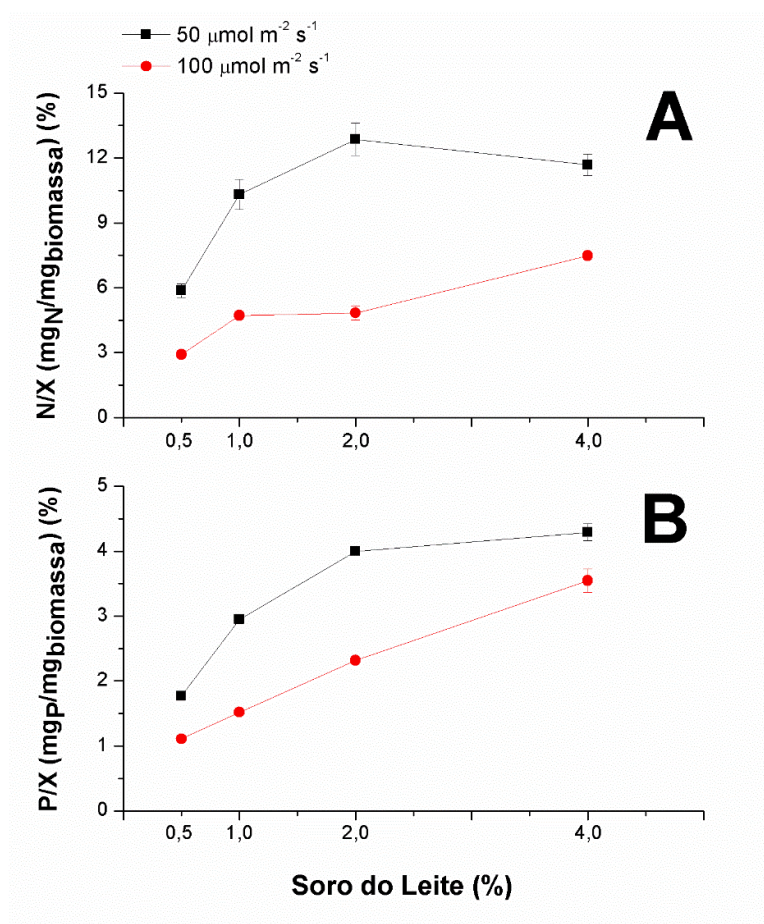
5.4 Percentagens de N/X e P/X

Como se percebe na Figura 16, o percentual de absorção de N e P foram maiores nas concentrações mais altas, provavelmente pelo fato de estarem em excesso. As microalgas podem absorver uma maior quantidade de nutrientes/contaminantes quando estão nessa condição (SILVA E SFORZA, 2016). Percebe-se, no entanto, que uma maior intensidade luminosa ocasionou uma redução desses componentes celulares em biomassa.

Xin et al. (2010) estudaram a microalga *Scenedemus sp.* e a relação N/P para remoção de nutrientes. Diante os resultados obtidos concluíram que as razões N/P de 5:1 – 8:1, o nitrogênio e o fósforo poderiam ser eficientemente removidos para as condições do estudo. Portanto, a diminuição da eficiência de remoção de nitrogênio pode ser devido a limitação de fósforo. A Formula empírica de Stumm cita que para microalgas é C₁₀₆H₂₆₃O₁₁₀N₁₆P (relação N/P = 7,2:1).

Vrede et al. (2002) verificou que a relação atômica C:N:P de bacterioplâncton crescida exponencialmente variou 32:6.4:1. Para células crescidas em limitação de carbono foi de 34:9.2:1, para limitadas por nitrogênio de 42:7:1 e para limitadas por fósforo foi de 172:16:1. Sendo a média geral, representada pela relação 45:7.4:1.

Figura 16 - % de Nitrogênio e Fósforo em biomassa.



Fonte: AUTOR (2019).

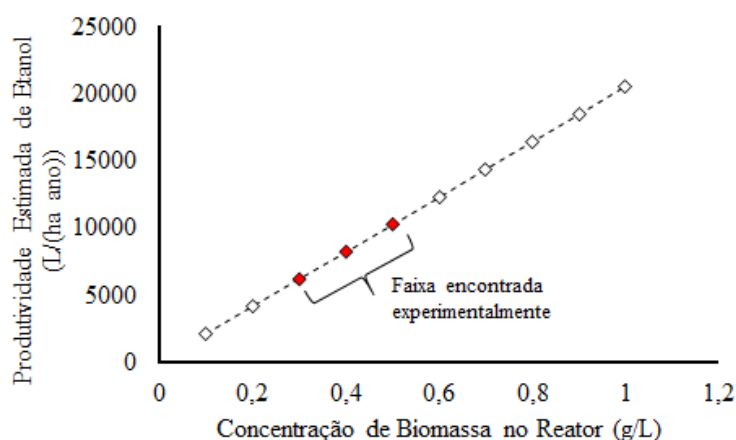
Nesse trabalho, verifica-se através da Figura 16, que a relação entre nitrogênio e fósforo na biomassa algal-bacteriana produzida variou entre 2-3,5:1, respectivamente, e a % de N e P em biomassa variou entre 3-13,5% e 1-4,5%, respectivamente. Silva e Sforza (2016) verificaram que para *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes condições ambientais (foram verificados principalmente a intensidade de luz e tempo de cultivo), assim como condições nutricionais (quantidades de N e P disponíveis), a % de N e P em biomassa variou entre 2-14% para N e 0,4-4% para P.

5.5 Determinação do teor de carboidratos e produtividade técnica de etanol por ano a partir de biomassa residual do tratamento de efluentes

A partir dos resultados para produção de biomassa nos reatores em batelada e em escala de laboratório, extrapolou-se para um sistema com 100 m³. O teor de carboidratos na biomassa foi de $63,2 \pm 2,3\%$ (foram analisadas as biomassas finais de todos os experimentos a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Como percebe-se na simulação apresentada na Figura 17, uma produtividade entre 6 a 10 mil litros de etanol por hectare ano. Esse valor é promissor, e mostra que realmente é possível pensar em utilizar a biomassa da estação de tratamento na produção de etanol 3G.

Figura 17 - Produtividade estima de etanol.



Considerações feitas: reator com profundidade de 20 cm, ou seja, uma área de 500 m², % de carboidratos em biomassa em torno de 60%, TDH de 15 dias.

Fonte: AUTOR (2019).

Na Tabela 7, é possível comparar esse valor simulado, e perceber que é maior ou igual a da maioria das biomassas utilizadas atualmente. Portanto, mesmo o biodiesel sendo muito considerado a partir da biomassa proveniente de sistemas de tratamento de efluentes (XU et al., 2006; TSOLCHA et al., 2016), o bioetanol também pode ser uma

alternativa, e tem sido estudado, mas ainda falta uma consolidação da tecnologia (ONEY, 2019).

Tabela 7 – Comparação de produtividade entre plantas e microalgas para biocombustíveis.

Matéria prima	Teor de carboidrato (%biomassa seca)	Produção ($L_{\text{bioetanol}}$ $\text{Ton}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	Uso da terra ($\text{m}^2 \text{ ano}$ $L_{\text{bioetanol}}^{-1}$)	Produção ($L_{\text{bioetanol}} \text{ ha}^{-1}$ ano^{-1})
Milho ¹	-	460	2,5	3.450-4.600
Beterraba ¹	-	100	1,3	5.000-10.000
Cana de açúcar ¹	-	90	1,2	5.400-10.800
Biomassa lignocelulósica ²	50-70	~ 400	1,0	~ 10.000
Microalga (BTC) ³	20	129	1,4-0,47	7.093-21.279
Microalga (MTC) ³	35	227	0,8-0,27	12.413-37.286
Microalga (ATC) ³	50	324	0,56-0,19	17.733-53.199
Microalga experimental ⁴	45-60	-	-	11.000-31.000
Expectativa máxima para microalgas ⁵	-	-	-	46.760- 140.290

BTC - baixo teor de carboidratos, MTC - médio teor de carboidratos, ATC - alto teor de carboidratos. ¹O BNDES (2008) foi utilizado para as produtividades de milho, beterraba e cana-de-açúcar. ²Santos et al. (2012) e Santos et al. (2014) (biomassa lignocelulósica da cana-de-açúcar). ³Para microalgas Acien et al. (2012) - *Scenedesmus almeriensis* com produtividade de 54,75-164,25 ton de biomassa $\text{ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ em fotobiorreator tubular aerado e temperatura abaixo de 35 ° C em condições externas de iluminação. ⁴Resultados experimentais do cultivo de microalgas quanto à produtividade de biomassa também foram utilizados e o etanol esperado calculado por estequiometria (1g de glicose dá 0,511g de etanol (SILVA e SFORZA, 2016; SILVA et al., 2017; SILVA et al.; 2018). ⁵A expectativa máxima foi mencionada por Cheryl (2008).

6. CONCLUSÃO

Microalgas associadas a bactérias (principalmente) são muito eficientes no tratamento do soro do leite. A intensidade de luz e a concentração do efluente influenciam significativamente no crescimento da biomassa do reator. A remoção da DQO foi influenciada positivamente pela intensidade de luz e concentração do efluente, e negativamente pelo pH, onde ocorreu a inibição da atividade bacteriana ($\text{pH} > 11$). A remoção de fósforo dependeu positivamente da intensidade de luz e negativamente da concentração do soro do leite. A remoção de nitrogênio foi inferior na maior intensidade de luz, mas não foi influenciada significativamente pela concentração do efluente. A relação N/P na biomassa microbiana gerada no reator depende significativamente da intensidade de luz e da carga orgânica podendo ser um *tool* para otimizar a remoção de contaminantes do efluente. A produtividade estimada de etanol por hectare a partir de biomassa microbiana se igualou ou foi maior que as tecnologias atualmente utilizadas, mostrando o potencial do estudo.

REFERÊNCIAS

- ACIÉN, F. G.; FERNANDÉZ, J. M.; MAGÀN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.*, Volume 30, Pages 1344-1353, 2012.
- ALKARAWIA, M. A. S.; C, CALDWELLB, G. S.; LEE, J. G. M. Continuous harvesting of microalgae biomass using foam flotation. *Algal Research*, Volume 36, Pages 125-138, 2018.
- BEHERA, B.; ACHARYA, A.; GARGEY, I. A.; ALY, N.; BALASUBRAMANIAN, P. Bioprocess engineering principles of microalgal cultivation for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology Reports*, 2018.
- BENTAHAR, J.; DOYEN, A.; BEAULIEU, L.; DESCHÊNES, J. Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetradismus obliquus* and production of β -galactosidase. *Algal Research*, Volume 41, 2019.
- BITOG, J. P.; LEE, I. B.; YOO, J. I.; HWANG, S. B.; HONG, S. W.; SEO, I. H. Development of a large-sized photobioreactor for microalgae production. *CIGR International Symposium of the Australian Society for Engineering in Agriculture*, Brisbane, Queensland, Australia, September 2009.
- BNDS. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDS, 2008.
- BORTOLAZZO, N. G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de São Paulo, 2011.
- BRASIL. Ministério da Casa Civil. Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997. Dispõe sobre a política energética nacional, as atividades relativas ao monopólio do petróleo, institui o Conselho Nacional de Política Energética e a Agência Nacional do Petróleo e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 1997.

CAMEJO, J. G.; VIRUELA, A.; RUANO, M. V.; BARAT, R.; SECO, A.; FERRER, J. Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, Volume 40, 2019.

CARRERES, B. M.; JAEGER, L.; SPRINGER, J.; BARBOSA, M. J.; BREUER, G.; END, E. J.; KLEINEGRIS, D. M. M.; SCHFFERS, I.; WOLBERT, E. J. H.; ZHANG, H.; LAMERS, P. P.; DRAAISMA, R. B.; MARTINS DOS SANTOS, V. A. P.; WIJFFELS, R. H.; EGGINK, G.; SCHAAP, P. J.; MARTENS, D. E. Draft Genome Sequence of the Oleaginous Green Alga *Tetradismus obliquus* UTEX 393. *Genome Announcements*, Volume 5, 2017.

CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 90, Pages 336–346, 2018.

CHEN, G.; ZHAO, L.; YUN QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, Volume 137, Pages 282–291, 2015.

CHERYL. Algae becoming the new biofuel of choice. 2008. Disponível em: <http://duelingfuels.com/biofuels/non-food-biofuels/algae-biofuel.php> Acessado em: 25 de fevereiro 2016.

CHEW, K. W.; CHIA, S. R.; SHOW, P. L.; YAP, Y. J.; LING, T. C.; CHANG, J. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Volume 91, Pages 332–344, 2018.

CHO, S.; LEE, N.; PARK, S.; YU, J.; LUONG, T. T.; OH, Y.; LEE, T. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresource Technology*, Volume 131, Pages 515-520, 2013.

CHOI, H. J. Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application. *Environmental Engineering*, Volume 21, Pages 393-400, 2016.

CUELLAR-BERMUDEZ, S.P.; NAVA, G.S.A.; CHANDRA, R.; GARCIA-PEREZ, J.S.; CONTRERAS-ÂNGULO, J.R.; MARKOU, G.; MUYLEAERT, K.; RITTMANN, B.E.; SALDIVAR, R.P. Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, Volume 24, Parte B, Pages 438-449, June 2017.

ELDALATONY, M. M.; KABRA, A. N.; HWANG, J.; GOVINDWAR., S. P.; KIM, K.; KIM, H.; BYONG-HUN JEON, B. Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/extraction of reducing sugars and proteins. *Bioprocess Biosyst Eng.*, Volume 39. Pages 95–103, 2016.

FERREIRA, A.; MARQUESA, P.; RIBEIRO, B.; ASSEMAN, P.; MENDONÇA, H. V.; BARATA, A.; OLIVEIRA, A. C.; REIS, A.; PINHEIRO, H. M.; GOUVEIA, L. Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, Volume 164, Pages 32–38, 2018.

FERREIRA, A.; RIBEIRO, B.; MARQUES, A. S. S.; FERREIRA, A. F.; DIAS, A. P.; PINHEIRO, H. M.; REIS, A.; GOUVEIA, L. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, Volume 165, Pages 1316-1327, 2017.

FONTOURA, J. T.; ROLIM, G. S.; FARENZENA, M.; GUTTERRES, M. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus sp.* *Process Safety and Environmental Protection*, Volume 111, Pages 355-362, 2017.

FUAD, N.; OMAR, R.; KAMARUDIN, S.; HARUN, R.; A. IDRIS,; W.A.K.G. Mass harvesting of marine microalgae using different techniques. *Food and Bioproducts Processing*, Volume 112, Pages 169-184, 2018.

GARCIA, L. M.; GARIEPY, Y.; BARNABÉ, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Effect of environmental factors on the biomass and lipid production of microalgae grown in wastewaters. *Algal Research*, Volume 41, 2019.

GARSD, M. Ethanol fuel production in top countries 2018. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/281606/ethanol-production-in-selected-countries/>, Acessado em: 23 de julho de 2019.

GIRARD, J. M.; ROY, M. L.; HAFSA, M. B.; GAGNON, J.; FAUCHEUX, N.; HEITZ, M.; TREMBLAY, R.; DESCHENES, J. S. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research*, Volume 5, Pages 241-248, 2014.

GIROTO, J.M.; PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos*, Número 10, Pages 43-44 2001.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, Volume 2017, Pages 403-415, 2017.

GONÇALVES, B. C. M.; CANILHA, L.; SANTOS, J. C.; SILVA, M. B.; SILVEIRA, J. L. Microalgas para Produção de Biohidrogênio e Biodiesel. *Janus, Lorena*, n. 21, 2015.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N, *Bioresource Technology*, Volume 113, pages 244-252, 2012.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4. ed. São Paulo, 2005.

JANKOWSKA, B.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 75, Pages 692–709, 2017.

JI, X.; LI, H.; JIANG, M.; ZHANG, J.; SAIYIN, H.; ZHENG, Z. The collaborative effect of *Chorella vulgaris*-*Bacillus licheniformis* consortia on the treatment of municipal water. *Journal of Hazardous Materials*, Volume 365, Pages 483-493, 2019.

JI, X.; JIANG, M.; ZHANG, J.; JIANG, X.; ZHENG, Z. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. *Bioresource Technology*, Volume 247, Pages 44-50, 2018.

KARATAY, S. E.; ERDOĞAN, M.; DÖNMEZ, S.; DÖNMEZ, G. Experimental investigations on bioethanol production from halophilic microalgal biomass. *Ecological Engineering*, Volume 95, Pages 266–270, 2016.

KASSIM, M. A.; POTUMARTHI, R.; TANKSALE, A.; SRIVATSA, S. C.; BHATTACHARYA, S. Enzymatic Saccharification of Dilute Alkaline Pre-treated Microalgal (*Tetraselmis suecica*) Biomass for Biobutanol Production. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, Volume 8, Número 9, 2014.

KIM, G.; YUN, Y.; SHIN, H.; KIM, H.; HAN, J. *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresource Technology*, Volume 196, Pages 235-240, 2015.

KIM, S.; PARK, J.; CHO, Y.; HWANG, S. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, Volume 144, Pages 8-13, 2013.

KLEIN, B. C. Cultivo de microalgas para produção de bioetanol de terceira geração. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Campinas, 2013.

LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, H. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Volume 29, Pages 33-37, 2009.

MAITY, J. P.; HOU, C.; MAJUMDER, D.; BUNDSCHUH, J.; KULP, T. R.; CHEN, C.; CHUANG, L.; CHEN, C. N.; JEAN, J.; YANG, T.; CHEN, C. The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae. *Energy*, Volume 78, Pages 94-103, 2014.

MAKUT, B. B.; DAS, D.; GOSWAMI, G. Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach. *Algal Research*, Volume 37, Pages 228-239, 2019.

MARKEB, A. A.; LLIMOS-TURET, J.; FERRER, I.; BLÁNQUEZ, P.; ALONSO, A.; SÁNCHEZ, A.; MORAL-VICO, J. FONT, X. The use of magnetic iron oxide based nanoparticles to improve microalgae harvesting in real wastewater. *Water Research*, Volume 159, Pages 490-500, 2019.

MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. *Bioresource Technology*, Volume 193, Pages 35-41, 2015.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, Volume 65, Pages 186-202, November 2014.

MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, Volume 14, Pages 217-232, 2010.

MCBRIDE, R. C.; LOPEZ, S.; MEENACH, C., BURNETT, M.; LEE, P. A. NOHILLY, F.; BEHNKE, C. Contamination Management in Low Cost Open Algae Ponds for Biofuels Production. *Industrial Biotechnology*, Volume 10, Número 3, Pages 221-227, 2014.

MEIER, L.; STARÁ, D.; BARTACEK, J.; JEISON, D. Removal of H₂S by a continuous microalgae-based photosynthetic biogas upgrading process. *Process Safety and environmental protection*, Volume 119, Pages 65-68, 2018.

MIRZAIE, M. A. M.; KALBASI, M.; MOUSAVI, S. M.; GHOBADIAN, B. Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. *Preparative Biochemistry And Biotechnology*, Volume 46, Número 2, Pages 150-156.

NGUYEN, M. T.; LIN, C.; LAY, C. Microalgae cultivation using biogas and digestate carbon sources. *Biomass and Bioenergy*, Volume 122. Pages 426-432, 2019.

NOVACANA. Propriedades físico-químicas do etanol. Portal NOVACANA. Disponível em: <www.novacana.com/etanol/propriedades-fisico-quimicas> Acesso em: 29 de abril de 2019.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Soro de leite: um subproduto valioso. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Volume 67, Número 385, Pages 64-71, 2012.

ONAY, M. Bioethanol production via different saccharification strategies from *H. tetrachotoma* ME03 grown at various concentrations of municipal wastewater in a flat-photobioreactor. *Fuel*, Volume 239, Pages 1315–1323, 2019.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, Volume 57, Pages 287-293, 2001.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WAERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STAINER, R. V. Genetic assignment, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J Gen Microbiol*, Volume 111, Pages 1–61, 1979.

RODRIGUES, T. Avaliação de biohidrogênio a partir da microalga. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 2016.

SALAMA, E.; KURADE, M. B.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; EL-DALATONY, M. M.; YANG I.; MIN, B., JEON, B. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 79, Pages 1189–1211, 2017.

SALATI, S.; D'IMPORZANO, G.; MENIN, B.; VERONESI, D.; SCAGLIA, B.; ABBRUSCATO, P.; MARIANI, P.; ADANI, F. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresour Technol*, Volume 230, Pages 82–89, 2017.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, A. S.; GUIMARAES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, Volume 35, Número 5, Pages 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIRÒZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. *Química Nova*, volume 37, Número 1, Pages 56-62, 2014.

SCHNEIDER, R. C. S.; LIMA, M. M.; HOELTZ, M.; NEVES, F. F.; JOHN, D. K.; AZEVEDO, A. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. *Algal Research*, Volume 32, Pages 280-292, 2018.

SHEN, Y.; GAO, J.; LI, L. Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: microorganism growth and nutrients removal. *Bioresour Technol*, Volume 243, Pages 905-913, 2017.

SFORZA, E.; PASTORE, M.; SANCHEZ, S. S.; BERTUCCO, A. Bioaugmentation as a strategy to enhance nutrient removal: Symbiosis between *Chlorella protothecoids* and *Brevundimonas diminuta*. *Bioresour Technol Rep*, Volume 4, Pages 153-158, 2018.

SFORZA, E.; PASTORE, M.; SPAGNI, A.; BERTUCCO, A. Microalgae-bacteria gas exchange in wastewater: how mixotrophy may reduce the oxygen supply for bacteria. *Environ Sci Pollut Res*, Volume 25, 2018.

SILVA, C. E. F. Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas- UFAL. Maceió, 2014.

SILVA, C.E.F.; BERTUCCO, A. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry*, Volume 51, Pages 1833-1842, 2016.

SILVA, C.E.F.; OLIVEIRA, R. B.; CARVALHO, C. M.; CARVALHO, F. O.; TONHOLO, J. Microalgae and Wastewaters: From Ecotoxicological Interactions to Produce a Carbohydrate-Rich Biomass Towards Biofuel Application. *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*, Volume 2, Cap. 21, Pages 495-529, 2019.

SILVA, C. E .F.; SFORZA, E.; BERTUCCO, A. Continuous cultivation of microalgae as an efficient method to improve carbohydrate productivity and biochemical stability. *Proceedings of the 25th European Biomass Conference and Exhibition*, Stockholm, Sweden, Pages 12-15, 2017.

SILVA, C.E.F.; SFORZA, E.; BERTUCCO, A. Stability of carbohydrate production in continuous microalgal cultivation under nitrogen limitation. Effect of irradiation regime and intensity on *Tetradismus obliquus*. *J. Appl. Phycol*, Volume 30, Pages 261-270, 2018.

SILVA, C. E. F.; SFORZA, E. Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. *Process Biochem*, Volume 51, Pages 2112-2118, 2016.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, Volume 217, Pages 499-508, 2018.

SOUZA, O.; MONTAGNOLI, M. S.; SCHULZ, M. A.; SOUZA E. L.; SELLIN, N.; MARANGONI, C. Bioetanol de cascas da Fruta e Pseudocaule da Bananeira. XIX SINAFERM. Foz de Iguaçu, 2013.

TORRES, H. S. J. Cultivo de microalgas em efluente de tratamento anaeróbico de esgoto. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, 2014.

TSOLCHA, O. N.; TEKERLEKOPOULOU, A. G.; AKRATOS, C. S.; BELLOU, S.; AGGELIS, G.; KATSIAPI, M.; MOUSTAKA-GOUNI, M.; VAYENAS, D. V. Treatment of second cheese whey effluents using a *Choricystis*-based system with simultaneous lipid production. *J Chem Technol Biotechnol*, Volume 91, Pages 2349–2359, 2016.

UMAMAHESWARI, J.; SHANTHAKUMAR, S. Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Environ Sci Biotechnol*, Volume 15, Pages 265-284, 2016.

WANG, H.; ZHANG, W.; CHEN, L.; WANG, J.; LIU, T. The contamination and control of biological pollutants in mass cultivation of microalgae. *Bioresource Technology*, Volume 128, Pages 745-750, 2013.

WANG, Y.; HO, S.H.; CHENG, C.L.; GUO, W.Q.; NAGARAJAN, D.; REN, N.Q.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. a. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. *Bioresource Technology*, Volume 222, Pages 485-497, December 2016.

WANG, Y.; HO, S.; CHENG, C.; NAGARAJAN, D.; GUO, W.; LIN, C.; LI, S.; REN, N.; CHANG, J. Nutrients and COD removal of swine wastewater with an isolated microalgal strain *Neochloris aquatica* CL-M1 accumulating high carbohydrate content used for biobutanol production. *Bioresource Technology*, Volume 242, Pages 7–14, 2017.

WANG, Y.; HO, S.; YEN, H.; NAGARAJAN, D.; REN, N.; LI, S.; HU, Z.; LEE, D.; KONDO, A.; CHANG, J. Current advances on fermentative biobutanol production using third generation feedstock. *Biotechnology Advances*, Volume 35, Pages 1049-1059, 2017.

XIN, L.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, Volume 101, Pages 5494-5500, 2010.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, Volume 126, Pages 499–507, 2006.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, Volume 42, Issue 12, Pages 8505-8517, 2017.

ZHANG, H.; LIU, C.; OU, Y.; CHEN, T.; YANG, L.; HU, Z. Development of a helical coagulation reactor for harvesting microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 127, Número 4, Pages 447-450, 2019.

ZHENG, Q.; XU, X.; MARTIN, G. J. O.; KENTISH, S. E. Critical review of strategies for CO₂ delivery to large-scale microalgae cultures. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2018.

ZHOU, X.; YUAN, S.; CHEN, R.; SONG, B. Modelling microalgae growth in nitrogen-limited continuous culture. *Energy*, Volume 73, Pages 575-580, 2014.