



UNIVERSIDADE TECNÓLOGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL
MULTICAMPI APUCARANA E LONDRINA

HIGGOR HENRIQUE DIAS GOES

PRODUÇÃO DE BIOMASSA NO CULTIVO DA MICROALGA *NEOCHLORIS*
***OLEOABUNDANS* EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

LONDRINA

2021

HIGGOR HENRIQUE DIAS GOES

**PRODUÇÃO DE BIOMASSA NO CULTIVO DA MICROALGA *NEOCHLORIS*
OLEOABUNDANS EM VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**BIOMASS PRODUCTION OF MICROALGAE *NEOCHLORIS*
OLEOABUNDANS GROWN IN SUGARCANE VINASSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental / multicampi Apucarana e Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Engenharia Ambiental

Linha de Pesquisa: Saneamento Ambiental

Orientadora: Profa. Dra. Joseane Débora Peruço Theodoro

Coorientadora: Profa. Dra. Lisandra Ferreira de Lima

LONDRINA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina**



HIGGOR HENRIQUE DIAS GOES

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA NO CULTIVO DA MICROALGA NEOCHLORIS OLEOABUNDANS EM
VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Ambiental.

Data de aprovação: 27 de Agosto de 2021

Prof.a Joseane Debora Peruco Theodoro, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Admilson Lopes Vieira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Diva De Souza Andrade, Doutorado - Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (Iapar-Emater)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 27/08/2021.

As minhas amadas avós,
aos meus pais e
aos meus queridos irmãos

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental Multicampi Londrina e Apucarana da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela oportunidade, estrutura e apoio financeiro.

As minhas orientadoras Prof. Dr^a Joseane Theodoro e a Prof. Dr^a Lisandra de Lima, pela amizade e pelas conversas, por toda a paciência e dedicação, pela confiança no meu trabalho e por aceitarem mais esse desafio. Saibam que vocês são exemplos de seres humanos e profissionais, que me inspiro a cada dia na busca de me tornar uma pessoa melhor.

A todos os docentes do programa que colaboraram com conselhos e ensinamentos que contribuíram para minha vida acadêmica.

Ao Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IDR (antigo IAPAR), em especial a Professora Dr^a Diva de Souza Andrade pelo fornecimento das microalgas utilizadas nesse estudo e nos reagentes do meio de cultivo BBM. Agradeço também a Dr^a. Maria Aparecida de Matos por toda a atenção e paciência durante os períodos no Laboratório de Microbiologia.

A Usina Nova Produtiva localizada em Astorga/PR pelo fornecimento da vinhaça para utilização neste trabalho. Um agradecimento a todos os colaboradores da empresa que nos auxiliaram, em especial para o Gerente Industrial Marco Antonio Falleiros e para a Auxiliar Administrativa Marialli Siuniti Lugato.

A Ana Julia Vergílio Dias, que além de minha irmã, é aluna da Engenharia Química e aceitou participar como Iniciação Científica Voluntária nesse projeto. Obrigado por todo apoio moral, pelo trabalho impecável e por estar sempre disposta a ajudar.

Aos meus amigos do mestrado, que sempre estiveram comigo e me deram o suporte necessário em todos os momentos dessa etapa. Um carinho especial a Natália Stier, Otávio Sobrinho e Larissa Piacenza.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa durante o primeiro ano do mestrado.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Diva de Souza Andrade e Prof. Admilson Lopes Vieira, que aceitaram avaliar e contribuir para a melhoria do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram por esse momento, os meus
mais sinceros agradecimentos

“No pares nunca de soñar”

GOES, H. H. D.. Produção de biomassa no cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar. 2021. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.

RESUMO

A vinhaça da cana-de-açúcar é o efluente líquido gerado na produção de etanol. A cada litro de etanol produzido são gerados até 15 litros de vinhaça. A composição físico-química do efluente apresenta alta toxicidade e elevadas concentrações de nitrogênio e fosfato. Microalgas, ao serem cultivadas, podem produzir matéria-prima para produtos de valor agregado como biocombustíveis, suplementos alimentares, pigmentos e bio-fertilizantes, mas para ser economicamente viável é necessário diminuir os custos do meio de cultivo. A vinhaça pode fornecer os nutrientes necessários para o cultivo de microalgas, sendo a combinação do tratamento biológico para diminuir os impactos de sua disposição no solo e o cultivo de biomassa de microalgas para comercialização de seus produtos uma alternativa vantajosa para ambos os propósitos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o crescimento da microalga *Neochloris oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar, assim como o tratamento biológico do efluente sucroalcooleiro. No estudo de diversas concentrações, os experimentos ocorreram com a diluição da vinhaça até 30% em água destilada e em meio BBM nas seguintes condições de cultivo: Temperatura 25°C, luminosidade 2000 lux, fotoperíodo 12h/12h e agitação constante em 150 rpm. A maior produção de biomassa ocorreu em vinhaça 30% diluída em água destilada com biomassa produzida de 2,72 g.L⁻¹ e taxa de crescimento específica de 0,5984 d⁻¹. Nos experimentos com 30% de vinhaça em meio BBM (Bold's Basal Medium) obteve-se uma biomassa produzida de 2,42 g.L⁻¹ e taxa de crescimento específica de 1,0550 d⁻¹. Assim, a vinhaça foi capaz de suplementar o crescimento da *N. oleoabundans* e produzir elevada biomassa. Um fator importante foi que em concentrações elevadas ocorreu a inibição do crescimento. Nessas condições apresentadas, as taxas de remoção de nutrientes no meio foram consideradas satisfatórias. Para os meios com vinhaça diluída em água as taxas de remoção foram superiores a 76%, 95% e 69% para os parâmetros Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK), fosfato e Demanda Química de Oxigênio (DQO), respectivamente. Para os meios preparados com a diluição de vinhaça em meio BBM, as taxas de remoção foram superiores a 74%, 93% e 74%, respectivamente. Durante o trabalho, foi observado que a vinhaça conservada por congelamento e/ou adição de ácido sofreu degradação, alterando suas propriedades físico-químicas. O cultivo da microalga *N. oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar apresentou bom crescimento indicando que a técnica de tratamento biológico do efluente com microalgas é uma alternativa promissora para os objetivos propostos.

Palavras-chave: *Chlorophyceae*; Tratamento de efluentes; Congelamento;

GOES, H. H. D.. Biomass production of microalgae *Neochloris oleoabundans* grown in sugarcane vinasse .2021. 103 f. Dissertation (Master in Environmental Engineering) – Federal University of Technology – Paraná, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The sugarcane vinasse is the wastewater from the ethanol process. Each liter of ethanol produced are generated almost 15 liters of vinasse. Physicochemical composition of the wastewater shows high toxicity and raised concentration of nitrogen and phosphate. When microalgae are cultivated, can produce feedstocks for products with added value, like biofuel, food supplements, pigments and fertilizers, but to be economically viable is necessary lower costs from the growing medium. The vinasse can provide the necessary nutrients for the cultivation of microalgae, being the combination of biological treatment to reduce the impacts of its disposal on the soil and the cultivation of microalgae biomass for the marketing of your products is an advantageous alternative for both purposes. The present work has the aim to evaluate microalgae growth *Neochloris oleoabundans* in the sugarcane vinasse, as well as the biological treatment of wastewater. The experiments occurred with the dilution of vinasse up to 30% in distilled water and in BBM medium under the following cultivation conditions: Temperature 25°C, brightness 2000 lux, photoperiod 12h/12h and constant agitation at 150 rpm. The biggest production of biomass occurred in 30% vinasse diluted in distilled water with produced biomass of 2.72 g. L⁻¹ and specific growth rate of 0.5984 d⁻¹. With 30% vinasse in BBM medium (Bold's Basal Medium) resulted in produced biomass of 2.42 g. L⁻¹ and specific growth rate of 1.0550 d⁻¹. So, the vinasse was able to supplement the growth of *N. oleoabundans* and produce high biomass. An important factor was that at higher concentrations, growth inhibitions occurred. The nutrient removal rates in the medium were considered satisfactory. For the medium with vinasse diluted in water the removal rates were higher than 76%, 95% and 69% for the parameters Total Kjehdahl nitrogen (NTK), phosphate and Chemical Oxygen Demand (COD), respectively. For the medium prepared with the dilution of vinasse in BBM medium, the removal rates were higher than 74%, 93% and 74%, respectively. During the work was observed that even with freezing and/or addition of acid, the vinasse was degrades, changing its physicochemical properties. The cultivation of microalgae *N. oleoabundans* in sugarcane vinasse showed good growth and the technique of biological treatment of the wastewater with microalgae is a promising alternative.

Keywords: *Chlorophyceae*; Wastewater treatment; Freezing process.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Número de publicações por ano que relacionam cultivo de microalga em vinhaça	18
FIGURA 2 - Número de publicações por ano que relacionam cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> e o tratamento de efluentes.....	19
FIGURA 3 - Comparativo entre fontes de energia não renováveis e renováveis no mundo e no Brasil	21
FIGURA 4 - Comparativo entre a matriz energética mundial e nacional	22
FIGURA 5 - Distribuição das usinas de açúcar e etanol no Brasil.....	23
FIGURA 6 - Esquema simplificado da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar	26
FIGURA 7 - Aspecto visual da vinhaça de cana-de-açúcar	28
FIGURA 8 - Processo de fertirrigação.....	30
FIGURA 9 - Principais grupos de microalgas do Domínio Bactéria e Eucarya.	33
FIGURA 10 - Principais classes da Divisão Chlorophyta.	33
FIGURA 11 - Curva de crescimento padrão.....	35
FIGURA 12 - Microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> por microscópio óptico (100x).	43
FIGURA 13 - Curva de crescimento exponencial da microalga <i>N. oleoabundans</i> cultivada em sistema fechado a 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h, durante 28 dias, com agitação.....	44
FIGURA 14 - Ilustração esquemática das aplicações industriais das microalgas	46
FIGURA 15 - Localização da Cooperativa Agroindustrial Nova Produtiva	59
FIGURA 16 - Esquematização do Ponto de coleta da vinhaça.	60
FIGURA 17 - Ilustração do reator construído para o experimento.	62
FIGURA 18 - Regressão linear entre biomassa (g/L) e densidade óptica (OD - 670 nm).	66
FIGURA 19 - Crescimento da <i>N. oleoabundans</i> no momento 1.....	72
FIGURA 20 - Comparativo do crescimento da <i>N. oleoabundans</i> nos meios (A1) 100% BBM; (B1) 10%Vinhaça em BBM; e (C1) 10%Vinhaça em água	74

FIGURA 21 - Comparativo do crescimento da N. oleoabundans nos meios (A) 100% BBM; (C) 30%Vinhaça em BBM; e (D) 50%Vinhaça em BBM.	75
FIGURA 22- Comparativo do crescimento da N. oleoabundans nos meios: (A2) 100% BBM; (B2) 5%Vinhaça em BBM e (C2) 10% vinhaça em BBM.	76
Figura 23 - Valores de biomassa diários em cada duplicata nos ensaios: (D2) 15%Vinhaça em BBM; (E2) 20%Vinhaça em BBM; e (F2) 25%Vinhaça em BBM;	77
FIGURA 24 - Formação de micela durante o cultivo de microalgas.....	79
FIGURA 25 - Ilustração dos ensaios realizados no momento 2: A esquerda - dia zero após inoculação; A direita - dia 35 após a inoculação da microalga.	80
FIGURA 26 - Comparativo do crescimento da N. oleoabundans nos meios: (A3) 100% BBM; (B3) 5%Vinhaça em BBM com inóculo adaptado em 5%Vinhaça.	82
FIGURA 27 - Valores de biomassa diários em cada duplicata nos ensaios H3, I3, C3, J3 e K3.....	83
Figura 28 - Ilustração dos ensaios realizados no momento 3:	85
FIGURA 29 - Porcentagem remanescente de DQO, DBO. NTK e P após o congelamento da vinhaça	88
FIGURA 30 - Valores de DQO na vinhaça bruta e após o congelamento com adição de HCl.....	89
FIGURA 31 - Crescimento da N. oleoabundans durante o momento 4.....	91
Figura 32 - Comparação da N. oleoabundans em meio BBM para os 4 momentos.	93
Figura 33 - Comparação da N. oleoabundans em meio 10% vinhaça em BBM94	
Figura 34 - Comparação da N. oleoabundans em meio 10% vinhaça em BBM95	
Figura 35 - Variação de pH em cada duplicata do momento 4.....	96
Figura 36 - Taxas de remoção de DQO, NTK e P após o cultivo da microalga N. oleoabundans.....	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Caracterização físico-química da vinhaça.	28
TABELA 2 - Pesquisas apresentadas na literatura no cultivo da microalga <i>N. oleoabundans</i> em efluente. T: Temperatura; L: Luminosidade; I: intensidade Luminosa; F: Fotoperíodo; TC: Tempo de cultivo; A; Aeração; R: Agitação; N: Nitrogênio; PO ₄ ³⁻ : Fosfato; NH ₄ ⁺ : Íon amônio	50
TABELA 3 - Pesquisas na literatura com cultivo de microalgas em vinhaça. T: temperatura; FP: fotoperíodo; L: Luminosidade; A: Aeração;	54
TABELA 4 - Esquema da concentração de vinhaça, BBM e água destilada para cada momento em seus respectivos ensaios para preparação do meio.	65
TABELA 5 – Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar e comparação dos valores obtidos na literatura.	69
TABELA 6 - Caracterização físico-química do BBM.....	71
TABELA 7 - Códigos dos ensaios do momento 1, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.	71
TABELA 8 - Taxa de crescimento específico e produção de biomassa máxima.	72
TABELA 9 - Códigos dos ensaios do momento 2, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P e relação N:P.....	81
TABELA 10 - Códigos dos ensaios do momento 3, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.	82
TABELA 11 - Absorbância das amostras em relação ao tempo.....	87
TABELA 12 - Variação dos parâmetros após o congelamento	88
Tabela 13 - Códigos dos ensaios do momento 4, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.	90
TABELA 14 - Taxa de crescimento específico e produção de biomassa máxima.	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Processamento da cana-de-açúcar para transformação em etanol	24
QUADRO 2 - Resíduos gerados na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar	27
QUADRO 3 - Mecanismos celular onde os nutrientes são utilizados.....	39
QUADRO 4 - Formas metabólicas das microalgas em relação à fonte de energia e de carbono.	42
QUADRO 5 - Parâmetros para análise da composição físico-química da vinhaça	61
QUADRO 6 - Composição química do meio BBM.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. JUSTIFICATIVA.....	18
1.2. OBJETIVOS.....	20
1.2.1. Objetivo geral.....	20
1.2.2. Objetivos específicos.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. MATRIZ ENERGÉTICA	21
2.2. INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA.....	23
2.2.1. Processos de produção de etanol	24
2.2.2. Vinhaça de cana-de-açúcar e seu uso na fertirrigação.....	27
2.3. MICROALGAS	31
2.3.2. Características de crescimento de microalgas	34
2.3.3. Fatores que influenciam no crescimento das microalgas	36
2.3.3.1. Temperatura	36
2.3.3.2. Luminosidade	36
2.3.3.3. pH e CO ₂	37
2.3.3.4. Salinidade.....	38
2.3.3.5. Nutrientes	38
2.3.3.6. Agitação.....	40
2.3.3.7. Compostos tóxicos	40
2.3.4. Nutrição e características dos processos metabólicos	41
2.3.5. <i>Neochloris oleoabundans</i>	42
2.3.6. Principais produtos da biomassa microalgal.....	45
2.4. APLICAÇÃO DE MICROALGAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	59

3.1. COLETA E PREPARAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR	59
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	60
3.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MEIO BBM.....	61
3.4. CEPAS DE MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	62
3.5. CULTIVO DE MICROALGA EM VINHAÇA.....	63
3.6. PREPARO DO MEIO A BASE DE VINHAÇA	63
3.7. DENSIDADE ÓPTICA E TAXA DE CRESCIMENTO	66
3.8. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE POLUENTES	67
3.9. TESTE DE SEDIMENTAÇÃO.....	68
3.10. TESTE DE CONSERVAÇÃO DA VINHAÇA PARA CONGELAMENTO	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEIO DE CULTIVO	69
4.1.1. Características físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar.....	69
4.1.2. Características físico-química do meio BBM	71
4.2. CRESCIMENTO DA MICROALGA	71
4.2.1. Momento 1	71
4.2.2. Momento 2.....	76
4.2.3. Momento 3.....	81
4.2.3.1. Teste de sedimentação.....	86
4.2.3.2. Degradação da vinhaça congelada	87
4.2.4. Momento 4.....	90
4.2.5. Comparação entre os momentos.....	93
4.2.6. Tratamento de efluentes	95
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
REFERÊNCIAS.....	99

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo estando atrás somente dos Estados Unidos da América na produção do biocombustível (AMARAL et al., 2016). Dentre os resíduos gerados, a vinhaça (efluente líquido) é o mais preocupante devido a sua composição físico-química e o grande volume gerado. Estima-se que para cada litro de etanol produzido são gerados de 9 a 15 litros de vinhaça, com elevada carga poluidora (SILVA et al., 2017; ENGIN et al., 2018; SYDNEY et al., 2019a).

De acordo com a Portaria nº 323/1978 da, seu descarte em corpos hídrico é proibido direta ou indiretamente, pois as altas quantidades de nitrogênio e fósforo contribuem para o processo de eutrofização (BEIGBEDER; BOBOESCU; LAVOIE, 2019; PRAZERES et al., 2019) afetando toda a vida do ecossistema aquático. Atualmente, o método usual de descarte é a fertirrigação. Esse processo lança em solo o efluente *in natura* para fertilização e irrigação das culturas de cana-de-açúcar (SILVA et al., 2017). Esse descarte a longo prazo gera impactos negativos nas características físico-químicas do solo e das águas subterrâneas.

Visto que esse efluente apresenta nutrientes em sua composição, estudos recentes apresentam a viabilidade do cultivo de microalgas como tratamento biológico do meio e conseqüentemente, a produção de biomassa para obtenção de matéria-prima para biocombustíveis, suplementos alimentares, pigmentos e fertilizantes.

As microalgas são organismos microscópicos, unicelulares, que são encontradas em ambientes aquáticos e terrestres (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; MENEGAZZO; FONSECA, 2019). Seu cultivo em escala industrial se torna inviável devido ao alto custo dos meios de cultivo e do processo de colheita (GUPTA; PAWAR; PANDEY, 2019).

Assim, o tratamento biológico da vinhaça para diminuir os impactos de sua disposição no solo e o cultivo de biomassa de microalgas para comercialização de seus produtos apresenta-se uma alternativa vantajosa para ambos os propósitos.

1.1. JUSTIFICATIVA

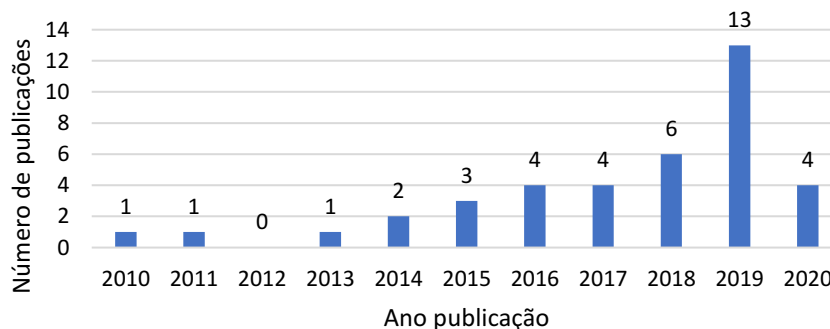
A longo prazo, o processo de descarte da vinhaça da cana-de-açúcar em culturas terrestres, sem tratamento, pode afetar e modificar as características físicas, químicas e biológicas do solo e das águas subterrâneas. Assim, alternativas promissoras para o tratamento do efluente devem ser estudadas e implementadas para redução dos impactos.

Em decorrência da sua alta toxicidade para o meio ambiente diversas tecnologias vêm sendo estudadas na busca de aplicações para revalorizar a vinhaça como forma de produto.

Utilizando o conceito de biorrefinaria¹, onde uma Usina de açúcar e álcool pode se enquadrar, a biomassa gerada no cultivo de microalgas no tratamento da vinhaça pode ser direcionada para a produção de biodiesel e bioetanol.

Em busca na literatura sobre cultivo de microalgas em vinhaça, pode-se perceber um número baixo de pesquisas publicadas referente ao tema. Na busca pela plataforma *Web Of Science* para o ano de 2010 (não constam publicações anteriores) a 2018 (ano anterior ao início deste trabalho) foram encontrados apenas 22 artigos científicos associados as palavras-chaves *Microalgae* e *Vinasse*. O número de publicações anuais pode ser visualizado na Figura 1, o que demonstra grandes possibilidades de pesquisa na área.

FIGURA 1 - Número de publicações por ano que relacionam cultivo de microalga em vinhaça



FONTE: Autoria própria (2021)

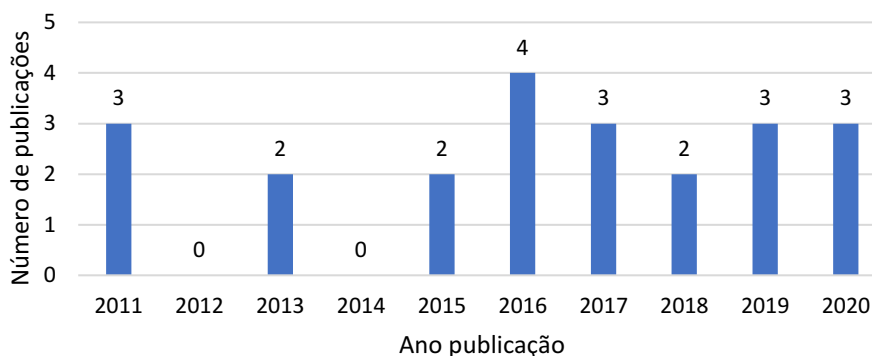
¹ Biorrefinaria: Instalação que integra processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, materiais, alimentos, rações e energia. Tem por objetivo otimizar o uso de recursos e minimizar os efluentes, maximizando os benefícios e o lucro (EMBRAPA, s.d).

Durante a realização deste trabalho, para o ano de 2019 ocorreram 13 novas publicações relacionadas com o tema, um valor consideravelmente alto em relação aos anos anteriores. Em 2020 o número de publicações registradas foi de 4 artigos, totalizando, entre os anos de 2010 e 2020, 39 resultados.

Para o uso em escala industrial, a microalga deve possuir taxas de crescimento e conteúdo lipídico satisfatórios (ÁLVAREZ-DÍAZ et al., 2017). Na literatura, a microalga *Neochloris oleoabundans* vem ganhando destaque devido as altas taxas de acúmulo de lipídio (OLGUÍN et al., 2015) e produção de ácidos graxos para conversão em ésteres metílicos adequados para a produção de biodiesel (OLGUÍN, 2012).

Em busca na literatura sobre o uso da microalga *N. oleoabundans* para o tratamento de efluentes, pela plataforma *Science Of web* para o ano de 2011 (não consta publicações anteriores) a 2018 (ano anterior ao início deste trabalho) foram encontrados apenas 16 artigos científicos associados as palavras-chaves *Neochloris oleoabundans* e *Wastewater*. O número de publicações anuais pode ser visualizado na Figura 2.

FIGURA 2 - Número de publicações por ano que relacionam cultivo da microalga *N. oleoabundans* e o tratamento de efluentes



FONTE: Aatoria própria (2021)

Durante a execução deste trabalho, 6 novos trabalhos foram publicados, entre 2019 e 2020. Do total de 22 artigos publicados, apenas um realizou o cultivo da microalga *N. oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar.

Assim, para possibilitar em escala industrial a produção de biomassa de microalgas e o tratamento biológico do efluente do etanol percebe-se a eminente necessidade de mais pesquisas sobre o assunto.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o crescimento da microalga *Neochloris oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar, assim como o tratamento biológico do efluente sucroalcooleiro.

1.2.2. Objetivos específicos

Os demais objetivos deste trabalho, mais específicos, são:

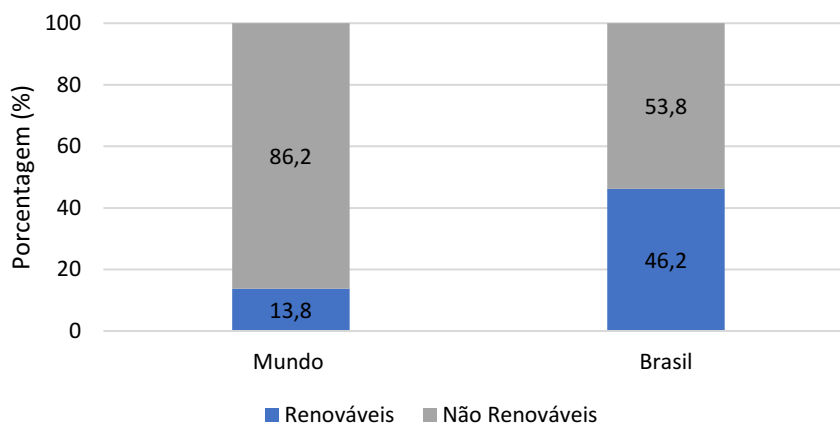
- Avaliar a aclimatação da microalga *N. oleoabundans* em vinhaça;
- Quantificar e qualificar o crescimento da microalga *N. oleoabundans* em vinhaça;
- Definir as taxas de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo na vinhaça após cultivo da microalga;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MATRIZ ENERGÉTICA

Atualmente, a Matriz Energética Mundial possui grande parte das fontes de energia de origem não renováveis. O Brasil utiliza de um percentual maior no uso de fontes renováveis de energia, quando comparado ao mundo. A Figura 3 ilustra o comparativo entre o percentual de fontes não renováveis e renováveis no mundo e no Brasil com ano base de 2019.

FIGURA 3 - Comparativo entre fontes de energia não renováveis e renováveis no mundo e no Brasil

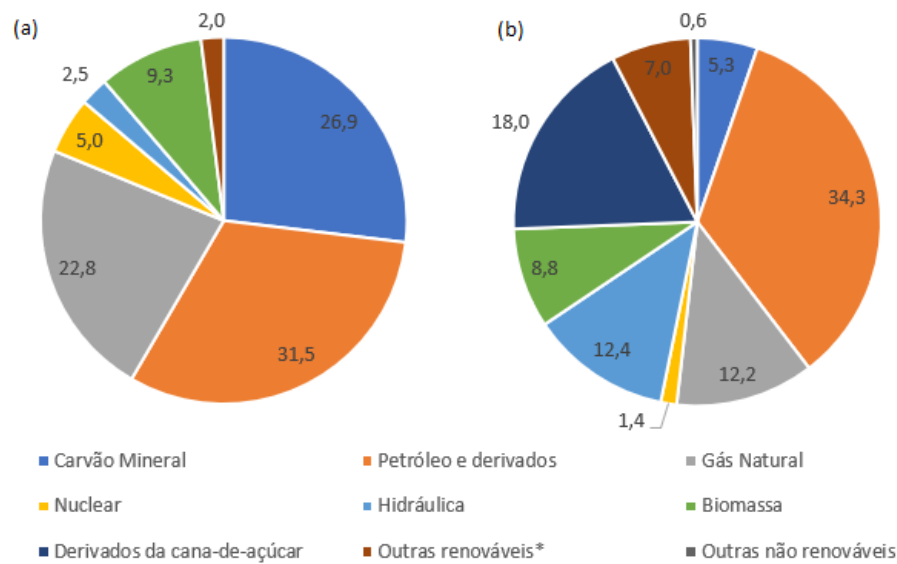


Fonte: adaptado de EPE (2019); IEA (2020).

Na matriz energética mundial, as fontes não renováveis como petróleo e derivados, carvão mineral e gás natural somam aproximadamente 86% das fontes de energia utilizadas. No Brasil, as fontes não renováveis de energia ainda são superiores as fontes renováveis, com aproximadamente 54%. Porém, em confronto com as fontes utilizadas mundialmente, o país utiliza mais fontes renováveis de energia, como energia hidráulica, biomassa, derivados da cana-de-açúcar e outras fontes renováveis (solar, térmica, etc.).

Quanto aos tipos de fontes de energia, a Figura 4 representa o comparativo entre a (a) matriz energética mundial e (b) a matriz energética do Brasil, ambas para o ano base de 2019.

FIGURA 4 - Comparativo entre a matriz energética mundial e nacional



(a) Matriz energética mundial

(b) Matriz energética do Brasil

Fonte: adaptado de EPE (2019); IEA (2020).

Como demonstrado na Figura 2(b), os derivados da cana-de-açúcar representam um percentual significativo para a matriz energética nacional, sendo seu principal produto o etanol.

Os investimentos do governo para a produção de etanol iniciaram-se em meados de 1970 como forma de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis importados e intensificar a economia do país promovendo o agronegócio. Nesta época, acontecia uma crise energética mundial que provocou a diminuição da oferta do petróleo e consequentemente o aumento do preço comercializável (FILOSO et al., 2015).

Para solucionar os problemas energéticos no Brasil, o Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL) foi desenvolvido em 1975 como alternativa de aumentar a segurança energética nacional e expandir a produção de etanol no país (REIS; HU, 2017).

2.2. INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA

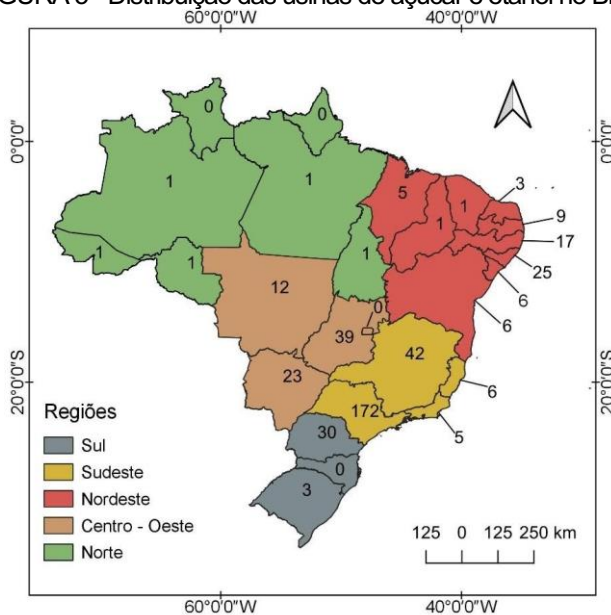
Para a produção de etanol podem ser utilizadas como matéria-prima a cana-de-açúcar, beterraba, soja e milho (CANDIDO; LOMBARDI, 2017). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol em escala mundial de etanol (AMARAL et al., 2016) atrás somente dos Estados Unidos da América, produzindo-o a partir da cana-de-açúcar (FIGUEIREDO, 2017), sendo considerada uma biomassa importante para o desenvolvimento da economia (ALBARELLI et al., 2018a).

Nas últimas décadas, o cultivo da planta esteve concentrado na região Sudeste do país, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais onde alojavam-se a maioria das usinas (FILOSO et al., 2015). Atualmente, o cultivo da cana-de-açúcar sofreu uma expansão para a região Centro-oeste (nos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás), no norte do Paraná e no litoral da região Nordeste.

A colheita da cana-de-açúcar varia em relação a região cultivada, sendo normalmente de abril a novembro nas regiões Centro-Oeste, sudeste e Sul e de setembro a março na região Nordeste do país (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

A Figura 5 representa a quantidade de usinas de açúcar e etanol alocadas em cada estado do Brasil.

FIGURA 5 - Distribuição das usinas de açúcar e etanol no Brasil



Fonte: Autoria própria (2020)
Base de dados: Nova Cana (2021)

No processo industrial, as usinas podem utilizar a cana-de-açúcar para a produção apenas de açúcar (usinas de açúcar), apenas de etanol (destilarias) ou possuírem os processos integrados de produção de açúcar em conjunto com a produção de etanol (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018). Processos otimizados são capazes de aproveitar subprodutos e resíduos para aumento da capacidade produtiva e geração de novos produtos (ALBARELLI et al., 2018b), como o biogás, biometano e eletricidade, perfazendo uma biorrefinaria.

De acordo com os dados publicados no Balanço Energético Nacional, EPE (2019), a produção de cana-de-açúcar em 2019 aumentou 2,3% em relação ao ano anterior, totalizando 639,0 milhões de toneladas. A produção nacional de açúcar teve uma redução de 0,4% em comparativo a 2018, representando 29,2 milhões de toneladas. Por sua vez, a produção de etanol em 2019 obteve um aumento de 5,9%, atingindo um total produzido de aproximadamente 35.000 mil m³ do biocombustível.

2.2.1. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DO ETANOL

Para a transformação da cana-de-açúcar em etanol são realizadas diversas etapas no processo produtivo como: recepção e limpeza da cana-de-açúcar; extração, tratamento e concentração do caldo; fermentação; destilação do etanol e possível desidratação (ALBARELLI et al., 2018b). O Quadro 1 descreve cada processo de uma destilaria para a produção de etanol.

QUADRO 1 - Processamento da cana-de-açúcar para transformação em etanol

Processo	Descrição
Recepção da cana-de-açúcar	Na chegada da destilaria a cana-de-açúcar é pesada, descarregada e enviadas ao sistema de limpeza.
Limpeza	A cana-de-açúcar é lavada com água ou limpa a seco com jatos de ar para diminuição das impurezas.
Preparação da cana-de-açúcar	A cana-de-açúcar passa por facas e trituradores para obtenção de tamanhos menores e uniformes. Um eletroímã pode ser utilizado para retirada de metais prejudiciais as etapas posteriores.
Moagem	A cana-de-açúcar passa por uma sequência de rolos (moinhos), onde é prensada, separando o caldo (fração líquida) e o bagaço (fração fibrosa). Nessa etapa ocorre a adição de água quente para aumentar a eficiência da extração dos açúcares da planta.

(Continuação) - QUADRO 1 - Processamento da cana-de-açúcar para transformação em etanol

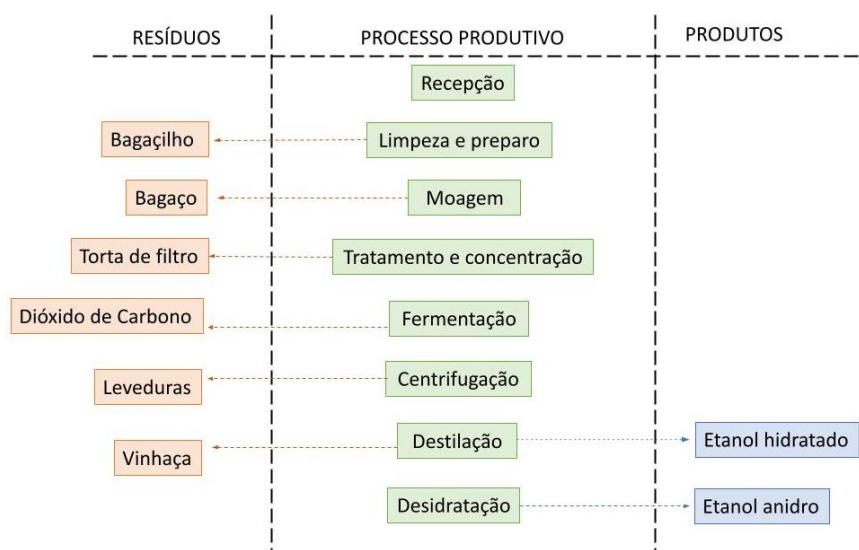
Processo	Descrição
Filtração	O caldo é enviado para uma peneira onde ocorre a separação da parte fibrosa que ainda pode estar dispersa no meio líquido.
Tratamento do caldo	Processo físico-químico para separação de impurezas como minerais, sais, compostos orgânicos e partículas finas de fibras. Nesta etapa ocorre o aquecimento do caldo até 70 °C, adiciona-se cal (CaO), continua o aquecimento até 105 °C e acrescenta-se um polímero floculante para clarificação.
Concentração do caldo	Esta etapa ocorre em evaporadores e realiza-se a concentração dos açúcares em quantidades adequadas para o processo de fermentação.
Fermentação	O processo de transformação dos açúcares em etanol. Adiciona-se o caldo concentrado em um reator com leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) a uma temperatura entre 30 a 34 °C. Esta etapa produz etanol em baixa concentração (até 10 °GL*) e subprodutos como ácidos orgânicos e dióxido de carbono.
Centrifugação	Separação das leveduras e do licor fermentado (vinho). As leveduras são recirculadas para o processo de fermentação e o vinho destinado para a destilação.
Destilação	O vinho passa por colunas de destilação para produção de etanol hidratado. O etanol produzido nesta etapa apresenta uma concentração de 93 % em peso (wt.).
Desidratação	Este processo visa aumentar a pureza do etanol, produzindo o etanol anidro que pode chegar a uma concentração de 99,3 % em peso (wt.).

● °GL: Grau Gay Lussac é a fração do volume de álcool na mistura hidroalcolica.

Fonte: adaptado de Dias et al. (2019).

A Figura 6 apresenta um esquema simplificado desse processo, com os produtos originados e os resíduos gerados.

FIGURA 6 - Esquema simplificado da produção de etanol a partir da cana-de-açúcar



Fonte: adaptado de Dias et al. (2019); Montalvo et al. (2019).

O etanol hidratado é comercializado para abastecimento dos veículos automotores flex. O etanol anidro é utilizado na mistura com a gasolina em percentual previsto por lei (FIGUEIREDO, 2017; SANTOS et al., 2019). Atualmente, de acordo com a Resolução CIMA - Conselho Interministerial do Açúcar e do Álcool nº 001/2015, o percentual obrigatório da adição de etanol anidro à gasolina é de 27% em gasolina comum e 25% em gasolina Premium.

Para o ano base de 2019, de acordo com os dados publicados no Balanço Energético Nacional (EPE, 2020) a produção de etanol obteve um aumento de 5,9% em relação a 2018, como mencionado anteriormente. Deste valor, 69,8% representam o aumento da produção do etanol hidratado com aproximadamente 24.5 mil m³. Em comparativo com o ano anterior, a produção de etanol hidratado aumentou em 3,6% e o etanol anidro apresentou uma queda de 11,6% em sua produção.

No processo de produção do etanol são gerados efluentes líquidos, sólidos e gasosos em elevadas quantidades (SYDNEY et al., 2019b). O Quadro 2 apresenta os resíduos gerados durante a produção de etanol, a etapa em que é formado e os possíveis tratamentos a serem realizados para mitigação dos impactos e possível produção de subprodutos.

QUADRO 2 - Resíduos gerados na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar

Resíduo	Geração	Usos
Palha	Gerada no momento da colheita mecânica.	Deixada na superfície do solo; contribui para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, controle da erosão e das ervas daninhas, retenção de umidade e aumento na microbiota do solo.
Bagaço	Gerado no processo de moagem.	Utilizado na queima em caldeiras para geração de vapor e energia elétrica, permitindo a autoeficiência energética das usinas e comercialização do excedente.
Torta de filtro	Gerado na etapa de filtração.	Aplicado no solo como fertilizante devido as altas taxas de nitrogênio, fósforo e cálcio.
Dióxido de carbono (CO ₂)	Produzido no processo de fermentação alcoólica.	Pode ser armazenado sobre pressão e utilizado na produção de bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) e no tratamento de efluente.
Levedura	Excesso produzido na fermentação	Destinadas para ração animal para alimentação de bovinos, suínos e aves.
Vinhaça	Resíduo líquido obtido no final do processo de destilação do vinho fermentado.	Aplicada no solo como fertilizante líquido na fertirrigação.

Fonte: adaptado de Santos et al. (2019).

Aplicando um tratamento adequado para cada resíduo é possível obter subprodutos no setor, diminuir a demanda energética e ainda mitigar os efeitos negativos ao meio ambiente (BEIGBEDER; BOBOESCU; LAVOIE, 2019).

2.2.2. VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEU USO NA FERTIRRIGAÇÃO

A vinhaça é o resíduo de maior quantidade gerada durante a produção de etanol (SILVA et al., 2017). De acordo com a literatura, são gerados de 9 a 15 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido (ENGIN et al., 2018; ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; SYDNEY et al., 2019c). Esse efluente é gerado no processo de destilação, onde ocorre a separação do etanol produzido na fermentação (SILVA et al., 2017) e o os demais compostos, como caldo fermentado sem etanol, sólidos orgânicos em suspensão, minerais, resíduos de açúcar e compostos voláteis (SYDNEY et al., 2019c)

As características da vinhaça dependem da matéria-prima utilizada para produção do etanol (SANTOS et al., 2016). Comumente, a vinhaça apresenta um cheiro forte característico e coloração marrom escura devido a presença de compostos fenólicos, melanoidinas, caramelos, furfurais, pigmentos naturais e produtos de

degradação alcalina de hexose (HADP) (HOARAU et al., 2018a; PRAZERES et al., 2019). O aspecto visual da vinhaça pode ser observado na Figura 7. Na Tabela 1 são apresentadas as características físico-químicas da vinhaça.

FIGURA 7 - Aspecto visual da vinhaça de cana-de-açúcar



(a) na saída do processo de destilação



(b) no laboratório após resfriamento

Fonte: Autoria própria (2019)

TABELA 1 - Caracterização físico-química da vinhaça.

Autor	Prazeres <i>et al.</i> (2019)	Candido e Lombardi (2016)	Amaral <i>et al.</i> (2016)	Bettani <i>et al.</i> (2019)	Mattos e Bastos (2015)	Olguin <i>et al.</i> (2015)	Faixa encontrada
pH	4,29	4,38	4	4,5	3,5	4	3,50 – 4,29
Condutividade (uS.cm ⁻¹)	8,43	18,31	3,73	-	-	-	3,73 – 18,31
Cor aparente (uH)	-	-	18.407,00	-	-	-	-
Óleos e graxas	1,19	-	-	-	-	-	-
Dureza total (g.L ⁻¹)	3,34	-	-	-	-	-	-
DQO (mg.L ⁻¹)	31.170,00	27.462,00	39.755,00	-	27.100,00	124.900,00	27.100,00 – 124.900,00
DBO ₅ (mg.L ⁻¹)	15.467,00	18.925,10	-	-	-	-	15.467,00 – 18.925,10
Sólidos totais (g.L ⁻¹)	22,5	-	13,67	26,8	26,22	-	13,67 – 26,80

Sólidos em suspensão (g.L ⁻¹)	-	1,59		-	-	-	-
Sólidos voláteis (g.L ⁻¹)	14,4	-	11,15	-	-	-	11,15 – 14,40
Sólidos fixos (g.L ⁻¹)	8,1	-	2,52	-	-	-	2,52 – 8,1
Sulfato (mg.L ⁻¹)	-	2.079,80	763	380	-	11.360,00	380,00 – 11.360,00
Fosfato (mg.L ⁻¹)	-	59,2	158	-	-	102	59,20 – 158,00
P (mg.L ⁻¹)	51	-	-	85	2,61	-	2,61 - 85
Nitrogênio Total Kjeldahl (mg.L ⁻¹)	489,4	348,3	81	543,3	1420	2.876,50	81,00 – 2.876,50
N amoniacal (mg.L ⁻¹)	46,2	10,4	-	-	-	752	10,40 – 752,00
Ca (mg.L ⁻¹)	605	557,3	315	680	-	-	315,00 – 680,00
Mg (mg.L ⁻¹)	444,1	351,8	-	270	-	-	270,00 – 444,10
K (mg.L ⁻¹)	2.480,60	3.548,00	1.665,00	3.923,30	-	-	1.665,00 – 3.923,00
Na (mg.L ⁻¹)	151,5	1505	-	-	-	-	151,50 – 1505,00
Cl (mg.L ⁻¹)	2.335,20	-	394	-	-	-	394,00 – 2.335,20

Conforme apresentado na Tabela 1, a vinhaça apresenta pH ácido e alta corrosividade, elevada demanda química de oxigênio (DQO), elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), metais tóxicos, íons (potássio, Cálcio, Magnésio), compostos orgânicos (açúcar, glicerol, ácido láctico), nitrogênio e fósforo (HOARAU et al., 2018a; PRAZERES et al., 2019; SANTANA et al., 2017). O percentual de água presente no efluente é de aproximadamente 93%, sendo o restante sólidos orgânicos e minerais (MARAFON et al., 2019).

Devido a sua composição físico-química, a vinhaça apresenta uma carga poluidora de até 100 vezes maior do que o efluente doméstico (CANDIDO; LOMBARDI, 2017).

A alternativa convencionalmente adotada para o uso da vinhaça é a aplicação do efluente por aspersão *in natura* como fonte de nutrientes para a cultura da cana-de-açúcar, visando à diminuição dos gastos com fertilizantes químicos (SILVA et al., 2017) e reduzir a quantidade de água necessária para o desenvolvimento da cultura (REIS; HU, 2017). Essa técnica, denominada fertirrigação, pode ser visualizada na Figura 8.

FIGURA 8 - Processo de fertirrigação



Fonte: Embrapa (2013).

Apesar do comprovado aumento da produtividade agrícola com expectativa do aumento da produção de etanol nos próximos anos e conseqüentemente o aumento da geração da vinhaça (DIAS *et al.*, 2015), o seu uso constante e excessivo poderão causar mudanças nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e das águas subterrâneas como apontados nos estudos por (BARRERA et al., 2016; FRANCISCO et al., 2016).

Nos processos químicos, sua disposição no solo pode promover modificações na disponibilidade de alguns elementos para as plantas, como nitrogênio e potássio (CETESB, 2018) e redução da alcalinidade do solo (AMARAL et al., 2016).

Na vertente dos impactos físicos, a aplicação do efluente pode alterar a agregação das partículas e aumentar o processo de lixiviação de metais tóxicos ao longo do perfil do solo, alteração das propriedades das águas subterrâneas, além de

potencializar o processo de salinização e desertificação do solo (AMARAL et al., 2016; SYDNEY et al., 2019c).

Nas propriedades biológicas, pode acarretar mudanças na função e estruturas do ecossistema pelo aumento da toxicidade (HOARAU et al., 2018a) e inibição da germinação (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011).

Devido aos impactos oriundos do descarte da vinhaça diretamente no solo, técnicas alternativas para o tratamento e uso desse efluente são descritos na literatura. Os trabalhos mais encontrados abordam a digestão anaeróbica do efluente que diminui a carga poluidora e mantém as características fertilizantes do efluente (MARAFON et al., 2019), gerando biogás (CANDIDO; LOMBARDI, 2018) que pode ser queimado para a geração de eletricidade (DIAS et al., 2015). Outras técnicas são descritas como concentração, recirculação, filtração por membranas, carvão ativado, aplicação de ozônio, eletrocoagulação, processo enzimático (HOARAU et al., 2018b).

Para o processo ser utilizado, ele deve apresentar custo-benefício satisfatório. Estudos recentes avaliam a viabilidade do cultivo de microalgas em efluentes, incluindo a vinhaça. As microalgas são capazes de utilizar os compostos disponíveis no meio como substratos e se desenvolver, apresentando em sua composição compostos de valor agregado. Além disso, esse processo contribui para a diminuição das substâncias poluidoras do efluente durante seu crescimento (ENGIN et al., 2018).

2.3. MICROALGAS

2.3.1. Grupos de microalgas

As algas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com o seu tamanho: macroalgas: organismos macroscópicos, e microalgas: organismos microscópicos (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). As microalgas são organismos unicelulares, naturalmente presentes em sistemas aquáticos ou locais úmidos, em diversas formas, características e funções ecológicas (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; MENEGAZZO; FONSECA, 2019). Seu desenvolvimento pode ocorrer como uma célula individual ou em pequenas colônias, podendo ser encontradas em ambientes de água

doce, água salgado e no solo (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018).

As microalgas são ecologicamente definidas como produtores primários de energia, sempre responsável por aproximadamente 60% da energia disponível a ser utilizada na cadeia alimentar e são responsáveis por pelo menos 50% da atividade fotossintética global (ANDRADE; FILHO, 2014).

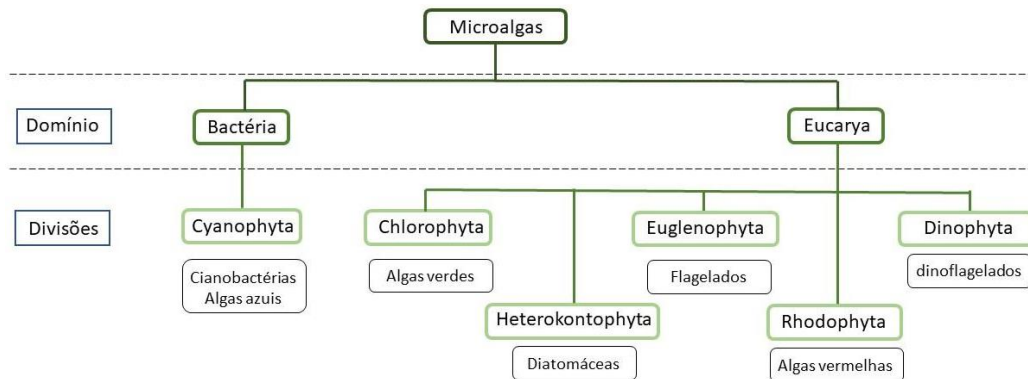
Dentre o grupo das microalgas, encontram-se organismos procariontes e eucariontes (SANTOS et al., 2016). As microalgas procariontes, agrupada no Domínio Bactéria de acordo com Woese; Kandler e Wheelis (1990), apresentam uma forma celular mais simplificada, com seu material genético disperso no citoplasma celular e não dispõe de organelas com funções específicas, ocorrendo por exemplo, a fotossíntese em qualquer região delimitada pela membrana plasmática.

Em contrapartida, as microalgas eucariontes, agrupada no Domínio Eucarya de acordo com Woese; Kandler e Wheelis (1990), possuem o material genético delimitado pela membrana nuclear e há presença de organelas com funções específicas, como o cloroplasto, local onde à fotossíntese ocorre (SAJJADI et al., 2018).

Para cada Domínio, de acordo com suas características morfológicas (presença e estrutura dos flagelos), composição bioquímica (presença de pigmentos e composição dos produtos de reserva), presença e caracterização de envoltório do cloroplasto, estrutura celular (processos de formação do núcleo e da divisão celular), ciclo de vida e dados da sequência de genoma, as microalgas foram classificadas em Divisões (agrupamentos primários) e Classes (agrupamentos secundários) (ANDRADE; FILHO, 2014).

A Figura 9 representa as principais divisões de microalgas dos domínios Bactéria e Eucarya.

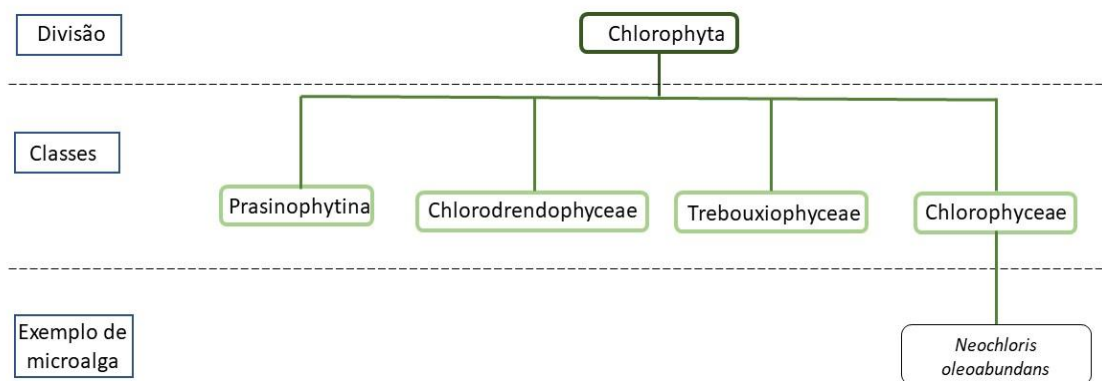
FIGURA 9 - Principais grupos de microalgas do Domínio Bactéria e Eucarya.



Fonte: adaptado de Sajjadi *et al.* (2018); Alessandro; Antonioso (2016); Andrade; Filho (2014).

Na divisão Chlorophyta (Clorófita), estão agrupadas classes importantes de algas verdes eucariontes. Em sua constituição há presença de vacúolos na função de armazenamento de amido e óleo, presença dos pigmentos fotossintetizantes clorofila *a* e clorofila *b* responsáveis pela coloração esverdeada desses organismos, além de possuir uma rígida parede celular (SAJJADI *et al.*, 2018). De acordo com Rashidi e Trindade (2018), a divisão Clorófita se subdivide taxonomicamente em algumas classes principais de acordo com a composição da parede celular, como apresentado na Figura 10.

FIGURA 10 - Principais classes da Divisão *Chlorophyta*.



Fonte: adaptado de Rashidi; Trindade (2018)

2.3.2. Características de crescimento de microalgas

O crescimento das microalgas segue o mesmo princípio do crescimento bacteriano e as taxas de crescimento estão diretamente relacionadas com os fatores ambientais e as características da própria espécie em estudo (MADIGAN *et al.*, 2016). Para esse processo, algumas fases do crescimento são observadas: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de morte ou declínio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Na primeira fase, denominada Fase lag, ocorre pouco processo de divisão celular, mas intensa atividade metabólica para aclimatação no meio. Esse período de adaptação depende do tamanho do inóculo e do choque pela mudança de ambiente (YOUSUF, 2019)

Posteriormente, inicia-se a fase log, onde ocorre uma intensa atividade metabólica associada ao rápido crescimento devido a divisão celular de ordem logarítmica (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE 2012).

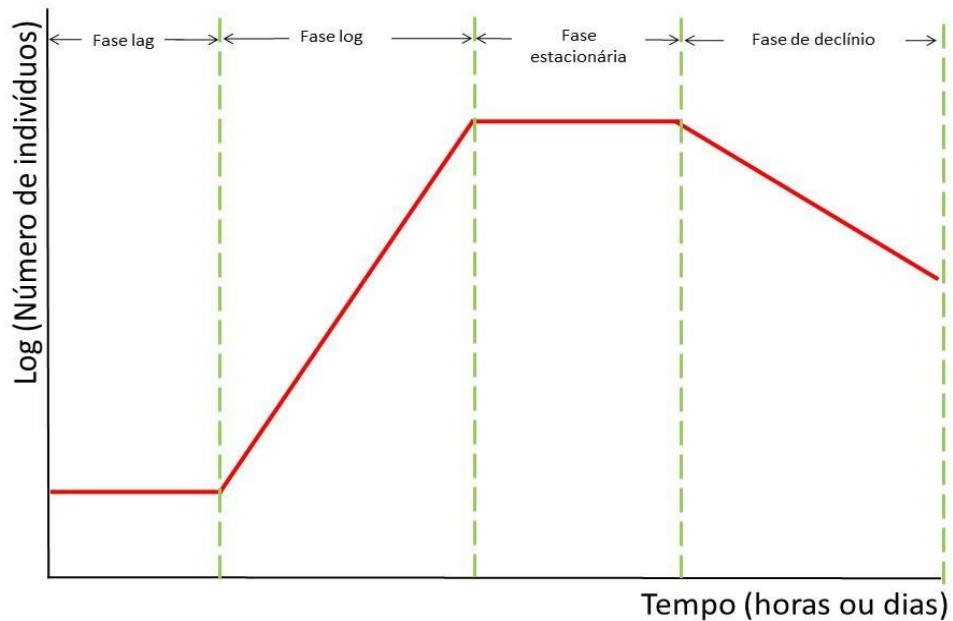
Na fase estacionária ocorre a redução da velocidade de multiplicação celular e o equilíbrio entre o número de células novas e mortas, perfazendo a estabilização (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE 2012). A causa da estabilização é devido a competitividade pelos recursos disponíveis no meio (YOUSUF, 2019)

Na fase de morte ou declínio, o número de organismos mortos é superior ao de células novas formadas, de forma exponencial (MADIGAN *et al.*, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE 2012). A queda no número de indivíduos ocorre devido a escassez de nutrientes disponíveis no meio (YOUSUF, 2019)

Assim, é possível obter uma representação gráfica do crescimento celular em função do tempo, quando observado o crescimento da população em estudo pelo tempo de análise. Essa representação é denominada de Curva de crescimento exponencial (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A Figura 11 representa uma curva de crescimento exponencial genérica com todas as fases do crescimento celular mencionado anteriormente. A duração de cada fase é uma variável em relação a espécie de microalgas.

FIGURA 11 - Curva de crescimento padrão



Fonte: adaptado de Madigan *et al.* (2016); Tortora; Funke; Case (2012)

No cultivo de microalgas, a diminuição da fase lag pode ocorrer com algumas estratégias: pré-adaptação ao meio de cultura, inoculação de uma cultura jovem e/ou aumentar a concentração do inóculo.

Na fase log, devido a intensa atividade metabólica das microalgas para o crescimento do número de indivíduos, ocorre a absorção de grande quantidade de nutrientes. Nessa etapa pode-se encontrar a taxa de crescimento específica da microalga.

A competitividade e a menor disponibilidades de nutrientes na fase estacionária acarretam o acúmulo de metabólicos secundários (MOBIN; CHOWDHURY; ALAM, 2019). Pesquisas recentes relatam que submeter as microalgas em situações de estresse estimulam o acúmulo em maiores quantidades de biocompostos na célula como lipídios.

2.3.3. Fatores que influenciam no crescimento das microalgas

2.3.3.1. Temperatura

A temperatura ideal para o cultivo de microalgas varia em relação a espécie. Microalgas encontradas em ambiente polares são capazes de tolerar temperaturas abaixo dos 10 °C, outras podem apresentar crescimento em temperaturas moderadas de 10 °C a 20 °C, e as oriundas de regiões tropicais possuem maior afinidade em temperaturas acima dos 30 °C (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). As temperaturas ótimas de crescimento geralmente variam entre 20 °C e 30 °C (KUMAR; SINGH, 2019).

A temperatura influencia diretamente na taxa de crescimento, na taxa de reações químicas, na composição química da célula, na atividade enzimática, na absorção de nutrientes e na solubilidade do dióxido de carbono - CO₂ (ANYANWU et al., 2018; SINGH; SINGH, 2015). As variações sazonais de temperatura, variações diárias de temperatura e variações bruscas de temperaturas em reatores são condições que afetam o crescimento das microalgas e a eficiência na produtividade (SAJJADI et al., 2018). Manter uma temperatura constante em um experimento ou nos processos operacionais auxiliam na estabilidade do cultivo e na reprodutibilidade (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

No cultivo de microalgas, temperaturas baixas contribuem para a inibição do crescimento devido à baixa atividade metabólica e o aumento da temperatura resulta no aumento das atividades metabólicas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Entretanto, temperaturas elevadas podem romper as células promovendo o decaimento da taxa de crescimento celular (SAJJADI et al., 2018).

Em experimentos em que as microalgas foram submetidas a estresse de temperatura, foi relatado o acúmulo de lipídios na célula (NAGAPPAN et al., 2019)

2.3.3.2. Luminosidade

Microalgas com metabolismo fotoautotrófico necessita de uma fonte de energia luminosa para converter o carbono inorgânico (CO₂) em compostos orgânicos (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017a). Para estes organismos a luz, intensidade,

comprimento de onda e o regime de fotoperíodo (claro/escuro) são fatores essenciais para o crescimento das microalgas, realização das atividades fotossintéticas, acúmulo de biomassa e de lipídios (ALTUNOZ et al., 2017; SINGH; SINGH, 2015).

A aplicação de uma taxa de luminosidade e o comprimento de onda depende da espécie de microalga em estudo (ALTUNOZ et al., 2017), onde os valores de luminosidade ideais podem variar entre 1.000 lux e 10.000 lux (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017a) e o fotoperíodo varia geralmente entre 10h/14h (claro/escuro) a 12h/12h (claro/escuro) (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

Até um determinado momento, o aumento da atividade fotossintética das microalgas está relacionado com o aumento da luminosidade (MENEGAZZO; FONSECA, 2019). Uma intensidade acima dos limites toleráveis pela microalga pode afetar o crescimento celular pela danificação do sistema receptor fotossintético, impossibilitando a ocorrência da fotossíntese (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017).

Estudos como o de Nagappan et al. (2019), relatam que a alta intensidade luminosa influencia no acúmulo de lipídios, compostos oxidantes e pigmentos. Os autores relatam também que em frequência de luz no azul propiciam o crescimento das microalgas e a frequência de luz verde proporciona o maior acúmulo de lipídios.

No cultivo da microalga *N. oleoabundans* em meio BBM em três diferentes intensidades de luz foi estudada por Loera-Quezada; Ángeles; Olguín (2011). Entre 50, 84 e 136 $\mu\text{mol fotóons.m}^2.\text{s}^{-1}$ foi observado que a maior densidade celular foi encontrada na maior intensidade luminosa. Em contrapartida, o tamanho celular foi maior nas menores intensidades luminosas.

2.3.3.3. pH e CO₂

As microalgas podem ser cultivadas entre os pH 4 (ácido) a pH 11 (alcalino) (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). Na maioria das espécies o cultivo acontece entre uma faixa de pH 7,0 e 9,0 (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Esse parâmetro afeta a cinética de crescimento, a atividade enzimática, a composição química das microalgas, e a disponibilidade de metais e nutrientes (ANYANWU et al., 2018; ZHAN; RONG; WANG, 2017)

A concentração de CO₂ influencia diretamente no pH no meio de cultivo. Durante o processo de fotossíntese ocorre a assimilação do CO₂ pelas microalgas e conseqüentemente o aumento do pH. Em processos de respiração celular, onde ocorre a liberação de CO₂ para o meio, ou em processos de aeração com adição de CO₂, tem-se a diminuição do pH (LI et al., 2019; SAJJADI et al., 2018).

2.3.3.4. Salinidade

Os níveis ótimos de salinidade diferenciam-se de acordo com as espécies de microalgas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017a) podendo variar entre 12 g.L⁻¹ a 40 g.L⁻¹ (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017a). Devido ao seu local de origem as microalgas de águas do mar são capazes de suportar maiores valores de salinidade quando comparados com as microalgas de água doce (ENAMALA et al., 2018a)

Valores acima do tolerado podem provocar efeitos adversos nas células, inibição da taxa de crescimento celular (ENAMALA et al., 2018a), e na composição bioquímica da microalga. Essas modificações podem provocar estresse osmótico, estresse de íons e alterações na permeabilidade da membrana de íons (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017a). Altas concentrações de salinidade pode ser fator de estresse para o aumento no acúmulo de lipídios e no aumento da produção de carotenoides (ANYANWU et al., 2018; NAGAPPAN et al., 2019).

2.3.3.5. Nutrientes

Para seu desenvolvimento as microalgas precisam de macronutrientes como carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) e de micronutrientes como magnésio (Mg), cálcio (Ca), manganês (Mn), zinco (Zn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo) (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017).

O Quadro 3 mostra os mecanismos onde são utilizados cada nutriente utilizado pelas microalgas.

QUADRO 3 - Mecanismos celular onde os nutrientes são utilizados.

Nutriente	Mecanismo
Carbono inorgânico (Dióxido de carbono - CO ₂)	Utilizado no ciclo de Calvin (Fotossíntese)
Carbono orgânico	Utilizado no processo de respiração
N ₂ (gás nitrogênio)	Fixado pelas microalgas na forma de amônia, seguido da conversão em aminoácidos.
NO ₃ ⁻ ou NO ₂ ⁻ (ions nitrato e nitrito)	Ocorre redução para amônia, seguido da conversão em aminoácidos.
NH ₄ ⁺ (ion amônia)	Conversão direta para aminoácidos.
PO ₄ ³⁻ (ion fosfato)	Utilizado no processo de fosforilação.

Fonte: adaptado de Gonçalves; Pires; Simões (2016)

A composição média da massa seca de microalga, de acordo com (YOUSUF, 2019), pode ser definida por 40-50% de Carbono, 4-8% de nitrogênio e 0,1% de fosfato.

O carbono é um elemento essencial para o desenvolvimento da microalga, onde sua concentração e o tipo de carbono fornecido ao meio devem ser otimizados para promover a produção de biomassa. As fontes de CO₂ e de carbono orgânico são fatores limitantes e tem influência direta no crescimento da cultura (ZHAN; RONG; WANG, 2017). Esse elemento é constituinte básico para a formação de carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídios (MENEGAZZO; FONSECA, 2019a).

Para crescimento e uso nos processos metabólicos as microalgas absorvem e assimilam o nitrogênio (CHEN; WANG, 2020). O nitrogênio pode ser fornecido para as microalgas na forma de amônia, nitrato ou nitrito, sendo as duas últimas formas de nitrogênio reduzidas para amônia dentro da célula (GUPTA; PAWAR; PANDEY, 2019). A presença destes compostos em concentrações limitantes pode afetar o crescimento celular e a produtividade de biomassa, pois são necessários para a síntese de ácido nucleico e proteínas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016).

Pesquisas demonstram que a deficiência de nitrogênio no meio inibe o crescimento e estimula o incremento da produção de lipídios. Na falta deste recurso, o carbono é redirecionado para a síntese de lipídeos e de carboidratos ao invés de proteínas (NAGAPPAN et al., 2019). Concentração de nitrogênio menor que 3% em relação ao Nitrogênio orgânico pela biomassa pode ser considerado deficiência de

nitrogênio (SAJJADI et al., 2018). Concentrações elevadas de amônia livre apresentam toxicidade e podem interferir no crescimento de microalgas fotossintetizantes, apresentando aumento da fotosensibilidade e aumento nos danos do fotosistema (GUTIERREZ et al., 2016).

O fósforo é um elemento necessário para o crescimento das microalgas sendo disponibilizado em forma de fosfato solúvel (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016). Esse composto deve ser adicionado em excesso, pois nem todos os compostos de fosfatos disponíveis para as microalgas estão disponíveis para a absorção (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). É utilizado nas microalgas para a formação de ácidos nucleicos, lipídios e ATP (ABINANDAN; SHANTHAKUMAR, 2015)

A relação entre a concentração de nitrogênio e a concentração de fósforo (Relação N/P) ideal para as microalgas para crescimento e remoção de nutrientes é de N:P igual a 6,8-10:1. Uma alta relação N:P pode causar limitações de crescimento pela baixa disponibilidade de fósforo. Uma baixa relação N:P pode causar limitações de crescimento pela baixa disponibilidade de nitrogênio (LI et al., 2019).

2.3.3.6. Agitação

A agitação pode ser utilizada para a homogeneização do meio, evitando a existência de zonas estagnadas. Esse parâmetro permite uma distribuição igual de luz e nutrientes entre as células, evita a sedimentação ou a autofloculação das microalgas, previne a estratificação térmica e melhora a transferência de gases entre o ar e a cultura (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017b; MENEGAZZO; FONSECA, 2019b; SANCHEZ RIZZA et al., 2019).

2.3.3.7. Compostos tóxicos

Os metais pesados (arsênio-As, chumbo-Pb, cádmio-Cd, mercúrio-Hg, alumínio-Al) são compostos tóxicos que podem afetar o crescimento das microalgas. Alguns gases (Dióxido de carbono- CO₂, óxidos de nitrogênios- NO_x, óxidos de enxofre - SO_x, gás oxigênio- O₂ e gás amônia - NH₃) em concentrações elevadas também pode afetar o

crescimento destes microrganismos. Dentre estes, o principal inibidor dos processos metabólicos das microalgas é o oxigênio dissolvido em excesso, pois pode causar danos foto-oxidativos nas células da microalga, reduzindo assim a eficiência do tratamento (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). Compostos fenólicos e aldeídos apresentam toxicidade que afetam o desenvolvimento das microalgas (LI et al., 2019).

2.3.4. Nutrição e características dos processos metabólicos

Para a produção de biomassa, o crescimento de microalgas pode ocorrer em regimes metabólicos distintos, sendo sistema fotoautotrófico, heterotrófico ou mixotrófico (ALTUNOZ et al., 2017; KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018). Nesses processos, o crescimento celular e a síntese dos nutrientes dependem dos nutrientes presentes no meio e dos fatores ambientais (ANYANWU et al., 2018)

No cultivo fotoautotrófico, as microalgas realizam o processo de fotossíntese, onde utilizam luz solar ou artificial como fonte de energia e compostos inorgânicos (CO_2) como fonte de carbono (ANDRADE; TELLES; LEITE CASTRO, 2020; FERREIRA et al., 2019). De acordo com Abinandan e Shanthakumar (2015), essa técnica de cultivo é considerada simples e antiga, apresentando baixa produtividade quando comparada com as demais. Porém, o desenvolvendo destes microrganismos em situações de estresse podem aumentar sua produtividade.

As microalgas heterotróficas são capazes de utilizar compostos orgânicos dissolvidos no meio como fonte de energia e de carbono, sem a necessidade de fonte luminosa (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018; GUPTA; PAWAR; PANDEY, 2019). Nesse modelo de cultivo, tem-se maiores taxas de produtividade de biomassa e de densidade celular e maior eficiência de remoção de carbono quando comparadas com sistemas fotoautotrófico (LI et al., 2019)

No metabolismo mixotrófico, a microalga é capaz de incorporar as características dos cultivos autotróficos e heterotróficos, realizando a absorção de carbono em compostos orgânicos ou inorgânicos e se desenvolvendo na presença de luz ou em condições escuras de cultivo (KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018). Esse sistema funciona em dois estágios, sendo o primeiro heterotrófico, onde é utilizado compostos

orgânicos como fonte de carbono, e quando ocorrer o déficit desses compostos, inicia-se o segundo estágio, fotoautotrófico, para assimilação do CO₂ (ZHAN; RONG; WANG, 2017). Nesse sistema, a produtividade de biomassa densidade celular e remoção de nutrientes são elevadas (ANYANWU et al., 2018; LI et al., 2019).

O Quadro 4 apresenta de forma resumida as principais características dos possíveis metabolismos.

QUADRO 4 - Formas metabólicas das microalgas em relação à fonte de energia e de carbono.

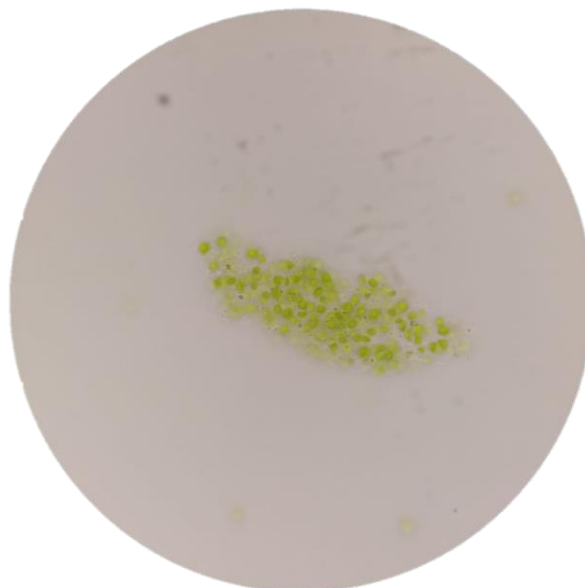
Metabolismo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânica
Heterotrófico	Compostos orgânicos	Orgânica
Mixotrófico	Luz e compostos orgânicos	Inorgânica e Orgânica

Fonte: Andrade; Filho (2014)

2.3.5. *Neochloris oleoabundans*

A microalga *Neochloris oleoabundans* é uma espécie de microalga verde unicelular oleaginosa pertencente a Classe *Chlorophyceae*. Essa espécie edáfica foi isolada em dunas de sal da Arábia Saudita e recentemente está sendo utilizada em pesquisas por apresentar altas taxas de crescimento e significativa composição de sua biomassa, gerando interesse em processos industriais (RASHIDI et al., 2019). Ela pode ser encontrada em águas naturais, salobra e salgada (BALDISSEROTTO et al., 2012). A Figura 12 representa a microalga *N. oleoabundans* vista em microscópio óptico.

FIGURA 12 - Microalga *Neochloris oleoabundans* por microscópico óptico (100x).

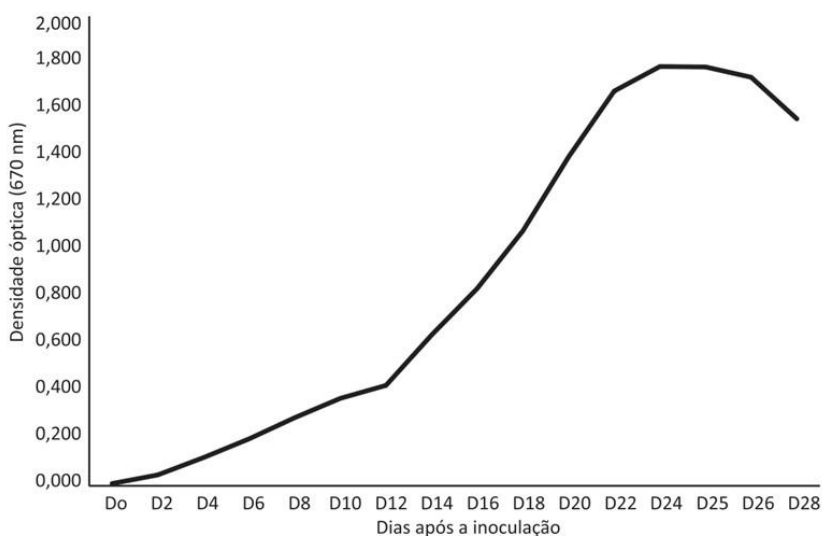


Fonte: Autoria própria (2021)

A composição bioquímica desta microalga dependerá das condições de cultivo. A parede celular da *N. oleoabundans* apresenta plasticidade e rigidez, que possibilita seu desenvolvimento sob condições de estresse por fatores bióticos e abióticos. A *N. oleoabundans* é conhecida pelo elevado acúmulo de lipídio sob condições de concentrações de nitrogênio limitadas, intensa luminosidade e altas temperaturas (OLGUÍN et al., 2015). Para a produção de biodiesel, a espécie de microalga é a melhor fonte de lipídios para a geração do biocombustível (SINGH; SINGH, 2015), podendo apresentar em sua biomassa uma porcentagem de lipídio de até 65,0% (KADIR et al., 2018).

A Figura 13 elaborada por Andrade e Filho (2014), representa uma curva de crescimento exponencial da microalga *N. oleoabundans* cultivada em sistema fechado a 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h, durante 28 dias, com agitação.

FIGURA 13 - Curva de crescimento exponencial da microalga *N. oleoabundans* cultivada em sistema fechado a 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12h, durante 28 dias, com agitação.



Fonte: Andrade; Filho (2014)

Em sistemas fechados as microalgas seguem a curva de crescimento. Na Figura 13, podemos perceber a fase lag, de adaptação da microalga *N. oleoabundans* do dia zero (D0) ao dia 2 (D2). A fase log, com crescimento de ordem logarítmica, ocorre do dia 2 (D2) ao dia 24 (D24) com algumas alterações nas taxas de crescimento. Durante os dias 24 (D24) e 25 (D25) foi obtido a fase estacionária, seguido da queda de crescimento a partir do dia 25 (D25).

Dependendo das condições que é submetida, a microalga *N. oleoabundans* pode apresentar metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

Em condições na ausência de luz e fornecimento de fontes de carbono como glucose e celobiose (cultivo heterotrófico), Morales-Sánchez et al. (2014) realizou o cultivo heterotrófico da *N. oleoabundans*. Com uma relação C:N de 17:1, foi encontrado uma biomassa máxima de $1,72 \text{ g.L}^{-1}$ com 44% (w/w) de proteína. Ao elevar a relação C:N para 278:1 com limitação de nitrogênio no meio, a biomassa máxima obtida foi de $9,2 \text{ g.L}^{-1}$ e um acúmulo de lipídio de 52% (w/w).

Em condições na presença de luz e fornecimento de fontes de carbono como glucose e acetato de sódio (cultivo mixotrófico), a microalga *Neochloris oleoabundans* apresentou grandes produtividades de biomassa, proteínas e lipídios. Esses foram os

resultados encontrados por Silva et al. (2016). Ao adicionar em meio BBM, 7,5 g.L⁻¹ de glucose e acetato de sódio, a microalga produziu 1,75 g.L⁻¹ com 34,4% (w/w) de lipídio.

De acordo com Wang; Lan (2011), o crescimento da *Neochloris oleoabundans* apresenta um comportamento similar de produção de biomassa entre as temperaturas de 25 a 30°, sendo esse a fase ótima para seu cultivo. A partir de 32°C foi observado uma significativa inibição do crescimento celular. Na literatura, o cultivo da *N. oleoabundans* varia de 20 °C a 35 °C.

Na literatura, a intensidade luminosa varia de 50 a 200 μmolfotóns.m².s⁻¹. A fluxo luminoso de 1120 a 3500 lux e fotoperíodo de 12/12, 18/6, 16/8, 14/10. 3

Quanto a salinidade, a *N. oleoabundans* é uma microalga halotolerante, podendo crescer em água salobra (21 g.L⁻¹ NaCl) ou salina (35 g.L⁻¹ NaCl) (BALDISSEROTTO et al., 2012).

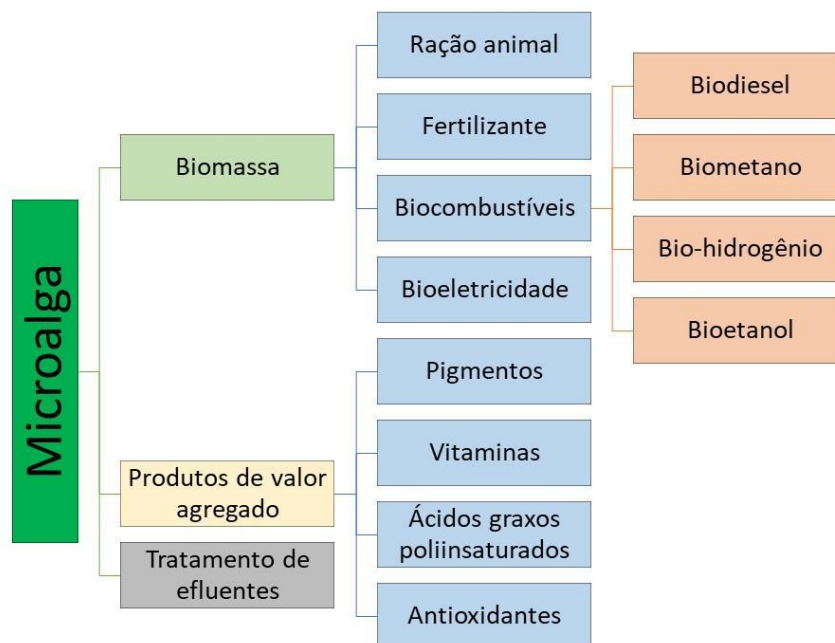
Referente a compostos tóxicos a concentração de amônia também apresenta toxicidade para o cultivo da *N. oleoabundans*. Gutierrez et al. (2016), demonstrou que em valores próximos de 8 mg.L⁻¹ de NH₃/NH₄⁺ inibiu em 50% o crescimento da microalga.

2.3.6. Principais produtos da biomassa microalgal

As microalgas são constituídas basicamente por proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. A proporção de cada componente varia significativamente da espécie de microalga e das condições de cultivo que são submetidas (LI et al., 2019) Em média a composição de microalgas são: 50% proteínas, 23% lipídios e 23% carboidratos (ABINANDAN; SHANTHAKUMAR, 2015). Devido a essas características a biomassa de microalga apresenta a possibilidade de ser convertida em produtos de valor agregado.

A Figura 14 ilustra as possíveis aplicações do cultivo de microalgas em escala industrial.

FIGURA 14 - Ilustração esquemática das aplicações industriais das microalgas



Fonte: adaptado de Enamala *et al.* (2018)

Os principais produtos que podem ser obtidos das microalgas são os biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biometano, bio-hidrogênio) e bioenergia, cosméticos, produtos farmacêuticos (vitaminas e medicamentos anticâncer) e suplementos nutricionais para alimentação humana e animal (ABINANDAN; SHANTHAKUMAR, 2015; ALTUNOZ *et al.*, 2017; MENDONÇA *et al.*, 2018)

Para a nutrição humana a biomassa de microalga pode ser utilizada como suplemento de vitaminas e de ácidos graxos poli-insaturados, comercializados na forma de granulado e pó, em comprimidos ou em cápsulas. Para a nutrição animal, a adição desta biomassa a ração promove benefícios no aumento a resistência antiviral e bacteriana, controle do peso, promoção do crescimento e desempenho reprodutivo (COSTA *et al.*, 2019).

Nas microalgas podem ser encontrados três tipos diferentes de pigmentos, sendo a ficobilina, clorofila e carotenoide. Seu uso em escala industrial é devido as propriedades antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, antiobesidade, antiangiogênico e neuroprotetor (D'ALESSANDRO; ANTONIOSI FILHO, 2016).

Em cosméticos, as microalgas podem ser fonte de proteínas e colágeno que auxiliam no efeito antienvhecimento. Esses compostos previnem o envelhecimento precoce da pele, evita a formação de estrias, estimula a síntese de colágeno e reduz a formação de rugas (ENAMALA et al., 2018).

Os combustíveis que podem ser produzidos a partir de das microalgas são o biodiesel (lipídeos), bioetanol (fermentação de biomassa) e o biogás (biometano e bio-hidrogênio) (COSTA et al., 2019).

Atualmente, a combinação do tratamento de efluentes com o cultivo de microalgas é considerada uma alternativa promissora (RASTOGI et al., 2018) para obtenção de produtos utilizando a biomassa e realizar o tratamento de efluentes pela remoção de nutrientes (MENDONÇA et al., 2018).

2.4. APLICAÇÃO DE MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES

As águas residuárias podem ser divididas em três principais fontes: municipal (esgoto sanitário), agrícola (suinocultura, laticínios) e industriais (curtume, usinas de etanol) (ANDRADE; TELLES; LEITE CASTRO, 2020). Cada efluente possui característica diferente devido as diferenças de matéria-prima utilizada e do processo produtivo, porém todos apresentam uma variedade de nutrientes que podem promover o crescimento das microalgas.

As técnicas convencionais de tratamento de efluentes utilizam processos químicos e biológicos para redução da carga poluidora dos efluentes. Os processos químicos exigem altas quantidades de produtos químicos e geram grandes quantidades de lodo pela reação química e precipitados. Os processos biológicos exigem grande demanda de oxigênio por aeração e alta demanda de energia. Além disso, esses processos são incapazes de retirar os nutrientes como nitrogênio e fósforo do efluente, necessitando de outras técnicas para redução destes parâmetros (ALMOMANI; ÖRMECI, 2016)

No cultivo de microalgas a maior desvantagem para a produção em larga escala é o alto custo de suplementos necessários para a produção de biomassa (GUPTA; PAWAR; PANDEY, 2019) A suplementação com todos os nutrientes necessários não

possui custo-benefício atrativo para os investidores e dificulta sua comercialização (ABINANDAN; SHANTHAKUMAR, 2015).

Atualmente, a combinação do tratamento de efluentes com o cultivo de microalgas é considerada uma alternativa promissora (RASTOGI et al., 2018) para obtenção de produtos utilizando a biomassa microalgal e realizar o tratamento de efluentes pela remoção de nutrientes (DE MENDONÇA et al., 2018). Nessa combinação ocorre a produção de biomassa utilizando o efluente de baixo custo como fonte de nutrientes e conseqüentemente a diminuição da carga poluidora do efluente.

Para esse tipo de cultivo é necessário se atentar em relação a variação da composição do efluente, proporção de nutrientes, a baixa transmitância devido a turbidez do efluente e a presença de contaminantes bióticos e abióticos (RASTOGI et al., 2018).

As microalgas são capazes de crescer em águas residuárias devido a disponibilidade de nutrientes e a capacidade de assimilação durante o funcionamento de seu metabolismo (KADIR et al., 2018). Durante o cultivo pode ocorrer a remoção de compostos orgânicos, CO₂, nitrogênio, fósforo e destruição de poluentes orgânicos (SOLOVCHENKO et al., 2016) Esse processo reduz o custo do tratamento de águas residuárias, as emissões de gases de efeito estufa e o impacto ambiental pelo despejo deste efluente no meio ambiente (ALBERTO et al., 2019).

Assim, existem vantagens no cultivo de microalgas em efluentes. As microalgas apresentam rápido crescimento (DE MENDONÇA et al., 2018) e taxas de crescimento maiores do que as plantas (ZHAN; RONG; WANG, 2017). Esses microrganismos podem se desenvolver em águas salinas, salobras e não potáveis, diminuindo a pressão por captação de água para irrigação (COLLING KLEIN; BONOMI; MACIEL FILHO, 2018b) e não competem com culturas terrestres (SAJJADI et al., 2018).

Entretanto, para ser vantajoso economicamente este processo, deve-se ter um desenvolvimento de linhagens de microalgas, determinar métodos eficientes de cultivo, melhorias de colheita e das extrações dos compostos e a otimização dos processos de conversão dos compostos em produtos comercializáveis (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017a).

Vários tipos de efluentes foram estudados para a produção de microalga como: efluente de laticínios, efluente de suinocultura, efluente sucroalcooleiro, efluente doméstico.

Na Tabela 2 são apresentados os artigos encontrados na literatura que associam o cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* em efluentes.

TABELA 2 - Pesquisas apresentadas na literatura no cultivo da microalga *N. oleoabundans* em efluente. T: Temperatura; L: Luminosidade; I: intensidade Luminosa; F: Fotoperíodo; TC: Tempo de cultivo; A; Aeração; R: Agitação; N: Nitrogênio; PO₄³⁻: Fosfato; NH₄⁺: Íon amônio

Efluente	Parâmetros de estudo	Melhores resultados	Biomassa	Conteúdo Lipídico	μ (d ⁻¹)	Remoção nutrientes (%)	Referência
Esgoto doméstico	T: 20 °C L: 1120 lux I: 0,98 μ W/cm ² TC: 28 dias	Efluente secundário	1,44 g.L ⁻¹	-	-	DQO: 42,4 NH ₄ ⁺ : 67,5	(ALMOMANI; ÖRMECI, 2016)
Esgoto doméstico	T: 20 °C I: 143 μ molfótons.m ² .s ⁻¹ F: 14h/10h A: 1,5 L.min ⁻¹ CO ₂ : 4% TC: 25 dias	Efluente secundário	-	-	-	-	(ÁLVAREZ-DÍAZ et al., 2017)
Soro de queijo e esterco de gado digerido	T: 25 °C I: 200 μ molfótons.m ² .s ⁻¹ CO ₂ : 3% R: 150 rpm TC: 14 dias	1:15	0,24 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹		0,37	NH ₄ ⁺ : 99,9 PO ₄ ³⁻ : 97,3	(FRANCHINO et al., 2013)
Esterco de leite	T: 23 – 25 °C I: 200 μ molfótons.m ² .s ⁻¹ F: 14h/10h A: 0,4 L.min ⁻¹ CO ₂ : 2-3% TC: 16 dias	1:50	88,3 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹	2,57 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹	-	-	(LEVINE; COSTANZA-ROBINSON; SPATAFORA, 2011)
Vinhaça digerida	T: 35 °C I: 66 μ molfótons.m ² .s ⁻¹ F: 16h/8h TC: 21 dias	6%+NaHCO ₃	1,545 g.L ⁻¹	17,7%	-	NH ₄ ⁺ : 85,2	(OLGUÍN et al., 2015)
Suínocultura digerida	T: 35 °C I: 134 μ molfótons.m ² .s ⁻¹ F: 16h/8h A: 0,375 vvm	7,4 % Filtrada	0,63 g.L ⁻¹	22,4 %	0,25	NH ₄ ⁺ : 97,8 PO ₄ ³⁻ : 98,97	(OLGUÍN et al., 2015)

(continuação) TABELA 2 - Pesquisas apresentadas na literatura no cultivo da microalga *N. oleoabundans* em efluente. T: Temperatura; L: Luminosidade; I: intensidade Luminosa; F: Fotoperíodo; TC: Tempo de cultivo; A; Aeração; R: Agitação; N: Nitrogênio; PO₄³⁻: Fosfato; NH₄⁺: Íon amônio

Efluente	Parâmetros de estudo	Melhores resultados	Biomassa	Conteúdo Lipídico	μ (d ⁻¹)	Remoção nutrientes (%)	Referência
Esgoto doméstico	T: 25 °C I: 3500 lux F: 12h/12h pH: 7,2 CO ₂ : 5% TC: 14 dias	-	-	-	-	-	(SYDNEY et al., 2011)
Vinhaça	T: 28 °C I: 50 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^2.s^{-1}$ F: 18h/6h R: 100 rpm	30%	1,6 g.L ⁻¹	-	-	-	(SYDNEY et al., 2019)
Esgoto doméstico	T: 25 a 32 °C TC: 6 dias	+70 mg. L ⁻¹ (N-NO ₃ ⁻)	2,1	-	-	No ₃ ⁻ : 100 PO ₄ ³⁻ : 100	(WANG; LAN, 2011)

No trabalho desenvolvido por Almomani et al. (2016) foi realizado o estudo da performance das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Neochloris oleoabundans* em efluentes domésticos nas etapas primários, secundários e centrado. No efluente primário, a microalga *C. vulgaris* apresentou um rápido crescimento e maior biomassa $2,71 \text{ g.L}^{-1}$. No efluente secundário a microalga *N. oleoabundans* apresentou sua maior biomassa, $1,44 \text{ g.L}^{-1}$. Observou-se que no cultivo da *N. oleoabundans*, em todos os experimentos foi observado uma fase lag de 10 dias, sendo necessário um longo período de adaptação no meio para seu desenvolvimento.

Alvarez-Diaz et al. (2017) no estudo de sete microalgas para crescimento em efluente secundário de uma estação de tratamento de esgoto não obteve crescimento da microalga *N. oleoabundans*. Os autores justificam a inibição da microalga no efluente por ações de organismos patogênicos, como bactérias que produzem metabolitos extracelulares com potencial algicida.

Na composição de 35% esterco de gado e 65% soro de queijo, os compostos foram digeridos e utilizados como meio de cultivo para a microalga *N. oleoabundans*. Realizado por Franchino et al. (2013), os melhores resultados para a microalga foram na diluição de 1:15, apresentando taxas de remoção de amônia em quase 100% e de fosfato de 97%. Em comparação com a microalga *Chlorella vulgaris*, também abordada no trabalho, as taxas de crescimento foram inferiores enquanto a remoção de nutrientes foi superior.

Para Levine et. al (2011), o cultivo da microalga *N. oleoabundans* em meio preparado com esterco de leite digerido e diluído 1:50 apresentou a maior produtividade de biomassa, $88,3 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, quando comparado com concentrações menores. Nos primeiros quatro dias, a taxa de remoção de amônia foi de aproximadamente $7,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Ao aumentar a diluição do efluente, diminuiu-se a produtividade de biomassa, porém aumentou-se a produtividade de lipídio.

Na pesquisa desenvolvida por Olguin et al. (2015a), o uso de vinhaça digerida na concentração de 6% com adição de 1 g.L^{-1} de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) como meio de cultivo para a microalga *N. oleoabundans* apresentou a melhor produção de biomassa ($1,545 \text{ g.L}^{-1}$). Nos meios com apenas 6% e 8% de vinhaça digerida, a microalga não apresentou crescimento.

No cultivo de *N. oleoabundans* em efluente de suinocultura diluído 7,4% e filtrado com material cerâmico realizado por Olguin et al. (2015b), foi verificado uma biomassa de 0,63 g.L⁻¹ associado com uma remoção de amônia e fosfato de 98%. A partir disso, a biomassa apresentou produção lipídica de 22% com características de FAME (Fatty Acid Methyl Esters) adequados para a produção de biodiesel.

Sydney et al. (2011) realizou o experimento com 20 cepas de microalgas, dentre elas a *N. oleoabundans*. No experimento utilizando esgoto doméstico bruto, a microalga não foi capaz de se desenvolver.

No cultivo de *N. oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar, Sydney et al. (2019) conseguiu crescimento da microalga até 30% do efluente diluído em água. Nessas condições, a concentração de biomassa atingida foi de 1,6 g.L⁻¹. Em concentrações superiores o crescimento foi inibido e as causas podem ser as altas concentrações de potássio ou de turbidez.

Na Tabela 3 são apresentados os artigos encontrados na literatura que associam o cultivo de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar.

TABELA 3 - Pesquisas na literatura com cultivo de microalgas em vinhaça. T: temperatura; FP:fotoperíodo; L: Luminosidade; A:Aeração;

Microalga	Parâmetro de estudo	Vinhaça	Melhores resultados	Biomassa	μ (d ⁻¹)	Referência
<i>Chlamydomonas sp.</i>	T: 25 °C FP: 12h/12h L:150 $\mu\text{mol. fotóns.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ A; aerado	Bruta	-	72 mg.L ⁻¹	0,74	(CALIXTO et al., 2016)
<i>Chlorella vulgaris</i>	T: 24 °C L:150 $\mu\text{mol. fotóns.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$	Bruta filtrada	Diluída 60%	-	1,1	(CANDIDO; LOMBARDI, 2017)
		Digerida Filtrada	Diluída 80%	-	1,2	
<i>Micractinium sp.</i>	T: 25 °C FP: 12h/12h L:54 $\mu\text{mol. fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ A: 0,5 L.min ⁻¹	Bruta	Diluída 5%	1,21 g.L ⁻¹	1,01	(ENGIN et al., 2018)
	T: 25 °C A: 0,5 L.min ⁻¹	Bruta	Diluída 10%	0,93 g.L ⁻¹	0,97	
<i>Scenedesmus sp.</i>	T: 25 °C A; 1 VVM pH: 7,0	Bruta	-	101,1 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	0,15*	(MATTOS; BASTOS, 2016)
<i>Chlorella vulgares</i>	T: 27 °C FP: 12h/12h L:72 $\mu\text{mol. fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ A: Constante pH: 6,8	Bruta	Diluída 2% em BBM	0,77 g.L ⁻¹	0,34	(MELO et al., 2018)
<i>Arthrospira máxima</i>	T: 30 °C FP: 12h/12h L:31 $\mu\text{mol. fotóns.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ L: 2500 lux A: 0,5 VVM	Bruta	Diluída 30%	3,015 g.L ⁻¹	-	(MONTALVO et al., 2019)
<i>Scenedesmus sp.</i>	T: 20 a 35 °C FP: 12h/12h L: 2400 a 10000 lux R: 125 rpm	-	-	-	-	(RAMIREZ; FARENZENA; TRIERWEILER, 2014)

(continuação) TABELA 3 - Pesquisas na literatura com cultivo de microalgas em vinhaça. T: temperatura; FP:fotoperíodo; L: Luminosidade; A:Aeração; R:rotação

Microalga	Parâmetro de estudo	Vinhaça	Melhores resultados	Biomassa	μ (d ⁻¹)	Referência
Micractinium sp.	T: 26 °C FP: 16h/8h	Bruta	Diluída 50%	177,78 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹	-	(SANTANA et al., 2017)
<i>C. biconvexa</i>	L:100 μ mol. fotóns.m ⁻² .s ⁻¹ L: 2500 lux A: 5 L.h ⁻¹	Clarificada	100%	222,22 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹	-	
<i>Spirulina</i> sp.	T: 32 °C FP: 16h/8h L: 10000 lux A: 2 x 3 L.h ⁻¹	Digerida	10%	0,115 g.L ⁻¹ .dia ⁻¹ (massa seca)	-	(KRISHNAMOORTHY; MANICKAM; MUTHUKARUPPAN, 2019)
<i>Spirulina máxima</i>	T: 30 °C FP: 12h/12h L: 70 μ mol. fotóns.m ⁻² .s ⁻¹ A: 800 cm ³ .min ⁻¹	Bruta	1%	0,716 g.L ⁻¹	0,14 d ⁻¹	(SANTOS et al., 2016)
	T: 30 °C A: 800 cm ³ .min ⁻¹	Bruta	1%	-	1,02 d ⁻¹	
<i>Chlorella vulgaris</i>	T: 30 °C FP: 16h/8h L:47 mmol. fotóns.m ⁻² .s ⁻¹ A; Aeração	Digerida	100%	139 mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹	-	(SEREJO et al., 2021)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	T: 15 a 40 °C A: 1 VVM	Bruta	-	-	-	(SILVA et al., 2017)

Os autores Calixto *et al.* (2016) objetivaram a avaliação do crescimento de quatro espécies de microalgas (*Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Lagerheimia longiseta*, e *Pediastrum tetras*) em cinco tipos de meios alternativos, sendo um efluente doméstico municipal e quatro agroindustriais (biocomposto de resíduos de frutas e vegetais, vinhaça, biocomposto com excremento de frango e exerceo de galinha). Em vinhaça de cana-de-açúcar somente a microalga *Chlamydomonas sp.* apresentou crescimento significativo no efluente. Os parâmetros apresentados foram: taxa de crescimento específica de $0,74 \text{ d}^{-1}$, densidade celular de $3,89 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ e Concentração de Biomassa máxima de 72 mg.L^{-1} . Comparado com o meio WC (controle) os parâmetros de crescimento foram menores, sendo respectivamente, $0,95 \text{ d}^{-1}$, $4,28 \times 10^6$ e 371 mg.L^{-1} .

No trabalho desenvolvido por Candido e Lombardi (2017) foi verificado que a microalga *Chlorella vulgaris* apresentou taxas específicas de crescimento nos meios com 80% de vinhaça digerida filtrada ($1,1 \text{ d}^{-1}$) e 60% com vinhaça bruta filtrada ($1,2 \text{ d}^{-1}$) em comparação com o meio controle BG11 ($1,1 \text{ d}^{-1}$).

No estudo realizado por Engin *et al.* (2018) foi estudado a vinhaça como fonte de nutrientes para o cultivo heterotrófico e mixotrófico da microalga *Micractinium sp.* O estudo demonstrou que a microalga foi capaz de se desenvolver no efluente diluído até a concentração de 10%, com melhores resultados de produção de biomassa para o sistema mixotrófico. O estudo do volume do meio de cultivo demonstrou que maiores volumes proporcionam maiores produções de biomassa diária. Para frascos de 500 mL obteve-se $0,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, para os de 2L teve-se $0,27 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e para 5L foram $0,32 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

O trabalho desenvolvido por Mattos e Bastos (2015) estudou o crescimento da microalga *Desmodesmus sp.* em vinhaça de cana-de-açúcar em condições heterotróficas de cultivo. Durante o período de 30h foi obtido uma produtividade de biomassa de $101,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e uma taxa de crescimento específica $0,022 \text{ h}^{-1}$. Durante o período a taxa de remoção de DQO e N foram de 36,2 e 52,1%, respectivamente. Parte da remoção dos nutrientes foi devido a presença de bactérias contaminantes do meio de cultivo causando competição e o estresse das microalgas.

Melo *et al.* (2018) avaliou o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* sobre condições mixotróficas em três resíduos agroindustriais (soro de queijo,

licor de maceração de milho e vinhaça). Para a vinhaça foi avaliado o meio BBM suplementado com 0,5, 1, 2, 4 e 6% de vinhaça. A concentração de 2% apresentou os maiores biomassa (0,77 g.L⁻¹) e maior produtividade de biomassa (0,09 g.L⁻¹.dia⁻¹). No cultivo a microalga foi capaz de remover todo o nitrogênio presente no meio e 49,93% da DQO.

No cultivo da microalga *Arthrospira máxima* OF15 em vinhaça diluída nas concentrações de 10, 30 e 50%, Montalvo et. al (2019) mostraram que os melhores resultados na produção de biomassa foram encontrados na concentração de 30% de vinhaça, com 3,015 g.L⁻¹ de biomassa produzida. O valor encontrado foi próximo do meio controle (Meio Zarrouk). Valores acima desta concentração apresentaram inibição no crescimento da microalga.

Ramirez et al. (2014) realizou um design experimental para determinar a influência dos fatores temperatura, intensidade luminosa e concentração da vinhaça no crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. No estudo todos os fatores foram estatisticamente significativos na influência da produção de biomassa, sendo a temperatura e luminosidade fatores positivos e a concentração de vinhaça um fator negativo.

Os autores Santana et al. (2017) estudaram o crescimento de 40 espécies de microalgas em vinhaça de cana-de-açúcar. No trabalho apenas duas microalgas apresentaram crescimento em vinhaça bruta, apresentando crescimento similar ao meio controle BBM quando na presença de luz. A maior taxa de produtividade de biomassa para a microalga *Micractinium* sp. foi em 50% de vinhaça diluída em água com 177,78 mg.L⁻¹.dia⁻¹. A maior taxa de produtividade da microalga *C. biconvexa* foi em 100% vinhaça clarificada com 222,22 mg.L⁻¹.dia⁻¹.

No trabalho realizado por Serejo et al. (2021), a microalga *Chlorella vulgaris* foi capaz de crescer na vinhaça anaerobicamente digerida sem diluição. A produtividade da vinhaça digerida filtrada e não filtrada foram muito próximas com valores de 77 e 76 mg.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente, demonstrando que a retirada de SS para diminuição da turbidez não se faz necessário. Além disso, a aeração da vinhaça digerida não filtrada foi capaz de aumentar a produtividade para 139 mg.L⁻¹.dia⁻¹.

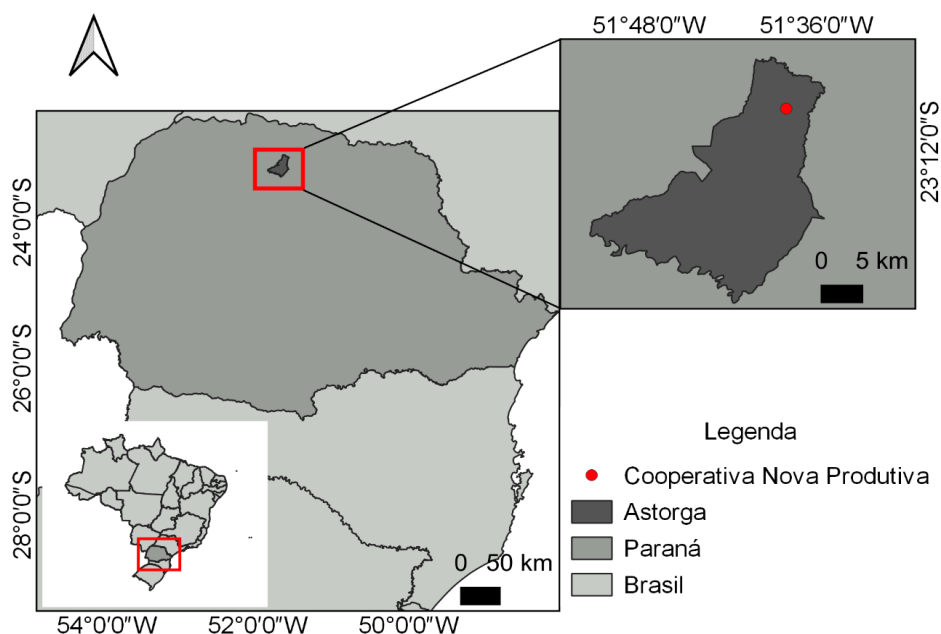
Para Silva et al. (2016), o estudo da influência de temperatura (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C) no cultivo heterotrófico da microalga *Desmodesmus subspicatus* mostrou que a concentração celular máxima foi obtida entre as temperaturas de 30 e 35 °C, e a taxa de crescimento específica entre 25 e 35 °C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA E PREPARAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

A vinhaça foi disponibilizada pela Cooperativa Agroindustrial Nova Produtiva localizada em Astorga/PR. A usina produz etanol a partir da cana-de-açúcar. A Figura 15 apresenta a localização da Usina.

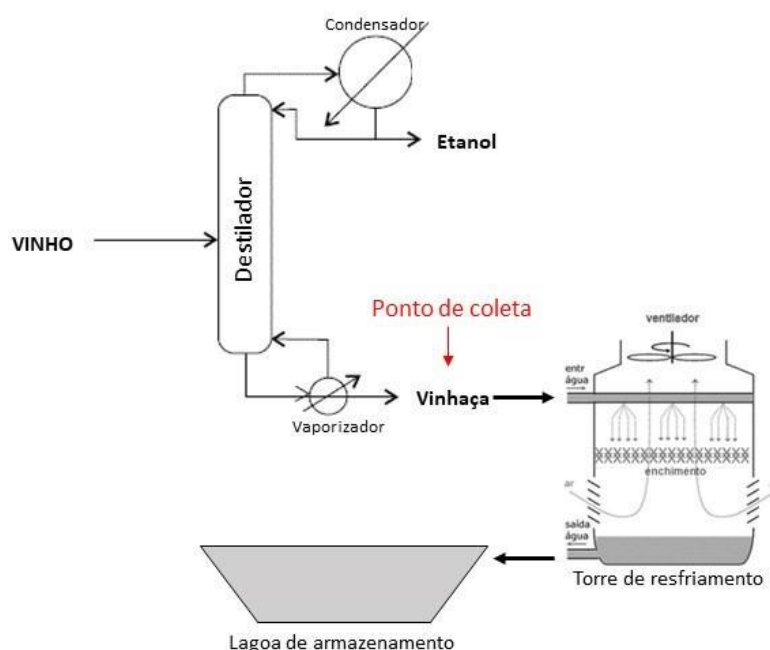
FIGURA 15 - Localização da Cooperativa Agroindustrial Nova Produtiva



Fonte: Autoria própria (2020)

Foram realizadas duas coletas de vinhaça: out/2019 e maio/2021. Elas foram coletadas diretamente na saída da torre de destilação conforme demonstrado no fluxograma apresentado na Figura 16, com uma temperatura de aproximadamente 80 °C, e alocadas em bombonas de polipropileno de 20 L previamente limpas com ácido clorídrico (HCl 10%) e água destilada (CANDIDO; LOMBARDI, 2017).

FIGURA 16 - Esquemática do Ponto de coleta da vinhaça.



Fonte: Autoria própria (2020)

Em laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, após esfriamento natural, o efluente foi transferido para recipientes limpos de 2 L. Retirado parte para análises descritas na seção 3.2, o restante foi mantido em congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservação das amostras até o uso (SYDNEY et al., 2019).

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Após a coleta da vinhaça, realizou-se a caracterização dos aspectos físicos e dos compostos químicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar. As análises foram realizadas no Laboratório de Saneamento da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina.

As análises foram realizadas em triplicata, com as metodologias de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* e o Manual de procedimentos e técnicas laboratoriais voltados para análises de águas e esgotos sanitários e indústria, cujas unidades de amostragem e o número do procedimento estão demonstrados no Quadro 5 (APHA, 1990; GARCEZ, 2004).

QUADRO 5 - Parâmetros para análise da composição físico-química da vinhaça

Parâmetro	Unidade	Procedimento
Cor aparente	Abs	2120 C ^[1]
Turbidez	uT	2030 B ^[1]
Condutividade elétrica (CE)	mS.cm ⁻¹	Leitura direta
pH	-	4500-H+ B ^[1]
Acidez	mg.L ⁻¹	-
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	mgO ₂ .L ⁻¹	5210 ^[1]
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mgO ₂ .L ⁻¹	5520 ^[1]
Série de sólidos	mg.L ⁻¹	^[2]
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	mgN-NTK.L ⁻¹	4500-N B ^[1]
Nitrogênio Amoniacal (N _{amon})	mgN-NH ₃ .L ⁻¹	4500 – NH ₃ D ^[1]
Nitrato (NO ₃ ⁻)	mgN-NO ₃ ⁻ .L ⁻¹	4500 – NO ₃ ⁻ B ^[1]
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	mgPO ₄ ³⁻ .L ⁻¹	4500-P H ^[1]

Nota: ^[1] APHA (1990); ^[2] Garcez (2004)

3.3. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MEIO BBM

Como meio de cultivo, meio controle e diluente foi utilizado o Meio BBM (*Bold's Basal Medium*) preparado de acordo com o Quadro 6. O meio foi autoclavado por 30 min a 121 °C e com pH ajustado em 6,8 com ácido clorídrico (HCl 1N) ou hidróxido de potássio (KOH 1N).

QUADRO 6 - Composição química do meio BBM

Nome	Fórmula molecular	Quantidade
Fosfato dipotássico	K ₂ HPO ₄	75 mg.L ⁻¹
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	75 mg.L ⁻¹
Nitrato de sódio	NaNO ₃	250 mg.L ⁻¹
Fosfato monopotássico	KH ₂ PO ₄	175 mg.L ⁻¹
Cloreto de sódio	NaCl	25 mg.L ⁻¹
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	11,42 mg.L ⁻¹
Solução de metais traços		1 mL.L ⁻¹
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 g.L ⁻¹
Cloreto de manganês	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 g.L ⁻¹
Trióxido de molibidênio	MoO ₃	0,71 g.L ⁻¹
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g.L ⁻¹
Nitrato de cobalto	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 g.L ⁻¹
Solução estoque alcalina de EDTA		1 mL.L ⁻¹
Ededato Dissódico	Na ₂ EDTA	50 g.L ⁻¹
Hidróxido de potássio	KOH	31 g.L ⁻¹
Solução mãe de ferro acidificado		1 mL.L ⁻¹
Sulfato de ferro	FeSO ₄	4,98 g.L ⁻¹
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	1 mL.L ⁻¹

Fonte: Engin *et al.* (2018); Olguín *et al.* (2015).

Para o meio foram realizadas as análises descritas no Quadro 5.

3.4. CEPA DE MICROALGA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A cultura axênica da microalga da espécie *Neochloris oleoabundans* (UTEX #1185 - Coleção de Cultura da Universidade do Texas) foi obtida pelo Laboratório de Microalgas do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná - IDR na concentração de $2,85 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Uma alíquota de 10 mL da microalga foi transferida para frascos Erlenmeyers de 250 mL com tampa de gase (boneca) contendo 200 mL de meio de cultivo BBM (*Bold's Basal Medium*) autoclavado por 30 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e com pH ajustado em 6,8 com ácido clorídrico (HCl 1N) ou hidróxido de potássio (KOH 1N). Esse processo foi repetido periodicamente para manter as microalgas em atividade.

Os experimentos aconteceram em reator orbital shaker com agitação constante de 150 rpm e temperatura controlada de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi acoplado ao equipamento um caixote de MDP equipado com 4 lâmpadas frias de LED branca. A intensidade luminosa foi medida por um luxímetro digital (Instrutherm – Modelo LD-300) resultando em 2000 lux ($2000 \text{ lumens.m}^{-2}$) com fotoperíodo claro/escuro de 12h/12h. Um esquema do módulo pode ser visualizado na Figura 17.

FIGURA 17 - Ilustração do reator construído para o experimento.



(a) Caixote de MDP fechado para isolamento da iluminação interna e externa



(b) Ilustração do sistema de shaker coberto por caixote de madeira com instalação de iluminação.

Durante a fase exponencial da cultura foi retirada uma alíquota de 10 mL e inoculado nas unidades experimentais. O volume de inóculo definido foi de 5% do volume líquido (200 mL) nas unidades experimentais.

3.5. CULTIVO DE MICROALGA EM VINHAÇA

Os experimentos ocorreram em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo (preparado conforme seção 3.6), vedados com um tampão de gaze (boneca). Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 30 min a 121 °C para prevenir contaminação por fungos e bactérias no experimento.

Os experimentos aconteceram em reator orbital shaker com temperatura controlada de 25 °C e agitação constante de 150 rpm. Foi acoplado ao equipamento um caixote de MDP equipado com 4 lâmpadas frias de LED branca. A intensidade luminosa foi medida por um luxímetro digital (Instrutherm – Modelo LD-300) resultando em 2000 lux (2000 lumens.m⁻²) com fotoperíodo claro/escuro de 12h/12h, conforme Figura 17.

Com as condições do experimento considera-se o cultivo mixotrófico da microalga. O pH das amostras não foi controlado, deixando alterar livremente, sem a adição de reagentes corretivos.

Os experimentos ocorreram em duplicata e os valores médios são apresentados como resultados. As duplicadas possuíam uma triplicata do meio de cultivo (branco) sem inoculação de microalgas.

O tempo de cultivo foi até o experimento atingir estabilidade na fase estacionária.

3.6. PREPARO DO MEIO A BASE DE VINHAÇA

Na primeira batelada de teste, denominada Momento 1, com a motivação de analisar a máxima concentração de vinhaça para o crescimento da microalga, foi realizada a diluição da vinhaça nas concentrações de 10, 30 e 50% (v/v) em BBM e a diluição de vinhaça de 10% (v/v) em água destilada. Os ensaios ocorreram por um período de 30 dias. O controle foi realizado em meio BBM

(sem adição de vinhaça). O branco de cada concentração não teve a inoculação de microalga.

O ensaio seguinte, denominado Momento 2, com o intuito de analisar valores intermediários ao momento anterior, foi realizada a diluição da vinhaça nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25 % (v/v) em meio BBM. Os ensaios ocorreram por um período de 35 dias. O controle foi realizado em meio BBM (sem adição de vinhaça). O branco de cada concentração não teve a inoculação de microalga.

Posteriormente, em posse de microalgas já adaptadas e com base nos resultados obtidos no momento anterior, foi realizado os ensaios do Momento 3. Foram utilizadas as microalgas adaptadas em vinhaça na concentração de 5 e 10% (v/v) diluída em meio BBM como inóculos de concentrações maiores. As microalgas adaptadas em 5% de vinhaça foram inoculadas em meios com 5, 10 e 15% (v/v) de vinhaça em meio BBM. As microalgas adaptadas em 10% de vinhaça foram inoculadas em meios com 10, 15 e 20% (v/v) de vinhaça em meio BBM. Os ensaios ocorreram por um período de 35 dias. O controle foi realizado em meio BBM (sem adição de vinhaça). O branco de cada concentração não teve a inoculação de microalga.

Os ensaios do Momento 1, Momento 2 e Momento 3, escritos anteriormente, ocorreram com a mesma coleta de vinhaça (Coleta 1). Para armazenamento e conservação da vinhaça, ela foi mantida sob refrigeração a temperatura de -20 °C e descongelada para preparo dos meios do Momento 2 e do Momento 3.

Para o próximo ensaio, ocorreu com uma nova coleta de vinhaça (Coleta 2) para validar experimentos com outra matéria prima e explicar os motivos dos resultados encontrados anteriormente. Para cultivar as microalgas em condições próximas dos ensaios anteriores, a fim de comparações, foi realizado a diluição da vinhaça com água destilada para que o valor de DQO entre ambas as coletas sejam próximos. Essa vinhaça foi denominada vinhaça corrigida.

Assim, no Momento 4, foi utilizado como meio de cultivo de microalgas as seguintes concentrações: 10% e 30% (v/v) da vinhaça corrigida diluída em BBM, 30% (v/v) da vinhaça sem correção diluída em BBM, 10% e 30% (v/v) da vinhaça corrigida diluída em água destilada, 30% (v/v) da vinhaça sem correção

diluída em água destilada. O controle foi realizado em meio BBM (sem adição de vinhaça). O branco de cada concentração não teve a inoculação de microalga.

Na Tabela 4 é apresentado um esquema com os códigos de cada ensaio, a porcentagem de vinhaça, BBM e água destilada.

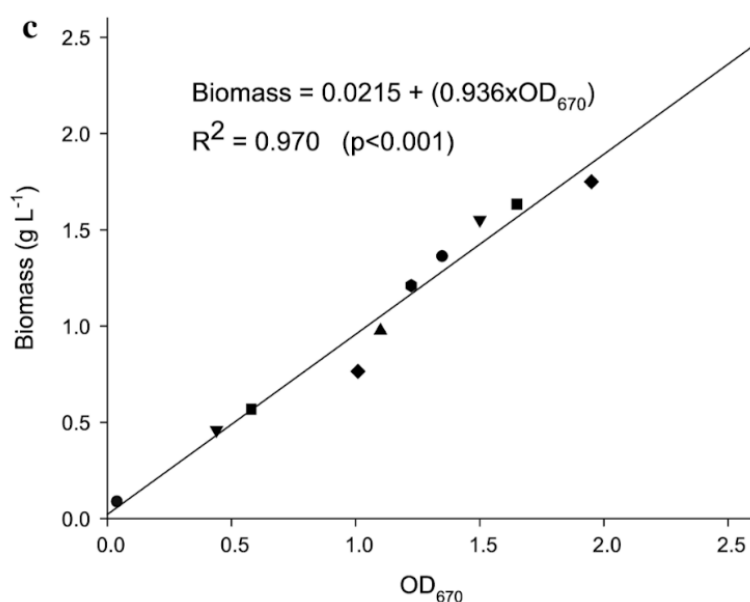
TABELA 4 - Esquema da concentração de vinhaça, BBM e água destilada para cada momento em seus respectivos ensaios para preparação do meio.

Momento 1 – Coleta 1 - Fresca			
Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água destilada (%)
A1	0	100	0
B1	10	90	0
C1	30	70	0
D1	50	50	0
E1	10	0	90
Momento 2 – Coleta 1 – Congelada			
Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água destilada (%)
A2	0	100	0
B2	5	95	0
C2	10	90	0
D2	15	85	0
E2	20	80	0
F2	25	75	0
Momento 3 – Coleta 1 - Congelada			
Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água destilada (%)
A3	0	100	0
B3	5	95	0
C3	10	90	0
H3	10	90	0
I3	15	85	0
J3	15	85	0
K3	20	80	0
Momento 4 – Coleta 2 - Fresca			
Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água destilada (%)
A4	0	100	0
B4	10	0	90
C4	30	0	70
D4	30	0	70
E4	10	90	0
F4	30	70	0
G4	30	70	0

3.7. DENSIDADE ÓPTICA E TAXA DE CRESCIMENTO

As taxas de crescimento foram obtidas a partir da curva de crescimento da microalga que relaciona absorvância e biomassa produz apresentada por (SILVA et al., 2016). A Figura 18 apresenta a curva de crescimento obtida pelos autores:

FIGURA 18 - Regressão linear entre biomassa (g/L) e densidade optica (OD - 670 nm).



Fonte: Silva et al. (2016)

A densidade óptica do sobrenadantes da *N. oleoabundans* foi mensurado no comprimento de onda de 670 nm, onde foi verificado a maior absorção da microalga nas condições de cultivos selecionadas, usando o espectrofotômetro UV/VIS (Metash UV- 5100) como indicador de densidade óptica.

A OD_{670nm} é convertida para biomassa (g/L) pela regressão linear representada pela equação a seguir:

$$Biomassa = (OD_{670nm} \times 0,936) + 0,0215 \quad (1)$$

Onde: OD_{670nm} é o valor da absorvância da microalga *N. oleoabundans* a 670 nm.

Como o efluente possui coloração marrom escura e sólidos presentes no meio, descontou-se a OD670 nm do branco (sem inoculação de microalga e na mesma concentração que as duplicatas) que foi submetido as mesmas condições de cultivo. Assim a equação utilizada foi:

$$\text{Biomassa} = (\text{OD}_{\text{microalga}_{670\text{nm}}} - \text{OD}_{\text{branco}_{670\text{nm}}}) \times 0,936 + 0,0215 \quad (2)$$

A taxa de crescimento específica, μ (d^{-1}), refere-se a fase exponencial do crescimento da cultura e foi estimada pela equação 3.

$$\mu \text{ (d}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(X_{\text{final}}) - \ln(X_{\text{inicial}})}{(t_{\text{final}}) - (t_{\text{inicial}})} \quad (3)$$

Em que, X_{final} = Biomassa no final da fase exponencial, em g.L^{-1} ;

X_{inicial} = Biomassa no início da fase exponencial, em g.L^{-1} ;

t_{final} : tempo final, em dia;

t_{inicial} : tempo inicial, em dia.

3.8. EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO DE POLUENTES

A concentração de nitrogênio amoniacal, fosfato e DQO foram mensurados no início e ao final do período de ensaio para verificar a eficiência do tratamento biológico empregado. As amostras foram filtradas com membrana de fibra de vidro $0,45 \mu\text{m}$. As análises foram realizadas de acordo com a Tabela 7 na secção 3.3.

A eficiência de remoção foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Eficiência de remoção (\%)} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

Onde, C_i é a concentração inicial, em mg.L^{-1} ;

C_f é a concentração final do poluente, em mg.L^{-1} .

Os experimentos ocorreram em duplicata e os valores médios foram apresentados como resultados.

3.9. TESTE DE SEDIMENTAÇÃO

O teste de sedimentação do material coloidal nas amostras foi realizado pela medida da densidade óptica (OD) em espectrofotômetro UV/VIS (Metash UV- 5100) no comprimento de onda 670 nm. Foram realizadas medidas de OD das amostras após 0, 1, 2, 3 e 4 min em repouso.

3.10. TESTE DE CONSERVAÇÃO DA VINHAÇA PARA CONGELAMENTO

Para avaliar a preservação da amostra de vinhaça por adição de ácido, foram separadas três amostras de 500 mL de vinhaça bruta. Na amostra 1, não foi adicionado nenhum reagente. Na amostra 2, foi adicionado ácido clorídrico (37%) na concentração de 3 mL.L⁻¹. Na amostra 3, foi adicionado ácido clorídrico (37%) na concentração de 5 mL.L⁻¹. As amostras permaneceram congeladas por 75 dias e após o descongelamento foi realizado a análise de DQO, conforme Quadro 5 da seção 3.2. Com o valor inicial e final foi verificado a remoção de cada ensaio durante o congelamento utilizando a Equação 4 da seção 3.8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERÍSTICA FÍSICO-QUÍMICA DO MEIO DE CULTIVO

4.1.1. Características físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar

Os valores médios obtidos em cada análise da coleta 1 e da coleta 2, descritas na seção 3.2, são apresentados na Tabela 5. Um comparativo com as faixas dos parâmetros apresentados na Tabela 1 (Seção 2.2.2) foi adicionado para interpretação dos dados.

TABELA 5 – Caracterização físico-química da vinhaça de cana-de-açúcar e comparação dos valores obtidos na literatura.

Parâmetro	Coleta 1	Coleta 2	Faixa Literatura ^[1]
pH	3,94	3,78	3,50 – 4,29
Condutividade elétrica (mS.cm ⁻¹)	4,83	5,15	3,73 – 18,31
Cor aparente (Abs)	1,30	2,18	-
Turbidez (uT)	1208,00	1916,00	-
Acidez mineral (mg _{CaCO3} .L ⁻¹)	700,00	1250,00	-
Acidez total (mg _{CaCO3} .L ⁻¹)	1800,00	2050,00	-
Sólidos totais (g.L ⁻¹)	15,56	25,94	13,67 – 26,80
Sólidos fixos (g.L ⁻¹)	3,90	4,12	2,52 – 8,10
Sólidos voláteis (g.L ⁻¹)	11,66	21,83	11,15 – 14,40
Sólidos em suspensão (g.L ⁻¹)	2,07	2,78	1,59
Sólidos dissolvidos (g.L ⁻¹)	13,49	23,16	-
Sólidos em suspensão fixos (g.L ⁻¹)	0,17	2,13	-
Sólidos em suspensão voláteis (g.L ⁻¹)	2,050	2,38	-
Sólidos dissolvidos fixos (g.L ⁻¹)	3,73	3,72	-
Sólidos dissolvidos voláteis (g.L ⁻¹)	9,55	19,44	-
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L ⁻¹)	156,00	632,00	81,00 – 2.876,50
Fosfato (mg.L ⁻¹)	33,05	49,56	59,20 – 158,00
DQO (g.L ⁻¹)	30,55	50,41	27,10 – 124,90
DQO filtrada (g.L ⁻¹)	26,82	35,77	-
DBO (g.L ⁻¹)	16,63	35,16	15,46 – 18,92
DBO filtrada (g.L ⁻¹)	13,28	20,51	-

^[1] Intervalo dos parâmetros encontrados na literatura demonstrado na Tabela 1, seção 2.2.2.

Em comparação com os valores encontrados na literatura, para a Coleta 1 (out/2019) todos os parâmetros apresentaram-se dentro da faixa. Para a Coleta 2 (maio/2021), os valores de Sólidos voláteis (SV) e a Demanda Química de Oxigênio (DBO) foram superiores. Valores diferentes podem ser encontrados pois as características da vinhaça dependem da matéria-prima utilizada para

produção do etanol (SANTOS et al., 2016), além do processo produtivo. Os parâmetros que não possuem valores de referência na literatura, são devido a falta desses dados nos artigos científicos verificados.

O pH em ambas as coletas apresentou caráter ácido. A elevada acidez total indica grande quantidade de CO₂ livre presente no meio, além de ácidos minerais e orgânicos.

Em relação aos sólidos, em ambas as coletas os valores dos sólidos voláteis (SV) foram bem maiores do que os sólidos fixos (SF). Isso representa que a maior parte dos sólidos presentes na vinhaça são orgânicos enquanto a menor parte são de minerais.

A relação DQO/DBO da vinhaça na Coleta 1 foi de 1,84 e da coleta 2 foi de 1,43. Esses valores indicam elevada fração biodegradável do efluente, que demonstram segundo Von Sperling (2014) ser indicado o tratamento biológico do efluente.

Nas duas coletas, a concentração de sólidos em suspensão (SS) foi menor que a de sólidos dissolvidos (SD). Assim, a maior parte dos sólidos presentes no efluente são de tamanho de pequena grandeza. Mesmo assim, ambas as coletas apresentaram elevada turbidez e cor. Todos esses parâmetros foram maiores para a vinhaça da Coleta 2.

A relação SSV/SS da coleta 1 foi de 0,99, enquanto que para a coleta 2 foi de 0,85. Valores de SSV/SS mais próximos de 1 indica o alto grau de mineralização do lodo, onde ocorre a conversão de toda a matéria orgânica no efluente em substância inorgânica, e conseqüentemente a disponibilidade de nutrientes no meio.

A relação N:P (Nitrogênio/Fósforo) da vinhaça da coleta 1 foi de 4,7:1. Na vinhaça da Coleta 2 a relação N:P foi maior, 12,8:1. Em comparação com o relatado por Li et al. (2019), a relação N:P ideal para o crescimento de microalgas é de N:P igual a 6,8-10:1, estando assim a vinhaça da coleta 1 em uma proporção menor que o ideal e a vinhaça da coleta 2 com uma relação mais próxima do ideal para o cultivo.

4.1.2. Características físico-química do meio BBM

Os valores médios obtidos em cada análise no meio BBM, descritas na seção 3.2, são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - Caracterização físico-química do BBM.

Parâmetro	Valor
pH	6,85
Condutividade elétrica (mS.cm ⁻¹)	0,88
Cor aparente (Abs)	0,002
Turbidez (uT)	0,00
Acidez mineral (mg _{CaCO3} .L ⁻¹)	0,00
Acidez total (mg _{CaCO3} .L ⁻¹)	100
Nitrogênio total kjeldahl (mg.L ⁻¹)	31,17
Fosfato (mg.L ⁻¹)	19,68
Demanda Química de Oxigênio (g.L ⁻¹)	11,28
DQO filtrada (g.L ⁻¹)	2,65

O pH do meio BBM apresentou-se mais próximo da neutralidade, 6,85, devido ajuste no preparo. Em comparação com a vinhaça, o meio BBM apresenta baixa condutividade elétrica, baixa cor aparente e baixa turbidez. A relação N:P do meio BBM foi de 1,6:1.

4.2. CRESCIMENTO DA MICROALGA

4.2.1. Momento 1

Os ensaios referentes ao Momento 1 foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.6.

Os valores de DQO inicial, NTK inicial e Fosfato inicial no Momento 1, foram demonstrados na Tabela 7. Os valores foram obtidos a partir da diluição de vinhaça em meio BBM ou em água destilada nas proporções indicadas.

TABELA 7 - Códigos dos ensaios do momento 1, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.

Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água (%)	DQO inicial (g.L ⁻¹)	NTK inicial (mg.L ⁻¹)	Fosfato inicial (mg.L ⁻¹)	Relação N:P
A1	0	100	0	11,28	31,17	19,68	1,58:1

B1	10	90	0	13,21	43,65	21,02	2,08:1
C1	30	70	0	17,06	68,62	23,69	2,90:1
D1	50	50	0	20,92	93,59	26,37	3,55:1
E1	10	0	90	3,06	15,60	3,31	4,72:1

O crescimento na microalga *N. oleoabundans* durante o período de 30 dias nos ensaios do Momento 1 podem ser visualizados na Figura 19. Na Tabela 8 são descritos a taxa de crescimento específico (μ) e a biomassa para cada experimento.

FIGURA 19 - Crescimento da *N. oleoabundans* no momento 1.

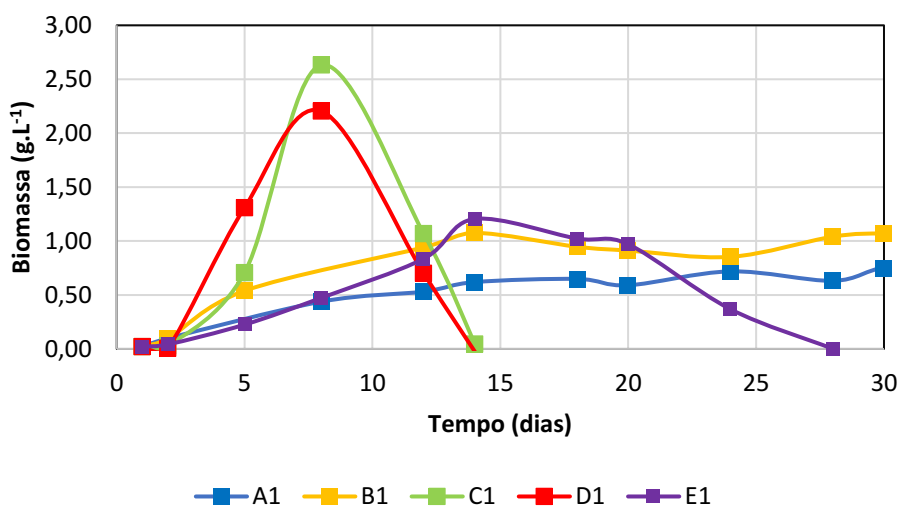


TABELA 8 - Taxa de crescimento específico e produção de biomassa máxima.

Código	μ (dia ⁻¹)	Vinhaça (%)	Biomassa máxima produzida (g.L ⁻¹)
A1	0,2568	0	0,65
B1	0,2992	10	1,08
C1	0,7508	30	2,63
D1	0,9930	50	2,21
E1	0,2795	10	1,20

Na Fig. 19, pode-se perceber que em meio BBM (A1 – em azul), utilizado como controle, a microalga *N. oleoabundans* obteve uma produção máxima de biomassa de 0,65 g.L⁻¹ e uma taxa de crescimento específica de 0,2568 d⁻¹.

Quando adicionada vinhaça no meio BBM, pode-se perceber que ao aumentar da concentração de vinhaça até 30% foi possível resultar no aumento do valor máximo de biomassa obtida, sendo 1,08 e 2,63 g.L⁻¹ para os meios B1 (em laranja) e C1 (em verde), respectivamente. Na concentração de 50% (D1 –

em vermelho) a produtividade foi maior que o meio controle (A1) e ao meio com 10% vinhaça em BBM (B1), com 2,21 g.L⁻¹.

No trabalho desenvolvido por Sydney et al. (2019), o cultivo de *N. oleoabundans* foi obtido até a concentração máxima de 30% de vinhaça diluída em água destilada, com biomassa produzida de 1,6 g.L⁻¹. O excesso de potássio e a elevada turbidez não favoreceram o crescimento da microalga.

Ao analisar a relação N:P dos meios A1, B1, C1 e D1, percebe-se que ocorre o aumento da proporção N:P disponível no meio para assimilação pelas microalgas. O aumento da concentração dos nutrientes como N e P favoreceu o crescimento da biomassa, com exceção do ensaio D1 com 50% de vinhaça diluído em BBM. A diminuição da concentração de biomassa pode ter ocorrido devido a toxicidade da vinhaça, pela alta turbidez ou pela inibição pela alta concentração de amônia.

A diluição da vinhaça foi descrita por Olguin *et al.* (2015) como uma forma de diminuir a turbidez, a concentração de nitrogênio amoniacal e demais compostos tóxicos.

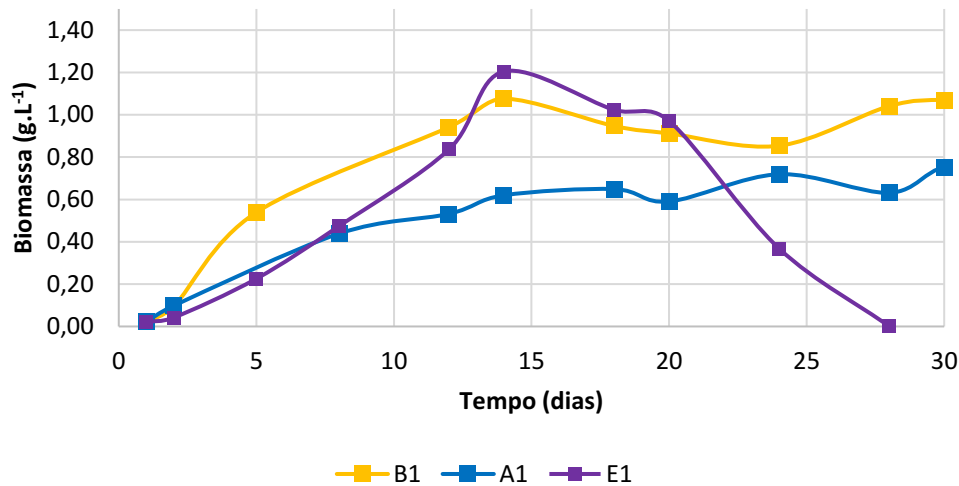
Para o meio com 10% vinhaça diluída em água destilada (E1 – em roxo) foi possível obter crescimento da *N. oleoabundans* e com produção de biomassa máxima de 1,20 g.L⁻¹, valor que representa quase o dobro do meio controle. Apesar de em relação aos demais possuir a maior relação N:P, as concentrações de N e P no meio eram as menores disponíveis. Mesmo assim, a vinhaça diluída forneceu condições para o desenvolvimento da microalga.

Ao utilizar 6% de vinhaça digerida e diluída em água com adição de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), os autores atingiram uma produtividade de 1,545 g.L⁻¹ de biomassa. A Relação N:P foi de 5,88:1, sendo uma razão menor do que as recomendadas para promover o crescimento da microalga Olguin *et al.* (2015).

De acordo com Li et al. (2019), a razão N:P ideal para o crescimento e remoção de nutrientes é de N:P igual a 6,8-10:1. Todos os ensaios deste momento apresentaram razões menores do que a ideal.

A Figura 20 apresenta um comparativo entre os experimentos A1, B1 e E1, que apresentaram comportamentos parecidos.

FIGURA 20 - Comparativo do crescimento da *N. oleoabundans* nos meios (A1) 100% BBM; (B1) 10%Vinhaça em BBM; e (C1) 10%Vinhaça em água



Em comparação a curva do experimento A1, 100% em meio BBM (Figura 20) pode-se perceber que os ensaios com mesma concentração em vinhaça (10%), mas em meios diferentes B1 (em amarelo) em BBM e E1 (em roxo) em água, percebeu-se que as microalgas não precisaram de um tempo elevado para adaptação no meio e apresentaram o início da fase exponencial no segundo dia de experimento. Outro fator interessante é que a microalga estava utilizando nutrientes da vinhaça, uma vez que as diferenças dos resultados obtidos entre B1 e E1 foram muito pequenas.

A curva de crescimento específica no meio controle (A1 em azul) foi de 0,2568 d⁻¹, atingindo o valor máximo de biomassa no dia 18.

Para o meio com 10 % de vinhaça diluído em água destilada (E1 em roxo), a taxa de crescimento específico foi sutilmente maior, com 0,2795 d⁻¹, atingindo o valor de pico durante o 14° dia de cultivo.

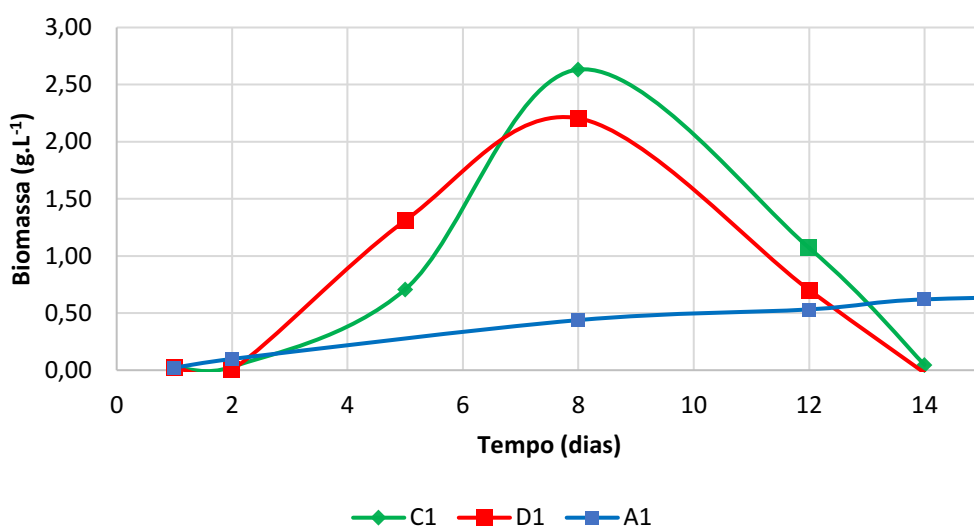
Em meio BBM suplementado com 10% de vinhaça, a taxa específica de crescimento foi potencializada pelo incremento do efluente, com valor de 0,2992 d⁻¹. O valor de biomassa máxima produzida foi obtido no 14° dia de cultivo.

Em comparação ao comportamento das curvas, a microalga em meio BBM (A1 – em azul) e a microalga em meio 10% de Vinhaça diluída em BMM (B1 – em laranja) obtiveram comportamentos semelhantes, permanecendo na fase estacionária até o final do experimento. Já a curva do meio com 10% vinhaça em água destilada o crescimento atingiu a fase de declínio no vigésimo dia e não suportou os 30 dias de cultivo. A menor concentração de nutrientes

disponível pode ter levado a escassez de recursos e a queda da produtividade de biomassa.

A Figura 21, apresenta o comportamento das curvas C1 e D1, agora com 30% e 50% de vinhaça em meio BBm respectivamente. É possível observar comportamento semelhantes. A curva do meio controle foi adicionado a fim de comparação.

FIGURA 21 - Comparativo do crescimento da *N. oleoabundans* nos meios (A) 100% BBM; (C) 30%Vinhaça em BBM; e (D) 50%Vinhaça em BBM.



Em ambas, curva C (em verde) e D (em vermelho) a adaptação ocorreu apenas até o segundo dia de cultivo, apresentando posteriormente uma fase log atenuada. As taxas específicas de crescimento, respectivamente, foram de 0,7508 d⁻¹ e 0,9930 d⁻¹. A maior concentração de vinhaça foi resultar em uma maior aceleração no crescimento. Ambas atingiram o valor máximo no 8º dia de cultivo.

Após atingir a produção máxima de biomassa não foi possível observar a presença da fase estacionária de crescimento, pois ao atingir o final da fase exponencial iniciou-se a fase de declínio do crescimento e cessando as atividades no dia 14. Apesar disso, os valores de produtividade e da taxa específica de crescimento foram maiores quando comparados ao meio controle (BBM), demonstrando assim que a vinhaça é capaz de potencializar o meio de cultivo e suprimir as necessidades de nutrientes das microalgas.

4.2.2. Momento 2

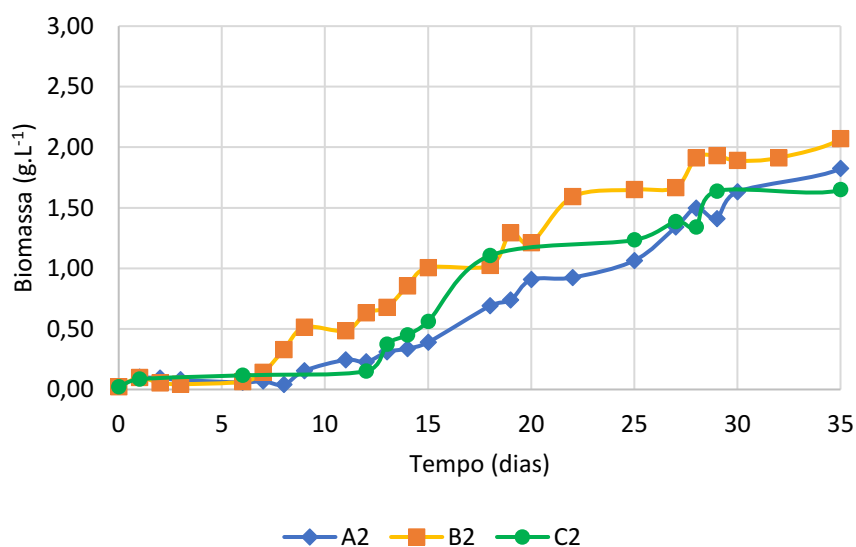
Os ensaios referentes ao Momento 2 foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.6.

A intencionalidade inicial era de fazer uma análise entre as concentrações de 10 a 30% de vinhaça, para verificar, posteriormente, a cinética de crescimento da melhor concentração.

Apesar da concentração de 50% em vinhaça ter sido um resultado muito promissor, este comparativo seria realizado em momento posterior.

A vinhaça utilizada nesse experimento permaneceu congelada por 43 dias. O crescimento na microalga *N. oleoabundans* no meio controle BBM (A2), no meio com 5% vinhaça em meio BBM (B2) e no meio com 10% de vinhaça em meio BBM (C2) pode ser visualizado na Figura 22.

FIGURA 22- Comparativo do crescimento da *N. oleoabundans* nos meios: (A2) 100% BBM; (B2) 5% Vinhaça em BBM e (C2) 10% vinhaça em BBM.



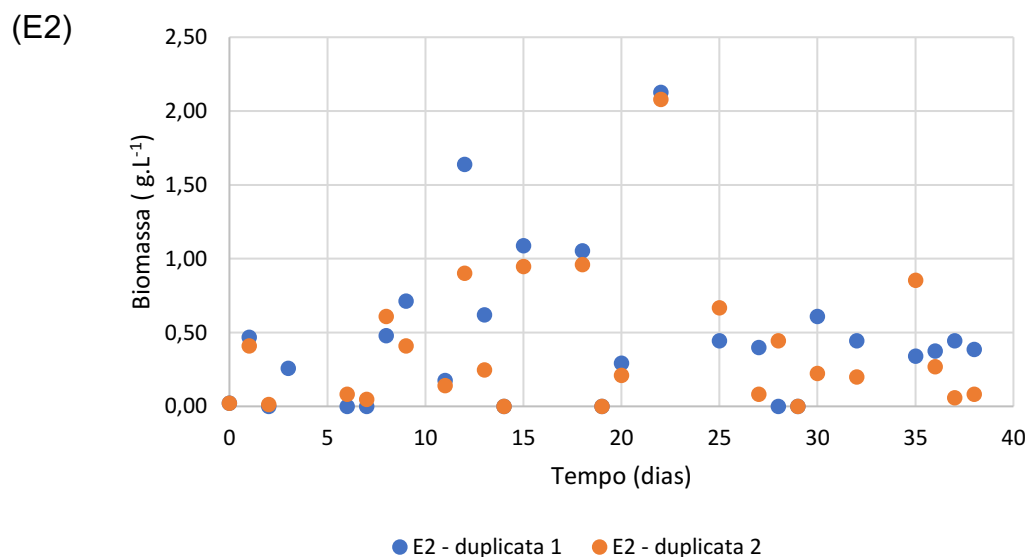
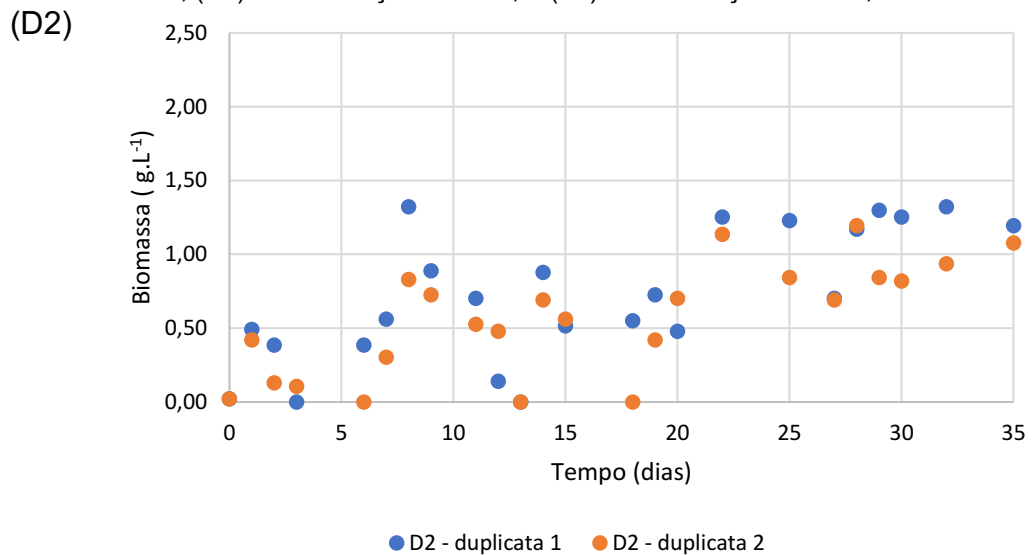
Em meio BBM (A2 em azul), a microalga *N. oleoabundans* obteve uma produção máxima de biomassa de 1,82 g.L⁻¹. Nos ensaios com 5% de vinhaça diluída em meio BBM (B2 em laranja) foi encontrada uma produção de biomassa máxima superior, de 2,07 g.L⁻¹. Na concentração de 10% de vinhaça em meio BBM (C2 em verde) a produção máxima de biomassa foi de 1,64 g.L⁻¹, uma concentração menor que as duas anteriormente citadas.

Em todas as curvas houve uma longa fase de adaptação, seguida de uma curva exponencial de crescimento. As taxas específicas de crescimento dos três experimentos foram próximas, sendo de 0,1348, 0,1245 e 0,1399 d⁻¹ para A2, B2 e C2, respectivamente. Ao final do experimento, todas as curvas ainda não apresentaram queda, permanecendo no início da fase estacionária.

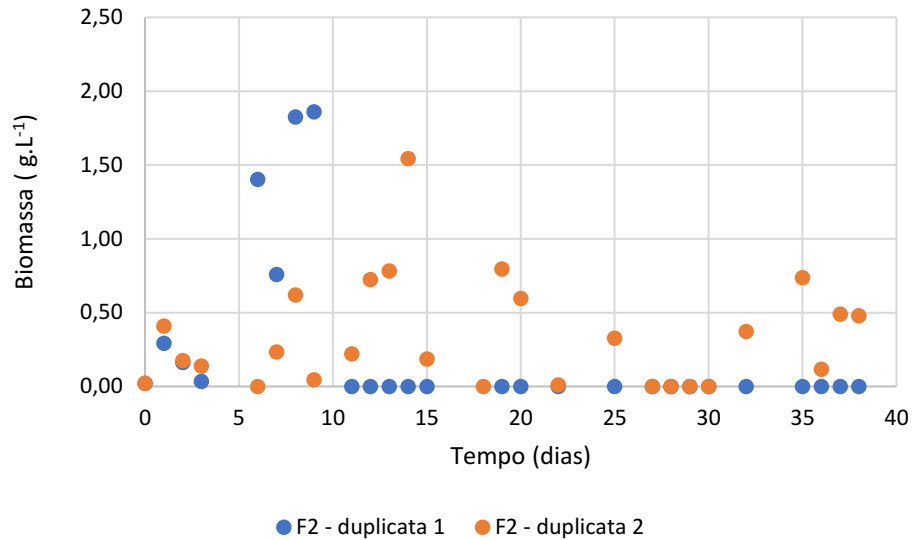
A comparação entre os momentos será apresentada na secção 4.2.5.

A Figura 23 apresentam os gráficos referentes ao crescimento da microalga nas concentrações de 15 (D2), 20 (E2) e 25% (F2) de vinhaça em meio BBM.

Figura 23 - Valores de biomassa diários em cada duplicata nos ensaios: (D2) 15% Vinhaça em BBM; (E2) 20% Vinhaça em BBM; e (F2) 25% Vinhaça em BBM;



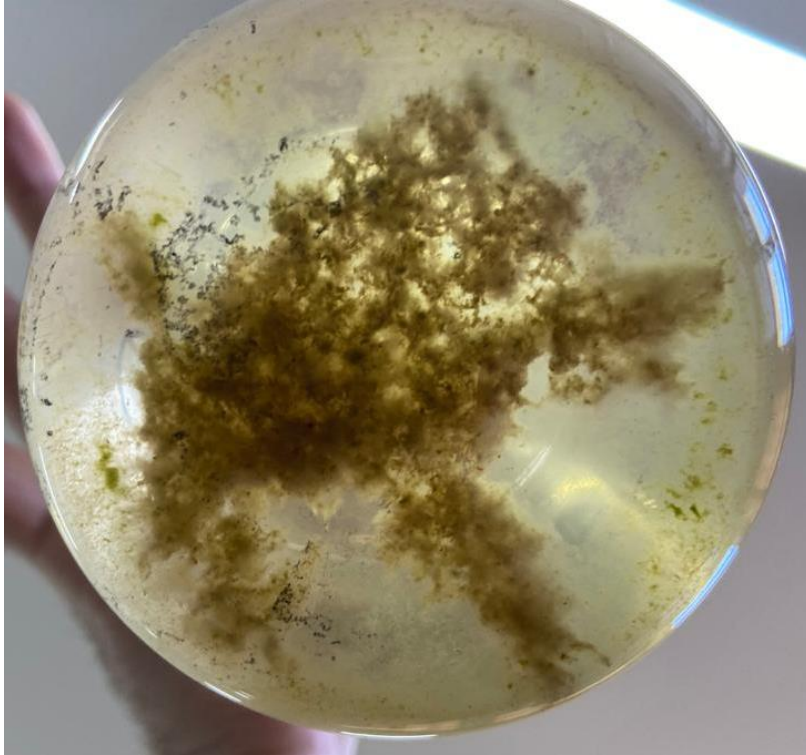
(F2)



Diferente do momento 1, nos ensaios apresentados na Figura 23, não foi possível encontrar uma curva de crescimento para a microalga devido a amplitude e as oscilações dos valores apresentado nas medições durante os dias de análise. Durante o ocorrer dos ensaios, pode-se perceber que a vinhaça formou micelas com aspecto gelatinoso, tanto no branco (sem inoculação de microalgas) quanto nos ensaios com microalgas inoculadas. As microalgas utilizaram essa micela como suporte para seu crescimento em colônia e essa formação dificultou a leitura do sobrenadante pela metodologia do espectrofotômetro.

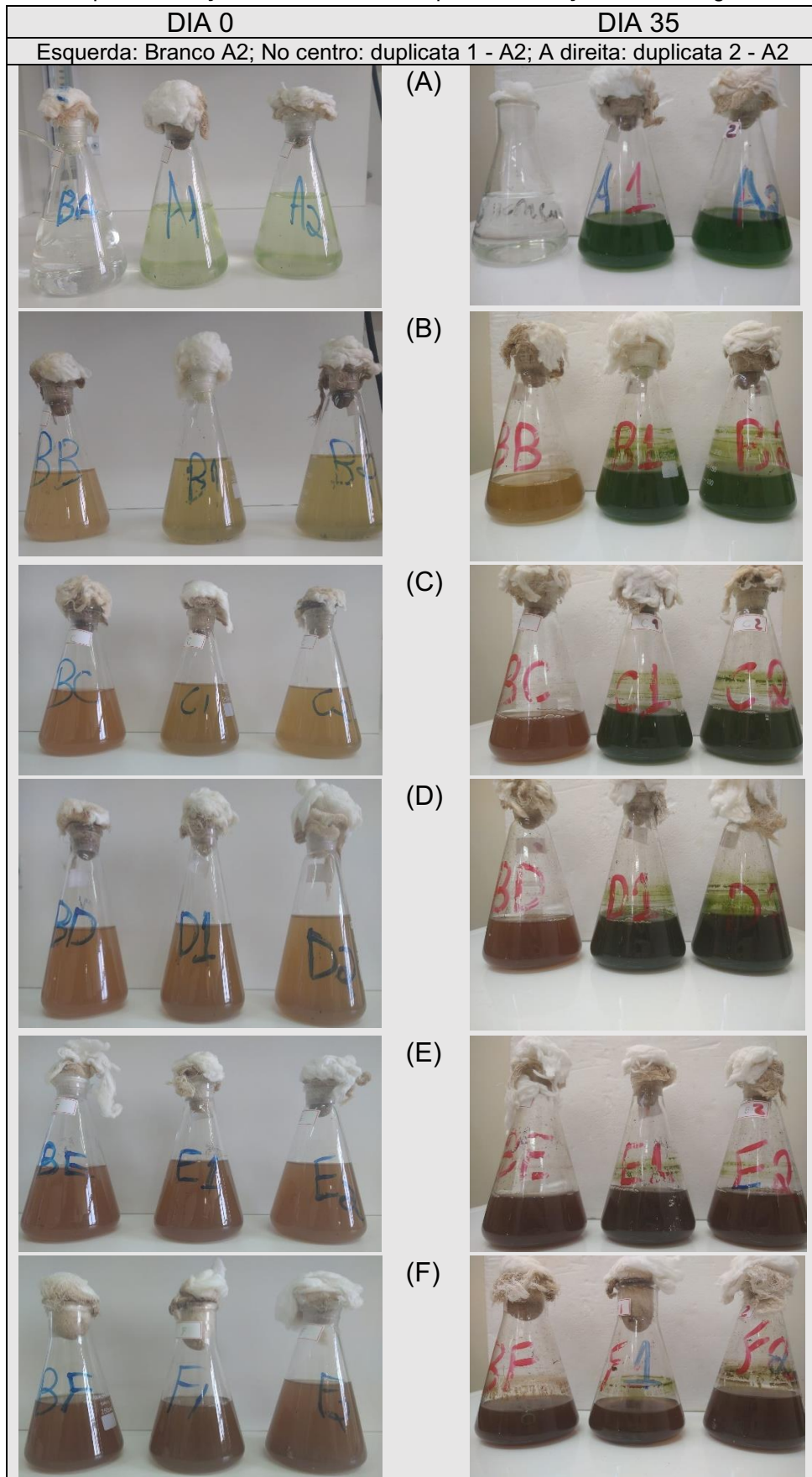
Na Figura 24 é apresentado uma fotografia da miscelas formadas durante o cultivo da microalga.

FIGURA 24 - Formação de micela durante o cultivo de microalgas



Na Figura 25, o crescimento da microalga pode ser visualizado pela coloração verde dos meios de cultivos.

FIGURA 25 - Ilustração dos ensaios realizados no momento 2: A esquerda - dia zero após inoculação; A direita - dia 35 após a inoculação da microalga.



Diferentemente do que havia acontecido no momento 1, concentrações mais elevadas de vinhaça, neste momento, não propiciaram leitura adequada dos resultados obtidos.

Estes resultados imprecisos dificultaram o desenvolvimento desta etapa do trabalho de cinética destas concentrações.

A busca pelas motivações desta disparidade de resultados entre o momento 1 e 2, apontaram que mesmo com o congelamento, ocorreu a degradação e mudança na sua composição físico-química da vinhaça. Os valores de DQO inicial, NTK inicial e Fosfato inicial no Momento 2 são demonstrados na Tabela 9. Os valores foram obtidos a partir da diluição de vinhaça em meio BBM nas proporções indicadas.

TABELA 9 - Códigos dos ensaios do momento 2, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P e relação N:P.

Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	DQO inicial (g.L⁻¹)	NTK inicial (mg.L⁻¹)	Fosfato inicial (mg.L⁻¹)	Relação N:P
A2	0	100	11,28	31,17	19,68	1,58:1
B2	5	95	11,87	37,11	19,92	1,86:1
C2	10	90	12,46	43,05	20,16	2,14:1
D2	15	85	13,05	48,99	20,40	2,40:1
E2	20	80	13,64	54,94	20,64	2,66:1
F2	25	75	14,23	60,88	20,88	2,92:1

Um detalhamento do comparativo entre os valores iniciais e finais da vinhaça em cada momento é apresentado na seção 4.2.3.2.

4.2.3. Momento 3

Os ensaios referentes ao Momento 3 foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.6.

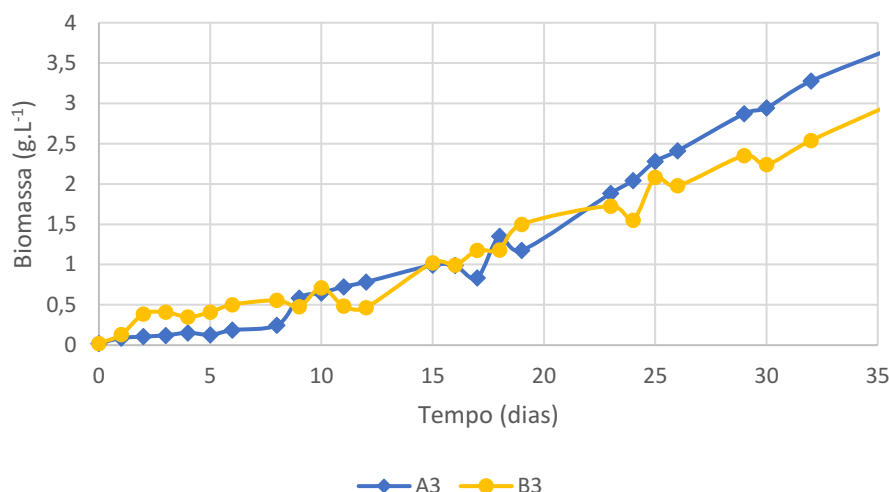
A vinhaça utilizada nesse experimento permaneceu congelada por 82 dias. Mesmo com o congelamento, ocorreu a degradação e mudança na sua composição físico-química. Os valores de DQO inicial, NTK inicial e Fosfato inicial no Momento 3 são demonstrados na Tabela 10. Os valores foram obtidos a partir da diluição de vinhaça em meio BBM nas proporções indicadas.

TABELA 10 - Códigos dos ensaios do momento 3, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.

Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Inóculo adaptado	DQO inicial (g.L ⁻¹)	NTK inicial (mg.L ⁻¹)	Fosfato inicial (mg.L ⁻¹)	Relação N:P
A3	0	100	-	11,28	31,17	19,68	1,58:1
B3	5	95	5%	11,58	36,02	19,10	1,89:1
C3	10	90	10%	11,88	40,87	18,51	2,21:1
H3	10	90	5%	12,18	45,73	17,93	2,55:1
I3	15	85	5%	11,88	40,87	18,51	2,21:1
J3	15	85	10%	12,18	45,73	17,93	2,55:1
K3	20	80	10%	12,48	50,58	17,34	2,92:1

O crescimento na microalga *N. oleoabundans* no meio controle BBM (A3) e no meio com 5% de vinhaça em meio BBM com inóculo adaptado em vinhaça 5% (B3) pode ser visualizado na Figura 26.

FIGURA 26 - Comparativo do crescimento da *N. oleoabundans* nos meios: (A3) 100% BBM; (B3) 5%Vinhaça em BBM com inóculo adaptado em 5%Vinhaça.



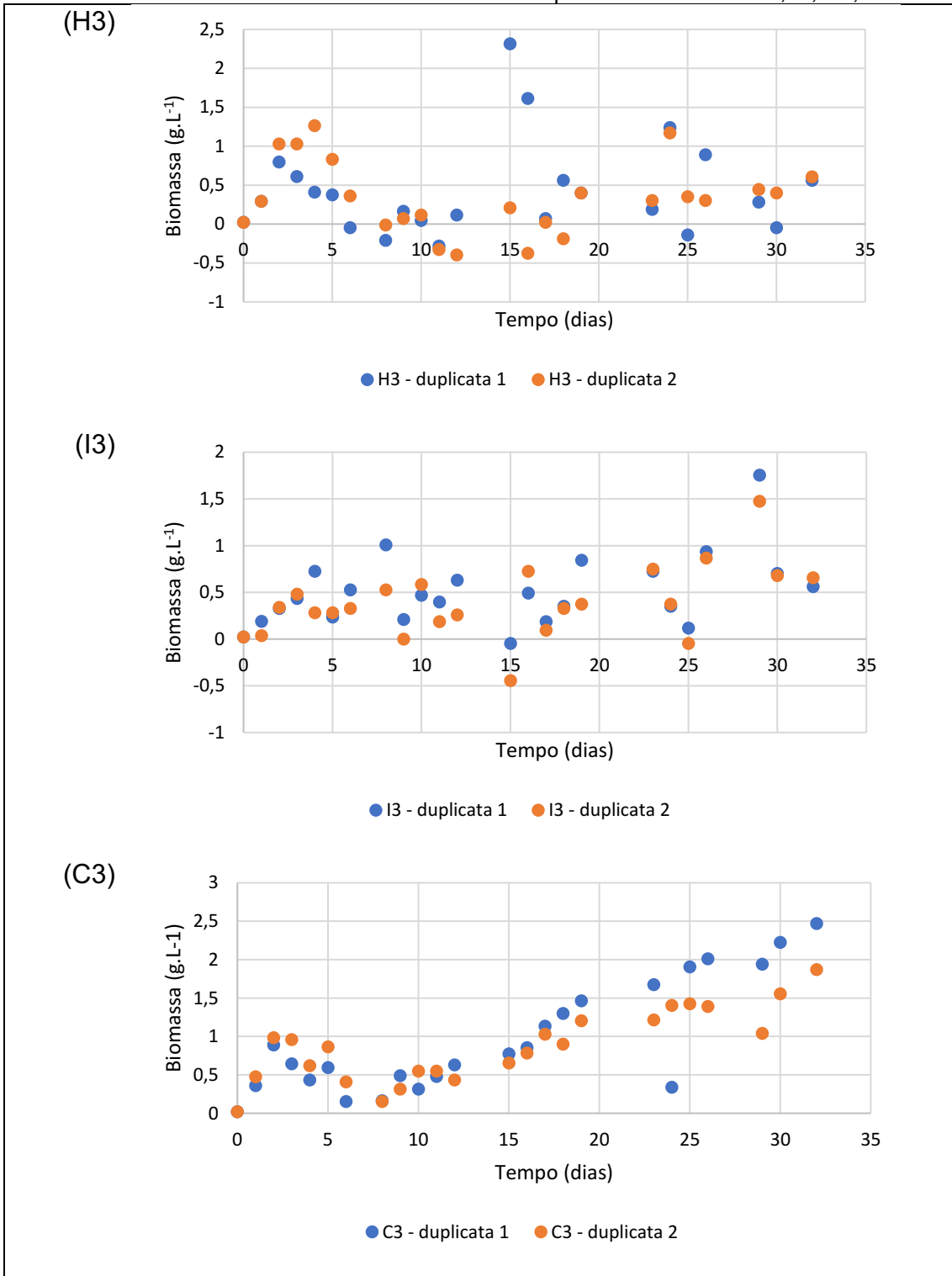
Durante os 35 dias de experimento, o meio BBM (A3 - azul) apresentou uma produção máxima de biomassa de 3,72 g.L⁻¹, enquanto no mesmo período o meio com 5% de vinhaça em BBM com inóculo adaptado (B3 em laranja) apresentou uma produção de biomassa de 3,04 g.L⁻¹.

A relação N:P do meio A (Azul) foi de 1,58:1 e para o meio B (laranja) foi de 1,89:1. Apesar da relação do meio B ser maior que o meio A, apresentou uma produção de biomassa menor que o meio controle.

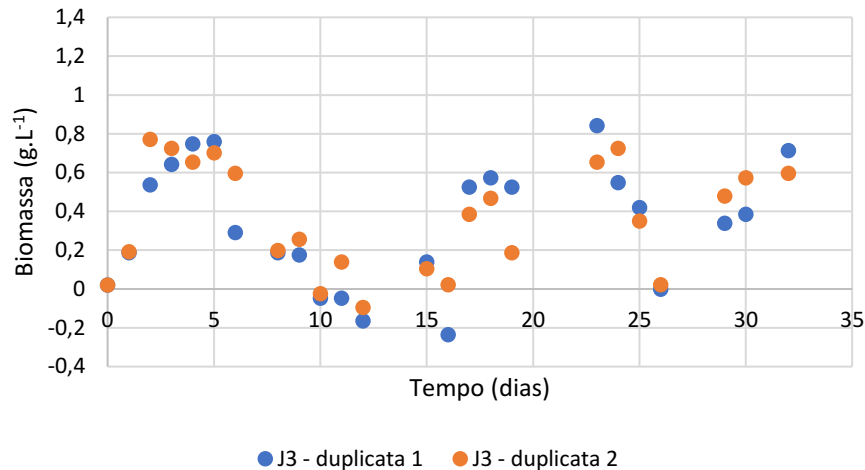
A Figura 27 apresentam os gráficos referentes ao crescimento da microalga nas concentrações de 10% (H3) e 15% (I3) com inóculo adaptado em

5% e nas concentrações de 10 (C3), 15 (J3) e 20% (K3) com inóculo adaptado em 10% de vinhaça em meio BBM.

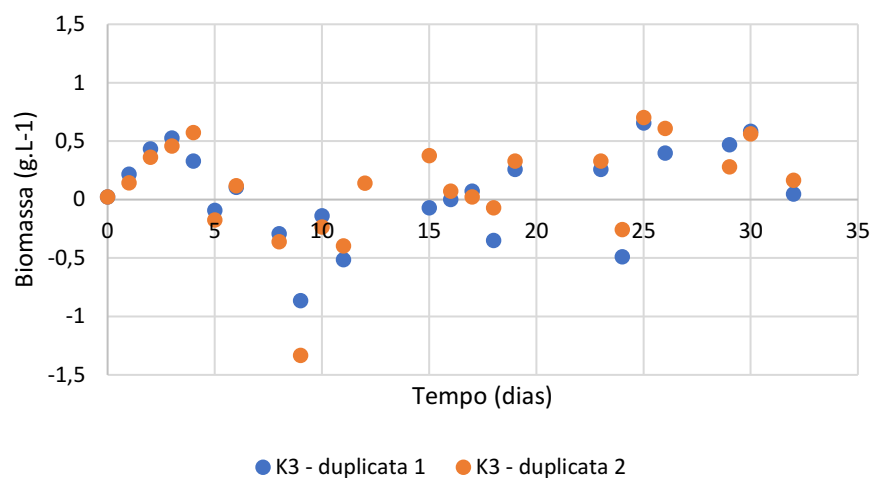
FIGURA 27 - Valores de biomassa diários em cada duplicata nos ensaios H3, I3, C3, J3 e K3.



(J3)



(K3)



Da mesma maneira que o Momento 3, nos ensaios C3, H3, I3, J3 e K3 não foi possível encontrar uma curva de crescimento para a microalga devido a amplitude e oscilação dos valores apresentado nas medições durante os dias de análise. Durante o ocorrer destes ensaios, percebeu-se novamente que a vinhaça formou micelas com aspecto gelatinoso, tanto no branco (sem inoculação de microalgas) quanto nos ensaios com inoculação de microalgas. As microalgas utilizaram essa micela como suporte para seu crescimento em colônia. Essa junção dificultou a leitura pelo espectrofotômetro.

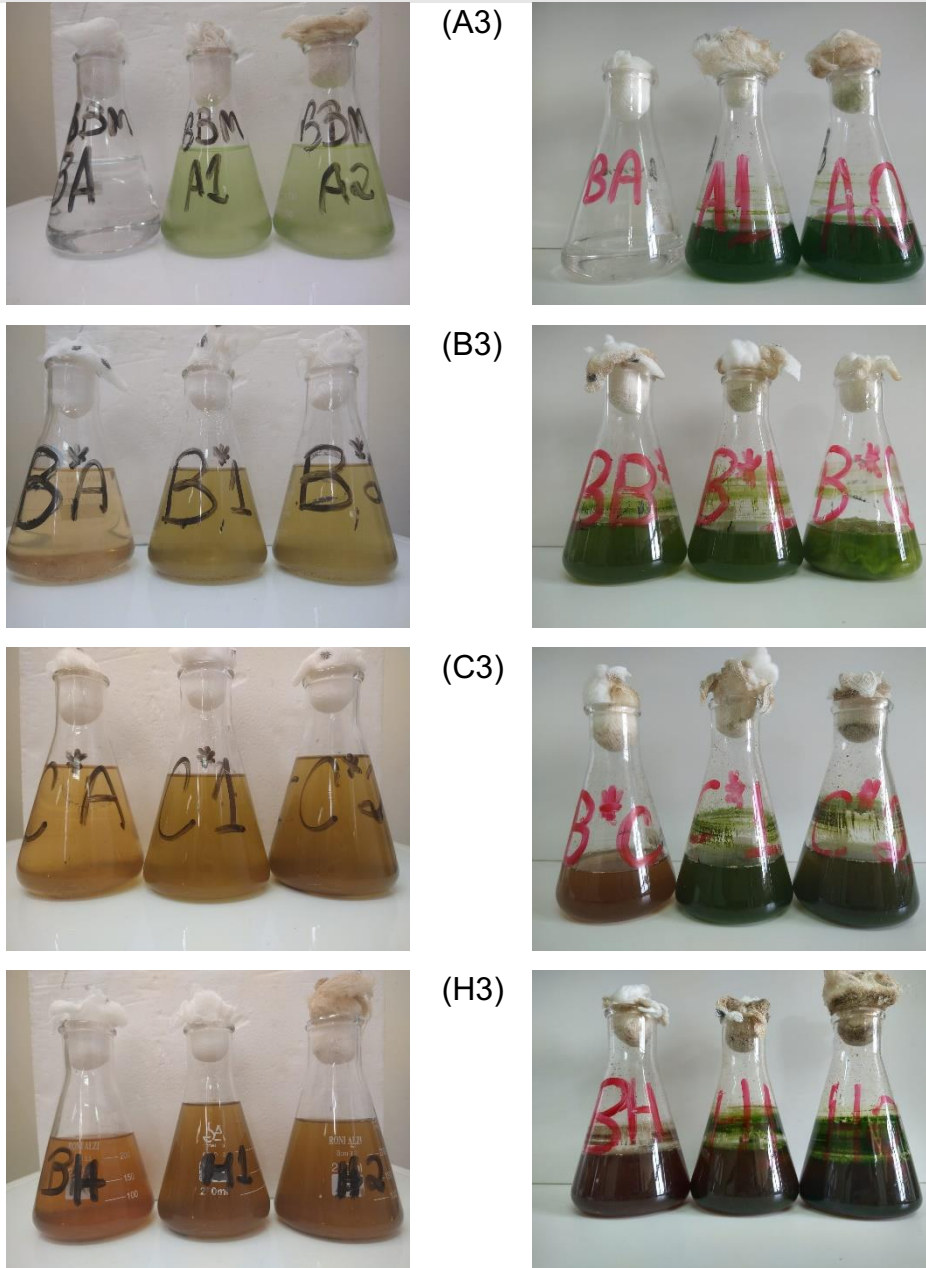
Em todas os ensaios, pode-se perceber que os valores das duplicatas de cada concentração seguiram a mesma tendência de comportamento. Com isso, pode-se perceber que em concentrações de vinhaça acima de 5% após o congelamento a metodologia de espectrofotômetro não é a indicada para a estimativa de concentração de microalga no efluente.

Como demonstrado na Figura 28, visivelmente pode-se perceber o crescimento da microalga pela coloração esverdeada dos meios de cultivo.

FIGURA 28 - Ilustração dos ensaios realizados no momento 3:
DIA 0

DIA 35

Esquerda: Branco A3; No centro: duplicata 1 – A3; A direita: duplicata 2 – A3





(I3)



(J3)



(K3)



A comparação entre os momentos será apresentada na secção 4.2.5.

4.2.3.1. Teste de sedimentação

Diante da hipótese que após o congelamento da vinhaça ocorre a intensificação da formação de micelas em concentrações superiores que 5% de vinhaça diluída em meio BBM e isso resulta num prejuízo para a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, foi realizado um teste de sedimentação. O teste tem por objetivo, verificar se ocorre a sedimentação do coloide após um determinado tempo de sedimentação que resulta na leitura adequada do crescimento das microalgas pela metodologia de espectrofotômetro.

A Tabela 11, demonstra o teste de sedimentação. Foram verificados a densidade óptica a 670 nm nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 min da amostra parada.

TABELA 11 - Absorbância das amostras em relação ao tempo.

Amostra	Tempo (min)						
	Duplicata	0	1	2	3	4	5
A2	1	0,126	0,130	0,132	0,133	0,133	0,136
A2	2	0,164	0,165	0,166	0,166	0,166	0,167
B2	1	0,170	0,171	0,170	0,170	0,171	0,171
B2	2	0,211	0,218	0,211	0,210	0,209	0,209
C2	1	0,194	0,192	0,192	0,192	0,193	0,190
C2	2	0,172	0,165	0,166	0,165	0,168	0,164
D2	1	0,149	0,149	0,148	0,147	0,145	0,142
D2	2	0,150	0,149	0,151	0,147	0,148	0,146
E2	1	0,130	0,127	0,126	0,127	0,125	0,127
E2	2	0,096	0,093	0,090	0,090	0,092	0,089
F2	1	0,048	0,065	0,047	0,047	0,047	0,047
F2	2	0,142	0,142	0,139	0,138	0,136	0,136
A2	BRANCO	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B2	BRANCO	0,028	0,027	0,027	0,027	0,026	0,026
C2	BRANCO	0,055	0,053	0,053	0,053	0,053	0,052
D2	BRANCO	0,064	0,064	0,062	0,063	0,063	0,063
E2	BRANCO	0,110	0,105	0,105	0,108	0,105	0,106
F2	BRANCO	0,125	0,121	0,121	0,122	0,119	0,120

Avaliando a absorbância em relação ao tempo, pode-se perceber que não ocorre alteração dos valores ao passar o tempo de sedimentação do meio, visto que a micela coloidal formada não sedimenta e dificulta a leitura de OD.

Em busca na literatura, não foram encontrados relatos sobre a presença de micelas e os consequentes problemas de medição do crescimento de biomassa de microalga.

4.2.3.2. Degradação da vinhaça congelada

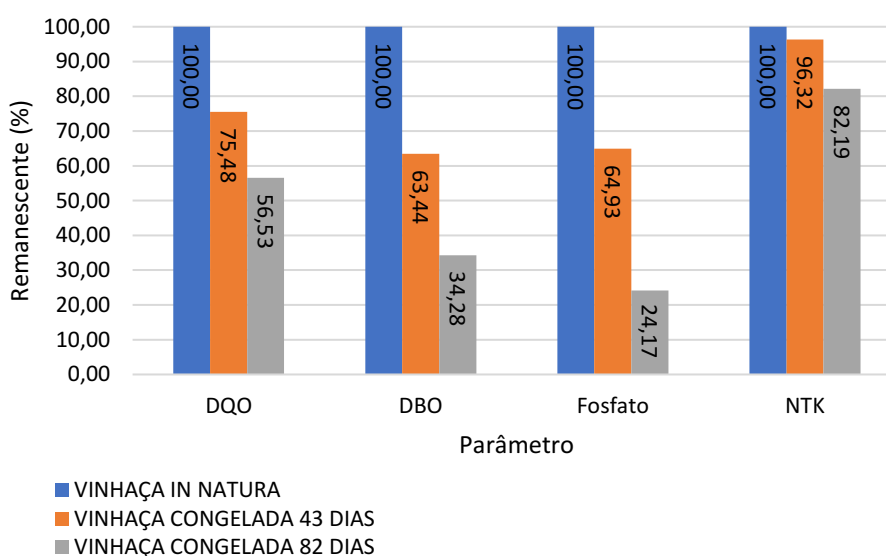
Durante o descongelamento da vinhaça de cana-de-açúcar percebeu-se que mesmo estando em temperaturas negativas, o efluente degradou, diminuindo parâmetros como DQO, DBO, NTK e P. A Tabela 12 apresenta a variação dos parâmetros do efluente no dia da coleta e após 43 e 82 dias de congelamento.

TABELA 12 - Variação dos parâmetros após o congelamento

Parâmetro	Dia 0	DIA 43	DIA 82
DQO (g.L ⁻¹)	30,55	23,06	17,27
DQO filtrada (g.L ⁻¹)	26,82	19,14	12,11
DBO (g.L ⁻¹)	16,63	10,55	5,7
DBO filtrada (g.L ⁻¹)	13,27	8,4	4,79
NTK (mg.L ⁻¹)	156,00	150,26	128,21
NTK filtrada (mg.L ⁻¹)	135,2	117,45	101,65
P (mg.L ⁻¹)	33,05	21,46	7,99
P filtrado (mg.L ⁻¹)	27,49	18,29	1,13

Pode-se perceber que em todos os parâmetros ocorreu a redução de valores durante o congelamento da vinhaça. Na Figura 29 ilustra a porcentagem de decaimento dos parâmetros da vinhaça durante o congelamento, indicando a degradação do efluente.

FIGURA 29 - Porcentagem remanescente de DQO, DBO, NTK e P após o congelamento da vinhaça



A DQO apresentou uma queda de 24,52% durante 43 dias de congelamento e uma queda de 43,47% após 82 dias sob condições negativas de temperatura. Para o mesmo período a DBO apresentou uma redução de 36,56 e 65,72%, respectivamente.

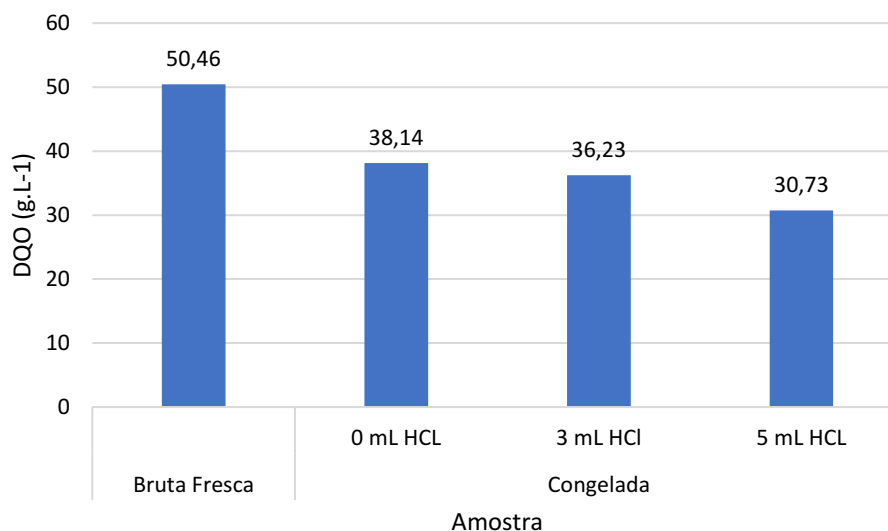
O NTK durante o congelamento não apresentou grande diferença de concentração em comparação com os demais parâmetros. Para os 43 dias de congelamento verificou-se uma redução de 3,68% e para os 82 dias 17,81%.

O fosfato apresentou os maiores valores de redução pós congelamento, sendo 35,07% para o primeiro período e 75,83 após o segundo período.

De acordo com o Guia Nacional de coleta e preservação de amostras (ANA; CETESB, 2011), a técnica de congelamento é inadequada para as amostras cujas frações sólidas alteram-se com o congelamento ao retornar a temperatura ambiente. Assim, a vinhaça apresenta alterações em suas propriedades ao ser congelada, sendo a técnica de conservação por congelamento uma técnica que compromete a representatividade do efluente.

Com isso, propomos a combinação da técnica de congelamento em conjunto a técnica de adição química para preservação da amostra. A Figura 30 apresenta os valores de DQO na amostra após a coleta (bruta), e após o congelamento sem adição de ácido clorídrico (37%) e com adição de HCl.

FIGURA 30 - Valores de DQO na vinhaça bruta e após o congelamento com adição de HCl



Durante o congelamento, a adição de HCl potencializou a redução de DQO na vinhaça. A redução para a amostra sem adição de ácido foi de 25,42%. As amostras com 3ml.L⁻¹ e com 5 mL.L⁻¹ foram, respectivamente de 28,19 e 39,10%. Mesmo com o congelamento e a adição de ácido não foi possível conservar a amostra.

Essas mudanças podem representar ações biológicas e alterações nos compostos químicos (ANA; CETESB, 2011) que não foram minimizadas pelas técnicas aplicadas.

Assim, o uso da vinhaça *in natura* é o recomendado para experimentos para representatividade e reprodutibilidade.

4.2.4. Momento 4

Os ensaios referentes ao Momento 4 foram realizados de acordo com o descrito na seção 3.6. Para o Momento 4, uma nova vinhaça de cana-de-açúcar foi coletada.

Os valores de DQO inicial, NTK inicial e Fosfato inicial são demonstrados na Tabela 13. Os valores foram obtidos a partir da diluição de vinhaça em meio BBM ou em água destilada nas proporções indicadas.

Tabela 13 - Códigos dos ensaios do momento 4, porcentagens de diluição e valores iniciais de DQO, NTK e P.

Código	Vinhaça (%)	BBM (%)	Água (%)	DQO inicial (g.L ⁻¹)	NTK inicial (mg.L ⁻¹)	Fosfato inicial (mg.L ⁻¹)	Relação N:P
A4	0	100	0	11,28	31,17	19,68	1,58:1
B4	10%*	0	90	3,02	37,92	2,97	12,75:1
C4	30%*	0	70	9,07	113,76	8,92	12,75:1
D4	30%	0	70	15,12	189,60	14,87	12,75:1
E4	10%*	90	0	13,18	65,97	20,69	3,19:1
F4	30%*	70	0	16,97	135,58	22,70	5,97:1
G4	30%	70	0	23,02	211,42	28,64	7,38:1

* Vinhaça diluída

O crescimento na microalga *N. oleoabundans* no momento 4 pode ser visualizado na Figura 31. Na Tabela 14 são descritos a taxa de crescimento específico (μ) e a biomassa máxima para cada experimento. O experimento teve uma duração de 20 dias.

FIGURA 31 - Crescimento da *N. oleoabundans* durante o momento 4.

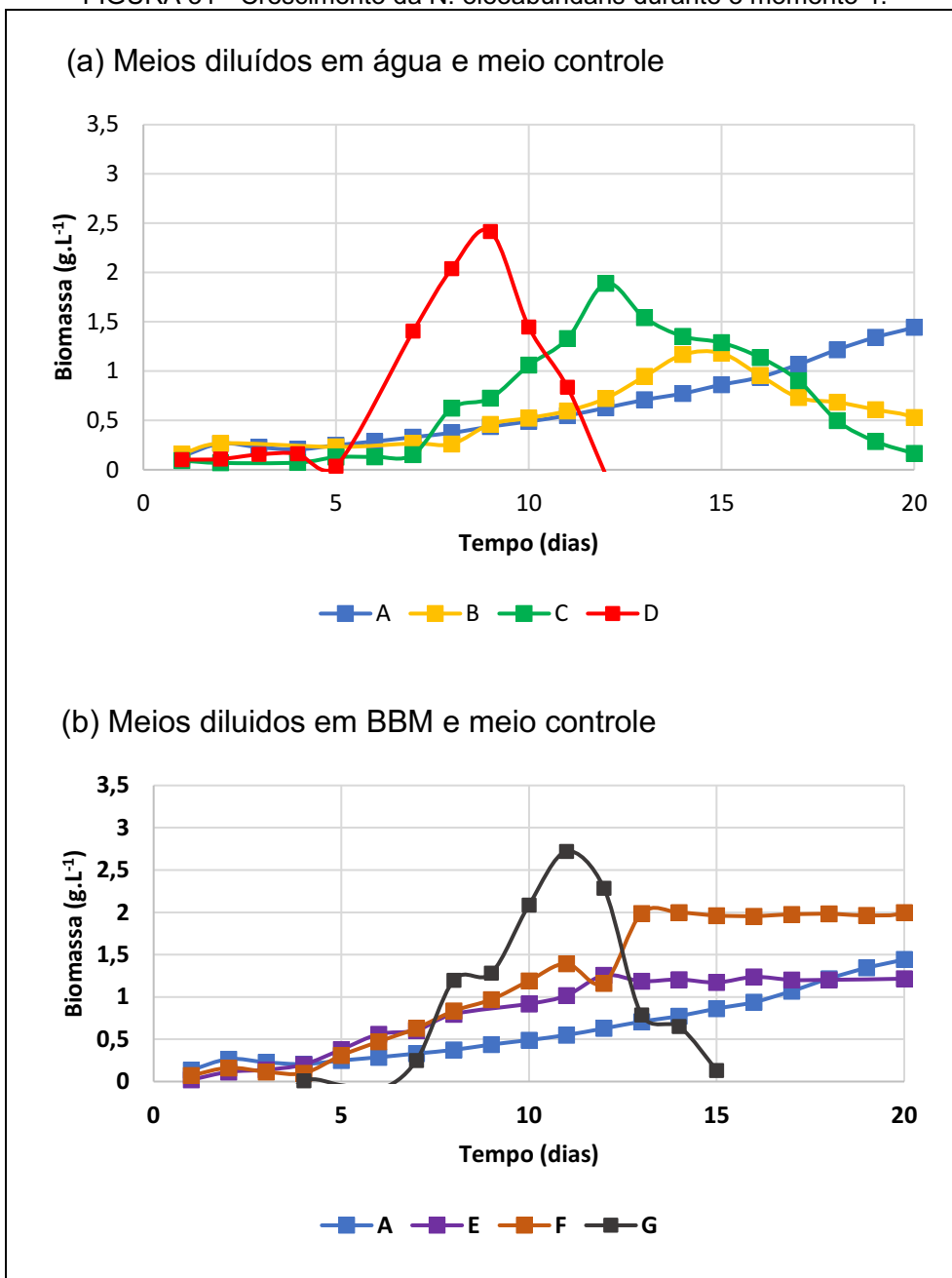


TABELA 14 - Taxa de crescimento específico e produção de biomassa máxima.

Código	μ (dia ⁻¹)	Biomassa máxima produzida (g.L ⁻¹)
A4	0,1168	1,45
B4	0,1070	1,18
C4	0,5010	1,89
D4	1,0550	2,42
E4	0,2399	1,26
F4	0,3326	1,39
G4	0,5984	2,72

Em meio BBM (A4 em azul), a microalga *N. oleoabundans* obteve uma produção máxima de biomassa de 1,45 g.L⁻¹ e uma taxa de crescimento específica de 0,1168 d⁻¹. O ensaio apresentou uma fase de adaptação de 5 dias, seguida da fase exponencial que permaneceu até o final do experimento.

Nos ensaios com vinhaça diluída em água (Figura 31 - a), a microalga foi capaz de se desenvolver no meio preparado. Em todos os ensaios ocorreram a fase de adaptação, fase log e posteriormente a fase de declínio. A vinhaça foi capaz de suplementar o crescimento, mas não de fornecer nutrientes suficientes para promover a fase estacionária. Ao aumentar a concentração de vinhaça ocorreu o pico máximo de biomassa mais rápido assim como também a queda da curva.

Nas concentrações de 10 e 30% de vinhaça diluída em água, após a correção, foi verificado valores de biomassa produzida de 1,18 e 1,89 g.L⁻¹, respectivamente. As taxas de crescimento específica foram de 0,1070 e 0,5010, na mesma ordem. Em comparativo com o meio BBM, o ensaio B4 apresentou taxas inferiores, o que pode ocorrer devido a concentração de fosfato disponível no meio com vinhaça ser menor que disponível no controle. O ensaio C4, apresentou valores superiores.

Na concentração de 30% vinhaça diluída em água, sem correção, foi verificado um pico de biomassa produzida de 2,42 g.L⁻¹ e uma taxa de crescimento específica de 1,0550 dia⁻¹. Em comparativo com o meio BBM, as taxas foram superiores, o que pode ocorrer devido a relação N:P ser superior ao controle.

A relação N:P para os ensaios B4 (em laranja), C4 (em verde) e D4 (em vermelho) foi igual de 12,75:1. Quanto maior foi a concentração de vinhaça diluída em água maior foi o valor de biomassa máxima obtida e maior foi a taxa de crescimento específica.

Nas concentrações de vinhaça corrigida e diluída em meio BBM (E4 em roxo e F4 em marrom na Figura 31 – b), ocorre, diferente dos casos anteriores, a presença da fase estacionária. Na concentração de 30% de vinhaça sem correção ocorreu o declínio após a fase log, onde apesar de ter ocorrido a maior concentração de biomassa, a vinhaça pode ter inibido a estabilidade do crescimento.

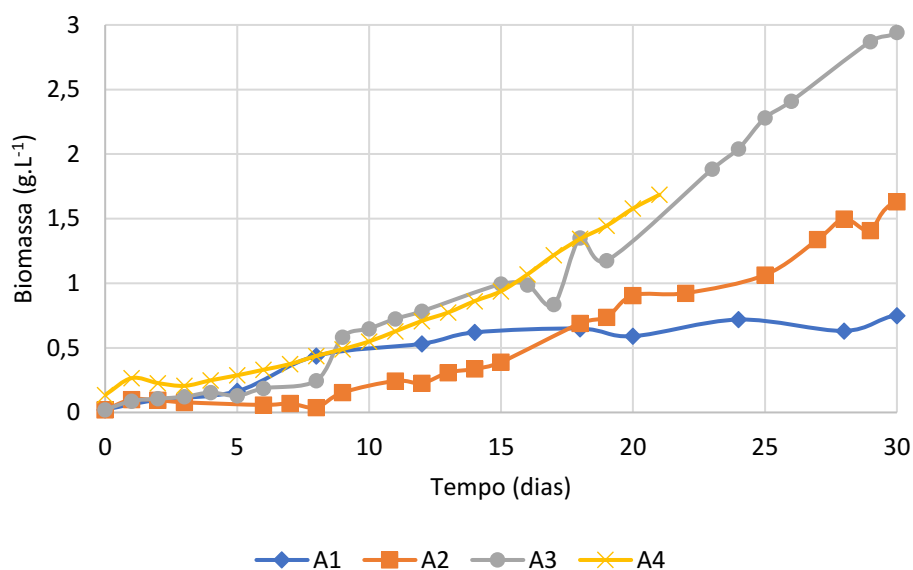
O ensaio E4 apresentou a produtividade máxima de $1,26 \text{ g.L}^{-1}$ no início da fase estacionária que se iniciou ao 12º dia.

Ao aumentar concentração de vinhaça em meio BBM, aumentou-se a taxa específica de crescimento em todos os ensaios desse grupo, com valores superiores ao meio controle, mostrando assim que a vinhaça foi capaz de impulsionar a produção de biomassa. Porém, na concentração de 30% não corrigida, o cultivo apresentou a fase de queda, apresentando toxicidade para as microalgas.

4.2.5. Comparação entre os momentos

A Figura 32 apresenta a comparação entre o comportamento da microalga *N. oleoabundans* durante os momentos 1, 2, 3 e 4 no meio BBM (controle).

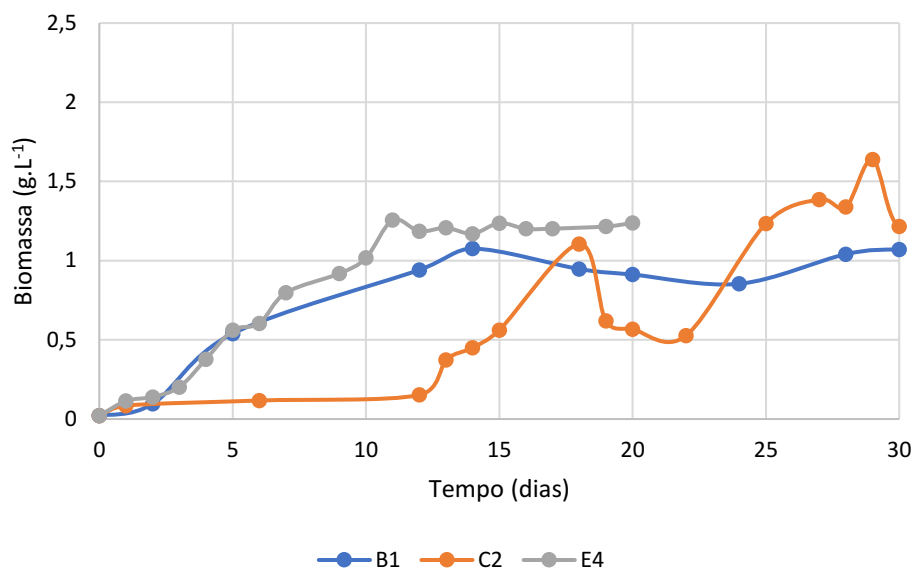
Figura 32 - Comparação da *N. oleoabundans* em meio BBM para os 4 momentos.



Ao comparar os momentos, percebe-se que as microalgas possuíram comportamentos com algumas diferenças. Isso ocorreu, pois, as microalgas ao serem inoculadas no próximo momento estavam mais adaptadas ao meio e as condições de cultivo em que foram submetidas resultaram assim em maiores produções de biomassa.

A Figura 33 apresenta a comparação entre o comportamento da microalga *N. oleoabundans* durante os momentos 1, 2 e 4 no meio com 10% de vinhaça em meio BBM.

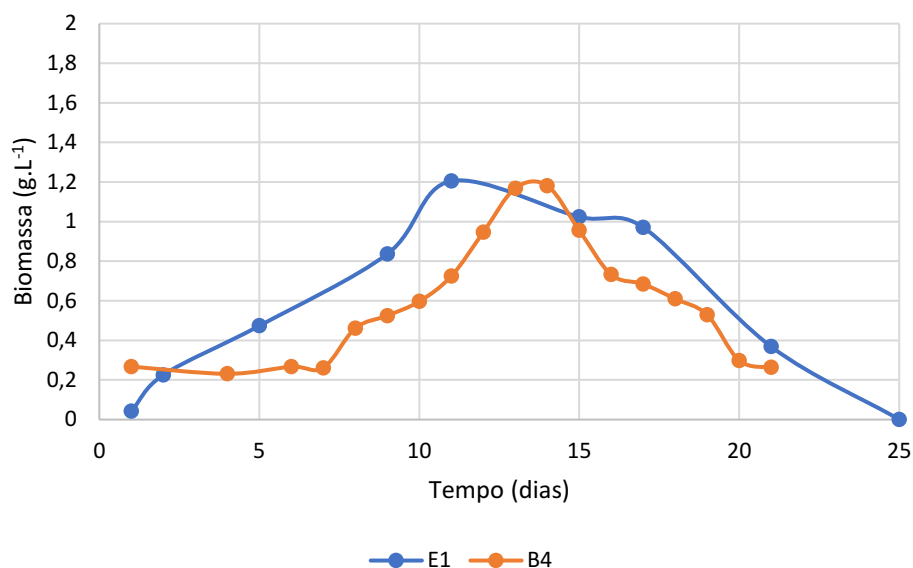
Figura 33 - Comparação da *N. oleoabundans* em meio 10% vinhaça em BBM



No momento 1, a curva apresentou uma curta fase de adaptação, seguida de uma fase exponencial e a fase estacionária. Para o momento 2, uma longa fase de adaptação foi apresentada, o que pode ser resultado pelas propriedades físico-química da vinhaça terem sido alteradas durante o processo de congelamento. No momento 4, o meio preparado com uma nova vinhaça *in natura* (Coleta 2) apresentou comportamento com as mesmas características ao Momento 1.

A Figura 34 apresenta a comparação entre o comportamento da microalga *N. oleoabundans* durante os momentos 1 e 4 no meio com 10% de vinhaça diluída em água destilada.

Figura 34 - Comparação da *N. oleoabundans* em meio 10% vinhaça em BBM

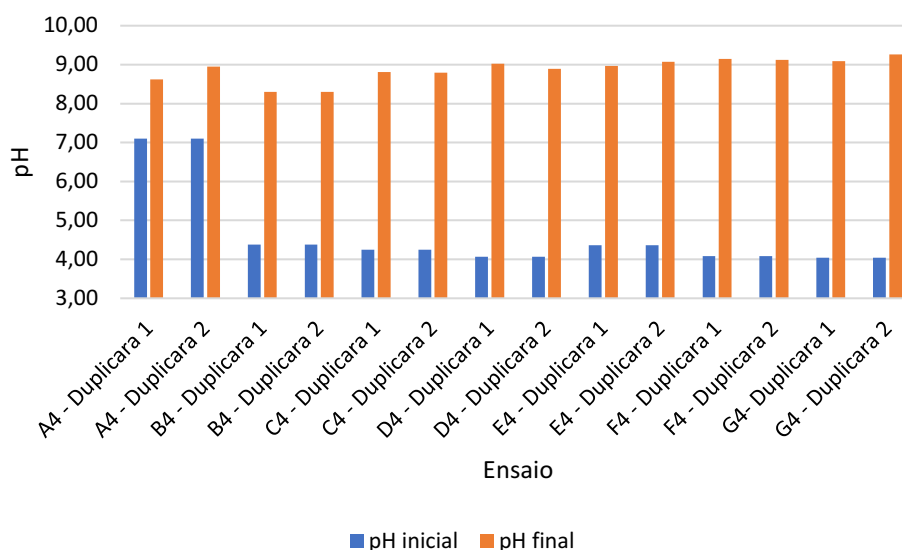


Em ambos os casos, com 10% de vinhaça diluída em água destilada, as curvas apresentaram comportamentos parecidos, mostrando que a vinhaça fornece condições nutricionais que promovem o crescimento da microalga *N. oleoabundans*. No momento 2 foi apresentado uma fase de adaptação pela microalga pelo período de 7 dias, o que pode ter sido causado pela diferença nutricional encontrada entre a vinhaça da coleta 1 e da coleta 2.

4.2.6. Tratamento de efluentes

Para o momento 4, foi realizado a medição de pH inicial e ao final do cultivo da microalga. A variação do pH nos ensaios pode ser verificada na Figura 35.

Figura 35 - Variação de pH em cada duplicata do momento 4.



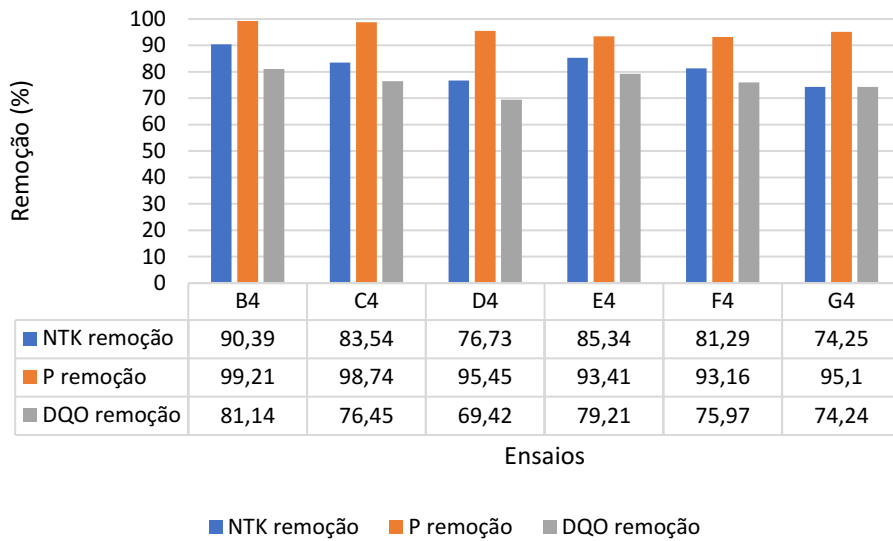
Em todos os ensaios o pH inicialmente foi de caráter ácido, com exceção do meio BBM que estava na neutralidade. Após o cultivo, o pH subiu em todos os ensaios e foi de caráter alcalino. O consumo de CO₂ dissolvido no meio pode ser um fator em que ocorreu a elevação do parâmetro devido a diminuição da concentração do composto.

O pH da vinhaça também subiu para a faixa de alcalinidade na pesquisa de Sydney et al. (2019). A vinhaça após o cultivo da *N. oleoabundans* apresentou pH próximo de 10.

Nesse pH ocorre também a predominância de carbono na forma de carbonato e bicarbonato, que podem ser assimilados pelas microalgas no cultivo mixotrófico (OLGUIN et al., 2015).

A Figura 36 apresenta a taxa de remoção de DQO, NTK e P após o cultivo da microalga *N. oleoabundans* no momento 4.

Figura 36 - Taxas de remoção de DQO, NTK e P após o cultivo da microalga *N. oleoabundans*.



As taxas de remoção de nutrientes no meio foram consideradas satisfatórias. Para os meios com vinhaça diluída em água (B4, C4 e D4) as taxas de remoção foram superiores a 76%, 95% e 69% para os parâmetros NTK, P e DQO, respectivamente. Para os meios preparados com a diluição de vinhaça em meio BBM, as taxas de remoção foram superiores a 74%, 93% e 74%, respectivamente, para NTK, P e DQO.

Durante o cultivo, a microalga realizou a assimilação de nutrientes presentes no meio para a produção de biomassa, realizando com eficiência o tratamento biológico do efluente. Com o pH próximo de 9 podemos atribuir parte da remoção de nutrientes pela volatilização da amônia e a precipitação de fósforo.

Assim como relatado por Wang; Lan (2011), assume-se a remoção de fósforo pela combinação da assimilação biológica do fosfato pelas microalgas e pela precipitação pela elevação do pH da cultura. Assim como parte da diminuição da remoção de nitrogênio pode ser assumida pela volatilização da amônia.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo da microalga *N. oleoabundans* em vinhaça de cana-de-açúcar, de modo geral, apresentaram bom crescimento. A técnica de tratamento biológico do efluente com microalgas é uma alternativa promissora. Além de elevadas taxas de produtividade, as taxas de remoção de nutrientes foram satisfatórias.

Em meios somente com vinhaça diluída foi observado maiores taxas de crescimento e produtividade quando comparados com os meios preparados com a mistura de vinhaça e BBM. Assim, a vinhaça foi capaz de suplementar o crescimento da microalga.

O congelamento da vinhaça como método de padronização, para garantir a reprodutibilidade e repetibilidade do experimento, apresentou alterações físico-químicas mesmo sobre temperaturas negativas.

A técnica de medição de produção de biomassa por espectrofotometria para vinhaça apresentou problemas na leitura de densidade óptica. O uso de técnicas como medida de peso seco poderia ser mais adequado.

REFERÊNCIAS

- ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. **Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review***Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 12 ago. 2015.
- ALBARELLI, J. Q. et al. Comparison of extraction techniques for product diversification in a supercritical water gasification-based sugarcane-wet microalgae biorefinery: Thermo-economic and environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 201, p. 697–705, 10 nov. 2018a.
- ALBARELLI, J. Q. et al. Product diversification in the sugarcane biorefinery through algae growth and supercritical CO₂ extraction: Thermal and economic analysis. **Renewable Energy**, v. 129, p. 776–785, 1 dez. 2018b.
- ALMOMANI, F. A.; ÖRMECI, B. Performance Of *Chlorella Vulgaris*, *Neochloris Oleoabundans*, and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent, secondary effluent and centrate. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 280–289, 1 out. 2016.
- ALTENHOFEN DA SILVA, M. et al. Heterotrophic growth of green microalgae *desmodesmus subspicatus* in ethanol Distillation wastewater (Vinasse) and lipid extraction with supercritical CO₂. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 573–579, 1 mar. 2017.
- ALTUNOZ, M. et al. Combined effects of LED lights and chicken manure on *Neochloris oleoabundans* growth. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1261–1268, 2017.
- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D. et al. Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. **Algal Research**, v. 24, p. 477–485, 1 jun. 2017.
- AMARAL, M. C. S. et al. Microfiltration of vinasse: Sustainable strategy to improve its nutritive potential. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 6, p. 1434–1441, 1 mar. 2016.
- ANDRADE, D. S.; TELLES, T. S.; LEITE CASTRO, G. H. **The Brazilian microalgae production chain and alternatives for its consolidation***Journal of Cleaner Production* Elsevier Ltd, , 20 mar. 2020.
- ANYANWU, R. C. et al. Microalgae Cultivation Technologies. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2018.
- BALDISSEROTTO, C. et al. Salinity promotes growth of freshwater *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185 (Sphaeropleales, Chlorophyta): Morphophysiological aspects. **Phycologia**, v. 51, n. 6, p. 700–710, nov. 2012.
- BARRERA, E. L. et al. A comparative assessment of anaerobic digestion power plants as alternative to lagoons for vinasse treatment: Life cycle assessment

and exergy analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 113, p. 459–471, 1 fev. 2016.

BEIGBEDER, J. B.; BOBOESCU, I. Z.; LAVOIE, J. M. Thin stillage treatment and co-production of bio-commodities through finely tuned *Chlorella vulgaris* cultivation. **Journal of Cleaner Production**, v. 216, p. 257–267, 10 abr. 2019.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 25 out. 2017a.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, 25 out. 2017b.

CALIXTO, C. D. et al. Biochemical compositions and fatty acid profiles in four species of microalgae cultivated on household sewage and agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 438–446, 1 dez. 2016.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. Growth of *Chlorella vulgaris* in treated conventional and biodigested vinasses. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 1, p. 45–53, 1 fev. 2017.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, v. 30, p. 79–85, 1 mar. 2018.

CHEN, H.; WANG, Q. **Microalgae-based nitrogen bioremediation** *Algal Research* Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

COLLING KLEIN, B.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. **Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2018a.

COLLING KLEIN, B.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. **Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2018b.

COSTA, J. A. V. et al. **Operational and economic aspects of Spirulina-based biorefinery** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. **Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 maio 2016.

DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465–9473, 26 abr. 2016.

DE MENDONÇA, H. V. et al. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: Comparison between batch and continuous operation. **Science of the Total Environment**, v. 633, p. 1–11, 15 ago. 2018.

DE SOUZA DIAS, M. O. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 1 jul. 2015.

DIAS, C. et al. **Yeast and microalgal symbiotic cultures using low-cost substrates for lipid production** *Bioresource Technology Reports* Elsevier Ltd, , 1 set. 2019.

DOS SANTOS, R. R. et al. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 1 mar. 2016.

ENAMALA, M. K. et al. **Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 out. 2018a.

ENAMALA, M. K. et al. **Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 out. 2018b.

ENGIN, I. K. et al. Evaluation of heterotrophic and mixotrophic cultivation of novel *Micractinium* sp. ME05 on vinasse and its scale up for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 251, p. 128–134, 1 mar. 2018.

EPE - Balanço Energético Nacional (2019). [s.d.].

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. **Vinasses: Characterization and treatments** *Waste Management and Research*, dez. 2011.

FERREIRA, G. F. et al. **A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 jul. 2019.

FIGUEIREDO, P. N. Micro-level technological capability accumulation in developing economies: Insights from the Brazilian sugarcane ethanol industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 167, p. 416–431, 20 nov. 2017.

FILOSO, S. et al. **Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2015.

FRANCHINO, M. et al. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. **Chemosphere**, v. 92, n. 6, p. 738–744, 2013.

FRANCISCO, J. P. et al. Variations in the chemical composition of the solution extracted from a Latosol under fertigation with vinasse. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 2, p. 229–239, 2016.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. **A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment***Algal Research* Elsevier B.V., , 1 jun. 2017a.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. **A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment***Algal Research* Elsevier B.V., , 1 jun. 2017b.

GUPTA, S.; PAWAR, S. B.; PANDEY, R. A. **Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries***Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 15 out. 2019.

GUTIERREZ, J. et al. Ammonia inhibition in oleaginous microalgae. **Algal Research**, v. 19, p. 123–127, 1 nov. 2016.

HOARAU, J. et al. **Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review***Journal of Water Process Engineering* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2018a.

HOARAU, J. et al. Sugarcane distillery spent wash, a new resource for third-generation biodiesel production. **Water (Switzerland)**, v. 10, n. 11, 9 nov. 2018b.

JANKOWSKA, E.; 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* Elsevier Ltd, , 2017a.

JANKOWSKA, E.; 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* Elsevier Ltd, , 2017b.

KADIR, W. N. A. et al. **Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review***Energy Conversion and Management* Elsevier Ltd, , 1 set. 2018.

KRISHNAMOORTHY, S.; MANICKAM, P.; MUTHUKARUPPAN, V. Evaluation of distillery wastewater treatability in a customized photobioreactor using blue-green microalgae – Laboratory and outdoor study. **Journal of Environmental Management**, v. 234, p. 412–423, 15 mar. 2019.

KUMAR, D.; SINGH, B. **Algal biorefinery: An integrated approach for sustainable biodiesel production***Biomass and Bioenergy* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2019.

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. Neochloris oleoabundans grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 40–49, jan. 2011.

LI, K. et al. **Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review***Bioresource Technology*Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.

LOERA-QUEZADA, M. M.; ÁNGELES, G.; OLGUÍN, E. J. **Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of Neochloris oleoabundans***Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*. [s.l.: s.n.].

MARAFON, A. C. et al. Use of sugarcane vinasse to biogas, bioenergy, and biofertilizer production. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 179–194.

MELO, R. G. DE et al. Chlorella vulgaris mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, v. 204, p. 344–350, 1 ago. 2018.

MENEGAZZO, M. L.; FONSECA, G. G. **Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review***Renewable and Sustainable Energy Reviews*Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019a.

MENEGAZZO, M. L.; FONSECA, G. G. **Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review***Renewable and Sustainable Energy Reviews*Elsevier Ltd, , 1 jun. 2019b.

MOBIN, S. M. A.; CHOWDHURY, H.; ALAM, F. **Commercially important bioproducts from microalgae and their current applications-A review**. *Energy Procedia. Anais...*Elsevier Ltd, 2019.

MONTALVO, G. E. B. et al. Arthrospira maxima OF15 biomass cultivation at laboratory and pilot scale from sugarcane vinasse for potential biological new peptides production. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 103–113, 1 fev. 2019.

MORALES-SÁNCHEZ, D. et al. Culturing Neochloris oleoabundans microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 61–69, 2014.

NAGAPPAN, S. et al. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. **Fuel**, v. 252, p. 339–349, 15 set. 2019.

OLGUÍN, E. J. **Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery***Biotechnology Advances*, set. 2012.

OLGUÍN, E. J. et al. Population dynamics in mixed cultures of Neochloris oleoabundans and native microalgae from water of a polluted river and isolation

- of a diatom consortium for the production of lipid rich biomass. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 705–715, 25 set. 2013.
- OLGUÍN, E. J. et al. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1813–1822, 30 out. 2015.
- PRAZERES, A. R. et al. Treatment of vinasse from sugarcane ethanol industry: H₂SO₄, NaOH and Ca(OH)₂ precipitations, FeCl₃ coagulation-flocculation and atmospheric CO₂ carbonation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 4, 1 ago. 2019.
- RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 630–635, 2014.
- RASHIDI, B. et al. *Neochloris oleoabundans* cell walls have an altered composition when cultivated under different growing conditions. **Algal Research**, v. 40, 1 jun. 2019.
- RASHIDI, B.; TRINDADE, L. M. Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga *Neochloris oleoabundans* cell wall. **Algal Research**, v. 35, p. 152–159, 1 nov. 2018.
- RASTOGI, R. P. et al. **Algal Green Energy – R&D and technological perspectives for biodiesel production** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2018.
- REIS, C. E. R.; HU, B. **Vinasse from sugarcane ethanol production: Better treatment or better utilization?** *Frontiers in Energy Research* Frontiers Media S.A., , 10 abr. 2017.
- SAJJADI, B. et al. **Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2018.
- SANCHEZ RIZZA, L. et al. A semi-closed loop microalgal biomass production-platform for ethanol from renewable sources of nitrogen and phosphorous. **Journal of Cleaner Production**, v. 219, p. 217–224, 10 maio 2019.
- SANTANA, H. et al. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133–140, 2017.
- SANTOS, F. et al. By-products of the sugarcane industry. In: **Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 21–48.
- SEREJO, M. L. et al. *Chlorella vulgaris* growth on anaerobically digested sugarcane vinasse: Influence of turbidity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, 2021.

SILVA, H. R. et al. Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions. **AMB Express**, v. 6, n. 1, 2016.

SINGH, S. P.; SINGH, P. **Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review** **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 30 maio 2015.

SOLOVCHENKO, A. et al. **Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae** **Biotechnology Advances** Elsevier Inc., , 1 set. 2016.

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

SYDNEY, E. B. et al. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production. **Bioresource Technology**, v. 292, 1 nov. 2019a.

SYDNEY, E. B. et al. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production. **Bioresource Technology**, v. 292, 1 nov. 2019b.

SYDNEY, E. B. et al. Microalgal biorefineries: Integrated use of liquid and gaseous effluents from bioethanol industry for efficient biomass production. **Bioresource Technology**, v. 292, 1 nov. 2019c.

VON SPERLING, Marcos. Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4 ed. Belo Horizonte. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

WANG, B.; LAN, C. Q. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5639–5644, maio 2011.

WOESE, C. R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M. L. **Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya (Euryarchaeota/Crenarchaeota/kingdom/evolution)** **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**. [s.l.: s.n.].

YOUSUF, A. Fundamentals of microalgae cultivation. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–9.

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**, v. 42, n. 12, p. 8505–8517, 23 mar. 2017.