

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENGENHARIA QUÍMICA

BIANCA MEDEIROS GUEDES
GESLIA THAISE BENÇAL

**CULTIVO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EM EFLUENTE
INDUSTRIAL DE POLPA MOLDADA: CINÉTICA DE CRESCIMENTO, REDUÇÃO
DE CARGA ORGÂNICA E PRODUÇÃO DE CLOROFILA**

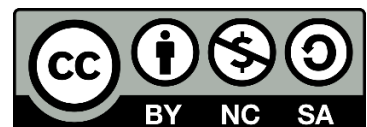
PONTA GROSSA
2020

BIANCA MEDEIROS GUEDES
GESLIA THAISE BENÇAL

**CROP OF MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS IN MOLDED PULP
INDUSTRIAL EFFLUENT: GROWTH KINETICS, ORGANIC LOAD REDUCTION
AND CHLOROPHYL PRODUCTION**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento Acadêmico de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney.



PONTA GROSSA
2020

TERMO DE APROVAÇÃO**CULTIVO DA MICROALGA CHLORELLA VULGARIS EM EFLUENTE INDUSTRIAL DE POLPA MOLDADA: CINÉTICA DE CRESCIMENTO, REDUÇÃO DE CARGA ORGÂNICA E PRODUÇÃO DE CLOROFILA.**

por

Bianca Medeiros Guedes

Geslia Thaise Bençal

Monografia apresentada no dia 13 de novembro de 2020 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Juliana Martins Teixeira de Abreu Pietrobelli
(UTFPR)

Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro
(UTFPR)

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus por se fazer presente infinitamente em nossas vidas.

A nossa família, em especial nossos pais, irmãos, marido e filho que muitas vezes abriram mãos de seus sonhos em prol dos nossos.

À UTFPR – Ponta Grossa, por nos tornar profissionais e seres humanos melhores. Ao nosso querido orientador Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, que não mediu esforços para nos auxiliar durante a execução do trabalho com muita paciência, sabedoria e excelente orientação. Somos imensamente gratas pelo privilégio de tê-lo como nosso orientador. Você é incrível.

As Profa. Dra. Juliana de Abreu Pietrobelli e Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Ribeiro, por aceitarem fazer parte da banca examinadora, pelas correções e sugestões referentes ao aprimoramento deste trabalho.

À Lauanny, Isadora, Sabrina e Leticia, pelas ajudas nos laboratórios de pesquisa.

Aos amigos, por terem tornado essa trajetória mais leve e feliz. Obrigada por tanto.

Agradecemos a todos que tornaram esse trabalho possível participando de forma direta ou indireta.

RESUMO

Sendo a água um recurso natural imprescindível para os processos industriais, tem-se a necessidade de seu uso consciente e tratamento visando a sua reutilização. Estima-se que em fábricas de papel e polpa, com produção média de 1000 ton/dia, sejam geradas quantidades de água residual semelhante ao de uma cidade de aproximadamente 1 milhão de habitantes. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade de tratamento de efluente de uma indústria de polpa moldada do Paraná utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*. A microalga foi cultivada em efluente não diluído e suplementado, atingindo reduções de 63% de Demanda Química de Oxigênio (DQO), 82% de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) e concentração de biomassa máxima igual a 0,63 g/L. Visando aproveitar esta biomassa em um sistema circular em que o biopigmento clorofila poderia ser utilizado pela própria indústria, foi quantificado o teor de clorofila na biomassa de *Chlorella vulgaris* em meio autoclavado resultando em 0,017%. O desenvolvimento de um processo integrado para tratamento de efluente e produção de bioprodutos mostrou-se promissor, possibilitando uma economia circular com a geração de zero resíduo.

Palavras-chave: Tratamento, Efluente, Microalga, Chlorella, Circularidade.

ABSTRACT

Since water is an essential natural resource for industrial processes, there is a need for its conscious use and treatment aiming at its reuse. It is estimated that in paper and pulp factories, with an average production of 1000 ton / day, are generated amounts of residual water similar to a city of approximately 1 million inhabitants. This work aims to evaluate the effluent treatment capacity of a molded pulp industry in Paraná using the microalgae *Chlorella vulgaris*. The microalgae was grown in undiluted and supplemented effluent, achieving reductions of 63% of Chemical Oxygen Demand (COD) and 82% of Biochemical Oxygen Demand (BOD) reaching a maximum biomass concentration equal to 0.63 g / L. In order to take advantage of this biomass in a circular system in which the chlorophyll biopigment could be used by the industry itself, the chlorophyll content in the *Chlorella vulgaris* biomass was quantified in an autoclaved resulting in 0.017%. The development of an integrated process for the treatment of effluents and the production of bioproducts proved to be promising, enabling a circular economy with the generation of zero waste.

Keywords: Treatment, Effluent, Microalgae, *Chlorella*, Circularity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma de processo da indústria de polpa moldada.....	13
Figura 2. Etapas de tratamento de efluente	15
Figura 3. Curva de crescimento celular	20
Figura 4. Mercado para produtos derivados de algas.....	22
Figura 5. Esquema básico da organização celular das organelas da microalga <i>C. vulgaris</i> .	23
Figura 6. Fases da reprodução da <i>C. vulgaris</i>	23
Figura 7. Meios de cultivos mantidos sob iluminação alternada	26
Figura 8. Diferentes concentrações de efluente para o crescimento da microalga <i>C. vulgaris</i>	29
Figura 9. Curva de crescimento da microalga para o meio autoclavado.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões para o lançamento de efluentes líquidos..... 18

Tabela 2 - Resultados a partir da extração de clorofila do meio autoclavado..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS

BBM	Bold's Basal Medium
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
<i>C. vulgaris</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DQO	Demanda química de oxigênio
EPA	Ácido eicosapentaenoico
H ₂ O	Água
NO ₃ ⁻	Nitrogênio
OH	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
POA	Processos oxidativos avançados
SO ₄ ⁻²	Enxofre
UTFPR – PG	Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Ponta Grossa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 INDÚSTRIA DE POLPA MOLDADA	13
3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES	14
3.2.1 Tratamento de efluentes por vias biológicas	17
3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EFLUENTES	17
3.4 MICROALGAS	19
3.4.1 Microalga <i>Chlorella</i>	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAL	25
4.2 MÉTODOS	25
4.2.1 Coleta da amostra	25
4.2.2 Condição ótima de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	25
4.2.3 Curva de crescimento da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	26
4.2.4 Caracterização Físico-Química do efluente	27
4.2.5 Pigmentos	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA INICIAL DO EFLUENTE	29
5.2 ANÁLISE DE CONDIÇÕES ÓTIMAS DO EFLUENTE AUTOCLAVADO PARA CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	29
5.3 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	30
5.4 ANÁLISE DE DBO E DQO DO EFLUENTE APÓS PERÍODO DE INCUBAÇÃO DA MICROALGA <i>CLHORELLA VULGARIS</i>	32
5.5 PIGMENTOS	32
6 CONCLUSÕES	34
6.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXO A – ARTIGO APRESENTADO NO CITREI 2020	40

1 INTRODUÇÃO

O recurso natural essencial para a sobrevivência de todos os seres vivos que habitam o Planeta Terra atende por uma velha fórmula bem conhecida, composta por duas moléculas de hidrogênio e uma de oxigênio, H₂O, ou como é popularmente chamada: água. Esse líquido além de compor 70% da massa corporal no organismo humano ainda é considerado um solvente universal. No entanto, a disponibilidade e finitude dessa substância é questionada e estudada por muitos pesquisadores do mundo e uma coisa é certa, temos que aproveitá-la de maneira mais eficiente possível, pois é impossível imaginar a vida sem ela.

A demanda de água na indústria reflete o tipo de produto ou serviço que está sendo produzido e os processos industriais associados. Os fatores determinantes para a intensidade do uso da água na indústria são oriundos de tecnologias empregadas, maturidade da gestão, boas práticas, além de processos e produtos (ANA, 2017).

As indústrias de papel e polpa, demandam grande quantidade de água em seus processos, resultando em alta quantidade de águas residuais, gerada todos os dias. Estima-se que para uma fábrica evoluída tecnologicamente, na área de celulose branqueada, com capacidade média de produção de 1.000 ton/dia, seja gerado de 50.000 a 70.000 metros cúbicos de efluente, semelhante ao produzido por uma cidade de aproximadamente de 1 milhão de habitantes. Devido a isso, iniciou-se o processo de reciclagem de água no entorno do sistema fabril de celulose branqueada (KLOCK, 2013).

Um método que vem sendo muito explorado para a reciclagem de água é a utilização de microalgas. As microalgas, de diversas espécies, vêm sendo largamente estudadas no meio científico devido a sua elevada aplicabilidade industrial e ambiental, estando presentes em processos como a remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis e de moléculas de origem lipídica com capacidade surfactante, biofixação de CO₂, entre outros (SCHMITZ et al., 2012).

O Brasil possui uma grande área costeira tropical, contando com 12% do abastecimento de água doce mundial, e recebe níveis de insolação altos e constantes ao longo do ano na maior parte de seu território. Além de ser lar da flora mais rica do

mundo e possuir mais de 3,5 mil espécies de algas catalogadas. Sendo a área, o sol, a água e a diversidade de algas vantagens consideráveis para produção em larga escala de microalgas (EMBRAPA AGROENERGIA, 2017).

Dentro deste contexto, optou-se por realizar estudos da redução de DBO e DQO por via biológica do efluente de uma empresa de polpa moldada do Paraná, utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*, pois devido a sua rápida capacidade de multiplicação pode-se interligar o tratamento do efluente com a produção de biomassa. Dado que a *C. vulgaris*, apresenta elevados teores de clorofila buscou-se produzir um biopigmento para ser reintroduzido na própria indústria, no entanto, a clorofila presente na biomassa gerada apresentou resultado inferior ao esperado. Neste caso, podendo ser transformada em biocombustível para ser inserido no processo industrial, trabalhando assim com o conceito de economia circular e gerando resíduo zero da microalga (Seyfabadi et al., 2011; LÚCIO, 2013). A empresa que cedeu o efluente produz embalagens de polpa moldada com material 100% reciclado e conta com um ciclo de água fechado, no entanto, não dispõe de tratamento de efluente, sendo essa tese, um potencial método para aprimorar o tratamento de efluente juntamente com a produção de biomassa da microalga.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um processo circular em que a carga orgânica do efluente de indústria de polpa moldada seja substancialmente reduzida concomitantemente com a produção de biomassa pela microalga *C. vulgaris*, da qual será extraída a clorofila que pode ser utilizado como biopigmento pela própria indústria.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a condição ótima de concentração de efluente real de indústria de polpa moldada para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*;
- Quantificar a produção de biomassa da microalga *C. vulgaris* e os parâmetros cinéticos de crescimento (máxima velocidade específica de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempo de duplicação (t_d));
- Avaliar a capacidade de redução de DBO e DQO promovido pelo crescimento microalgal;
- Quantificar o teor de clorofila na biomassa de *C. vulgaris*;

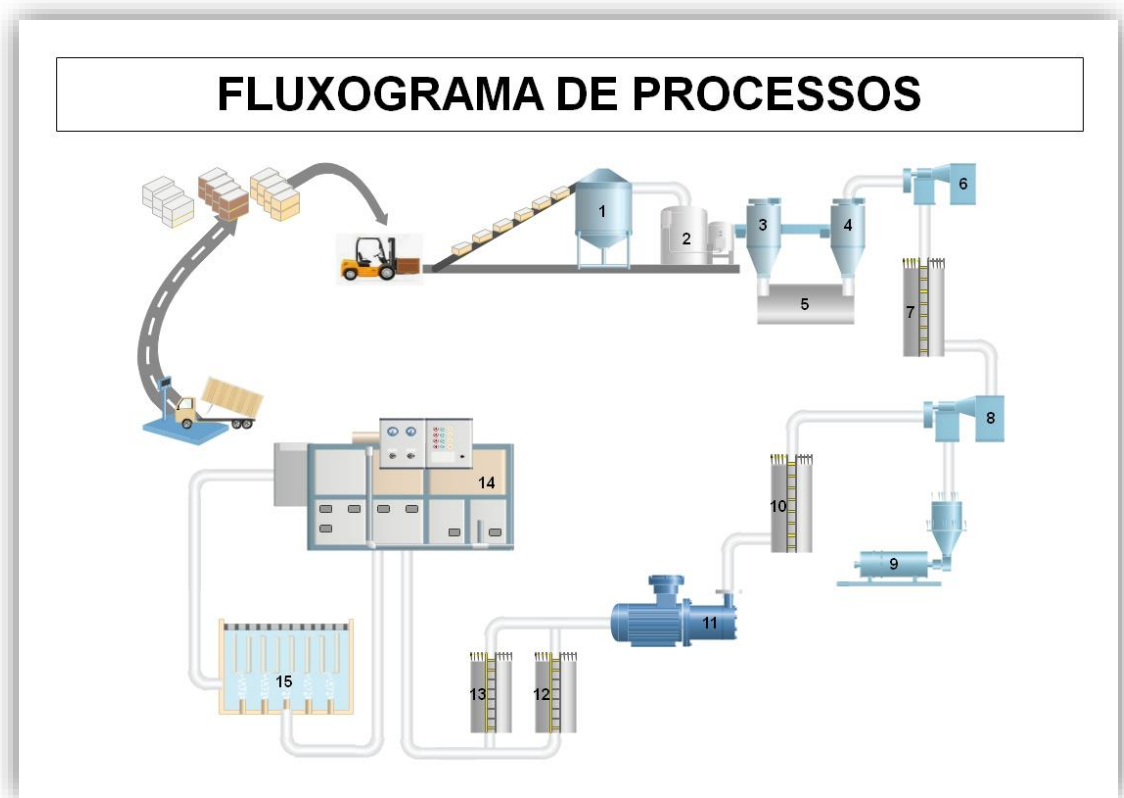
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 INDÚSTRIA DE POLPA MOLDADA

A indústria de polpa moldada é responsável pela origem de produtos como embalagens ou bandejas para acondicionamento, transporte e proteção de hortifrutigranjeiros, etc. Tratam-se de indústrias de reciclagem de papel que abrangem o processo de desagregação ou separação das fibras de jornal e aparas e sua moldagem na forma de um produto acabado. Polpa moldada é uma expressão técnica utilizada para a mistura de celulose, água e produtos químicos na formação de uma massa que depois é moldada, dando origem aos produtos (GRACH, 2006).

Trata-se de um processo produtivo complexo, onde há diversas etapas e adição de produtos químicos. O sistema de água do processo é em circuito fechado, contendo assim, alta quantidade de fibras, condutividade, DBO e DQO, além de outros parâmetros físico-químicos elevados. Observa-se as etapas da indústria na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma de processo da indústria de polpa moldada.



Fonte: Autoria própria.

A partir do fluxograma acima, pode-se observar o recebimento da matéria-prima para a produção da massa de polpa moldada, sendo iniciada no equipamento 1, passando por vários processos e seguindo até o equipamento 15. A troca total de água do processo, aproximadamente 500 m³, ocorre uma vez por ano, onde uma empresa terceirizada é responsável pela destinação do efluente.

3.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES

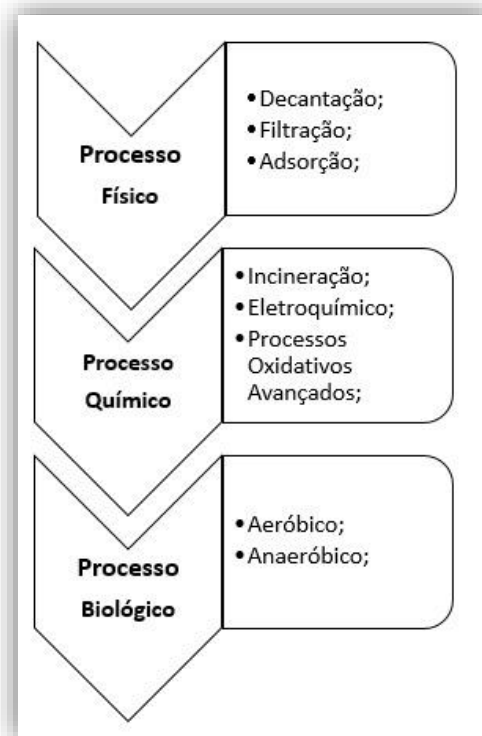
O Brasil, que antes do século XX, era reconhecido mundialmente por fazer parte do setor primário, com atividades associadas ao extrativismo e à agropecuária. Passou por um desenvolvimento expressivo de industrialização. Tornando-se hoje, um dos países mais industrializados do mundo. Segundo a Confederação Nacional da Indústria, “a Indústria, como um todo, representa 21,2% do PIB do Brasil, mas responde por 70,8% das exportações, 72,2% da pesquisa e desenvolvimento do setor privado e por 34,2% dos tributos federais (exceto receitas previdenciárias)”. Ou seja, a cada R\$ 1,00 oriundo da Indústria são gerados R\$ 2,40 na economia como um todo. Já na agricultura e comércio e serviços o valor gerado é menor: R\$ 1,66 e R\$ 1,49, respectivamente. Após a expansão do setor terciário e seu vasto parque industrial, pode-se afirmar com certeza que o Brasil é responsável por produzir tanto bens de consumos quanto tecnologia de ponta (CNI,2020).

Após a inserção expressiva do Brasil no setor terciário, a industrialização é algo notável e de grande influência no país. Porém, com isso o consumo de água também aumenta consideravelmente. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2006), as indústrias chegam a consumir em média 22% do consumo total de água, e grande parte desse consumo é constituído de água limpa. Em alguns ramos industriais, a água oriunda dos processos industriais (efluentes industriais), carrega consigo resíduos tóxicos, metais pesados e até mesmo materiais em decomposição. Acredita-se que anualmente são acumuladas nas águas cerca de 400 mil toneladas de dejetos industriais. Sendo a grande vilã a indústria de alimentos, seguida de todas as outras indústrias. Quando a água contaminada é lançada nos rios, os danos são nítidos na flora, fauna e na vida humana, resultando em um desequilíbrio ambiental (MMA, 2006).

Devido aos danos ambientais, a lei 9605/98 – Lei de crimes ambientais - foi criada e garante sanções penais para pessoas físicas e jurídicas que cometam crimes que danifiquem o Meio Ambiente (Brasil, 12 de fevereiro de 1998). Desde então, as empresas devem fazer o tratamento prévio de seus efluentes antes de reenviarem para rios e lagos (MMA, 2006).

O tratamento de efluentes pode ser feito de inúmeras maneiras, podendo ser utilizado via física, química e biológica, como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2. Etapas de tratamento de efluente



Fonte: Autoria própria

O processo físico é utilizado tanto na etapa preliminar quanto na etapa final, é um método que objetiva reduzir sólidos em suspensão (GIORDANO, 2004).

O início do processo físico ocorre através da separação de fases (decantação, sedimentação, centrifugação, flotação e filtração), onde caso tenha a presença de substâncias contaminantes, essas são apenas encaminhadas para próxima fase (cristalização, destilação e evaporação), não sendo eliminadas do meio. No processo de mudança de fases (extração por solventes, adsorção e “air-stripping”), parte considerável do volume sofre redução. A última etapa do tratamento é a separação molecular (osmose reversa, diálise, hiperfiltração e ultrafiltração), garantindo ao

processo físico alto potencial no tratamento de águas industriais, no entanto com alto investimento financeiro. Nesse método pouca redução da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é observada (FREIRE et al., 2000; GIORDANO, 2004).

O processo químico é utilizado em diferentes etapas do tratamento de efluente, onde reações químicas favorecem a eliminação de contaminantes ou até mesmo são capazes de aglomerar poluentes para que sejam removidos em estágios subsequentes (FREIRE et al., 2000).

O princípio do processo químico é dado pela precipitação e incineração através da utilização de produtos químicos, onde a precipitação é semelhante ao processo físico, ou seja, ocorre a transição de fases de substâncias. Já a incineração degrada sedimentos e contaminantes, principalmente organoclorados. Apesar disso, seu alto custo e formação de compostos excessivamente tóxicos, em muitos casos mais tóxicos que o efluente, comprometem sua utilidade. Devido a esses problemas, processos mais eficazes vêm sendo testados, como os Processos Oxidativos Avançados (POA). Esse método é fundamentado pela formação do radical hidroxila (OH), o qual apresenta elevada capacidade oxidante, com isso promove a degradação de compostos poluentes em apenas alguns minutos. A geração do radical hidroxila (OH) vem sendo estudada e produzida através da utilização de ozônio, peróxido de hidrogênio, Fotocatálise e reagente Fenton (FREIRE et al., 2000;).

O reagente de Fenton, capaz de eliminar a matéria orgânica recalcitrante, vem sendo associado a tratamentos biológicos, uma vez que, com essa associação de métodos, obtêm-se alta eficiência na remoção de poluentes orgânicos, facilidade operacional além de baixo custo (ARAUJO; COSSICH; TAVAREZ, 2009).

Já o processo biológico fundamenta-se na utilização de microrganismos para transformar substâncias orgânicas tóxicas, perante sólidos em suspensão e dissolvidos, em produtos simples como CO_2 , H_2O , sais minerais, entre outros. Conforme a natureza do receptor de elétrons, processos biológicos são divididos em aeróbios e anaeróbios (MARCONDES, 2012).

A associação de métodos físicos, químicos e biológicos pode ser feita com intuito de otimizar a remoção de poluentes orgânicos, no entanto, não é uma obrigatoriedade, podendo ser utilizado cada método separadamente, dependendo da relação DQO/DBO (JARDIM, CANELA, 2004).

3.2.1 Tratamento de efluentes por vias biológicas

O tratamento biológico ocorre através da introdução de microrganismos em um meio, que contenham compostos tóxicos de interesse, com isso o microrganismo utiliza esses compostos tóxicos como substrato, e desenvolve seu crescimento. (FREIRE et al.,2000).

Nos processos biológicos aeróbios o receptor de elétrons é o oxigênio molecular (ar atmosférico ou oxigênio puro), com isso os microrganismos biodegradam a matéria orgânica em suspensão, formando CO_2 e H_2O . Dos processos aeróbios, o processo de lodo ativado é o mais utilizado. Esse processo consiste em uma massa microbiana floculante oriunda de um processo de aeração. Sua larga utilização se deve a sua alta eficiência (FREIRE et al.,2000; MARCONDES, 2012; GIORDANO, 2004).

Já nos processos biológicos anaeróbios, sem a presença de oxigênio molecular, os receptores de elétrons apresentam-se em diferentes formas de nitrogênio, carbono e enxofre (NO_3^- , CO_2 , SO_4^{2-}), com isso os microrganismos têm a capacidade de biodegradar CO_2 e CH_4 (FREIRE et al.,2000; MARCONDES, 2012; GIORDANO, 2004).

O tratamento por vias biológicas possibilita a remoção de matéria orgânica, as quais são medidas na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT) (FREIRE et al.,2000).

3.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE EFLUENTES

A análise de parâmetros físico-químicos é imprescindível para a escolha do melhor método de tratamento de efluentes. Um dos principais objetivos do tratamento de efluente é medir a matéria orgânica presente no meio, que é mensurada através da fração de sólidos voláteis, nele presente (GIORDANO, 2004).

Para a quantificação de matéria orgânica total e de matéria orgânica biodegradável são realizadas as determinações da DBO e da DQO (PEREIRA, 2011).

Entende-se DBO como a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica a partir da decomposição microbiana aeróbia, resultando em uma forma inorgânica estável. Ou seja, é a medida das necessidades respiratórias de uma

população microbiana, durante um determinado período de tempo (5 dias), numa temperatura de incubação (20°C). A incubação por 5 dias foi definida a partir, de dados experimentais que comprovaram que a oxidação completa da matéria orgânica ocorre por aproximadamente 20 dias, sendo assim, em 5 dias cerca de 70% da matéria orgânica é oxidada. Outro fator que influencia a DBO é o pH, que deve estar entre 6,5 a 8,5 (MARCONDES, 2012; PACHECO, 2017).

Já a DQO é a quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica através de um agente químico. Trata-se de um parâmetro importantíssimo nos estudos de caracterização de esgotos e efluentes industriais, sendo que o aumento de sua concentração num corpo d'água se deve principalmente à despejos de origem industrial. Seus valores, normalmente, são maiores que os da DBO (CETESB, 2020).

A DQO e a DBO são utilizadas usualmente para observar a biodegradabilidade de um efluente. Com a relação DQO/DBO, podemos definir qual o processo de tratamento a ser utilizado. Considerando um efluente, se a relação $DQO/DBO < 2,5$ ele é de fácil biodegradação. Se a relação for $2,5 < DQO/DBO < 5,0$ o processo biológico exigirá cuidados para que se obtenha a remoção desejável de carga orgânica. E se a relação $DQO/DBO > 5$, o processo biológico apresenta poucas chances de sucesso, sendo assim o processo físico-químico uma alternativa (JARDIM, CANELA, 2004).

Os parâmetros de DBO e DQO variam de acordo com a cidade, estado e país, valendo sempre o mais restritivo. Sendo assim, utilizou-se os padrões para o lançamento de efluentes líquidos, definidos pela Secretaria de Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Ponta Grossa, como referência para os dados obtidos nesse trabalho. Segue abaixo a Tabela 1.

Tabela 1 - Padrões para o lançamento de efluentes líquidos	
Papel e celulose	
DBO ₅ :	50 mg/L
DQO:	300 mg/L
Sulfetos:	1,0 mg/L S
Toxicidade aguda:	FTd para <i>Daphnia magna</i> : 8 FTbl para <i>Alga</i> : 8
Toxicidade crônica:	Ftd para <i>Scenedesmus subspicatus</i> : 8 FTbl para <i>Vibrio fischeri</i> : 8

Fonte: Secretária de Meio Ambiente, Prefeitura Municipal de Ponta Grossa.

3.4 MICROALGAS

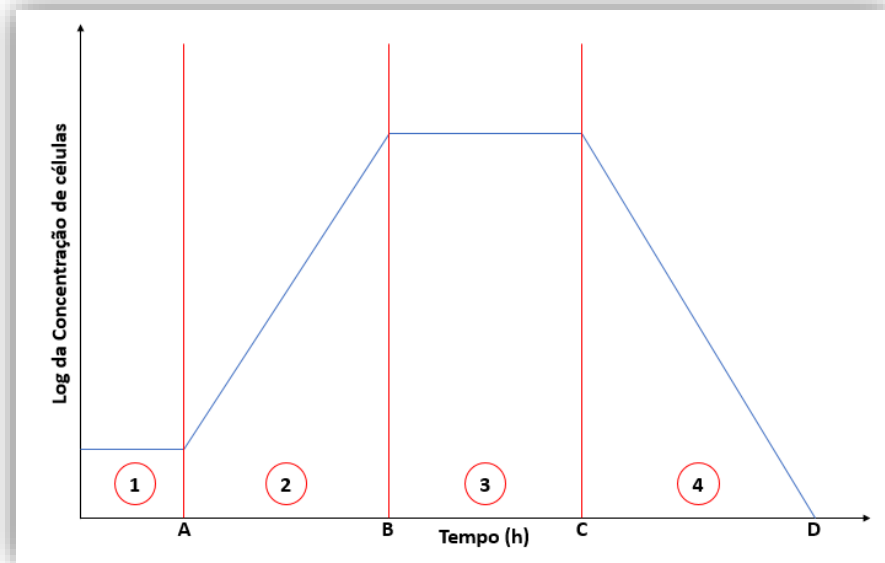
As microalgas são organismos fotossintéticos naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos/úmidos, incluindo lagos, rios, oceanos e solos. Elas são usadas como fonte para síntese de vários bioprodutos, como combustíveis, cosméticos, ração animal, suplementos alimentares, entre outros. Se comparada a matérias-primas tradicionais, a biomassa de algas possui vantagens consideráveis como alta produtividade, sua natureza unicelular assegura uma biomassa com a mesma composição química, captura de carbono altamente eficiente, possui elevado teor de lipídeos ou amido, pode ser cultivada em água do mar, água salobra ou mesmo em águas residuais, pode ser produzida sobre terras não agricultáveis e a colheita continua ao longo do ano em regiões tropicais. (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016; DERNER et al, 2006).

O cultivo das microalgas pode ocorrer de variados métodos, como os laboratoriais, que são mais controlados, ou como os tanques ao ar livre, sendo estes menos previsíveis. Pode ser também em diferentes sistemas, com volumes e características distintas. Obviamente quanto maior o controle, mais eficiente o processo, porém, com custo mais elevado. Para tanto deve-se existir um ponto de equilíbrio entre eficiência e custos operacionais (ANDRADE, 2014).

O crescimento celular ocorre através do aumento estruturado e integro dos componentes químicos, que são influenciados diretamente pelos parâmetros luminosidade, pH, temperatura, aeração, concentração de nutrientes e CO₂. Onde através de um crescimento equilibrado tem-se a união completa dos microrganismos que se encontram familiarizados em um meio apropriado. Dessa forma, o aumento da biomassa é diretamente proporcional a duplicação das outras propriedades mensuráveis, sendo elas, RNA, DNA, proteína, seguida de outras moléculas orgânicas. Para quantificar o crescimento celular, quando se objetiva redução de custos e rapidez, os parâmetros mais utilizados são dimensionados pela massa e número de células (RUSSO, 2011).

Para determinar o crescimento de células de uma microalga, utiliza-se um meio líquido, onde a cepa do microrganismo será introduzida. A partir do acompanhamento do crescimento do inóculo, adjunto do acompanhamento temporal, obtém-se a curva mostrada na Figura 3 (RICHMOND, 2004).

Figura 3. Curva de crescimento celular



Fonte: Autoria própria.

(1) Fase Lag ou de adaptação, refere-se à atividade intensa de preparo para o crescimento populacional, mas sem aumento da população. A duração dessa fase dependerá das condições iniciais do inóculo, podendo ser uma fase relativamente curta ou até mesmo nem observada, quando utiliza-se uma cultura proveniente de uma fase exponencial de crescimento. (BORZANI, 2001; MADIGAN, 2004).

(2) Fase Log ou exponencial, trata-se do aumento exponencial ou logarítmico da população, devido a adaptação ao meio de cultivo. A multiplicação dos microrganismos por completa só ocorre no fim desta etapa, visto que, no início nem todas as células multiplicam-se. Sendo assim, no início dela, a taxa de crescimento específica é inferior ao valor máximo, mas ao término da mesma, a concentração celular é diretamente proporcional a velocidade de crescimento (BORZANI, 2001; MADIGAN, 2004).

(3) Fase estacionária ou de desaceleração, nessa fase as mortes celulares são equiparadas as produções de novas células, resultando em um período de equilíbrio microbiológico. Dessa forma, a velocidade de crescimento reduz e se iguala a taxa de morte (BORZANI, 2001; MADIGAN, 2004).

(4) Fase de morte celular, nesta etapa a população se reduz em uma taxa logarítmica, devido ao esgotamento de nutrientes (BORZANI, 2001; MADIGAN, 2004).

A produção de produtos de baixo valor agregado, como produtos químicos, biomateriais e energia, ainda não atingiram a viabilidade econômica do cultivo em larga escala de microalgas. Mesmo já tendo sido demonstrada a viabilidade da produção de bioplásticos e biocombustíveis por meio das microalgas, seus processos ainda não apresentam custos de produção competitivos com os derivados da indústria petroquímica (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016). Uma oportunidade de viabilizar a comercialização de biocombustíveis seria integrar a sua produção a de substâncias valoradas convencionalmente estabelecidas no mercado, pois microalgas são basicamente compostas por lipídios, carboidratos, pigmentos, proteínas, ácidos graxos e uma variedade de moléculas orgânicas complexas, onde muitas são convertidas em biocombustíveis e outras utilizadas na produção de cosméticos, fármacos e suplementos alimentícios (ZHU, 2015).

O cultivo principal é das espécies pertencentes ao gênero *Arthrospira* (Spirulina) e *Chlorella*, que são utilizadas como fontes de pigmentos nas indústrias de cosméticos ou como suplementos proteicos para a alimentação humana e aquicultura. As espécies *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são usadas como fonte de pigmentos e antioxidantes, como os carotenoides astaxantina, cantaxantina e betacaroteno. A partir das microalgas são produzidos também ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6, como EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (ácido docosahexaenoico) que compõe formulações nutricionais infantis, bebidas e suplementos dietéticos. (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016).

Figura 4. Mercado para produtos derivados de algas



Fonte: EMBRAPA AGROENERGIA, 2016.

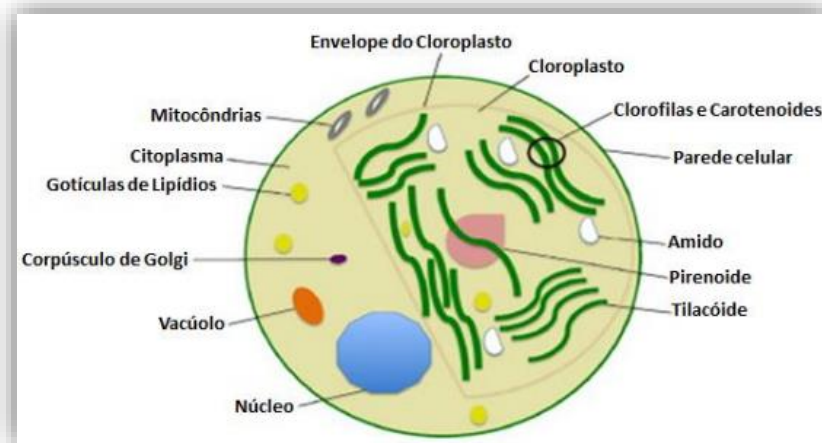
Com o aumento de escala das indústrias de microalgas seria possível o abastecimento de mercados maiores com subprodutos ou excedentes da produção. Por exemplo, com a extração do óleo de microalgas para produtos de alto valor agregado, como os ácidos graxos poli-insaturados, seria possível o aproveitamento da biomassa residual para a geração de produtos de menor valor agregado como os de nutrição animal, que possuem mercados maiores. Um modelo para essa produção em larga escala, seria o da microalga *Chlorella*, que possibilita obtenção simultânea de produtos como betacaroteno, ração animal e biocombustível, por exemplo (EMBRAPA AGROENERGIA, 2016). O aproveitamento do conteúdo total da biomassa para a produção de diversos compostos é chamado de biorrefinaria. (FRESEWINKEL et al., 2014).

3.4.1 Microalga *Chlorella*

O nome *Chlorella* é composto do grego (*chloros*, que significa verde) e latim (*ella*, ou seja, pequeno ser). Uma das espécies deste gênero é a *Chlorella vulgaris*,

que trata-se de uma alga verde, unicelular, medindo cerca de 3-10 μm encontrada individualmente ou agrupada em água doces ou salgadas e em solos (SAFI et al. 2014; CAVALCANTI, 2016). Sua principal fonte de reserva energética é o amido (DANTAS, 2013).

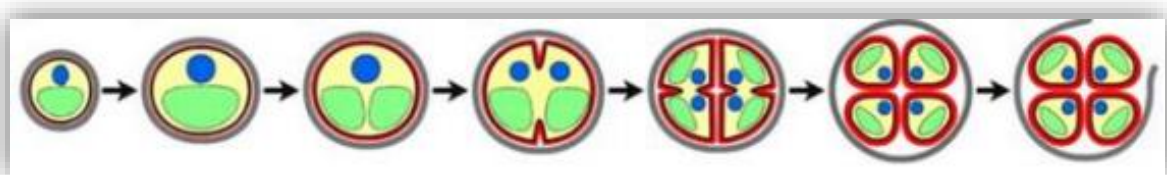
Figura 5. Esquema básico da organização celular das organelas da microalga *C. vulgaris*.



Fonte: SAFI et al 2014

Devido ao fato de as células serem imóveis, sua reprodução é assexuada e rápida, dentro de 24 horas, quando cultivada em condições ótimas, uma célula de *C. vulgaris* se multiplica por autoesporulação, dando origem a quatro células filhas. (CAVALCANTI, 2016; SAFI et al., 2014). Conforme o esquema da Figura 6 a seguir:

Figura 6. Fases da reprodução da *C. vulgaris*.



Fonte: SAFI et al., 2014.

A *C. vulgaris* tem um dos mais elevados teores em clorofila encontrados na natureza, sendo elas a clorofila a e b. E também, destaca-se dentre as microalgas que apresentam grande potencial biorremediador, pois apresenta altos teores de proteínas, ácidos graxos, vitaminas do complexo B, sais minerais, β carotenóides, entre outras substâncias, sendo assim utilizada como complemento alimentar e na

indústria de fármacos (Seyfabadi et al., 2011; CAVALCANTI, 2016). Ela é utilizada em estudos para a purificação de efluente de águas residuais devido a sua rápida capacidade de multiplicação e por ser rica em proteínas e vitaminas do complexo B (LÚCIO, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O meio de cultivo, ou seja, o efluente industrial, foi cedido por uma indústria de polpa moldada situada no Paraná. A microalga utilizada foi a *Chlorella vulgaris* LEB-104.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta da amostra

Coletou-se as amostras de efluente da indústria de polpa moldada no período da tarde, no sistema de saída de “limpeza da água”, após passar pelo sistema de ar dissolvido (DAF), onde boa parte das fibras são retiradas, podendo retornar ao processo produtivo.

Utilizou-se amostragem de datas distintas nessa dissertação. Sendo a primeira coletada em fevereiro e a última coletada em setembro. O efluente coletado, foi fracionado e mantido a -4°C, sendo descongelado de acordo com o volume necessário em cada etapa.

4.2.2 Condição ótima de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Inicialmente autoclavou-se o efluente (coletado em fevereiro) cedido pela indústria de polpa moldada, para sua posterior diluição em água destilada a fim de determinar em qual concentração a microalga *C. vulgaris* apresentaria maior crescimento. O meio de cultivo (coletado em fevereiro) foi preparado, em duplicata, para um volume total de 100 mL, com as seguintes diluições: 0% de efluente, considerado o branco para as análises de absorvância, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% de efluente. Em cada erlenmeyer preparou-se 20 mL de inóculo da *Chlorella vulgaris*. Manteve-se o meio de cultivo em ambiente fechado, sob iluminação de aproximadamente 3200 lux com fotoperíodo de 12 h, como apresentado na Figura 7.

Figura 7. Meios de cultivos mantidos sob iluminação alternada



Fonte: Autoria própria.

Coletou-se uma alíquota de cada Erlenmeyer para o tempo de 0 h e leu-se as absorvâncias em espectrofotômetro digital no comprimento de onda de 670 nm. Repetiu-se o mesmo procedimento, com periodicidade de 72 h, até o tempo de 432 h. Coletou-se todas as alíquotas do meio, em fluxo laminar, utilizando pipeta automática de 5 mL.

A partir dos dados de absorvância, foi possível definir a condição ótima de crescimento da microalga *C. vulgaris*.

4.2.3 Curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*

Para elaborar a curva de crescimento da microalga *C. vulgaris*, trabalhou-se com 100% de efluente (condição ótima). Para cada 1,3 L de efluente autoclavado adicionou-se 260 mL de inóculo. Retirou-se 1 alíquota por dia, iniciando-se no tempo 0h até o início da fase de morte celular, cujas absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 670 nm. A curva de crescimento foi feita em duplicata, utilizando efluente recolhido do mesmo ponto de coleta, mas utilizando amostragem coletada em fevereiro e setembro.

O cultivo foi mantido em ambiente fechado, sob iluminação de aproximadamente 3200 lux com fotoperíodo de 12 h. Todas as alíquotas do meio, foram coletadas em fluxo laminar, utilizando-se pipeta automática de 5 mL.

Através dos dados de absorvância foi possível obter as curvas de crescimento da microalga. E assim, calculou-se a velocidade de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de duplicação (t_d), através das fórmulas:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\ln \frac{X}{X_i}}{(t-t_i)} \text{ e } t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}}$$

Sendo, X_i e t_i referentes a concentração e tempo no início da fase log, e X e t referentes a concentração e tempo no fim da mesma (Borzani, et al., 2001).

4.2.4 Caracterização Físico-Química do efluente

Centrifugou-se todo o meio restante do procedimento 4.2.3, em velocidade de 10.000 rpm, por um período de 15 min a 24 °C, e enviou-se a amostra para ser analisada DBO e DQO por uma empresa terceira em Ponta Grossa - PR.

O método de determinação de DBO e DQO, foi realizado utilizando o Kit Hach. O procedimento de análise, consiste na digestão da amostra no reator modelo Hach DRB200 com orifícios para tubos de ensaio de 16mm de diâmetro. Posteriormente, realiza-se a leitura em um espectrofotômetro Hach modelo DR 6000.

4.2.5 Pigmentos

Após 7 dias de crescimento celular em meio estéril com concentração de 100% de efluente, retirou-se uma alíquota de 100 mL das amostras, centrifugou-se para a recuperação da biomassa em velocidade de 10000 rpm, por um período de 15 min a 24 °C e descartou-se o líquido sobrenadante. Utilizou-se o método de extração da clorofila com biomassa úmida, assim, posteriormente a centrifugação e descarte do líquido sobrenadante adicionou-se acetona 90%, com pH=9, na proporção de 1:40 m/v. Reservou os frascos, enrolados em papel kraft, no refrigerador a $\pm 4^\circ\text{C}$ por 24 h. Após a extração centrifugou-se o meio novamente, com as mesmas condições utilizadas anteriormente, assim obteve-se o meio sem células utilizado para quantificar clorofila a, b e c, a partir da leitura das absorvâncias em espectrofotômetro digital.

Retirou-se também uma alíquota de 20 mL da amostra, centrifugou-se nas mesmas condições e reservou-se o tubo Falcon na estufa por 24 h a 80 °C.

Para a metodologia de extração de pigmentos baseou-se nos experimentos propostos por CETESB, 2014; SYDNEY, 2009 e HENRIQUES, 2007. Para os cálculos referentes a quantificação da clorofila total (Chl) utilizou-se as equações propostas por Strickland & Parsons, 1968:

$$\text{Chla} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{11,6 \cdot D_{665} - (1,31 \cdot D_{645} + 0,14 \cdot D_{630} + D_{750})}{V_2 \cdot L} \cdot V_1$$

$$\text{Chlb} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{(20,7 \cdot D_{645} - 4,34 \cdot D_{665} - 4,42 \cdot D_{630})}{V_2 \cdot L} \cdot V_1$$

$$\text{Chlc} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{(55 \cdot D_{630} - 4,64 \cdot D_{665} - 16,3 \cdot D_{645})}{V_2 \cdot L} \cdot V_1$$

Onde:

D = leitura de absorvância no comprimento de onda específico;

V₁ = acetona a 90% em volume (mL);

V₂ = volume da amostra (mL);

L = percurso óptico da cubeta (cm);

Assim obteve-se a quantidade de biomassa por litro presente no meio autoclavado e a porcentagem de concentração de clorofila presente na biomassa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

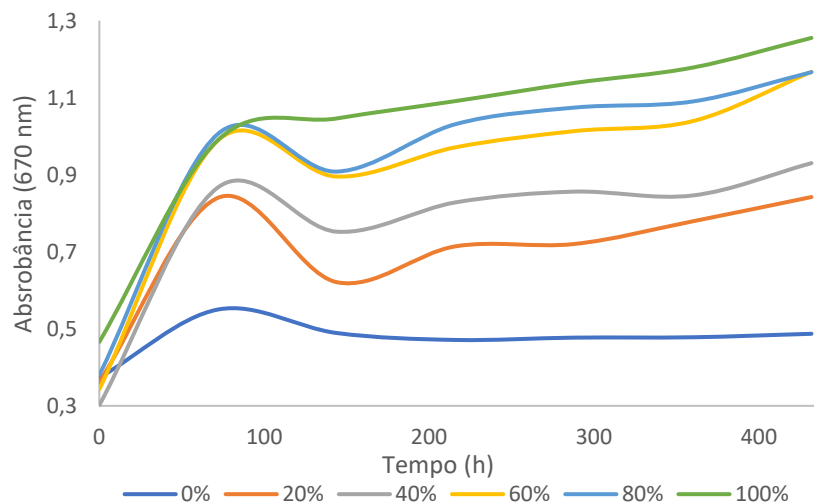
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA INICIAL DO EFLUENTE

Os valores referentes as condições iniciais de DBO e DQO do efluente real da indústria de polpa moldada em fevereiro foram de 2879 mg/L e 9050 mg/L, e em setembro foram de 1749 mg/L e 9120 mg/L respectivamente (dados cedidos pela indústria). No entanto, devido a Pandemia (COVID-19) as análises desses parâmetros puderam ser realizadas apenas no efluente tratado em fevereiro, sendo utilizado apenas os dados de fevereiro como comparativo de redução de DBO e DQO. A relação DQO/DBO foi de 3,14, estando na faixa de 2,0 a 5,0, que indica tratamento por processo biológico. O pH foi de 7, estando o valor entre 4,5 a 8,0, que segundo MAYO e NOIKE (1994) é considerado condição ótima de crescimento da *Chlorella vulgaris*, não sendo assim necessária a correção do pH.

5.2 ANÁLISE DE CONDIÇÕES ÓTIMAS DO EFLUENTE AUTOCLAVADO PARA CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

Para a determinação da condição ótima e tempo de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* no efluente comparou-se o crescimento celular em diferentes diluições do efluente com água destilada (Figura 8).

Figura 8. Diferentes concentrações de efluente para o crescimento da microalga *C. vulgaris*.



Fonte: Autoria própria.

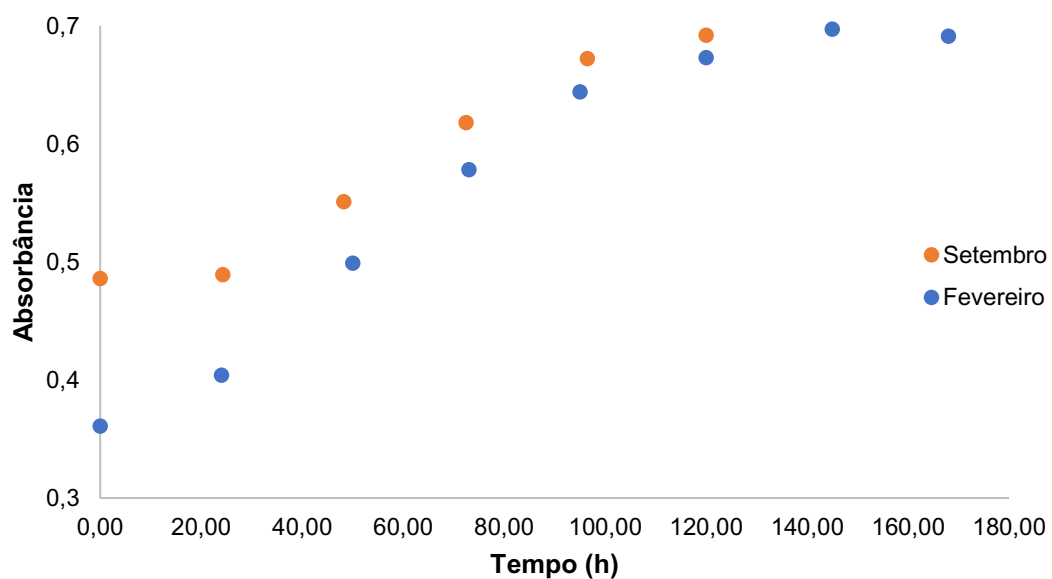
Observou-se na Figura 8, que a curva com 100% de efluente foi a que possuiu maiores valores de absorvância, sendo que o ponto máximo foi de 1,255 em 432 h de cultivo. Como a absorvância é diretamente proporcional a produção de biomassa da microalga utilizou-se esta concentração de efluente nos experimentos posteriores. Notou-se que em 100 h de cultivo foi atingida 80% da absorvância final, não sendo vantajoso manter o cultivo por mais 300 h para aumento muito pequeno de biomassa.

5.3 ANÁLISE DA CURVA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS*

Para observação das fases de crescimento da microalga fez-se um experimento com o efluente autoclavado, evitando a interferência de microrganismos contaminantes.

A partir dos resultados apontados no item 5.2, o experimento foi conduzido utilizando efluente na concentração de 100% (não diluído), logo obteve-se o tempo (h) e absorvância (670 nm) correspondente a cada dia de cultivo e com isso possibilitou-se a construção da curva de crescimento no período de 7 e 6 dias, conforme dispostos na Figura 9, para facilitar a visualização das etapas da curva de crescimento.

Figura 9. Curva de crescimento da microalga para o meio autoclavado.



Fonte: Autoria própria.

Observou-se uma pequena variação dos dados, apresentando valores bem próximos mesmo com longo tempo de intervalo entre a coleta de amostras. Devido a isso, o experimento elaborado em setembro pode ser interrompido no 6° dia. Uma vez que a fase de morte celular da microalga *C. vulgaris* está no intervalo de 114 h a 150 h.

A partir da Figura 9, pode-se observar claramente no gráfico as fases lag, log, e estacionária para ambas as amostragens e de morte celular da microalga *C. vulgaris* no meio autoclavado para a amostragem coletada em fevereiro. A fase lag pode ser visualizada nas primeiras 20 h, das 20 h até 114 h observou-se a fase log e após 114 h notou-se a fase estacionária, para ambas as curvas, a fase de morte celular só foi observada para a amostragem de fevereiro. Sendo assim, suspendeu-se o experimento no sétimo dia para a amostra coletada em fevereiro e no sexto dia para a amostra coletada em setembro.

Para o cálculo de velocidade máxima, fez-se a média dos valores encontrados nas curvas de crescimento e obteve-se $\mu_{\text{máx}}=0,1057 \text{ dia}^{-1}$ e $t_d=6,5$ dias, valores bem diferentes dos encontrados por Andrade (2014) e Lopes, et al.(2018), que em seus estudos obtiveram $\mu_{\text{máx}}=0,3203 \text{ dia}^{-1}$ e $t_d=2$ dias e $\mu_{\text{máx}}=1,1784 \text{ dia}^{-1}$ e $t_d=0,59$ dias, respectivamente. Estas diferenças se dão ao fato de que em seu estudo, Andrade (2014) preparou as microalgas em um meio de cultivo sintético WC (Andersen, 2005) para posteriormente serem introduzidas na amostra. Assim como Lopes et al. (2018) que também utilizou um meio de cultivo sintético, neste caso o Bold's Basal Medium (BBM). Ou seja, em ambos os estudos a microalga foi cultivada em um meio cuja composição química é conhecida, contou com um sistema de agitação que homogeniza o meio e favorece a absorção da luz no estudo de Andrade (2014) e dispôs de suplementação com extrato de levedura e efluente de reator UASB no estudo de Lopes et al. (2018), resultando em alta taxa de crescimento celular. No presente trabalho, utilizou-se apenas o efluente industrial, sem suplementação e agitação do meio, para que fosse fiel a condição que se encontra no local de origem, além de mitigar os custos relacionados ao tratamento de efluente. De qualquer forma, a suplementação, agitação e aeração do cultivo são parâmetros importantes de serem avaliados em trabalhos futuros.

5.4 ANÁLISE DE DBO E DQO DO EFLUENTE APÓS PERÍODO DE INCUBAÇÃO DA MICROALGA *CLHORELLA VULGARIS*

A amostra autoclavada resultou em valores de DQO de 3325 mg/L e de DBO de 500 mg/L. Obteve-se assim uma redução de 82% para a DBO e 63% para a DQO. Apesar do uso da microalga poder ser considerado eficiente devido a porcentagem de redução expressiva obtida quando comparado valores iniciais e finais de DQO e DBO, os resultados não se enquadram nos parâmetros definidos pelas legislações estaduais de DBO e DQO para descarte de efluentes (Tabela 1). A etapa de cultivo da microalga é, portanto, importante para a recuperação de nutrientes do efluente e redução parcial de carga química e orgânica, mas deve ser complementado com subsequente etapa de tratamento de modo a atingir requisitos para disposição em corpos d'água. Nesse contexto, o aproveitamento de bioprodutos advindo da biomassa microalgal pode ser um parâmetro decisivo para a implementação desta tecnologia.

5.5 PIGMENTOS

Após a recuperação da biomassa e extração com solvente, leu-se os comprimentos de onda da amostra autoclavada no espectrofotômetro digital obtendo os resultados de $D_{665}=0,065$, $D_{645}=0,043$, $D_{630}=0,039$ e $D_{750}=0,019$. Com os valores de absorbância e dos parâmetros $V_1=4,8$ mL, $V_2=100$ mL e $L=1$ cm, utilizou-se as equações de Strickland & Parsons (1968, *apud* SYDNEY, 2009) para calcular a clorofila e dispôs os resultados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados a partir da extração de clorofila do meio autoclavado

Extração de Clorofila	mg/L
Chla	0,03231
Chlb	0,02091
Chlc	0,05484
Clorofila total	0,10806

Fonte: Autoria própria.

Com as alíquotas de 20 mL retiradas das amostras para o procedimento de peso seco, obteve-se o valor de 0,63 g/L de biomassa presente na amostra de meio

autoclavado. Assim, em 1 L, a porcentagem de clorofila presente na biomassa do meio autoclavado foi de 0,017%. A partir dessa análise pode-se observar que a porcentagem de clorofila presente na biomassa é incapaz de gerar biopigmento suficiente para a indústria. Mas com a otimização das condições de cultivo e/ou suplementação do efluente pode-se obter aumento do acúmulo do referido pigmento.

Ainda, a microalga pode ser estudada para a produção de outros bioprodutos. A literatura científica é bastante rica em trabalhos de utilização de *C. vulgaris* para a produção de biocombustíveis, tanto biodiesel a partir dos lipídios acumulados intracelularmente, que segundo Singh e Dhar (2011), pode ser explicado pelos rendimentos mais elevados oriundos de microalgas, que chegam a possuir 40 vezes mais óleo por unidade de área de terra, se comparado as culturas de sementes oleaginosas terrestres (soja e canola). Quanto bioóleo advindo da pirólise da biomassa inteira, como é o caso de Rodrigues (2017) que em seu estudo calculou os parâmetros cinéticos e os subprodutos gerados a partir da pirólise da microalga *Chlorella vulgaris*. Aplicando assim o conceito de economia circular, já que a microalga trataria o efluente e sua biomassa poderia ser utilizada para produzir energia integrada ao sistema industrial afim de reduzir custos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados dos experimentos respaldam a concepção de que a microalga *Chlorella vulgaris* LEB-104 dispõe de um potencial de biorremediação para o tratamento de efluente industrial de polpa moldada, concomitantemente a produção de biomassa. A partir dos experimentos observou-se que a microalga se adaptou bem ao meio, apresentando uma fase de defasagem curta (1 dia), mesmo em efluente não diluído. Em razão disso, pode-se afirmar que o resíduo possui os nutrientes mínimos necessários para o crescimento celular das microalgas. Em 7 dias de tratamento, uma concentração máxima de biomassa de 0,63 g/L foi alcançada. É importante salientar que os experimentos foram realizados sem nenhum tipo de suplementação, aeração ou agitação, objetivando simular as condições de um tratamento realizado na indústria. A eficiência do tratamento do efluente foi observada a partir da redução significativa dos parâmetros poluentes DBO e DQO, entretanto, em virtude dos valores iniciais elevados de DBO e DQO, o tratamento apenas por vias biológicas não tornou o efluente adequado aos padrões definidos pelas leis estaduais brasileiras. Devido a isso, um tratamento adicional é imprescindível. Por fim, na biomassa gerada não foram alcançadas quantidades suficientes de clorofila para a produção de biopigmento nas condições avaliadas, porém otimizações podem ser feitas no sentido de aumentar esta produção (como adição de magnésio, fonte de nitrogênio, agitação e aeração, entre outros). Apesar disso, existe uma ampla gama de produtos que podem ser explorados a partir da biomassa obtida nesse experimento, sendo eles, biocombustíveis, aditivo animal e biofertilizantes, dependendo da composição da biomassa. Uma abordagem de biorrefinaria poderia ser explorada também, desenvolvendo um processo combinado mais viável e transformando o efluente em produtos vantajosos para a indústria de polpa moldada, atrelando assim o conceito de economia circular.

6.1 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para estudos futuros relacionados a métodos biológicos para redução de DBO e DQO de efluente industrial de polpa moldada, a partir das metodologias desenvolvidas neste trabalho, podemos incluir:

- Realizar a quantificação de lipídeos, proteínas e carboidratos na biomassa de *C. vulgaris* objetivando compreender possíveis utilizações para a biomassa gerada;
- Realizar suplementação do efluente com nutrientes e otimização das condições de cultivo visando a maximização da produção de biomassa e bioprodutos, com consequente redução de DBO e DQO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Águas (Brasil). **Água na indústria: uso e coeficientes técnicos / Agência Nacional de Águas**. 37 p. Brasília, 2017.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Produção de Biomassa e Coprodutos. **Microalgas de águas continentais**, vol. 2. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, 2014.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Biotecnologia Industrial. Fundamentos**, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.
- CAVALCANTI, D. L. **Potencial biotecnológico de *Chlorella vulgaris*: aplicação em biocélulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂**. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- CETESB, 2014 – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/L5306.pdf>>. Acesso em 22 de julho de 2020.
- CETESB, 2020 – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/glossario/#1500038655219-85aedbc6-f9c3>>. Acesso em 03 de junho de 2020.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (Brasil). **Perfil da Indústria Brasileira (fevereiro/2020)**. Disponível em: < <http://industriabrasileira.portaldaindustria.com.br/#/industria-total>>. Acesso em: 01 de março de 2020.
- DANTAS, D. M. M. **Atividades biológicas das preparações obtidas das clorofíceas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus subspicatus* Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas**. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R.; **Microalgas produtos e aplicações**. Ciência Rural, vol. 36, p.1959-1967. Santa Maria, 2006.
- EMBRAPA AGROENERGIA. Microalgas. **Agroenergia em revista**. Ano IV, nº 10, 2016.
- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. **Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas**. Química Nova, v. 23, n. 4, 504-511 p. São Paulo, 2000.

FRESEWINKEL, M.; ROSELLO, R.; WILHELM, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B.; POSTEN, C. **Integration in microalgal bioprocess development: Design of efficient, sustainable, and economic processes.** Engineering in Life Sciences, n.14, 560–573 p. 2014.

GIORDANO, Gandhi. Tratamento e controle de efluentes industriais. **Revista ABES**, v. 4, n. 76, p. 1-84, 2004.

GRACH, F. C. **Incorporação de resíduos de embalagens pós consumo provenientes das agroindústrias na fabricação de bandejas de polpa moldada.** Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

HENRIQUES, M.; SILVA, A.; ROCHA, J. **Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method.** Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology, v. 2, 586-593 p. 2007.

JARDIM, W.F.; CANELA, M. C. **Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos** - Caderno temático v. 01, 2-3 p. 2004.

KLOCK, U.; ANDRADE, A. S.; HERNANDES, J. A. **Polpa e papel.** FUPEF. Série Didática. 3ª Edição. Curitiba, 2013.

LOPES, T. S. A.; FERREIRA, W. B.; SILVEIRA, T. N.; DINIZ, C. R.; SANTOS, W. B.; TORQUATO, A. L.; OLIVEIRA, L. S. O. Estudo cinético do desenvolvimento da microalga *Chlorella vulgaris* em efluentes de tratamento anaeróbio de esgoto doméstico para fins de produção de biodiesel. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.9, n.8, 70-81 p. 2018.

LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo.** 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MAYO, A. W.; NOIKE, T. **Response of mixed culturas of *Chlorella vulgaris* e heterotrophic bacteria to varia of pH.** In: Pergamon. Wat. Sci. Tech. v. 30. n. 8, 285-294 p. 1994.

Ministério do Meio Ambiente / SQA. **Coletânea de Legislação para o Licenciamento Ambiental: Resíduos Sólidos Urbanos e Sistemas de Tratamento de Esgotos.** Ministério do Meio Ambiente / SQA. v. 1. 302 p. Brasília, 2006.

PACHECO, E. **Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio – DBO**. Portal tratamento de água, 09 de novembro de 2017. Metodologias de Análises. Disponível em: <<https://www.tratamentodeagua.com.br/artigo/determinacao-da-demanda-bioquimica-de-oxigenio-dbo/>>. Acesso em: 11 de junho de 2020.

PEREIRA, J. A. R., **Geração de resíduos industriais e controle ambiental**. In Saber, v. 3, 121-139 p. 2001.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

RODRIGUES, T. T. M. **Estudo da pirólise da microalga *Chlorella vulgaris*: determinação das classes de produtos e dos parâmetros cinéticos**. Dissertação (Doutorado em Ciências), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2017.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia), Universidade Nova de Lisboa, 2011.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PIERRE-YVES, P.; VACA-GARCIA, C. **Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.35, p.265–278. 2014.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L.M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC - UPF**, v.4, n.1, p.48-60, 2012.

Secretária de Meio Ambiente - Prefeitura Municipal de Ponta Grossa. **Padrões para o lançamento de efluentes líquidos**. Disponível em: <<https://smma.pontagrossa.pr.gov.br/download/licenciamento/3-atividades-industriais/11.doc>>. Acesso em: 22/07/2020.

SEYFABADI, J., RAMEZANPOUR Z. e KHOEYI, Z.A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, n. 23, p. 721-726. 2011.

SINGH, N. K., DHAR, D. W. **Microalgae as second-generation biofuel. A review**. Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, 2011.

STRICKLAND J. D. H., PARSONS T. R. **A practical handbook of seawater analysis**. Pigment analysis, Bull. Fish. Res. Bd. Canada, n. 167. 1968.

SYDNEY, E. B. **Balço respirométrico e análise de quatro microalgas**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, 2009.

ZHU, L. **Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, n. 41, 1376–1384 p. 2015.

ANEXO A – ARTIGO APRESENTADO NO CITREI 2020



*I Congreso Internacional para el Tratamiento y Reúso de Efluentes Industriales
CITREI 2020- Lima - Perú*

Tratamiento de Efluente de Industria de Pulpa Moldeada Utilizando la Microalga *Chlorella vulgaris*

Treatment of Effluent from Molded Pulp Industry Using the Microalga *Chlorella vulgaris*

Bianca Guedes¹, Geslia Bençal¹, Isadora Kaniak Ikeda¹, Alessandra Cristine Novak Sydney¹, Eduardo Bittencourt Sydney^{1*}

1. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa, Bioprocess Engineering and Biotechnology Department, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. eduardosydney@utfpr.edu.br

Resumen

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia humana y su demanda en las industrias depende de los procesos necesarios para la generación de productos. Se estima que en las plantas de papel y celulosa con una producción promedio de 1000 ton/día, se generan cantidades de agua residual similar a la que produce una ciudad de aproximadamente 1 millón de habitantes. En estas industrias, el tratamiento de sus efluentes y su reintroducción en el proceso productivo hace parte de las soluciones para la escasez de agua. El presente trabajo reporta datos sobre el tratamiento de efluente de una industria de pulpa moldeada en Brasil, utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*. El tratamiento biológico resultó en reducciones de 60% en la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y de 78% en la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO). Concomitantemente, hay producción de biomasa microalgal, en efluente sin dilución, alcanzando una concentración de 0,3818 g/L en 145 h de incubación. Es sabido que *C. vulgaris* presenta altos niveles de clorofila y su biomasa puede generar otros compuestos valiosos. Así, se puede usarla para producción de materias primas para otros mercados, así como para la industria de pulpa moldeada, desarrollando una economía circular.

Palabras clave: Biotecnología. Bioproceso. Economía circular.

Abstract

Water is an essential natural resource for human survival and its demand in industries depends on the necessary processes for the generation of products. It is estimated that in paper and pulp mills, with an average production of 1000 ton/day, large amounts of residual water are generated, similar to that produced by a city of approximately 1 million inhabitants. As the demand for water by this industrial sector is great, treating its effluent and reintroducing it into the production process corroborates solutions for water scarcity worldwide. The present work reports data regarding the effluent treatment of a molded pulp industry in Brazil using the microalgae *Chlorella vulgaris*. Reductions in Chemical Oxygen Demand (COD) and Biochemical Demand Oxygen (BOD) reached 60 and 78%, respectively. Microalgae biomass production occurs in an optimum condition of 100% effluent, reaching a concentration of 0.3818 g/L in 145 h of incubation. *C. vulgaris* presents high levels of chlorophyll and its biomass can generate other valuable compounds. This provides an opportunity to use its biomass for the production of bioproducts to be used by the molded pulp industry itself, resulting in a circular economy.

Keywords: Biotechnology. Bioprocess. Circular Economy.

1. Introduction

The essential natural resource for the survival of all living beings on earth serves an old well-known formula, which is composed by two hydrogen and one oxygen molecules: H₂O, popularly called as water. This liquid, besides composing 70% of corporal mass in the human organism, is considered a universal solvent, being widely used in industries all over the world.

The demand for water at industry reflects the kind of product or service that is being produced and the associated industrial processes. The determinant factor for the intensity of water use in industry come from applied technologies, management maturity, good practices, as well as processes and products.

Paper and pulp industries demand huge volumes of water in their processes, resulting in a high quantity of daily residual waters. It is estimated that a technologically evolved bleach pulp factory generates 50 to 70 m³ /ton of pulp. This is similar to that produced by a city of nearly 1 million of inhabitants. Thus, there is a trend to recycle the water within the production system (Klock *et al.*, 2013).

Molded pulp industry is responsible for the production of packaging and trays for packing, transportation and protection of horticulture and grange products. They are paper recycling industries that embrace breakdown or separation process of newspaper and paper shavings fibers, and their molding into the finished product form. Molded Pulp is a technical expression used for cellulose, water and chemical products mixture in a mass formation which is then molded, originating the products. It is a complex production process with many steps and chemical products addition. Consequently, the water process presents high fiber content, conductivity, BOD (biochemical oxygen demand) and COD (chemical oxygen demand), besides other elevated physical-chemical parameters (Grach, 2006).

Due to environmental damage, caused by inadequate disposal of industrial effluents, Law 9605/98 - Law on Environmental Crimes - was created and guarantees criminal sanctions for individuals and companies that commit crimes that damage the environment. Since then, companies must pre-treat their effluents before returning to rivers and lakes (MMA, 2006).

Effluent treatment can be carried in a number of ways and it can be physical, chemical and biological. The biological treatment occurs through the introduction of microorganisms in a medium, in this case, the effluent, whose polluting compounds serve as substrate, where it develops and grows. The biological processes can be aerobic or anaerobic, differing only by the presence or absence of oxygen,

respectively. From biological treatment, organic matter can be removed, which is measured by the parameters BOD, COD, or total organic carbon (COT). The most used type of microorganism in this process is microalgae (Freire *et al.*, 2000).

Microalgae are photosynthetic organisms naturally occurring in different aquatic/humid environments, including lakes, rivers, oceans and soils. They are used as a source for synthesis of various bioproducts, such as fuels, cosmetics, animal feed, food supplements, among others. Compared to traditional raw materials, algae biomass has considerable advantages such as high productivity, biomass with the same chemical composition due to its unicellular nature, highly efficient carbon capture, high lipid or starch content. They can be cultivated outdoors in sea water, brackish water, wastewater and even on non-agricultural land. Also, it can be cultivated in labs, where processes are more controlled, and thus more efficient and also costly. (Embrapa Agroenergia, 2016; Derner *et al.*, 2006).

Microalgae cell growth occurs through the structured and integrated increase of chemical components, which are directly influenced by the parameters: luminosity, pH, temperature, aeration, nutrients concentration and CO₂. In a balanced growth, there is a complete union of microorganisms that are familiarized in an appropriate environment. In this way, the increase of biomass is directly proportional to the duplication of other measurable properties such as RNA, DNA, and protein, followed by other organic molecules. When the objective is to reduce costs and accelerate the process, the most used parameters for quantifying cell growth are mass and number of cells (Russo, 2011).

In order to determine a microalgae cell growth, it is introduced in a liquid medium, where cell evolution is monitored in the time. Then, a curve can be obtained (Figure 1) (Richmond, 2004).

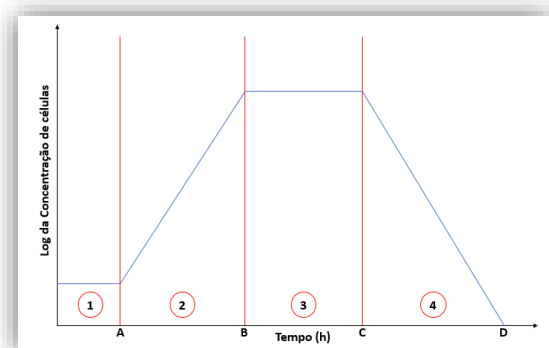


Figure 1. Cell growth curve

Distinct phases, that are enumerated in Figure 1, can be observed during the cell growth:

(1) Lag or adaptation phase: it refers to the intense activity of preparing for population growth, but without increasing the population. Duration of this phase will depend on the initial conditions of the inoculum, and it can be a relatively short phase or not even observed, when using a culture from an exponential growth phase. (Borzani *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004).

(2) Log or exponential phase: it is the exponential or logarithmic increase of the population, due to adaptation to the culture medium. The microorganism multiplication occurs by complete only at the end of this stage, since at the beginning, not all cells multiply. Thus, at the beginning of it, the specific growth rate is lower than the maximum value, but at the end of it, the cell concentration is directly proportional to the growth rate (Borzani *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004).

(3) Stationary or deceleration phase: in this phase, cell deaths are equal to new cells production, resulting in a period of microbiological equilibrium. In this way, the growth speed reduces and equals the death rate (Borzani *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004).

(4) Cell death phase: at this stage the population is reduced at a logarithmic rate, due to nutrient depletion (Borzani *et al.*, 2001; Madigan *et al.*, 2004).

With the increase in the scale of microalgae industries, it would be possible to supply larger markets with production by-products or surplus. For example, with the extraction of microalgae oil for products with high-value added, such as polyunsaturated fatty acids, it could be possible to use residual biomass to generate lower value-added products such as animal additives, which have bigger markets. A model for this large-scale production would be that of the *Chlorella* microalgae, which enables simultaneous production of various products such as β -carotene, animal feed and biofuel, for example (Embrapa Agroenergia, 2016). The use of the total content of biomass for the production of various compounds is called biorefinery. (Fresewinkel *et al.*, 2014).

The main cultivated microalgae are of the species belonging to the genus *Arthrospira* (*Spirulina*) and *Chlorella*, which are used as sources of pigments in the cosmetics industries or as protein supplements for human food and aquaculture (Embrapa Agroenergia, 2016).

The name *Chlorella* is composed of Greek (chloros, which means green) and Latin terms (ella, that is, small being). One of the species of this genus is *Chlorella vulgaris*, which is a green, single-cell algae, measuring about 3-10 μm , found individually or grouped in fresh or salt water and in soils (Safi *et al.* 2014; Cavalcanti, 2016). Its main source of energy reserve is starch (Dantas, 2013). Due to the fact that

its cells are immobile, it reproductions fast and asexually. One *C. vulgaris* cell multiplies by self-sporulation, given rise to four daughter cells (Safi *et al.* 2014; Cavalcanti, 2016).

C. vulgaris has one of the highest chlorophyll levels found in nature, namely chlorophyll a and b. Also, it has high levels of proteins, fatty acids, B vitamins, mineral salts, β -carotenoids, among other substances, thus, being used as a food supplement and in pharmaceutical industry. It stands out among the microalgae that have great bioremediation potential (Seyfabadi *et al.*, 2011; Cavalcanti, 2016). It is used in studies for wastewater purification due to its rapid multiplication capacity (Lucio, 2013).

Due to these aspects, in this study, the microalgae *Chlorella vulgaris* was chosen to treat biologically an effluent with high values of BOD and COD from a molded pulp company located in Brazil. Concomitantly, biomass production is evaluated, for it can be used as feedstock for many purposes, including being useful for the company owning the effluent itself. So, the objective of this work is to evaluate *C. vulgaris* efficiency in reducing polluting parameters from the effluent and if it can be a good substrate for biomass generation.

2. Materials and methods

The effluent used in this study was provided by a molded pulp industry located in Brazil. The collection was carried out in the "water cleaning" outlet system, where a good part of the fibers is removed, after going through the entire production process. The effluent samples used in all the experiments included in this work were collected on 06/02/2020, in the afternoon. The effluent was then fractionated and kept at -4°C , being thawed according to the volume required in each experimental step.

The microalgae used to perform the biological treatment was *Chlorella vulgaris* LEB-104.

Firstly, different effluent concentrations were tested in order to determine in which condition the microalgae *C. vulgaris* LEB-104 would show greater growth. Thus, the effluent was sterilized in an autoclave and subsequently diluted in distilled water to form the culture media in the following concentrations (v/v): 0% (considered the blank for absorbance analysis), 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. Each condition was performed in duplicate in a total volume of 100 mL. Twenty millimeters of *C. vulgaris* LEB-104 culture was inoculated. The inoculated culture media were kept indoors under artificial lighting, with a 12-hour photoperiod. Aliquots were collected in a laminar flow with a period of 72 hours, starting at time 0 until 432 h. To evaluate the microalgae growth, absorbances of the culture media were read on a digital spectrophotometer at a wavelength of 670 nm.

According to the best effluent concentration for *C. vulgaris* LEB-104 growth, a new experiment was carried out in order to build its growth curve during the treatment. For 1.3 L of autoclaved culture medium, a volume of 260 mL of inoculum was added. The cultivation was maintained under the same conditions described above. The absorbance reading of the medium was performed once a day, starting at time 0 until the beginning of the cell death phase was observed. The measurements were performed in duplicate. Subsequently, the kinetic parameters maximum specific growth speed (μ_{max}) and doubling time (t_d) were estimated (Borzani *et al*, 2001):

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{\frac{X}{X_i} e^{\mu_{\text{máx}} t}}{(t-t_i)} \quad d = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}}$$

X_i e t_i refer to cell concentration and time in the beginning of log phase, and X and t refer to cell concentration and time in the end of log phase.

In order to quantify the biomass growths in the culture medium, the relation between absorbance and biomass was constructed. For this, the absorbance reading of the culture at the end of the experiment was carried out in different concentrations. In parallel, dry weight was estimated using gravimetric method. Culture samples were diluted to a total volume of 30 mL in the following proportions (v/v): 83.33%, 66.67%, 50.00%, 33.33% and 16.67%. The dilutions were then subjected to centrifugation (10,000 rpm; 15 min; 24 °C) in previously weighed Falcon tubes. After reading their absorbances, supernatants were discarded and the tubes containing the biomass were placed in an oven at 80 °C. After 24 h, the tubes were weighed again. Thus, the weight difference of the tube was calculated with and without the sample, in order to estimate the dry weight concentration in each one. From these data, a correlation between the absorbance and dry weight values was obtained, allowing the construction of the growth curve of *C. vulgaris* LEB-104 in terms of biomass.

To verify whether the biological treatment of the effluent was effective, parameters of BOD and COD before and after the cultivation of microalgae were evaluated. Initial BOD and COD were provided by the molded pulp company itself. After biological treatment, the culture was centrifuged (10,000 rpm; 15 min; 24 °C) and evaluated for COD and BOD at the Paraná Sanitation Company (SANEPAR) in Ponta Grossa (Paraná).

3. Results and Discussion

To obtain the optimal growth condition of *C. vulgaris* LEB-104 in the effluent, the medium was sterilized in order to eliminate microorganisms that could influence on its growth. Subsequently, cell

growth was compared at different effluent dilutions (Figure 2).

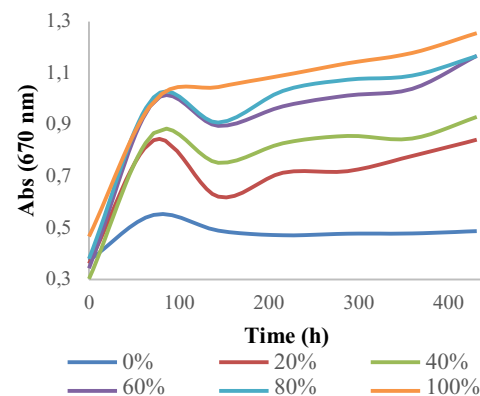


Figure 2. Different growth curve obtained in different effluent % for *Chlorella vulgaris* LEB-104.

From Figure 2, it is observed that the growth curve with 100% effluent, that is, without dilution, was the one that presented the highest absorbance values. The maximum absorbance obtained was 1.255 in 432h of cultivation. Considering that absorbance is directly proportional to microalgae concentration, the best *C. vulgaris* LEB-104 growth was found in undiluted effluent, which was used in the subsequent experiments.

At this stage of the study, it was also possible to observe that in 100 h of cultivation, about 80% of final absorbance was obtained, therefore, it is not advantageous to maintain the cultivation for another 300 h for such a small increase in biomass.

Subsequently, *C. vulgaris* LEB-104 growth was evaluated for 7 days in undiluted effluent. From the absorbance reading performed daily, the growth curve was obtained (Figure 3)

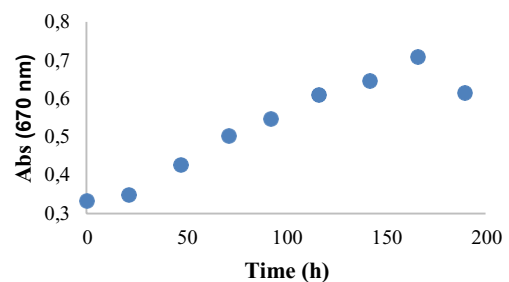


Figure 3. *Chlorella vulgaris* LEB-104 growth curve in undiluted effluent.

From Figure 3, the different microalgae growth phases can be observed. In the first 24 hours, the lag phase occurs; from 24h to 120h, the log phase; from 120h to 145, the stationary phase; and after 168h the cell death was observed. Therefore, the experiment was suspended on the 7th day. The curve profile shows that *C. vulgaris* LEB-104 adapted well to the effluent due to the short duration of lag phase (1 day).

Based on these, μ_{max} and t_d were calculated, which resulted in 0.1268 day^{-1} and 5.5 days, respectively. These values differ from those found by Andrade (2014), who obtained a higher μ_{max} of 0.3203 day^{-1} and a lower t_d of 2 days. These differences are due to the fact that the authors cultivated microalgae in synthetic WC culture medium (Andersen, 2005). That is, microalgae was grown in a chemically defined medium and under a stirring system that homogenizes the medium and favors the absorption

of light, resulting in a high rate of cell growth. It is worth mentioning that the present work uses an industrial effluent as a means of cultivation, without any type of supplementation or agitation. Thus, it resembles the condition found in the place of origin. Despite promoting higher growth rates, synthetic media are more costly. The use of effluent is advantageous because it makes a low-value substrate while performing its treatment, mitigating its costs. On the other hand, more similar results have been reported by Sydney *et al.* (2011). The authors cultivated *C. vulgaris* in similar conditions to this study, using domestic wastewater, and the parameters obtained were $\mu_{max} = 0.10 \text{ day}^{-1}$ and $t_d = 7.36$ days.

Biomass quantification was made by relating the effluent absorbance at the end of the treatment in different concentrations. Knowing the dry weight contained in each sample, the relationship between biomass concentration and absorbance was obtained (Figure 4).

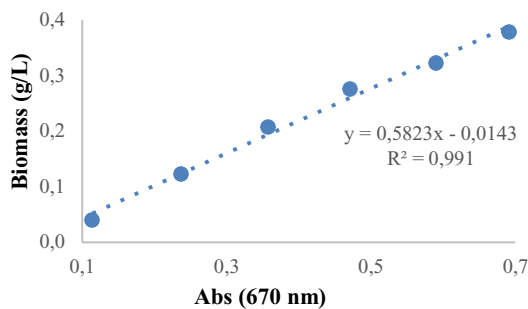


Figure 4. Biomass concentration from *Chlorella vulgaris* LEB-104 absorbance.

Using the equation of the obtained straight line ($y = 0.5823x - 0.0143$; $R^2 = 0.991$), biomass growth curve versus time was constructed (Figure 5).

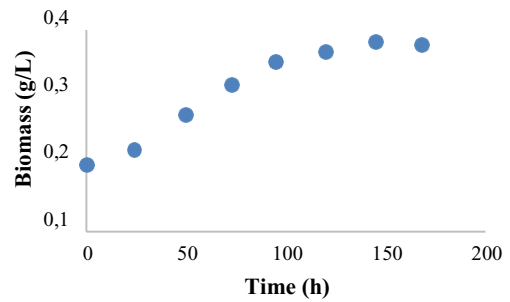


Figure 5. *Chlorella vulgaris* LEB-104 biomass growth curve in undiluted effluent.

In Figure 5 it is also possible to visualize the lag, log, stationary and cell death phases, sustaining that there is no more biomass production after the 7th day. The highest biomass production achieved was 0.3818 g/L in 145 h. This value was higher than a study disclosed by the Agronomic Institute of Paraná (IAPAR) (2014), in which *C. vulgaris* was grown in biodigested swine waste. The average biomass obtained with different concentrations of the residue was 0.30 g/L . In the study conducted by Sydney *et al.* (2011), on the 7th day of cultivation in domestic wastewater, the biomass concentration of *C. vulgaris* was equivalent to 1.11 g/L . These differences may be due to the variability of locality and nutrients present in the culture medium. It is known that the production of microalgal biomass depends on several factors such as temperature, light, availability of nutrients, and its development can vary even among strains of the same species. It should also be considered that the experiments using industrial effluent described in this study was not supplemented nor optimized.

The values referring to the initial conditions of BOD and COD were 2321 mg/L and 8380 mg/L , respectively. COD/BOD ratio was 3.61, being in the range of 2.0 to 5.0, which indicates the possibility of treatment by biological process (Jardim and Canela, 2004). Its pH was 7, with a value between 4.5 and 8.0, which according to Mayo and Noike (1994) is considered to be an optimal growth condition for *C. vulgaris*. Therefore, it is not necessary to correct the pH. After the 7-day period of microalgae growth, the treated effluent presented a COD equal to $3,325 \text{ mg/L}$ and a BOD equal to 500 mg/L . Thus, a reduction of 60% was obtained for COD and 78% for BOD. This demonstrates that the biological treatment with *C. vulgaris* LEB-104 can be considered effective, due to the significant reduction of the pollution parameters. However, the obtained values do not yet fall within the defined parameters of BOD and COD for the disposal of effluents, defined by the state legislations of Brazil. Therefore, a physical-chemical treatment could be applied previously to the biological one, in order to reduce the initial parameters. In addition, a more prolonged treatment should be evaluated in order to see if a higher reduction could be achieved, despite of the biomass reduction.

From these analyzes, we see that the biological treatment of the effluent from the molded pulp industry is a good alternative. This is because, in addition to reducing the BOD and COD parameters, the treatment generates microalgal biomass, which can be used later.

There are several products generated from the production of microalgae biomass, namely biopigments, protein supplements for human consumption and aquaculture, biofertilizers, bioplastics, biofuels, etc. (Embrapa Agroenergia, 2016). In this case, the *C. vulgaris* LEB-104 biomass may not be used for human food or cosmetic purposes, since its growth occurs in an industrial effluent with a complex composition that does not guarantee the absence of toxic substances that could migrate to the biomass. Even so, this biomass becomes useful mainly for the production of other products with a certain added value. The use of an industrial effluent as a substrate makes the process cheaper. In the case of microalgae, this is a factor of great importance, since the costs of its production on a large scale make the processes economically unfeasible, not being competitive with petrochemical industry (Zhu, 2015).

In the case of microalgae biofuels, it is estimated that almost 80% of the total production cost comes from the cultivation (Ge *et al.*, 2018). Thus, this finality is one of the most reported in the literature for *Chlorella* biomass generated from various effluents, such as: dairy-derived liquid digestate (Zhu *et al.*, 2019), centrate wastewater (Ge *et al.*, 2018), MnO₂ industry effluent (Li *et al.*, 2019), saline effluents (Church *et al.*, 2017) and municipal wastewater (He *et al.*, 2013). For this purpose, lipid profile must be analyzed to ensure that there is potential for the production of biodiesel. In addition to lipids, the high carbohydrates content in biomass allows the use of microalgae also in the production of bioethanol. It is also interesting to use the biomass after lipid extraction, that is discussed later. In this way, the whole process becomes even more efficient in terms of utilization, generating more than one product.

Biofertilizer is one of the approaches given to this biomass, which could be direct applied on lands to enhance productivity. The biofertilizer potential will depend on the biomass composition in terms of nitrogen, phosphorus and potassium. Also, it is a great alternative to chemical fertilizers, which is associated to environmental issues (Khan *et al.*, 2018).

Another option is to use this biomass for animal feed and aquaculture. *Chlorella* accumulates a large amount of proteins, with a good balance of essential amino acids. Thus, it becomes an excellent feedstock for protein nutrition (Li *et al.*, 2013). In addition, it is a source of other interesting components for animal nutrition, such as lutein and β -1,3-glucan

(Yakoob *et al.*, 2014) and polyunsaturated fatty acids. Inclusively, Chen *et al.* (2020) proposes the use of *Chlorella* biomass grown in swine wastewater, which is rich in lutein and protein, as swine feed additive, accomplishing a circular economy in the farm.

Chlorella biomass from effluent treatment can also be a good biopigment source. It is known that the most abundant pigment in this microalgal biomass is chlorophyll (Safi *et al.*, 2014). This is an interesting goal since it can therefore be used as a dye in packaging produced by the industry itself. This gives rise to the development of a circular economy project in which, at the same time as there is a reduction in costs for the treatment of its effluent, occurs the generation of a raw material for its products.

A concept worth exploring in this context is that of the biorefinery. Due to the wide range applications of *Chlorella* biomass, a process integration could be made in order to produce different products in a sustainable way. *C. vulgaris* LEB-104 could be produced in the industry effluent, reducing costs and energy input for the effluent treatment. Then, depending on the biomass composition, biofuel or biopigment could be extracted from it, being both of them useful for the company itself: as a source of energy or as a product dye, respectively. The resulting biomass can still be valuable as biofertilizer or even as animal additive.

It is also worth mentioning the high CO₂ biofixation capacity of *C. vulgaris*. These photosynthetic microorganisms have a fundamental role, since they are responsible for about 50% of the photosynthesis of the planet. This process occurs through the consumption of inorganic carbon by the microalgae that develops its growth, reducing CO₂ effectively, thus contributing to the mitigation of the greenhouse effect (Radmann, 2007) and the CO₂ generated by the industry. So, beyond the effluent treatment and *Chlorella* biomass generation, the process proposed in this study could promote the sequestration of CO₂ released by the molded pulp industry.

4. Conclusions

The results from the experiments support the idea that the microalgae *Chlorella vulgaris* LEB-104 has bioremediation potential for the treatment of a effluent from a molded pulp industry located in Brazil, with concomitant biomass production. It was possible to observe that the microalgae adapted well to the medium, presenting a short lag phase (1 day), even in undiluted effluent. This shows that the residue has nutrients that meet to a certain extent the requirements of microalgae for cell growth. In 7 days of treatment, a maximum biomass concentration of 0.38 g/L was achieved. It is important to highlight that the experiments were produced without any type of supplementation, aeration or agitation, in order to simulate the conditions of a treatment carried out at

the factory. The efficiency of the effluent treatment was observed by the reduction of the polluting parameters BOD and COD. However, due to the high initial BOD and COD values, treatment using biological pathways alone did not result in an effluent within the standards defined by Brazilian laws. Thus, a previous physical-chemical treatment should be necessary. Finally, the biomass generated has potential to become a wide range of products. That includes biofuels, animal additive, biofertilizer and biopigments, depending on the biomass composition. A biorefinery approach could be applied, making the combined process more feasible and transforming the effluent into products useful to the molded pulp industry, featuring a circular economy.

5. Referencias

- ANA. Agência Nacional de Águas – Brasil. (2017). *Água na indústria: uso e coeficientes técnicos / Agência Nacional de Águas*, pp 37.
- Andersen, R. (2005). *Algal Culture Technique*. San Diego: Elsevier.
- Andrade, L.M. (2014). *Produção de microalgas e caracterização de sua composição proteica e lipídica via espectrometria de massas*. pp 141. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Borzani, W.; Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone E. (2001). *Biotecnologia Industrial. Fundamentos*, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher.
- Cavalcanti, D. L. (2016). *Potencial biotecnológico de Chlorella vulgaris: aplicação em biocélulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂*. pp 67. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Chen, C.-Y. et al. (2020) *Cultivating Chlorella sorokiniana AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production*, Bioresource Technology, 302, 122814.
- Church, J. et al. (2017). *Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of Chlorella vulgaris in synthetic saline wastewater for biofuel production*, Bioresource Technology, 243, 147–153.
- Dantas, D. M. M. (2013). *Atividades biológicas das preparações obtidas das clorofíceas Chlorella vulgaris e Scenedesmus subspicatus Chodat e suas potenciais aplicações biotecnológicas*. pp 127. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- Derner, R. B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S. M.; Fett, R. (2006). *Microalgas produtos e aplicações. Ciência Rural*. vol. 36, pp 1959-1967. Santa Maria.
- Embrapa Agroenergia. (2016). *Microalgas. Agroenergia em revista*. Ano IV, nº 10.
- Freire, R. S.; Pelegrini, R.; Kubota, L. T.; Durán, N. (2000). *Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas*. Química Nova, v. 23, n. 4, pp 504-511. São Paulo.
- Fresewinkel, M.; Rosello, R.; Wilhelm, C.; Kruse, O.; Hankamer, B.; Posten, C. (2014). *Integration in microalgal bioprocess development: Design of efficient, sustainable, and economic processes*. Engineering in Life Sciences, n.14, pp 560–573.
- Ge, S. et al. (2018). *Centrate wastewater treatment with Chlorella vulgaris: Simultaneous enhancement of nutrient removal, biomass and lipid production*, Chemical Engineering Journal, 342, 310–320.
- Grach, F. C. (2006). *Incorporação de resíduos de embalagens pós consumo provenientes das agroindústrias na fabricação de bandejas de polpa moldada*. Dissertação de mestrado em Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- He, P. J. et al. (2013). *Cultivation of Chlorella vulgaris on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production*, Bioresource Technology, 129, 177–181
- Instituto Agrônomo do Paraná (2014). *Microalgas de águas continentais* em impresso. V2.
- Jardim, W.F.; Canela, M. C. (2004). *Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos*. Caderno temático v. 01, pp 2-3.
- Khan, S. A. et al. (2019). *Microalgae based biofertilizers: A biorefinery approach to phycoremediate wastewater and harvest biodiesel and manure*, Journal of Cleaner Production, 211, 1412–1419.
- Klock, U.; Andrade, A. S.; Hernandez, J. A. (2013). *Polpa e papel. FUPEF. Série Didática. 3ª Edição*. Curitiba.
- Li, C. et al. (2013). *Novel bioconversions of municipal effluent and CO₂ into protein riched Chlorella vulgaris biomass*, Bioresource Technology, 132, 171–177.
- Li, H. et al. (2019). *Treatment of high-nitrate wastewater mixtures from MnO₂ industry by*

Chlorella vulgaris, Bioresource Technology, 291, 121836.

Lucio, M. J. (2013). *Cultivo de microalgas Chlorella vulgaris com efluente doméstico como meio de cultura alternativo*. pp 32. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2004). *Microbiologia de Brock*. São Paulo: Prentice Hall.

Mayo, A. W.; Noike. T. (1994). *Response of mixed culturas of Chlorella vulgaris e heterotrophic bacteria to varia of pH*. In: Pergamon. Wat. Sci. Tech. v. 30. n. 8, pp 285-294.

MMA. Ministério do Meio Ambiente / SQA. (2006). *Coletânea de Legislação para o Licenciamento Ambiental: Resíduos Sólidos Urbanos e Sistemas de Tratamento de Esgotos*. Ministério do Meio Ambiente / SQA. v. 1. 302. Brasília.

RADMANN, E. M. (2007) *Cultivo de microalgas com gases de combustão formados na geração termelétrica*. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande.

Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science.

Russo, D. A. M. T. (2011). *Estudo do crescimento da microalga Chlorella vulgaris numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura*. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia), Universidade Nova de Lisboa.

Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; Pierre-Yves, P.; Vaca-Garcia, C. (2014). *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.35, pp 265–278.

Seyfabadi, J., Ramezanpour Z. e Khoeyi, Z.A. (2011). *Protein, fatty acid, and pigment content of Chlorella vulgaris under different light regimes*. Journal of Applied Phycology, n. 23, pp 721-726.

Sydney, E. B. et al. (2011). *Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage*. Applied Energy, 88 (10), 3291–3294.

Yaakob, Z. et al. (2014) *An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture*, Journal of Biological Research-Thessaloniki, 21 (1), 6.

Zhu, L. (2015) *Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative*

framework. Renewable and Sustainable Energy Reviews, n. 41, pp 1376–1384.

Zhu, S. et al. (2019) *Cultivation of Chlorella vulgaris on unsterilized dairy-derived liquid digestate for simultaneous biofuels feedstock production and pollutant removal*, Bioresource Technology, 285, 121353.