

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

DISSERTAÇÃO

**POTENCIAL DO CULTIVO DE *CHLORELLA* sp. PARA
BIORREMEDIÇÃO DE EFLUENTES DE LEITE DE SOJA E
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

JACOB SANTANA DE LIMA NETO

2025



UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

**POTENCIAL DO CULTIVO DE *CHLORELLA* sp. PARA
BIORREMEDIÇÃO DE EFLUENTES DE LEITE DE SOJA E
PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS**

JACOB SANTANA DE LIMA NETO

Sob a Orientação do Professor
HENRIQUE VIEIRA DE MENDONÇA

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Agrícola e
Ambiental, no Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Agrícola e
Ambiental, Área de Concentração **em**
Meio Ambiente

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2025

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L472p Lima Neto, Jacob Santana de, 1996-
Potencial do cultivo de Chlorella sp. para
biorremediação de efluentes de leite de soja e produção
de biocombustíveis / Jacob Santana de Lima Neto. -
Seropédica-RJ, 2025.
64 f.: il.

Orientador: Henrique Vieira de Mendonça.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Agrícola e Ambiental, 2025.

1. Microalgas. 2. Tratamento de águas residuárias
agroindustriais. 3. Lipídios. 4. Biodiesel. 5.
Biofixação de CO₂. I. Mendonça, Henrique Vieira de ,
1984-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Agrícola e Ambiental III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.**

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

JACOB SANTANA DE LIMA NETO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Agrícola e Ambiental**, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental, Área de Concentração em Meio Ambiente.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 27/02/2025

Membros da Banca:

Henrique Vieira de Mendonça, D.Sc, UFRRJ (Orientador/Presidente da Banca)

Conan Ayade Salvador, D.Sc, UFRRJ

Glicélia Pereira Silva, D.Sc, UNIFIMES (Externo à Instituição)

Renata Vilas Bôas, Ph.D, PPGEQ - IT UFRRJ (Externo ao Programa)



ATA Nº 84 Defesa de mestrado JACOB SANTANA DE LIMA NETO /2025 - PPGEAAMB

(12.28.01.00.00.00.40)

(Nº do Documento: 531)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 11:42)
CONAN AYADE SALVADOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEPTOENG (12.28.01.00.00.00.44)
Matricula: ###318#2

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 11:41)
HENRIQUE VIEIRA DE MENDONCA
COORDENADOR CURS/POS-GRADUACAO
PPGEAAMB (12.28.01.00.00.00.40)
Matricula: ###331#3

(Assinado digitalmente em 06/03/2025 16:53)
GLICÉLIA PEREIRA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.231-##

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 19:21)
RENATA DE NAZARÉ VILAS BÓAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ####.###.236-##

(Assinado digitalmente em 28/02/2025 14:36)
JACOB SANTANA DE LIMA NETO
DISCENTE
Matricula: 2023#####6

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, acima de tudo, a Deus Pai, Filho e Espírito Santo, bem como à Santíssima Virgem Maria e a São José, que foram meus guias ao longo desta jornada, fortalecendo-me nos momentos de incerteza.

Dedico também aos meus familiares, especialmente à minha mãe Nilva, por seu amo e incansável apoio na minha formação pessoal e profissional, e à minha mãe Cléria (in memoriam), que me deu a vida e cuja presença, mesmo na ausência, segue sendo fonte de força e inspiração.

“É justo que muito custe o que muito vale!” Santa Tereza d’Ávila (Doutora da Igreja)

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força e sabedoria, pelo dom da vida e por me sustentar em cada passo até aqui.

A minha mãe Nilva Severina de Oliveira Santana, pelo amor incondicional, pelo apoio constante desde o início e pelas orações que sempre me fortaleceram, minha eterna gratidão.

Aos meus tios Maria Estela, Marcos Emílio, Iamaque, Lázaro e Cleonice, e meus irmãos Jonathan e Jaqueline por acreditarem em meu potencial e estarem comigo nesta batalha.

Ao meu orientador, professor Henrique Vieira de Mendonça, pela orientação, conselhos, amizade, paciência e oportunidade de aprendizado acadêmico e profissional.

À professora Marisa Fernandes Mendes e Renata Vilas Bôas do PPGEQ/UFRRJ, pelo suporte na execução das análises realizadas nesta pesquisa.

À EMBRAPA Gado de Leite e seus funcionários pelo suporte prestado.

À Mônica Santos pelos conselhos nos momentos de provações e por ter me ajudado a permanecer firme nessa jornada de pós-graduação. Sou extremamente grato a você.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Mônica Santos, Andressa Blasi, Cecília Mattos e Camila Motta, pela parceria nas diversas etapas deste trabalho.

A todos os integrantes do Grupo de Pesquisa em Microalgas e Interfaces (GPMI) e do Laboratório de Tecnologias Ambientais e Bioenergia (LabTec) pelo apoio ao longo desta trajetória.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental (PGEAAmb) pela oportunidade de especialização. Minha gratidão se estende a todos os funcionários, professores e pesquisadores, de modo especial professor Conan Ayade Salvador pela colaboração ao longo dessa jornada.

Aos amigos, familiares e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho, meu sincero agradecimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Jacob Santana de Lima Neto, nascido em 11 de janeiro de 1996, no município de Mineiros, sudoeste do estado de Goiás. Filho de Cléria Maria Severina Santana (*in memoriam*), que lhe deu a vida e deixou um legado de força e amor. Criado por sua avó materna, Nilva Severina de Oliveira Santana, que foi mais que avó, foi mãe, presença, cuidado, amor e base em minha formação. Sobrinho de Maria Estela, Marcos Emílio, Iamaque, Lázaro e Cleonice. Irmão de Jonathan Alves Santana e Jaqueline Alves Santana, com quem compartilhou laços de afeto e muitas histórias. Também padrinho orgulhoso de Isadora, Verônica, Yan, Adrian, Roger, Sarah e João, que iluminam sua vida com alegria e significado. Aprendeu desde cedo na família o sentido da palavra amor e o respeito ao próximo. Cresceu em um lar genuinamente católico, onde os valores cristãos eram ensinados pelo exemplo, pela fé vivida no cotidiano e pela prática da solidariedade. Cursou o Ensino Fundamental I na Escola Municipal Professor Salviano Neves Amorim e o Ensino Fundamental II e Ensino Médio no Colégio Estadual Polivalente Antônio Carlos Paniago, onde se tornou membro do conselho escolar e representante estudantil pela União Brasileira dos Estudantes Secundaristas – UBES, lutando desde jovem em congressos estadual e nacional da União Nacional dos Estudantes – UNE pelos anseios da educação básica e técnica e atuando ativamente na defesa e no fortalecimento dos direitos estudantis. Posteriormente graduou-se como Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária pelo Centro Universitário de Mineiros – UNIFIMES (2020). Goiano de coração, filho do Cerrado, sempre nutriu um profundo respeito e admiração pelo bioma que o viu crescer. Essa conexão foi o que o impulsionou a seguir na área ambiental, como forma de contribuir para a sustentabilidade dos recursos naturais, o solo, a água, mata e ar, tão essenciais à vida e à preservação do seu território de origem. Atuou profissionalmente na área de Segurança, Saúde e Meio Ambiente em empresa voltada à produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, onde surgiu o interesse por energias limpas e renováveis. Assim, em fevereiro de 2023, ingressou no Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental – PGEAAmb, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Tal oportunidade oferecida pela instituição, consolida-se não apenas como um sonho, mas como uma forma concreta de retribuir à sociedade e ao meio ambiente, por meio da pesquisa científica, tudo que já conquistou ao longo da sua trajetória.

RESUMO

LIMA NETO, Jacob Santana de. **Potencial do Cultivo de *Chlorella* sp. para Biorremediação de Efluentes de Leite de Soja e Produção de Biocombustíveis.** 2025, 64p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola e Ambiental). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

As mudanças climáticas são intensificadas pelas emissões de CO₂ do uso de combustíveis fósseis, criando uma necessidade urgente de alternativas sustentáveis. Biocombustíveis de terceira geração, como os de microalgas, mitigam essas emissões por meio da biorremediação de efluentes e captura de CO₂. Uma fonte significativa de efluente é a produção de leite de soja, que representa uma ameaça aos ecossistemas aquáticos quando descartados de forma inadequada. Nesse sentido o objetivo desta pesquisa foi avaliar cultivo de *Chlorella* sp. em efluente de leite de soja (SMW) para fins de biorremediação e produção de biocombustíveis. A pesquisa foi conduzida no município de Seropédica, RJ, Brasil. Seis tratamentos foram conduzidos em dois fotobiorreatores (FBRs) considerando três concentrações da SMW, 10, 20 e 30 mL L⁻¹, e duas condições de suplementação de CO₂, sem adição e com adição de CO₂ a 2% v/v. Os FBRs foram iluminados continuamente com 6 lâmpadas de LED com potência de 40 W cada. Parâmetros físicos diários, como pH, temperatura e irradiância, foram monitorados, e a cinética do tratamento de águas residuais foi analisada medindo nitrogênio total (N), amônio (NH₄⁺), demanda química de oxigênio (DQO) e carbono orgânico total (COT). A extração de lipídios e a análise de ácidos graxos foram conduzidas para avaliação do biodiesel. Um Delineamento Composto Central (CCD) foi inicialmente realizado, com dois fatores independentes (temperatura e irradiância) e densidade óptica (DO) como variável de resposta, modelada por meio de gráficos de superfície de resposta gerados no software R (v. 4.2.3). A biorremediação foi avaliada por meio da verificação da eficiência de remoção de N, NH₄⁺, DQO e COT. Por fim, a análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey ($p < 0,05$), no software R (v. 4.2.3). A extração lipídica foi realizada com clorofórmio pelo método de Randall e Twisselmann no equipamento VELP Scientifica modelo ELS SER 148/3 e os lipídios foram convertidos em ésteres metílicos (FAMEs) por transesterificação. Com base nas análises realizadas, os tratamentos resultaram em uma produção de biomassa seca variando entre 1,4 e 3,2 g L⁻¹ e apresentaram de 78 a 98%

de eficiência de remoção para N, NH_4^+ , DQO e COT. O tratamento que apresentou melhor desempenho na produção de lipídios, proteínas e carboidratos, foi o FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, com composição de 12,24%; 51,67% e 25,67% respectivamente. Além disso, o cultivo de microalgas no sistema atingiu uma taxa de biofixação de CO₂ de 44,96 Mg ano⁻¹. A qualidade do biodiesel atendeu aos padrões internacionais e nacionais, incluindo ASTM D6751 (2024) e ANP (2024). O tratamento com FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ apresentou produtividade e rendimentos significativos de biodiesel. Esses resultados demonstram que o cultivo de *Chlorella* sp. em FBRs usando SMW é uma solução promissora para tratamento de águas residuárias e produção de biocombustíveis, contribuindo para a transição energética global.

Palavras-chave: microalgas, tratamento de águas residuárias agroindustriais, lipídios, biodiesel, biofixação de CO₂.

ABSTRACT

LIMA NETO, Jacob Santana de. **Potential of *Chlorella* sp. Cultivation for Bioremediation of Soybean Milk Effluents and Biofuel Production.** 2025, 64p. Dissertation (Master's in Agricultural and Environmental Engineering). Institute of Technology, Engineering Department, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Climate change is intensified by CO₂ emissions from fossil fuel use, creating an urgent need for sustainable alternatives. Third-generation biofuels, such as those derived from microalgae, help mitigate these emissions through wastewater bioremediation and CO₂ capture. A significant source of wastewater is soybean milk production, which poses a threat to aquatic ecosystems when improperly disposed of. In this context, the aim of this research was to evaluate the cultivation of *Chlorella* sp. in soybean milk wastewater (SMW) for bioremediation and biofuel production purposes. The study was conducted in the municipality of Seropédica, RJ, Brazil. Six treatments were carried out in two photobioreactors (PBRs), considering three concentrations of SMW (10, 20, and 30 mL L⁻¹) and two CO₂ supplementation conditions—without addition and with 2% v/v CO₂ addition. The PBRs were continuously illuminated with six 40 W LED lamps. Daily physical parameters such as pH, temperature, and irradiance were monitored, and the kinetics of the wastewater treatment process were analyzed by measuring total nitrogen (N), ammonium (NH₄⁺), chemical oxygen demand (COD), and total organic carbon (TOC). Lipid extraction and fatty acid analysis were conducted to evaluate biodiesel quality. A Central Composite Design (CCD) was initially performed, with two independent factors (temperature and irradiance) and optical density (OD) as the response variable, modeled through response surface graphs generated using R software (v. 4.2.3). Bioremediation efficiency was assessed by evaluating the removal of N, NH₄⁺, COD, and TOC. Statistical analysis of the data was performed using ANOVA, followed by Tukey's test ($p < 0.05$), also in R software (v. 4.2.3). Lipid extraction was carried out with chloroform using the Randall and Twisselmann method in a VELP Scientifica apparatus, model ELS SER 148/3. Lipids were then converted into fatty acid methyl esters (FAMEs) via transesterification. Based on the analyses, the treatments produced between 1.4 and 3.2 g L⁻¹ of dry biomass and showed 78–98% removal efficiency for N, NH₄⁺, COD, and TOC. The treatment with the best performance in lipid, protein, and carbohydrate production

was FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, with compositions of 12.24%, 51.67%, and 25.67%, respectively. Furthermore, the microalgae cultivation system achieved a CO₂ biofixation rate of 44.96 Mg year⁻¹. The biodiesel quality met both international and national standards, including ASTM D6751 (2024) and ANP (2024). The FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ treatment showed significant biodiesel productivity and yield. These results demonstrate that cultivating *Chlorella* sp. in PBRs using SMW is a promising solution for wastewater treatment and biofuel production, contributing to the global energy transition.

Key words: microalgae, agro-industrial wastewater treatment, lipids, biodiesel, CO₂ biofixation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos tratamentos avaliados seguindo diferentes concentrações da água resíduária de leite de soja e condição de suplementação de CO ₂	5
Tabela 2: Caracterização química inicial da água resíduária sintética de leite de soja antes de aplicação dos tratamentos estudados	10
Tabela 3: Parâmetros cinéticos de crescimento de microalgas para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂) em água resíduária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹	21
Tabela 4: Percentuais de biomoléculas detectados na biomassa de <i>Chlorella</i> sp. para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂) em água resíduária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹	25
Tabela 5: Relação C/N na biomassa de microalgas cultivadas em água resíduária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹ , em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂).....	28
Tabela 6: Equações da cinética de remoção e eficiência da biorremediação pós-tratamento com microalgas <i>Chlorella</i> sp. de água resíduária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹ , em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂).	31
Tabela 7: Propriedades físico-químicas do biodiesel extraído de microalgas <i>Chlorella</i> sp. cultivadas em água resíduária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹ , em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂).	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas do preparo experimental para a produção de microalgas: a) separação dos volumes de água resíduária sintética de leite de soja e do inóculo de <i>Chlorella</i> sp.; b) preenchimento dos fotobioreatores com o meio de cultivo; c) preparação do cilindro pressurizado contendo liberação do gás CO ₂ ; e, d) detalhe do fotobioreator sem suplementação de CO ₂ (FBR1) e com suplementação de CO ₂ (FBR2CO ₂).....	5
Figura 2: Identificação microscópica da espécie de microalga presente em cada tratamento	15
Figura 3: Efeito da irradiação/LUX ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura (°C) na densidade óptica – DO para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂) sob as concentrações 10 mL L ⁻¹ (a e b), 20 mL L ⁻¹ (c e d), e 30 mL L ⁻¹ (e e f).....	16
Figura 4: Células de microalgas do gênero <i>Chlorella</i> sp. sob estresse por irradiação excessiva e formação de β – caroteno (coloração amarelada) no exterior da célula de amostras dos fotobioreatores (FBR) com suplementação de 2% de CO ₂ e concentrações do meio de cultivo de 20 e 30 mL L ⁻¹	19
Figura 5: Percentual de produtividade lipídica de microalgas <i>Chlorella</i> sp. cultivadas em água resíduária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹ , em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2CO ₂).	27
Figura 6: Avaliação da eficiência de remoção e cinética do tratamento com <i>Chlorella</i> sp. em água resíduária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L ⁻¹ , em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO ₂ (FBR1 e FBR2 CO ₂).: a) Nitrogênio Total – N; b) Nitrogênio Amoniacal – NH ₄ ⁺ ; c) Demanda Química de Oxigênio – DQO; e d) Carbono Orgânico Total – COT	30
Figura 7: Balanço de massa e melhor produtividade de biodiesel – FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹	39
Figura 8: Balanço de massa e melhor produtividade de biodiesel – FBR2CO2 20 mL L ⁻¹ ..	40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	3
2.1	Água residuária e produção do inóculo de microalgas	3
2.2	Delineamento experimental e cultivo das microalgas	4
2.3	Análises laboratoriais	6
2.3.1	Crescimento da biomassa	6
2.3.2	Características da água residuária de leite de soja.....	10
2.4	Extração de lipídios, proteínas e carboidratos da biomassa de microalgas	11
2.5	Determinação dos ácidos graxos	12
2.6	Balanço de Massa	14
2.7	Análise estatísticas dos dados	14
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1	Efeitos da intensidade luminosa e temperatura no aumento da biomassa de microalgas <i>Chlorella</i> sp.....	14
3.2	Efeitos da suplementação de CO ₂ no aumento da biomassa biofixação de CO ₂	20
3.3	Efeitos da carga de CO ₂ na acumulação de componentes bioquímicos	24
3.4	Biorremediação	29
3.5	Composição de ácidos graxos	34
3.6	Balanço de Massa	39
4	CONCLUSÃO	42
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O grande volume de água utilizada nas indústrias é um dos principais problemas da atualidade. Cerca de 12% da reserva de água doce do mundo é utilizada na indústria e 72% na agricultura (FAO, 2022), tal uso da água na indústria tem como subproduto a geração de águas residuárias. Essa água não apenas é caracterizada pelos grandes volumes, mas também por conterem quantidades expressivas de nutrientes, como componentes orgânicos e substâncias inorgânicas (Saravanan *et al.*, 2023). Salienta-se que um dos segmentos da indústria alimentícia que produz uma quantidade de água residuária significativa é o do processamento do leite de soja.

Afirma Cavalett (2008) que o farelo e o óleo da soja geram respectivamente 1.656,4 e 802,0 litros de efluente $ha^{-1} ano^{-1}$. Além disso, a cada 250 g de soja descascada utilizada na produção do extrato de soja, são gerados 1.493 mL de efluentes, em outras palavras, para cada 1 kg de soja, aproximadamente 6 litros de efluentes são produzidos (Galdeano *et al.*, 2015). Todo esse volume é constituído por cargas orgânicas que causam depleção de oxigênio dos corpos hídricos, além de macro e micronutrientes, que são eutrofizantes, mas, se usados conforme a tecnologia científica já estabelecida podem se tornar excelentes meio de cultura para produção de microalgas mixotróficas (TOMAR, *et al.*, 2022).

Nesse sentido pode destacar ainda que, as microalgas apresentam uma taxa de crescimento da biomassa superior quando comparado a culturas terrestres. Adicionalmente, o tempo de cultivo é relativamente inferior aos demais tipos de biomassas microbianas, e uma produção lipídica promissora para uso na conversão em biodiesel pode ser detectada (KHAIRUDDIN *et al.*, 2023).

Reforçando esse potencial, pesquisas recentes sugerem que tanto o extrato de soja quanto o efluente do extrato de soja apresentaram-se como fontes promissoras de nutrientes para o cultivo de *Chlorella* sp. (KIM *et al.*, 2023). Consequentemente, o aproveitamento da biomassa microalgal não se limita apenas ao tratamento de efluentes, mas também se destaca pelo seu potencial energético, especialmente na produção de biocombustíveis sustentáveis (SARWER *et al.*, 2022).

Com base nessa perspectiva, Tomar *et al.* (2022) apontam que os biocombustíveis que são obtidos a partir de materiais orgânicos, como a biomassa de microalgas, representam atualmente uma alternativa inovadora aos combustíveis de origem fóssil, pois constituem uma

fonte de energia ecologicamente benéfica e pouco explorada dentro do campo de produção do leite de soja, por exemplo. Além disso, possuem o potencial de aprimorar o cenário energético mundial, reduzir a dependência dos combustíveis fósseis, diminuir as emissões de poluentes e aumentar a pegada de carbono durante o cultivo (ABD EL-MALEK *et al.*, 2022; AKTER *et al.*, 2020).

Outro ponto pertinente ao uso das microalgas diz respeito a capacidade de biorremediação das águas residuárias, bem como a de biofixação de dióxido de carbono – CO₂ através da fotossíntese (KIM *et al.*, 2023). Em termos de biofixação têm-se que na produção de 1 kg de biomassa de microalgas pode-se fixar 1,8 kg de CO₂ e remover até 50 vezes mais CO₂ do que na produção de plantas. (RAEESOSSADATI, *et al.*, 2014; SARWER *et al.*, 2022). De acordo com Chisti (2013), cerca de 1,5 bilhões de toneladas de CO₂ tem potencial para gerar aproximadamente 82 milhões de toneladas de biomassa de microalga. Nesse contexto, as microalgas emergem como um método promissor para tratamento de águas residuárias, assim como fonte alternativa de obtenção de combustíveis renováveis, destacando-se como um biorecurso potencial para a geração de produtos de elevado valor agregado como os biocombustíveis (KIM *et al.*, 2023).

A adoção do biocombustível proveniente da biomassa da microalga como fonte de energia renovável surge como uma resposta às questões das mudanças climáticas e a busca na redução da emissão de gases de efeito estufa – GEEs advindos da queima de combustíveis fósseis. Uma vez que os desastres naturais podem resultar nas mudanças do clima, esses afetam as populações em situações de vulnerabilidade, bem como os ecossistemas (Ghaffar *et al.*, 2023).

De acordo com o Relatório Síntese sobre Mudanças Climáticas 2023, da ONU, até o momento a temperatura mundial atingiu a marca de 1,1 °C acima dos níveis pré-industriais, tendo como causa o uso de combustíveis fósseis e o manejo inadequado dos recursos naturais. Sendo assim, têm sido realizadas ações governamentais para redução da emissão de GEEs, dos quais se destaca o CO₂. Tais ações objetivam que a meta de 1,5 °C acima dos níveis pré-industriais, estipulada no Acordo de Paris, seja mantida (IPCC, 2023; WANG, *et al.*, 2022).

Além disso, o levantamento da International Energy Agency destaca que as emissões totais de CO₂ no ano de 2021, período pós pandemia, foi de 40,8 Gt, sendo que esse valor representa um aumento de 2,1 Gt quando comparado ao ano de 2020, período esse que apresentou queda de 5,2% das emissões globais de CO₂. Por outro lado, quando verificada

somente a emissão pelo uso de combustíveis fósseis, cerca de 33,45 Gt ou 82% do total de CO₂ emitidos em 2021 foram provenientes dessa atividade (IEA, 2021).

Sendo assim, a partir do cenário apresentado, essa pesquisa teve como objetivo avaliar cultivo de *Chlorella* sp. em efluente de leite de soja (SMW) para fins de biorremediação e produção de biocombustíveis. Tal investigação se justifica pelos benefícios associados ao uso de microalgas, tanto para biorremediação de água residuária quanto para o cenário de transição energética, bem como pela escassez de estudos sobre o tema em âmbito mundial, especialmente por ter sido realizada em uma região brasileira caracterizada por condições climáticas favoráveis ao cultivo de microalgas ao longo de todo o ano (dos Santos et al., 2021; de Souza et al., 2023).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Água residuária e produção do inóculo de microalgas

A água residuária sintética de leite de soja foi produzida no Laboratório de Tecnologias Ambientais e Bioenergia – LabTec, pertencente ao Instituto de Tecnologia – IT, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, localizada no município de Seropédica/RJ. A escolha pelo uso da água sintética ao invés da água residuária da própria indústria, deu-se ao fato de que as empresas de processamento de leite de soja possuem suas políticas internas para fornecimento de produtos e subprodutos.

Foram produzidos 5 L de água residuária sintética de leite de soja em cada batelada experimental, na qual o volume de trabalho foi dividido em dois FBRs, sendo cada um de 2,5 L. Para a produção da água residuária sintética de leite de soja, fez-se uso da metodologia adaptadas de Souza et al. 2023. A água residuária foi produzida com as seguintes concentrações 10 mL, 20 mL e 30 mL de leite de soja a cada 1L de água de torneira. Cada concentração representou uma etapa experimental, as quais foram realizadas em três repetições. Após a mistura com as concentrações de leite de soja, foi adicionado 2 gotas de detergente neutro a cada 1 L, bem como 2 gotas de ácido fosfórico a cada 2,5 L. A escolha do volume máximo de leite de soja a ser diluído por litro teve como critério a concentração da DQO (Demanda Química de Oxigênio) presente na mistura, sendo o valor estipulado em média 3000 mg L⁻¹. Uma vez que, os padrões de DQO em efluentes de indústrias de leite de soja estão compreendidos entre 3000 e 6000 mg/L (GONÇALVES, 2017).

O inóculo com as microalgas de *Chlorella* sp. utilizadas neste estudo foi retirado do banco de cultivo do LabTec. Em sequência, conduziu-se o cultivo do volume de inóculo necessário para etapa de produção de microalgas, sendo o meio de cultivo utilizado submetido à iluminação artificial contínua feita por 4 lâmpadas LED com potência de 40 W cada, bem como, fez-se o uso de um compressor de ar com vazão de 2 L min^{-1} para agitação e mistura homogênea do meio e das microalgas. Para identificação das microalgas presentes ao final de cada tratamento foi utilizado um Microscópio óptico (Biofocus, modelo BLUE1600) com resolução de foco de 4X - 1000Xs e ampliação de 16X. Esse procedimento foi realizado para verificar se além da *Chlorella* sp. outras microalgas haviam ou não crescido no meio de cultivo.

2.2 Delineamento experimental e cultivo das microalgas

O delineamento experimental adotado nesta pesquisa foi estruturado com base nos estudos de Mendonça *et al.* (2018) e Mello *et al.* (2024), cujas metodologias serviram como referência para a definição dos tratamentos e das condições de cultivo.

Inicialmente foram utilizados 2 FBRs de placa, construídos em acrílico com dimensões de 40 mm x 40 mm e espessura de 18 mm, denominados FBR1 e FBR2CO₂ (Figura 1d), com volume de trabalho de 2,5 L. Desse volume, 2 L foi preenchido com água resíduária sintética de leite de soja e 0,5 L do inóculo da cepa de *Chlorella* sp. (Figura 1a e 1b), ou seja, o inóculo compreendeu 1/5 do volume de trabalho de cada fotobioreator. Com o auxílio de um compressor que injeta 1 L min⁻¹ de oxigênio realizou-se a aeração dos FBRs. Além disso, o FBR2CO₂ foi alimentado com o gás CO₂ por meio de um cilindro pressurizado que forneceu a vazão de 0,02 L min⁻¹. Para a produção desse gás, fez-se uso de 100 g de ácido cítrico, 100 g de bicarbonato de sódio e 150 mL de água, conforme ilustrado na Figura 1c. A reação dessa mistura, encontra-se na Equação 1.



Onde: C₆H₈O₇ – ácido cítrico;

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio;

C₆H₇NaO₇ – citrato de sódio monossódico;

CO₂ – dióxido de carbono; e,

H₂O – água.

Além dessas condições, a iluminação dos fotobiorreatores foi fornecida de forma contínua por meio de 6 lâmpadas de LED, com potência de 40 W cada. Na Figura 1 ilustra-se todas as etapas do preparo experimental para a produção das microalgas.



Figura 1: Etapas do preparo experimental para a produção de microalgas: a) separação dos volumes de água residiária sintética de leite de soja e do inóculo de *Chlorella* sp.; b) preenchimento dos fotobiorreatores com o meio de cultivo; c) preparação do cilindro pressurizado contendo liberação do gás CO₂; e, d) detalhe do fotobiorreator sem suplementação de CO₂ (FBR1) e com suplementação de CO₂ (FBR2CO₂)

As descrições dos tratamentos estudados são sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos avaliados seguindo diferentes concentrações da água residiária de leite de soja e condição de suplementação de CO₂

Tratamentos	Condição
FBR1 10 mL L ⁻¹	Sem CO ₂
FBR2CO ₂ 10 mL L ⁻¹	Adição de 2% de CO ₂ ao dia
FBR1 20 mL L ⁻¹	Sem CO ₂
FBR2CO ₂ 20 mL L ⁻¹	Adição de 2% de CO ₂ ao dia
FBR1 30 mL L ⁻¹	Sem CO ₂
FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹	Adição de 2% de CO ₂ ao dia

Para calcular o percentual de CO₂ que estava sendo inserido no meio, utilizou-se a Equação 2.

$$[CO_2] = \frac{[(O_2 \times Q_{CO2}) + (CO_{2a} \times Q_{O2})]}{Q_{CO2} + Q_{O2}} \quad Equação\ 2$$

Onde: O₂ – concentração de oxigênio puro no experimento (%);

CO_{2a} – concentração de dióxido de carbono atmosférico (%);

Q_{CO2} – fluxo de oxigênio inserido no sistema (L min⁻¹); e,

Q_{O2} – fluxo de dióxido de carbono inserido no sistema (L min⁻¹).

Após a montagem dos FBRs, deu-se início as bateladas experimentais, no qual foram aplicadas em cada FBRs 3 diferentes concentrações de água residuária de leite de soja: 10 mL L⁻¹, 20 mL L⁻¹ e 30 mL L⁻¹. Em todas as concentrações foram avaliados a possibilidade de suplementação diária com 2% de CO₂, como mostrados na Tabela 1, totalizando 6 tratamentos executados no Galpão de Hidráulica da UFRRJ.

A medição do pH, temperatura, condutividade elétrica e salinidade do meio de cultivo foi feita com uma sonda portátil multiparâmetro (AKSO, modelo M4258) duas vezes ao dia. Já a irradiância foi verificada por meio do luxímetro digital (Instrutherm, modelo LD 400) duas vezes ao dia. Ao término de cada batelada experimental foram determinadas as equações de cinética de remoção de poluentes e eficiência de tratamento dos FBRs e a produção de biomassa. O processo de colheita da biomassa se deu por meio de centrifugação a 11000 rpm ou 13552 Xg - RCF em centrífuga digital (Anco, modelo CD 22000), durante 8 min. Após a colheita da biomassa procedeu-se sua secagem a frio em liofilização à -50 °C para fins de quantificação lipídica, e do teor de carboidratos e proteínas.

2.3 Análises laboratoriais

2.3.1 Crescimento da biomassa

Como parâmetros de crescimento da biomassa foram analisados a densidade óptica (DO), pH, temperatura, condutividade elétrica, irradiância e salinidade. As análises foram feitas duas vezes ao dia (8 h e 17 h). Também foram quantificadas a biomassa seca/sólidos totais – MS/ST, sólidos fixos – SF, sólidos voláteis – SV, diariamente.

Para a análise da DO, foram coletadas 5 mL de cada FBR, e quando necessário diluída para melhor precisão da leitura (evitando sombreamento), assumindo como faixa limite máxima de exatidão de 0,800 Abs. As leituras foram executadas em triplicatas com auxílio de um espectrofotômetro (Hach, modelo DR 3900), sob comprimento de onda de 540 nm (DO_{540nm}).

Para a realização da quantificação da MS e ST, foram coletadas amostras de 30 mL diariamente de cada FBR. As amostras foram vertidas em cadinho e encaminhadas a secagem em estufa à 105 °C por 24 h. Após esse tempo os cadinhos foram dispostos em dessecadores por 30 min para resfriamento em temperatura ambiente e isolamento da umidade relativa do ar, e em sequência pesados em balança analítica de precisão, com resolução de 0,001 g. Posteriormente a biomassa seca foi submetida a calcinação em forno mufla à 550 °C por 30 min, sendo que após esse período os cadinhos passaram pelo mesmo procedimento dos dessecadores por 30 min e pesados na balança analítica para quantificação dos SF. A partir da diferença entre a ST e SF obteve-se os SV.

As equações 3, 4 e 5 descritas por Matos (2004) foram utilizadas para definição dos ST, SF e SV.

$$\mathbf{ST} = (\mathbf{MS} - \mathbf{MR}) \times 1000 / V_{am} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: ST – sólidos totais (mg L⁻¹);

MS – massa da amostra seca a 105°C + MR (mg);

MR – massa do recipiente (mg); e,

V_{am} – volume da amostra (mL).

$$\mathbf{SF} = (\mathbf{MC} - \mathbf{MR}) \times 1000 / V_{am} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: SF – sólidos fixos (mg L⁻¹); e,

MC – massa cinza a 550 °C + MR (mg).

$$\mathbf{SV} = \mathbf{ST} - \mathbf{SF} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: SV – sólidos voláteis (mg L⁻¹).

Foi realizada a regressão dos dados sendo observado uma correlação linear entre a produção de biomassa seca com a densidade ótica para cada tratamento avaliado, as quais podem ser verificadas nas Equações de 6 a 11:

$$\mathbf{FBR1\ 10\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,3037 \times DO_{540} + 0,8845 \quad r^2 = 0,9575 \quad \text{Equação 6}$$

$$\mathbf{FBR2CO_2\ 10\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,4900 \times DO_{540} + 0,6582 \quad r^2 = 0,9007 \quad \text{Equação 7}$$

$$\mathbf{FBR1\ 20\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,8016 \times DO_{540} + 0,6970 \quad r^2 = 0,9506 \quad \text{Equação 8}$$

$$\mathbf{FBR2CO_2\ 20\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,8346 \times DO_{540} + 0,4995 \quad r^2 = 0,9595 \quad \text{Equação 9}$$

$$\mathbf{FBR1\ 30\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,5556 \times DO_{540} + 0,8174 \quad r^2 = 0,9616 \quad \text{Equação 10}$$

$$\mathbf{FBR2CO_2\ 30\ mL/L:}\quad Y(\text{g. L}^{-1}) = 0,6901 \times DO_{540} + 0,7335 \quad r^2 = 0,9635 \quad \text{Equação 11}$$

A taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), em d^{-1} , foi obtida por meio reta tangente à curva logarítmica da DO em seu trecho de maior declividade. Já o tempo de duplicação (Dt), em d^{-1} , foi calculado conforme Equação 12:

$$Dt = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad \text{Equação 12}$$

A produtividade volumétrica de biomassa (Pv), $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, foi calculada por meio da Equação 13, que leva em consideração a concentração final e inicial dividida pelo intervalo de tempo até a observação do final do experimento.

$$Pv = \frac{X_f - X_i}{T_f - T_i} \quad \text{Equação 13}$$

Onde: X_f – concentração final de biomassa (g L^{-1});

X_i – concentração inicial de biomassa (g L^{-1}); e,

$T_f - T_i$ – intervalo de tempo até o fim do processo (d).

Foi realizado um estudo com o objetivo de investigar os efeitos da temperatura e da intensidade luminosa no cultivo de microalgas, com foco no aumento da biomassa. Essa avaliação foi conduzida por meio de análise gráfica da superfície de resposta, utilizando o software R (versão 4.2.3). Para isso, foi adotado um modelo quadrático baseado em um Delineamento Composto Central (DCC), considerando dois fatores independentes: temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e intensidade luminosa (Lux). A variável resposta analisada foi a densidade óptica (DO) da biomassa microalgal, mensurada por espectrofotometria.

A biofixação de CO₂ (R_{CO_2}) foi calculada a partir da produtividade volumétrica de biomassa e da concentração de carbono presente na biomassa (Equação 14). Sendo a produtividade volumétrica determinada em laboratório e a composição interna de carbono e nitrogênio na biomassa determinada por detecção infravermelha usando um analisador elementar (LECO, modelo CNHS 932) a 1050 °C.

$$R_{CO_2} (\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}) = Pv \times C \times \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Onde: Pv – produtividade volumétrica diária de biomassa (mg L⁻¹ d⁻¹);

C – concentração de carbono na biomassa após o processo de secagem (g g⁻¹);

M_{CO_2} – massa molar do CO₂ (g mol⁻¹); e,

M_C – massa molar do carbono (g mol⁻¹).

A eficiência na captura de CO₂ pela microalga *Chlorella* sp. foi calculado a partir da Equação 15.

$$E_{CO_2} (\%) = R_{CO_2} \times \frac{V}{m_{id}} \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

Onde: V – volume de trabalho do fotobiorreator (L); e,

m_{id} – taxa diária de alimentação de CO₂ (mg d⁻¹).

O cálculo das perdas de amônia por volatilização para a atmosfera (*stripping*) foi determinado por meio da aplicação da Equação 16, conforme descrito por Emerson *et al.* (1975) e validado por Mendonça *et al.* (2018) para uso em sistemas fechados de cultivo de microalgas.

$$Vol (\%) = \frac{Free\ NH_3}{Total\ NH_4} = \frac{100}{1+10 \left\{ \left(0,09018 + \frac{2729,92}{T+273,20} \right) \right\} - pH} \quad \text{Equação 16}$$

Onde: Vol – volatilização de amônia (%);

T – temperatura (°C) e,

pH – potencial hidrogeniônico.

2.3.2 Características da água residiária de leite de soja

A água residiária sintética foi submetida a análises químicas em laboratório afim de se caracterizar a qualidade do meio de cultivo das microalgas. Salienta-se que tais análises foram usadas para criar as curvas de cinética de remoção dos nutrientes pelas microalgas. Os parâmetros analisados foram: nitrogênio total – N, nitrogênio amoniacal – NH_4^+ e demanda química de oxigênio (DQO), os quais foram executadas segundo APHA (2017) e carbono orgânico total (COT) foi calculado pela equação de Bower e Chaney (1974), em que o COT = $0,25 \text{ DQO} + 1,30$.

Durante o período experimental foram definidas três concentrações de água residiárias sintéticas da indústria de leite de soja, conforme já supracitado: 10, 20 e 30 mL L^{-1} . Com isso, suas caracterizações iniciais foram fundamentais para avaliar o desempenho da *Chlorella* sp. em biorremediar esse efluente, de forma que fosse possível calcular a eficiência de cada tratamento. Na Tabela 2 estão descritas as condições iniciais da SMW preparadas e antes da aplicação de qualquer um dos tratamentos.

Tabela 2: Caracterização química inicial da água residiária sintética de leite de soja antes de aplicação dos tratamentos estudados

TRATAMENTOS	PARÂMETROS			
	N (mg L^{-1})	NH_4^+ (mg L^{-1})	DQO (mg L^{-1})	COT (mg L^{-1})
FBR1 10 mL/L	202,6 (1,3)	52 (0,0)	1828,3 (0,0)	458,4 (0,0)
FBR2CO₂ 10 mL/L	202,6 (1,3)	52 (0,0)	1828,3 (0,0)	458,4 (0,0)
FBR1 20 mL/L	284,4 (8,6)	213,7 (0,0)	2190 (0,0)	548,8 (0,0)
FBR2CO₂ 20 mL/L	284,4 (8,6)	213,7 (0,0)	2190 (0,0)	548,8 (0,0)
FBR1 30 mL/L	302,2 (7,7)	287,5 (0,0)	3108,3 (0,0)	778,4 (0,0)
FBR2CO₂ 30 mL/L	302,2 (7,7)	287,5 (0,0)	3108,3 (0,0)	778,4 (0,0)

N – Nitrogênio Total; NH_4^+ - Nitrogênio Amoniacal; DQO – Demanda Química de Oxigênio; COT – Carbono Orgânico Total; FBR1 - fotobioreator sem suplementação de CO₂; FBR2CO₂ - fotobioreator com suplementação de CO₂; 10, 20 e 30 mL L^{-1} – concentração da água residiária; Valores em parênteses indicam o desvio padrão observado.

2.4 Extração de lipídios, proteínas e carboidratos da biomassa de microalgas

Para extrair os óleos da biomassa e quantificar a porcentagem de lipídios utilizou-se a extração pelo método Randall e Twisselmann no equipamento VELP Scientifica modelo ELS SER 148/3, a partir de biomassa triturada e utilizando como solvente o clorofórmio PA ACS - PM 119,38 g mol⁻¹.

O procedimento iniciou-se com o preparo dos copos de extração e demais vidrarias, os quais foram submetidas a secagem em estufa pré-aquecida à 105 °C por um período de 1 h, concluído esse período os copos foram transferidos para um dessecador, permitindo seu esfriamento por 30 min. Em sequência foi realizado a tara da balança analítica (resolução de 0,001 g) utilizando um becker vazio, assegurando que a balança estivesse devidamente ajustada para zero. Em seguida foi realizada a pesagem da biomassa triturada no becker, com 0,2 g de biomassa seca, conforme metodologia do fabricante para o modelo ELS SER 148/3. E posteriormente mensurado o peso inicial de cada copo de extração.

A biomassa pesada foi transferida para os cartuchos de extração apropriados e utilizadas estopas para selar hermeticamente a parte superior dos cartuchos, assegurando que a biomassa permaneça contida. Após a transferência da biomassa, procedeu-se a uma segunda pesagem do Becker para determinar a quantidade de biomassa retida no Becker e assim determinar a peso real da biomassa que foi submetida ao procedimento de extração de óleo. Concluídas essas etapas, iniciou-se o processo de extração, seguindo da mesma forma a metodologia do fabricante do equipamento.

Já no processo de extração, com uso de uma proveta foi medido 70 mL de solvente e esse transferido para o copo de extração. Os cartuchos e os copos foram inseridos no equipamento e imersos no solvente por 30 min. Após esse período os cartuchos ficaram suspensos para processo de lavagem/gotejamento do solvente e por fim, mediante processo de rotaevaporação, com duração de 15 a 20 min, o solvente foi separado da amostra e em seguida os frascos contendo o óleo foram colocados em dessecadores por 30 min para posterior pesagem e determinação de lipídios.

A determinação da porcentagem de lipídios presentes na biomassa é dada pela Equação 17.

$$\% \text{ Lipídios} = \frac{m_{\text{lipídios}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

Equação 17

Onde: $m_{lipídios}$ – massa de lipídios (g), obtida pela diferença entre o peso final e inicial do copo de extração;

$m_{amostra}$ – biomassa pesada (g), a qual foi de 0,2 g.

A extração de proteínas foi conduzida pelo método Kjeldahl (APHA, 2012). Já a extração de carboidratos seguiu o método proposto por Dubois *et al.* (1956). Ambas as extrações foram executadas na EMBRAPA – unidade Gado de Leite, em Juiz de Fora – MG.

2.5 Determinação dos ácidos graxos

Para determinação da composição de ácidos graxos do óleo de microalgas, os mesmos foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos por meio da pré-transesterificação. As reações de pré-transesterificação foram realizadas em frasco de fundo redondo acoplado a um sistema de resfriamento a água com condensador de refluxo utilizando agitador mecânico. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Termodinâmica e Biocombustíveis – LTAB do Departamento de Engenharia Química da UFRRJ.

As condições utilizadas na pré-transesterificação da matéria-prima lipídica foram baseadas nas recomendações de Yin *et al.* (2015), onde foi utilizado H_2SO_4 (v/p, 1,5%), razão molar de metanol/óleo de 12:1, tempo de reação de 120 min e temperatura de reação de 60 °C. Após a pré-transesterificação, as amostras foram transferidas para um funil de separação e foi lavado com água para a remoção do catalisador e excesso de metanol.

Posteriormente, o pré-transesterificado foi desidratado pela adição de 25% de sulfato de sódio e encaminhado para Fiocruz/RJ. Para análise de determinação de perfil de ácidos graxos foi empregado um cromatógrafo de fase gasosa Hewlett-Packard 6890 equipado com uma coluna Agilent 122-1831 modelo DB-17HT.

Os perfis de ácidos graxos foram utilizados a fim de se quantificar os seguintes parâmetros: número de cetano (NC), índice de saponificação (SV, mg de KOH g^{-1}), índice de iodo (IV), fator de saturação de cadeia longa (LCSF) ponto de entupimento a frio (CFPP, °C); ponto de névoa (Cloud Point - CP, °C), estabilidade oxidativa (OS, h), poder calorífico superior (HHV), viscosidade cinemática (ν , $mm^2 s^{-1}$) e densidade (ρ , $g cm^{-3}$). Abaixo apresenta-se as Equações utilizadas.

$$\text{Valor de Saponificação (VS)} = (560 \times \text{Ni})/\text{MM} \quad \text{Equação 18}$$

$$\text{Valor de Iodo (VI)} = (254 \times \text{Ni} \times \text{Di})/\text{MM} \quad \text{Equação 19}$$

$$\text{Número de Cetano (NC)} = \left(46,3 + \frac{5458}{\text{VS}} \right) - (0,225 \times \text{VI}) \quad \text{Equação 20}$$

$$\text{Grau de Saturação (GS)} = \sum \text{MUFA} + (2 \times \text{PUFA}) \quad \text{Equação 21}$$

$$\text{Fator de Saturação de Cadeia Longa (LCSF)} = (0,1 \times \text{C16:0}) + (0,5 \times \text{C18:0}) + (1 \times \text{C20:0}) + (2 \times \text{C24:0}) \quad \text{Equação 22}$$

$$\text{Ponto de Entupimento de Filtro a Frio (CFPP)} = (3,417 \times \text{LCSF}) - 16,477 \quad \text{Equação 23}$$

$$\text{Estabilidade Oxidativa (OS)} = (-0,0384 \times \text{GS}) + 7,770 \quad \text{Equação 24}$$

$$\text{Poder Calorífico Superior (HHV)} = 46,19 - \left(\frac{1794}{\text{Mi}} \right) - 0,21 \times N \quad \text{Equação 25}$$

$$\text{Viscosidade Cinemática} (\vartheta) = -12,503 + 2,496 \times \ln(\text{Mi}) - 0,78 \times N \quad \text{Equação 26}$$

$$\text{Densidade} (\rho) = 0,8463 + \frac{4,9}{\text{Mi}} + 0,0118 \times N \quad \text{Equação 27}$$

Onde:

MM – peso molecular do i-ésimo ácido graxo;

Ni – porcentagem de cada éster metílico de ácido graxo;

Di – número de ligações duplas do i-ésimo FAME;

MUFA – fração de massa de ácidos graxos monoinsaturados;

PUFA – fração de massa de ácidos graxos poli-insaturados;

Mi – peso molecular do ácido graxo; e,

N – número de ligações duplas em cada ácido graxo.

2.6 Balanço de Massa

O balanço de massa foi estimado com base nos dados experimentais obtidos neste estudo e em modelos previamente descritos na literatura. Para isso, foram consideradas as abordagens metodológicas propostas por Dong et al. (2016) e Lee, Oh e Lee (2015), que fornecem diretrizes para a estimativa do rendimento de biomassa, conversão de nutrientes e geração de coprodutos em processos envolvendo microalgas.

2.7 Análise estatísticas dos dados

As análises dos resultados foram submetidas ao método de análise de variância (ANOVA), usado para analisar a existência de diferenças significativas entre as concentrações dos parâmetros analisados nos diferentes experimentos. Havendo diferenças significativas os dados foram submetidos aos testes dos seguintes pressupostos: homogeneidade de variância, normalidade dos resíduos e independência dos resíduos, a fim de se qualificar a validade e confiabilidade dos dados. Sendo atendidos os pressupostos, e para efeito de comparação entre os tratamentos foi aplicado o teste de Tukey. Todos os testes foram executados em grau de significância de 5%. O R *version 4.2.3* foi o software de análise estatística utilizado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos da intensidade luminosa e temperatura no aumento da biomassa de microalgas *Chlorella* sp.

Durante o experimento foi quantificada a abundância relativa a fim de se determinar qual cepa de microalga era predominante no experimento e se haveria mais de uma espécie de microalga presente. Contudo, ao realizar a abundância relativa por microscopia óptica, verifica-se por meio da Figura 2, que todas as etapas foram conduzidas com 100% de *Chlorella* sp., não sendo identificadas outras espécies de microalgas nos tratamentos executados.

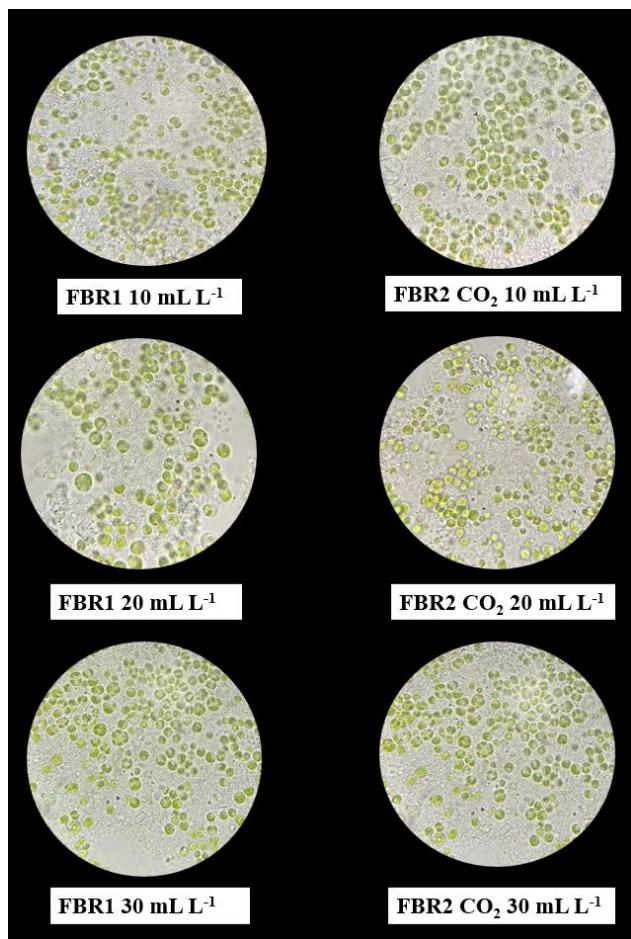


Figura 2: Identificação microscópica da espécie de microalga presente em cada tratamento

As microalgas possuem a necessidade de fontes de carbono que são absorvidos pela sua célula nos processos fotossintéticos que podem ser por vias autotróficas, heterotróficas ou mixotróficas. Além disso, outras variáveis impactam significativamente na produção e crescimento de sua biomassa, como a intensidade luminosa/LUX ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Dessa forma, compreender a influência desses fatores físicos na cultura da microalga, torna-se essencial para seu cultivo (Nur *et al.*, 2025).

Na Figura 3 pode-se observar os gráficos de superfície de resposta, devido o comportamento da DO quando submetida aos fatores de irradiação e temperatura no decorrer dos 6 (seis) tratamentos executados: FBR1 10 mL L^{-1} , FBR2CO₂ 10 mL L^{-1} , FBR1 20 mL L^{-1} , FBR2CO₂ 20 mL L^{-1} , FBR1 30 mL L^{-1} , FBR2CO₂ 30 mL L^{-1} . Visto que, por meio das equações 6 a 11, verificou-se que houve uma correlação (R^2 maior que 90%) entre as leituras de densidade ótica (Abs) com a produção de biomassa seca (g L^{-1}), em todos os tratamentos. Evidenciando que, a curva escolhida, DO_{540nm}, para leitura da produção de biomassa consegue

responder de forma direta o crescimento de *Chlorella* sp., quando submetida às características iniciais de cultivo já citadas.

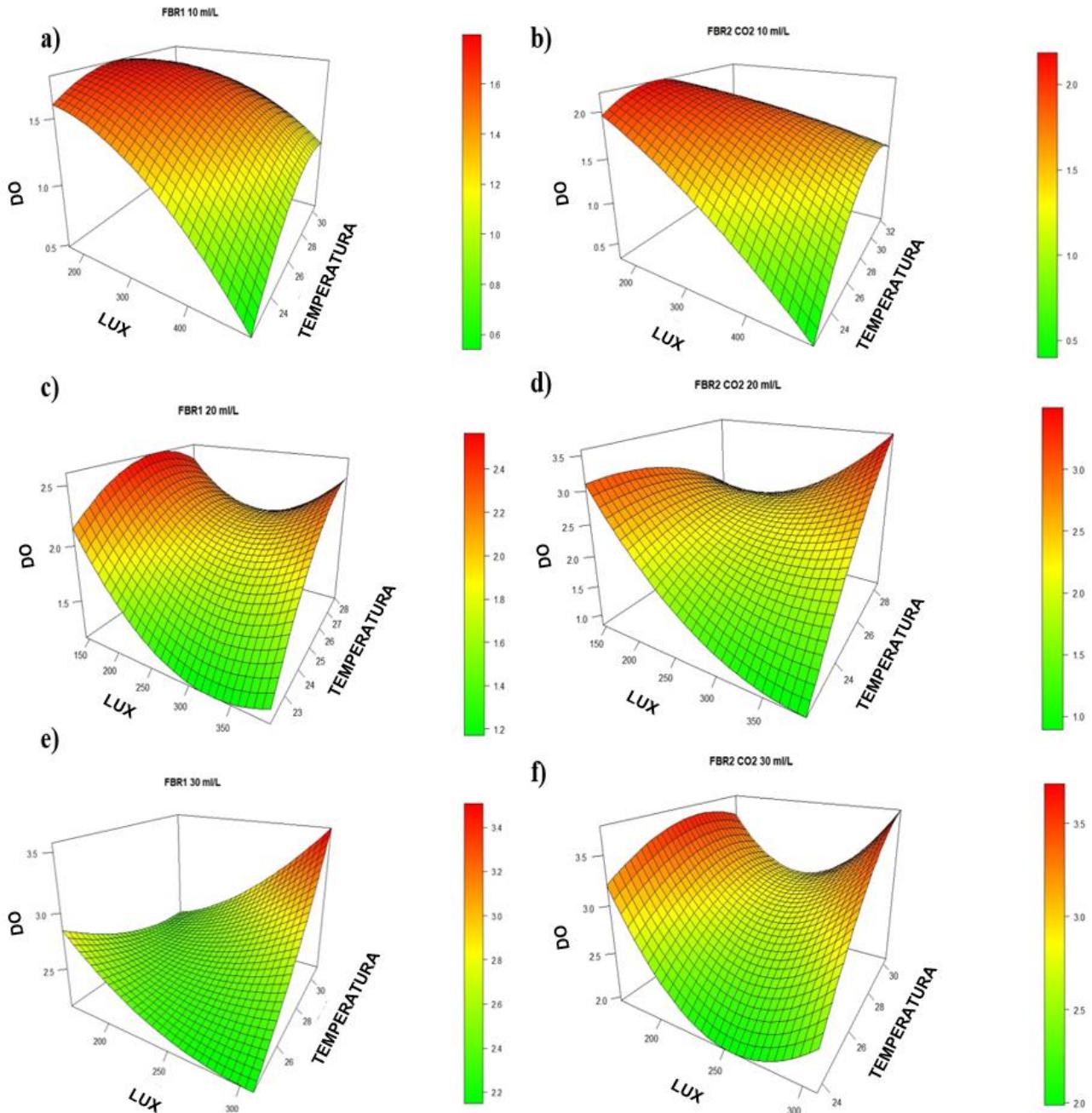


Figura 3: Efeito da irradiância/LUX ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) na densidade óptica – DO para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂) sob as concentrações 10 mL L⁻¹ (a e b), 20 mL L⁻¹ (c e d), e 30 mL L⁻¹ (e e f).

Constata-se ao observar a Figura 3 que a resposta da DO_{540nm} em função da irradiação e da temperatura para os tratamentos estudados apresentaram comportamentos distintos e importantes em relação a esses dois fatores, explicando como eles podem afetar o crescimento da biomassa de microalga.

Para os FBRs FBR1 10 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, Figuras 3a e 3b, tanto a intensidade luminosa como a temperatura possuem efeitos positivos no crescimento da biomassa de microalgas conforme as observações de DO_{540nm}. À medida que a temperatura e a intensidade luminosa aumentam, a DO_{540nm} também aumenta, evidenciando uma melhor troca de gases e penetração da luz devido à baixa concentração da água resíduária.

Nos FBR1 20 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, Figuras 3c e 3d, o comportamento apresentado pela DO_{540nm} se torna mais complexo. A DO_{540nm} atinge sua maximização em temperaturas de cerca de 27 °C para o tratamento com ausência de suplementação de CO₂, e acima de 28 °C para o tratamento com suplementação de CO₂. Esses resultados reforçam que em temperaturas altas ocorre o favorecimento do cultivo e crescimento de microalgas. Em contrapartida, a intensidade luminosa apresentou valores ótimos a níveis inferiores a 300 µmol/m².s. Nota-se ainda caso haja valores entre 300 e 350 µmol/m² s afetou o aumento da DO_{540nm} e por consequência da biomassa de microalgas.

Finalmente, para os tratamentos FBR1 30 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, Figuras 3e e 3f, ambos demonstraram semelhanças com os efeitos observados nos tratamentos FBR1 20 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹. As DO_{540nm} aumentam de acordo com a elevação da temperatura, e em contrapartida, observam-se uma grande área de fotoinibição por excesso de luz. Todavia, nota-se que é possível maximizar o crescimento de microalgas com a combinação de intensidade luminosa inferiores a 300 µmol/m².s, com temperaturas superiores a 28 °C, quando se empregou concentrações da água resíduária sintética de leite de soja de 20 e 30 mL L⁻¹.

De forma geral, nos tratamentos FBR1 10 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, tanto a luz quanto a temperatura possuem efeito positivo sob o aumento da DO_{540nm}. Já para os tratamentos FBR1 20 mL/L, FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, FBR1 30 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, há um ponto ótimo de luz entre 250 e 300 µmol m⁻² s⁻¹ após ultrapassar o maior valor ocorre a inibição do crescimento. A temperatura, por outro lado, favoreceu o crescimento.

A energia luminosa, é absorvida por pigmentos presentes nas células das microalgas e convertida em energia química na fotossíntese (Barsanti e Gualtieri, 2014). No entanto, nos tratamentos com concentrações de 20 e 30 mL L⁻¹, observou-se a ocorrência de inibição fotossintética devido à irradiância excessiva, o que pode ter comprometido o desempenho do cultivo em determinadas condições experimentais. De acordo com Barsanti e Gualtieri (2006), a exposição de determinadas espécies de microalgas a constante iluminação pode ocasionar o estresse e inibir o crescimento da microalga. Sendo utilizados, fotoperíodos de 12:12 h ou de 14:10 h de luz e escuridão, respectivamente.

Ievina e Romagnoli (2025) afirmam que as microalgas possuem 3 grupos de pigmentos que auxiliam no processo de absorção de luz: clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, mas cada um com suas funções. As ficobiliproteínas estão ausentes em *Chlorella* sp., sendo predominantemente encontradas em cianobactérias e em algumas microalgas pertencentes a outros grupos taxonômicos. As clorofilas, consideradas pigmentos verdes de classe primária, são as mais importantes para fotossíntese, e suas maiores absorções de luz, estão nas faixas de luz azul (460 a 490 nm) e vermelho (630 a 700 nm) do espectro de luz. Os carotenoides, entre eles o β – caroteno e xantofilas, de pigmentação vermelho-alaranjado e amarelo, bem como as ficobiliproteínas, são considerados pigmentos acessórios, pois não fazem parte direta da fotossíntese, mas auxiliam no aumento das faixas de absorção, reduzindo o estresse por irradiação excessiva (Gupta *et al.*, 2021; Hintz *et al.*, 2021).

A *Chlorella* sp., e a *Dunaliella salina* produzem β – caroteno em suas células e segundo Chini *et al.* (2023), na formação de carotenoides devido o estresse por irradiação, em algumas microalgas esse pigmento se adere as estruturas lipídicas da célula, chegando a preenchê-la por inteiro. Fazendo com que a microalga absorva a coloração de um desses pigmentos, e assumindo coloração amarelada (Almeida, 2020). Por meio da Figura 4a e 4b pode ser observado a alteração na coloração da microalga *Chlorella* sp. durante o experimento, devido ao estresse por irradiação excessiva

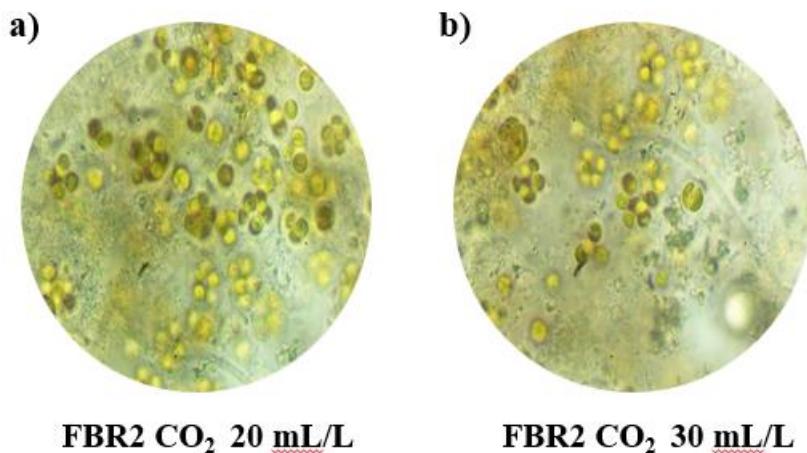


Figura 4: Células de microalgas do gênero *Chlorella* sp. sob estresse por irradiação excessiva e formação de β – caroteno (coloração amarelada) no exterior da célula de amostras dos fotobiorreatores (FBR) com suplementação de 2% de CO₂ e concentrações do meio de cultivo de 20 e 30 mL L⁻¹.

Dessa forma, afim de se solucionar o problema de estresse por irradiação excessiva, torna-se essencial realizar o cultivo em faixas de luz de LED que as microalgas melhor absorvem o espectro, no caso da *Chlorella* sp., a luz vermelha que possuem efeitos significativos no aumento do crescimento de sua biomassa quando comparada luz de LED branca. Pode-se também reduzir o tempo de fotoperíodo, que por consequência irá atenuar o aumento da temperatura do meio.

Chang *et al.* (2022) apontam que tais medidas foram eficazes no aumento da biomassa de *Chlorella* sp., cultivadas num fotoperíodo de 12:12 h, irradiância de 64,75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e em luz de LED vermelha, obtendo uma biomassa cerca de 1,15 vezes maior que a luz LED branca, além de estimular maior acúmulo de lipídio em sua célula.

Quanto a influência da temperatura no aumento da biomassa de microalgas, Nur *et al.* (2025), dispõem que as microalgas as adaptam e crescem em temperaturas para cultivo em torno de 30 °C, valor próximo ao encontrado nessa pesquisa. Além desses aspectos, os resultados corroboram com um estudo realizado por Converti *et al.* (2009), sob o efeito da temperatura em cultivos de *Chlorella* sp. e *Nannochloropsis oculata* que apontaram a taxas de crescimento ótimo para essas espécies de microalgas a temperatura de 25 °C e 20 °C, apresentando, contudo, ponto de inibição em temperaturas superiores a 30 °C e 35 °C, o que não foi observado nas tendências dos resultados apresentados na Figura 3.

Quanto a intensidade luminosa, um estudo de Takeshita *et al.* (2014) afirmam que embora seja preciso cultivar *Chorella* sp. sob alta intensidade luminosa, a maioria dos estudos só cultivam em valores $< 300 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Tal valor limite é o observado nessa pesquisa, visto que na Figura 3, as taxas de inibição ocorreu em luminosidade $> 300 \text{ } \mu\text{mol/m}^2\text{s}$. Contudo, os autores evidenciaram em oito linhagem de 6 espécies de Chlorella: *Chlorella* sp, *C. emersonii*, *C. viscosa*, *C. sorokiniana*, *P. kessleri CCALA255*, *P. kessleri NIES-2152*, *P. kessleri NIES-2159* e *Parachlorella beijerinckii*, submetidas a intensidade luminosa acima de $600 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ não demonstrou efeito significativo no seu crescimento, apenas reduziu o tempo necessário para alcançar a fase estacionária.

Febrieni, Sedjati e Yudiaty (2020) cultivaram *Chlorella* sp. em quatro níveis de intensidade de luz, 2500 lux ($46,25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 5000 lux ($92,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 7500 lux ($138,75 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), 10000 lux ($185 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), e apontaram que ao aumentar de $46,25 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para $92,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, houve um aumento do crescimento de microalgas, mas ao elevar esse nível, não observara diferença significativa em seu crescimento.

Tais apontamentos, indicam que cada espécie de microalgas possui uma quantidade de luz ideal para cultivo. Todavia, em níveis altos, a intensidade luminosa pode afetar o crescimento de microalgas, fenômeno esse conhecido por morte fotoxidativa, ou extresse oxidativo (Rosli *et al.*, 2020). Além do que, as altas temperatura não indicaram efeitos inibitórios em seu crescimento. Todavia, é fundamental compreender seu comportamento para fins de cultivo.

3.2 Efeitos da suplementação de CO₂ no aumento da biomassa biofixação de CO₂

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes, que utilizam de uma fonte de luz, CO₂, H₂O e outros nutrientes inorgânicos para seu crescimento, sendo necessário avaliar a cinética de crescimento, ou seja, seu comportamento nos FBRs.

Diante disso, os dados da Tabela 3, dispõem os resultados dos parâmetros de crescimento da biomassa de microalgas *Chlorella* sp.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos de crescimento de microalgas para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂) em água residiária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹.

TRATAMENTO	C (g g ⁻¹)	RCO ₂ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Eficiência (%, v/v)	Pb (g L ⁻¹ d ⁻¹)
FBR1 10 mL L⁻¹	0,38 (2,64)	35,96	0,35	0,026
FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹	0,41 (1,0)	83,38	0,81	0,056
FBR1 20 mL L⁻¹	0,41 (2,08)	107,30	1,04	0,071
FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹	0,51 (1,15)	290,92	2,83	0,156
FBR1 30 mL L⁻¹	0,41 (1,0)	173,84	1,69	0,116
FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹	0,53 (1,52)	410,63	4	0,211
TRATAMENTO	MS _{INICIAL} (g L ⁻¹)	MS _{FINAL} (g L ⁻¹)	μ máx (d ⁻¹)	td mín (d ⁻¹)
FBR1 10 mL L⁻¹	1,3 (0,151)	1,403 (0,76)	0,14 (0,10)	6,90 (5,13)
FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹	1,300 (0,151)	1,522 (0,00)	0,17 (0,00)	4,10 (0,0)
FBR1 20 mL L⁻¹	1,837 (0,024)	2,337 (0,27)	0,28 (0,05)	2,73 (0,18)
FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹	1,837 (0,024)	2,927 (0,00)	0,39 (0,05)	1,99 (0,49)
FBR1 30 mL L⁻¹	1,720 (0,123)	2,533 (0,01)	0,28 (0,11)	2,51 (0,53)
FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹	1,720 (0,123)	3,200 (0,09)	0,55 (0,00)	1,47 (0,47)

Pb - produtividade volumétrica da biomassa; C - concentração de carbono; RCO₂ - biofixação de CO₂; MS_{INICIAL} - massa seca inicial; MS_{FINAL} - massa seca final; μ _{máx} - taxa de crescimento específico máxima; td - tempo de duplicação de células; e, o desvio padrão são apresentados entre parênteses.

Durante a fotossíntese as microalgas fixam o CO₂. Estudos apontam que cerca de 1,8 Kg de CO₂ são fixados a cada 1 Kg de biomassa de microalgas produzida, assim, elas são consideradas aliadas junto às tecnologias que buscam um ótimo desempenho para captura, utilização e armazenamento desse carbono, visto que se adaptam ao meio de cultivo, podendo ser poluídos ou não, bem como as elevadas concentrações de carbono em sua biomassa, que podem gerar produtos de valor agregado (Esipovich *et al.*, 2025; Kim *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

Os tratamentos após a produção de sua biomassa tiveram suas taxas de crescimento máximas e tempo de duplicação de células definidos. Estes dois parâmetros auxiliam na identificação de como a *Chlorella* sp., se comportou nas fases desenvolvimento.

Após 7 dias de cultivo as melhores taxas de crescimento calculadas foram nos tratamentos que se suplementaram 2% de CO₂: FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, com μ _{máx} de 0,39 d⁻¹ e 0,55 d⁻¹, seguidos pelo menor tempo de duplicação, 1,99 d⁻¹ e 1,57 d⁻¹.

Enquanto a menor taxa de crescimento e maior tempo de duplicação são notados no FBR1 10 mL L⁻¹, 0,14 d⁻¹ e 6,9 d⁻¹, respectivamente. Tal situação é confirmada ao confrontar com os valores de Pb e MS_{FINAL}, que aumentaram consistentemente conforme se elevou a concentração em todos os tratamentos, especialmente nos que foram suplementados com CO₂. A maior produção volumétrica de biomassa e massa seca final foram obtidas no tratamento FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, com 0,211 g L⁻¹ d⁻¹ e 3,200 (\pm 0,09) g L⁻¹ e a menor no tratamento FBR1 10 mL L⁻¹, com 0,026 g L⁻¹ d⁻¹ e 1,403 (\pm 0,76) g L⁻¹ respectivamente.

Isso indica que o aumento da concentração combinado à suplementação de CO₂ atuaram não somente no crescimento da biomassa e de sua produtividade volumétrica, mas bem como aumentou sua taxa de crescimento, reduzindo assim o tempo de duplicação de células em aproximadamente cinco vezes, e por conseguinte, a necessidade de uma menor área necessária para seu cultivo, sendo 0,52 g m⁻² d⁻¹ (FBR1 10 mL L⁻¹) e 4,23 g m⁻² d⁻¹ (FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹).

A partir dos valores observados de RCO₂ (Tabela 3), constatou-se que as eficiências de biofixação ficaram em torno de 0,35%; 0,81%; 1,04%; 2,83%; 1,69% e 4%, do tratamento FBR1 10 mL L⁻¹ ao FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, respectivamente. Enquanto as concentrações de C na biomassa de microalgas foram, 0,38 (\pm 2,64); 0,41 (\pm 1,0); 0,41 (\pm 2,08); 0,51 (\pm 1,15); 0,41 (\pm 1,0) e 0,53 (\pm 1,52) g g⁻¹ para os respectivos tratamentos: FBR1 10 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, FBR1 20 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, FBR1 30 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹.

Nesse contexto, verifica-se uma tendência similar ao que ocorreu para Pb e MS_{FINAL} para as concentrações de C na biomassa e para as RCO₂, evidenciando que ao passo que se suplementava CO₂ no meio de cultivo, as microalgas incorporavam em suas células esse nutriente e simultaneamente havia uma maior captura de dióxido de carbono.

Ressalta-se que vários são os fatores que podem influenciar na biofixação de CO₂, incluindo a concentração de CO₂, a produtividade volumétrica de biomassa, a eficiência na transferência de massa de CO₂, e o fotobiorreator que foi utilizado para o cultivo. Dispondo a literatura que a média na concentração de carbono na biomassa de microalgas é de 0,55 g g⁻¹ (Duarte *et al.*, 2020).

Nesta pesquisa embora o valor médio de 0,55 g g⁻¹ não tenha sido observado conforme apontado pela literatura, alguns dos resultados ficaram próximos, como nos casos dos tratamentos FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹ (0,51 \pm 1,15 g g⁻¹) e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ (0,53 \pm 1,52 g

g^{-1}), semelhantes aos investigados por Mello *et al.* (2024), na composição bioquímica da biomassa de *Arthrospira platensis* DHR 20.

Esses resultados evidenciam o potencial dos sistemas de tratamentos executados nesta pesquisa, principalmente os com suplementação de CO_2 , para promover o acúmulo de carbono na biomassa da microalga. É importante notar ainda que esses tratamentos foram influenciados pela fotoinibição, decorrente do excesso de luminosidade, o que pode ter limitado a capacidade máxima de fixação de carbono, fator esse apresentado anteriormente.

Além da fotoinibição influenciar na fixação de carbono, tal desvio pode ocorrer também pelo fato de a célula de microalga assimilar maiores proporções de N para síntese proteica. Corroborando assim com os resultados de proteínas obtidos por meio da análise da biomassa, bem como com a relação C/N calculada, o que será discutido posteriormente (Ding *et al.*, 2024; Duarte *et al.*, 2020).

Considerando uma projeção de uma empresa que processa 50.000 Kg de soja descascada para produção de leite de soja, com geração de 6 L de efluente gerados a cada 1 kg de soja processada (Galdeano *et al.*, 2015), haveria uma vazão de efluentes para cultivo 300.000 L d^{-1} e 109.500.000 L ano^{-1} . Com base na maior taxa de RCO_2 , especificamente no tratamento FBR2CO₂ 30 mL L^{-1} , estimam-se 410,63 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de biofixação de CO_2 , resultando numa taxa da biofixação anual de 44,96 Mg ano^{-1} .

Jain *et al.* (2019) cultivaram *Chlorella vulgaris* NIOCCV sob suplementação de 5%, 10% e 20% de CO_2 e observaram valores de 149 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, 430 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e 236 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Eficiências de captura de CO_2 semelhantes ao presente estudo foram analisados por Beigbeder e Lavoie (2022) ao adicionar de 2,5% de CO_2 em um cultivo com *P. kessleri* em água resíduária da suinocultura, que resultou numa taxa de RCO_2 71 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, e eficiência de 0,33%.

Duarte *et al.* (2020) obteve taxas de RCO_2 entre 110 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e 165 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, com eficiências de 13% a 21,8%, quando injetados 10% de CO_2 ao sistema de cultivo de microalga. Xie *et al.* (2022), por meio de um cultivo de *Chlorella vulgaris* MBFJNU-1 em água resíduária da suinocultura com suplementação de 3% de CO_2 , reportaram Pb em 59,8 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ com RCO_2 de 63,2 mg $\text{L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, sendo esse maior do que os valores verificados em 0,04% de CO_2 . Foram observadas por Chiu *et al.* (2008) eficiências de 58%, 27% 20% e 16%, ao adicionarem 2%, 5%, 10% e 15% de CO_2 , respectivamente, com cultivo de *Chlorella* sp. em meio f/2 modificado. Os mesmos autores observaram que em concentração de $\text{CO}_2 \leq 5\%$ o

cultivo com essa microalga tendeu a apresentar maior eficiência na RCO₂ do que em tratamentos com concentrações maiores.

A partir desses resultados, comprehende-se que as microalgas podem aumentar a sua biofixação de CO₂ proporcionalmente a sua biomassa inicial, além disso os níveis de tolerância ao CO₂, ou seja, para que não sejam inibitórios ao seu crescimento, levam este fator em consideração, quanto maior a biomassa inicial, maior a sua tolerância (Chiu *et al.*, 2008). Todavia, é necessário averiguar os níveis de CO₂ que a espécie de microalgas está sendo submetida, visto que a maioria das espécies possuem inibição em valores superiores a 5% de CO₂ injetado (Zhao e Su, 2014).

Além disso disso foi possível observar que, todos os tratamentos, sem e com suplementação de 2% de CO₂ do presente experimento dispuseram de taxas de RCO₂ e eficiências na captura de CO₂ maiores que os resultados discorridos acima. Projetando-se assim que, o cultivo de microalgas em SMW, combinado a suplementação nessas concentrações pode aumentar eficiência de assimilação de CO₂.

3.3 Efeitos da carga de CO₂ na acumulação de componentes bioquímicos

As células das microalgas utilizam a fonte luminosa como fonte de energia para transporte e assimilação de CO₂, sendo não somente esse nutriente assimilado, mas demais que estão presentes no meio de cultura (Rosli *et al.*, 2020). Dessa forma, o aumento de CO₂ num sistema de cultivo pode favorecer a produção de biomassa bem como o acúmulo de componentes bioquímicos como os carboidratos, lipídios e proteínas (Makowska e Dziosa (2024); Lieutaud *et al.*, 2019; Sathasivam *et al.*, 2019). Tal favorecimento é obtido caso as concentrações de CO₂ estejam em níveis ideais nos cultivos (Condor *et al.*, 2024). Após o período de produção de biomassa e sua coleta, a análise elementar apresentou os seguintes resultados descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Percentuais de biomoléculas detectados na biomassa de *Chlorella* sp. para os tratamentos sem e com suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂) em água resíduária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹.

TRATAMENTO	Proteínas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
FBR1 10 mL L⁻¹	32,00 _(2,65) c	37,33 _(2,52) a	2,21 _(0,00) d
FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹	29,00 _(1,00) c	30,67 _(4,04) b	9,39 _(0,00) b
FBR1 20 mL L⁻¹	42,33 _(2,52) b	28,33 _(1,53) b	6,16 _(0,00) c
FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹	43,67 _(0,58) a	35,33 _(0,58) a	10,60 _(0,01) b
FBR1 30 mL L⁻¹	49,67 _(0,58) a	20,33 _(1,53) d	6,40 _(0,00) c
FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹	51,67 _(2,89) a	25,67 _(0,58) c	12,24 _(0,01) a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$); os valores do desvio padrão estão apresentados entre parênteses.

Ao realizar a análise de variância quanto a assimilação de proteínas, carboidratos e lipídios, verificou-se que o teste de Tukey foi significativo ao nível de 5% de probabilidade, afirmindo que os tratamentos possuem efeitos diferentes sobre cada uma das características analisadas, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade.

Abdel-latif *et al.* (2022) apontam que os níveis de proteínas, lipídios e carboidratos em *Chlorella* sp. podem chegar a 61%, 12% e 13%. Wang *et al.* (2021) descrevem que os teores de proteínas podem variar significativamente entre espécies e linhagens de microalgas, e são fortemente influenciadas pelo meio de cultivo, apresentando teores de 40 a 60%. Além disso, outros nutrientes como vitaminas e alguns pigmentos também estão presentes em suas células (Sa *et al.*, 2014).

Por meio da Tabela 4 verifica-se que, quanto ao percentual de proteínas, os melhores tratamentos foram FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, FBR1 30 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, apresentando respectivamente 43,67%, 49,67% e 51,67%, destacando-se o FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, com maior quantidade proteica em sua célula. Os piores tratamentos foram o FBR1 10 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, com apenas 32% e 29% de proteína. De modo geral, os tratamentos com maior concentração, considerando demais fatores intervenientes ao cultivo em níveis ideais, são mais favoráveis ao aumento, crescimento e multiplicação de células, elevação do teor de proteína, fatores esses que podem estar diretamente ligados a incorporação maior de nitrogênio em suas células e seu uso para biossíntese de aminoácidos (Ding *et al.*, 2024). Além disso, a adição de CO₂ potencializou essa produção proteica devido

maior disponibilidade de carbono inorgânico e sua assimilação nas vias metabólicas de aminoácidos (a.a.).

Mello *et al.* (2024) ao cultivar com outra linhagem de microalgas, *Arthrosphaera platensis* DHR 20, em água residuária da bovinocultura digeridas anaerobicamente, obtiveram 41,8% de proteínas em sua biomassa de microalgas, valores próximos ao encontrados nessa pesquisa. Adicionalmente, Vassalle *et al.* (2020) ao buscarem remover micro poluentes por meio de um sistema UASB-HRAP, combinando tratamento anaeróbico e aeróbico com microalgas e tempo de retenção hidráulica de 7 dias, verificaram quea *Chlorella* sp. foi a microalga predominante no experimento e após quantificação bioquímica encontrou-se teores de proteínas e carboidratos em torno de 62% e 10%. Os valores encontrados por Vassalle *et al.* (2020) são similares aos apontados por Abdel-latif *et al.* (2022).

Ding *et al.* (2024) ao cultivarem 9 (nove) linhagens de microalgas em água residuária da aquicultura marinha observaram teores de proteína de 44,28%, 40,42% e 38,35% para as microalgas *I. galbana*870, *Chlorella* sp. e *N. oculata*. Ao confrontar os resultados observados por Ding *et al.* (2024) com os do presente experimento, 4 (quatro) dos 6 (seis) tratamentos apresentaram melhores resultados quando cultivados em água residuária sintética da indústria de leite de soja (Tabela 4).

Diante disso, é notório que o comportamento da *Chlorella* sp. variou em cada uma das pesquisas apresentadas, no que diz respeito a sua produção proteínas, indicativo esse que, o meio de cultivo é um fator importante, e que pode ter efeitos positivos ou negativos para a síntese de proteica.

Quanto aos teores de carboidrato, seus valores foram inversamente aos encontrados para os teores de proteína, os tratamentos FBR1 10 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹ possuíram maiores percentuais de carboidratos em suas células, 37,33% e 35,33%, respectivamente. Ao passo que, ao aumentar a concentração da água residuária e adicionar CO₂, a exemplo dos tratamentos FBR1 30 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, seu teor de carboidrato ficaram em 20,33% e 25,67%, respectivamente. Esses últimos resultados indicam que a microalga *Chlorella* sp. priorizou a síntese de biomoléculas estruturais e funcionais, neste caso as proteínas, ao invés de serem assimilados para armazenamento de energia em forma de carboidratos (Ding *et al.*, 2024).

Além das proteínas e carboidratos, os lipídios são biomoléculas presentes na biomassa de microalgas e sua quantificação é um fator importante no que tange a produção de biodiesel. A Figura 5, apresenta os resultados de seus percentuais pós extração.

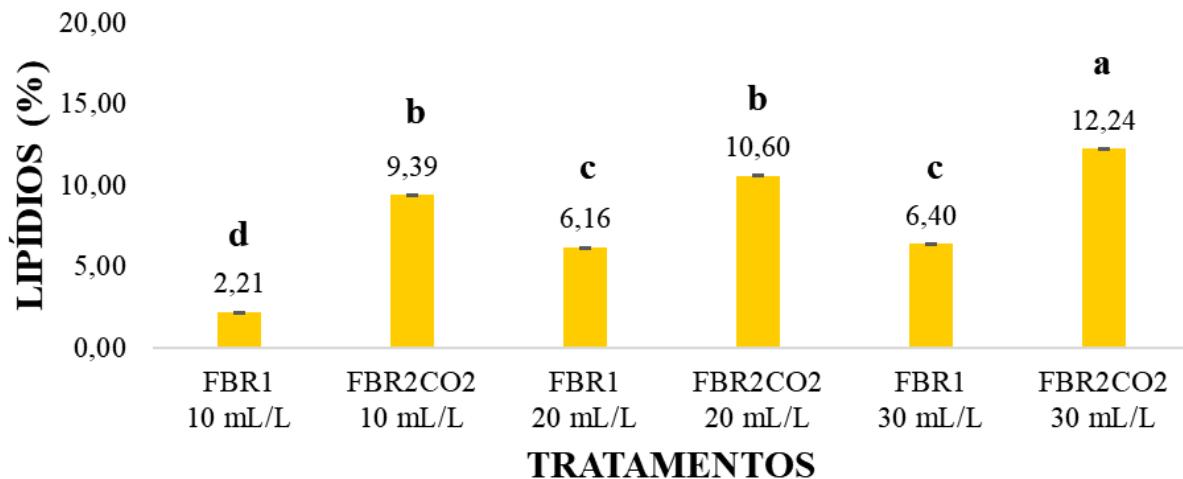


Figura 5: Percentual de produtividade lipídica de microalgas *Chlorella* sp. cultivadas em água residuária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹, em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂).

Na produção lipídica, figura 5 os tratamentos FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ alcançaram os maiores teores de lipídios, respectivamente 9,39%, 10,60% e 12,24%. O tratamento com pior desempenho na extração de lipídios foi o FBR1 10 mL/L que obteve apenas 2,21% de lipídios disponíveis nas células das microalgas. O aumento de concentração do meio de cultivo combinado com a adição de CO₂ favoreceram a acumulação de lipídios pelas microalgas, ao passo que a menor concentração estudada e a ausência de suplementação de CO₂ não foram ideais para produção lipídica.

O cultivo de microalgas em águas residuárias tem sido amplamente estudado (Saranya e Shanthakumar, 2019). Em um estudo recente, Lin, Wang e Dong (2024) cultivaram *Chlorella vulgaris* e *Pseudochlorella pringsheimii* em um ambiente misto de efluentes de esgoto e curtume a 20%, resultando na obtenção de 9,3% e 25,4% de lipídios na biomassa microalga. *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum humicola*, *Botryococcus braunii* e *Chlamydomonas* sp. também cultivadas em águas residuárias de característica doméstica foi identificada uma boa resposta quanto ao seu crescimento no meio de cultivo, além de acumularem alto teor de lipídio entre 21,54% e 41,98% (Hena, Abida e Tabassum, 2015).

Jain *et al.* (2019) ao cultivarem *Chlorella vulgaris* NIOCCV em três níveis de suplementação de CO₂, 5%, 10% e 20%, o conteúdo lipídico foi de 28,5%, 38% e 18%, respectivamente. Portanto conclui-se que nesse estudo, a suplementação em 10% de CO₂ demonstrou melhor eficiência em produção de lipídios, além de apresentar também menor concentração total de nitrogênio em sua célula, conforme também apresentado pelo autores. Com isso, fica evidenciado que a privação de nitrogênio é um fator importante quando se deseja obter um maior rendimento lipídico, uma vez que, a relação carbono/nitrogênio (C/N) presente na biomassa de microalgas são determinantes para o acúmulo de lipídios (Mello *et al.*, 2024; Stewart e Franklin, 2008).

A relação C/N varia conforme a espécie de microalga, pois o nitrogênio é um importante fator no processo de síntese proteica. Geralmente a alta relação desses dois compostos (C/N), em torno de 20-30:1 favorece a acumulação de lipídios na célula de microalgas (Sgorlon, Rizk, Bergamasco, 2011). Dessa forma, quando o nitrogênio está limitado, ocasionado estresse por ausência desse nutriente, o C/N será elevado, e por consequências as microalgas direcionam seu metabolismo para síntese de composto de energia, neste caso os lipídios. Isso ocorre pois o carbono é o principal componente estrutural de lipídios, ao passo que as proteínas utilizam do nitrogênio em sua síntese, caso a razão C/N $\leq 10:1$, (Brennan e Owende, 2010).

Tal afirmativa, comprova-se ao analisar a razão C/N na biomassa descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Relação C/N na biomassa de microalgas cultivadas em água residuária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹, em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂).

TRATAMENTOS	C (%)	N (%)	C/N
FBR1 10 mL L⁻¹	25,4	5,27	5:1
FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹	35,8	4,53	8:1
FBR1 20 mL L⁻¹	22,94	6,73	3:1
FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹	13,5	7,17	2:1
FBR1 30 mL L⁻¹	21,84	7,83	3:1
FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹	14,16	8,17	2:1

Carbono (C); nitrogênio (N) e relação carbono/nitrogênio (C/N)

As relações C/N, Tabela 5, abaixo dos valores mínimos dispostos pela literatura (20-30:1), favoreceram uma síntese de proteínas mais eficiente que a acumulação lipídica. Os

resultados da extração apontaram que a maior produtividade de lipídios foi no tratamento FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, tratamento esse que, além do carbono orgânico, foi suplementado 2% de CO₂. Por um lado, a suplementação de favoreceu a produção de lipídios, todavia menores do que os encontrados por Jain *et al.* (2019); Lin, Wang e Dong, (2024) e Mello *et al.* (2024). Ademais, a síntese de proteínas embora estivesse com valores abaixo dos estipulados por Abdel-latif *et al.* (2022), não contrapõem os resultados encontrados por Ding *et al.* (2024).

3.4 Biorremediação

A indústria de alimentos gera grande quantidade de água resíduária, tal efluente torna-se um dos principais poluidores do ambiente, como compostos orgânicos e inorgânicos. Tais compostos necessitam de adequado tratamento antes de sua disposição final em corpos receptores, evitando o agravamento da poluição das águas superficiais e subterrâneas (Lee e Stuckey, 2022; Saravanan *et al.*, 2023).

Na Figura 6 e Tabela 6 pode-se observar o comportamento da microalga *Chlorella* sp., e a cinética de remoção de N, NH₄⁺, DQO E COT da água resíduária sintética da indústria de leite soja, em diferentes concentrações.

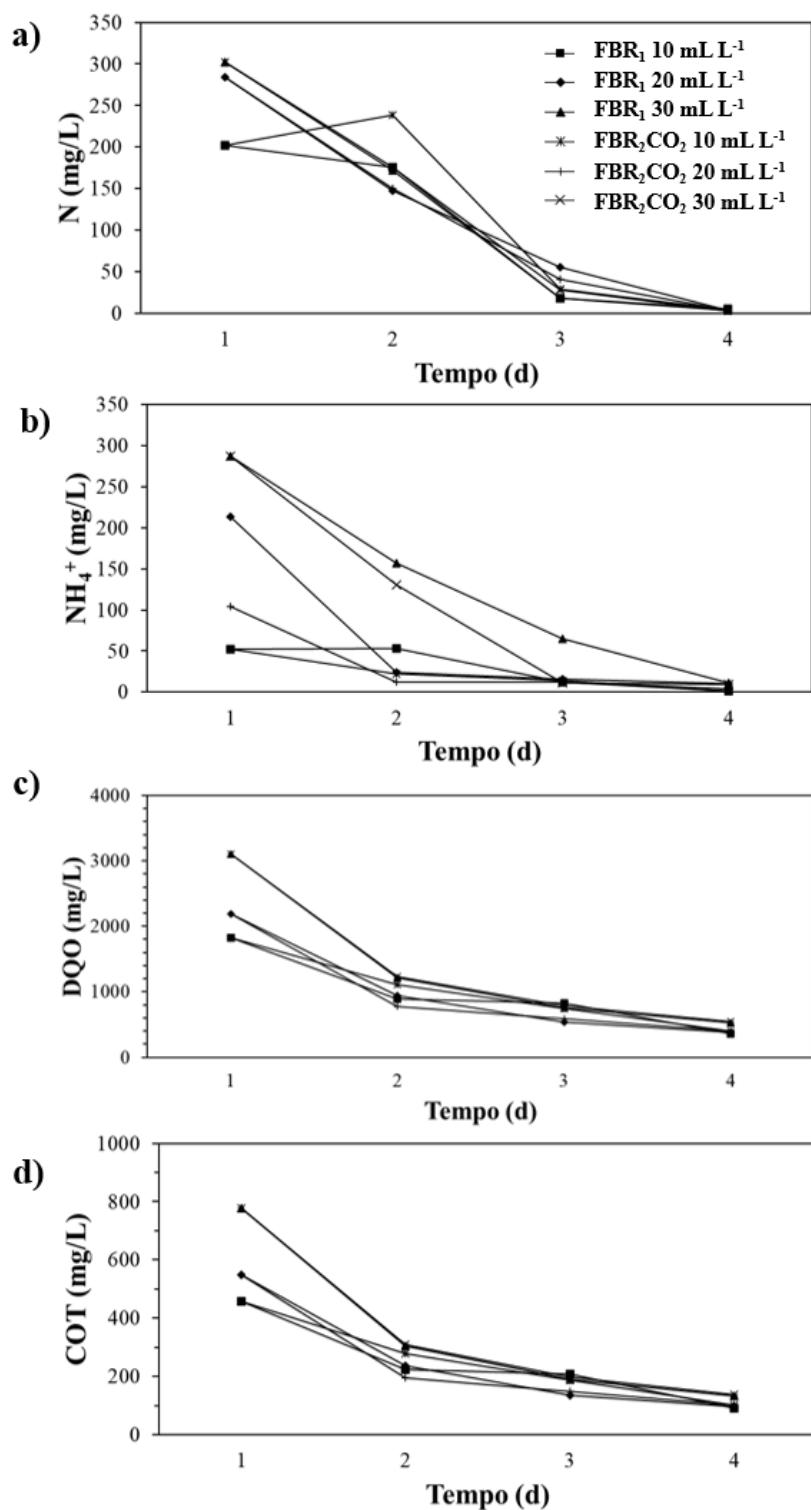


Figura 6: Avaliação da eficiência de remoção e cinética do tratamento com *Chlorella* sp. em água residuária sintética de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹, em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2 CO₂).: a) Nitrogênio Total – N; b) Nitrogênio Amoniacal – NH₄⁺; c) Demanda Química de Oxigênio – DQO; e d) Carbono Orgânico Total – COT.

Tabela 6: Equações da cinética de remoção e eficiência da biorremediação pós-tratamento com microalgas *Chlorella* sp. de água residiária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹, em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂).

CINÉTICA DE REMOÇÃO					
PARÂMETROS		N		NH ₄ ⁺	
TRATAMENTOS	Equações de Cinéticas	R ²	Equações de Cinéticas	R ²	
FBR1 10 mL L ⁻¹	y = -156,4ln(x) + 224,96	0,84	y = -39ln(x) + 60,589	0,76	
FBR2CO ₂ 10 mL L ⁻¹	y = -160,2ln(x) + 246,09	0,65	y = -35,36ln(x) + 50,401	0,98	
FBR1 20 mL L ⁻¹	y = -204,6ln(x) + 285,39	0,99	y = -148,7ln(x) + 184,03	0,82	
FBR2CO ₂ 20 mL L ⁻¹	y = -209,1ln(x) + 286,06	0,99	y = -71,65ln(x) + 90,006	0,83	
FBR1 30 mL L ⁻¹	y = -230,4ln(x) + 306,98	0,96	y = -200,8ln(x) + 289,79	0,99	
FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹	y = -228,6ln(x) + 308,89	0,97	y = -214,6ln(x) + 280,35	0,96	
PARÂMETROS		DQO		COT	
TRATAMENTOS	Equações de Cinéticas	R ²	Equações de Cinéticas	R ²	
FBR1 10 mL L ⁻¹	y = -995,4ln(x) + 1765,9	0,95	y = -248,9ln(x) + 442,77	0,95	
FBR2CO ₂ 10 mL L ⁻¹	y = -1017ln(x) + 1828,1	0,99	y = -254,1ln(x) + 458,33	0,99	
FBR1 20 mL L ⁻¹	y = -1337ln(x) + 2073,3	0,96	y = -334,2ln(x) + 519,63	0,96	
FBR2CO ₂ 20 mL L ⁻¹	y = -1292ln(x) + 2015,9	0,91	y = -323,1ln(x) + 505,28	0,91	
FBR1 30 mL L ⁻¹	y = -1891ln(x) + 2903	0,94	y = -472,7ln(x) + 727,05	0,94	
FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹	y = -1874ln(x) + 2907,6	0,94	y = -468,5ln(x) + 728,2	0,94	
EFICIÊNCIA DA BIORREMEDIACÃO (%)					
TRATAMENTOS		PARÂMETROS			
		N	NH ₄ ⁺	DQO	COT
					Free NH ₃
FBR1 10 mL L ⁻¹	97,1 _(1,0) b	97,3 _(0,7) a	80,3 _(0,7) c	80,1 _(0,7) c	38,57
FBR2CO ₂ 10 mL L ⁻¹	97,9 _(0,6) b	96,6 _(1,0) a	78,2 _(0,7) d	78,0 _(0,7) d	8,17
FBR1 20 mL L ⁻¹	98,6 _(0,2) a	95,2 _(0,5) b	82,8 _(0,4) a	82,6 _(0,4) a	41,22
FBR2CO ₂ 20 mL L ⁻¹	98,8 _(0,3) a	95,7 _(0,5) b	81,5 _(0,2) b	81,3 _(0,2) b	8,27
FBR1 30 mL L ⁻¹	98,8 _(1,2) a	96,0 _(0,5) b	83,0 _(0,2) a	82,9 _(0,2) a	61,7
FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹	99,1 _(0,2) a	96,8 _(0,1) a	82,3 _(0,1) a	82,2 _(0,1) a	7,52

N – Nitrogênio Total; NH₄⁺ - Nitrogênio Ammoniacal; DOQ – Demanda Química de Oxigênio; COT – Carbono Orgânico Total; Free NH₃ – Volatilização de amônio; Valores em parênteses indicam o desvio padrão; e, Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p > 0,05).

A Tabela 6 apresenta as equações de regressão obtidas, sendo verificada uma correlação logarítmica entre a redução das concentrações de poluentes e o tempo em dias de tratamento/cultivo de microalgas, e seus respectivos coeficientes de determinação (R^2) para cada um dos tratamentos estudados, bem como a eficiência de biorremediação para cada parâmetro. Dessa forma, ao realizar a análise de variância para quantificação da eficiência de biorremediação de N, NH_4^+ , DQO e COT verificou-se que o teste foi significativo ao nível de 5% de probabilidade, concluindo assim que os tratamentos possuem efeitos diferentes sobre cada uma das características analisadas, com um grau de confiança superior a 95% de probabilidade.

Os melhores coeficientes de determinação (R^2) $\geq 0,9$, evidenciando que o modelo matemático obtido se ajustou adequadamente a variabilidade dos obtidos, foram: 0,99; 0,99; 0,96; 0,97 dos tratamentos FBR1 20 $mL\ L^{-1}$, FBR2CO₂ 20 $mL\ L^{-1}$, FBR1 30 $mL\ L^{-1}$, FBR2CO₂ 30 $mL\ L^{-1}$. Esse resultado ao ser comparado com a análise estatística de eficiência de biorremediação, foram similares, pois esses mesmos tratamentos apresentaram eficiências de 98,6 ($\pm 0,2$)%; 98,8 ($\pm 0,2$)%; 98,8 ($\pm 1,2$)%; 99,1 ($\pm 0,2$), com concentrações de saída de: 3,8 $mg\ L^{-1}$; 4,2 $mg\ L^{-1}$; 3,5 $mg\ L^{-1}$ e 2,6 $mg\ L^{-1}$ respectivamente. Sendo esses resultados um indicativo, de que com o aumento de concentração da água resíduária, associado a suplementação de CO₂, ocorre um favorecimento da eficiência de tratamento.

Jain *et al.* (2019) ao se cultivar *Chlorella vulgaris NIOCCV* verificou uma taxa de remoção média de N de 79,68% sob condições de 5%, 10% e 20% de suplementação de CO₂, apontando que a eficiência aumentou conforme o CO₂ era adicionado. Já Lacerda Farias *et al.* (2023) obtiveram eficiências de 95 ($\pm 1,2$)% na remoção de N em esgoto doméstico tratado com *Chlorella vulgaris*. A presente pesquisa apresentou resultados superiores as pesquisas supracitadas.

É interessante notar que, a eficiência na biorremediação pode ser explicada pelas concentrações de N assimiladas e quantificados pela análise elementar da biomassa, bem como as razões de C/N que foram baixas (Tabela 4 e Tabela 5). Isso porque, caso a razão de C/N fosse alta, em torno de 20-30:1 haveria maior acumulação de lipídios e relação C/N $\leq 10:1$ melhor síntese proteica na célula de microalgas (Brennan e Owende, 2010; Sgorlon, Rizk, Bergamasco, 2019). Dessa forma, constata-se a *Chlorella* sp. utilizou o N como sua principal fonte de nutrientes no que tange seu desenvolvimento.

Na avaliação da biorremediação de NH_4^+ , os maiores coeficientes de determinação das equações de regressão logarítmicas foram obtidos nos tratamentos FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ ($R^2 = 0,96$), FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹ ($R^2 = 0,98$), e FBR1 30 mL L⁻¹ ($R^2 = 0,99$). E estatisticamente, os tratamentos com os melhores resultados de biorremediação foram FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹ - 96,6 ($\pm 1,0$)%, FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹ - 96,8 ($\pm 0,1$)% e FBR1 10 mL L⁻¹ - 97,3 ($\pm 0,7$), embora em todos os tratamentos tenham sido observados eficiências maiores que 95%. Silva *et al.* (2020), no uso de *Chlorella* sp. para o tratamento de efluente de aterro sanitário, com pH igual a 8,0, verificaram eficiências menores, de até 67% nos níveis de nitrogênio amoniacal. Ao se analisar os resultados das eficiências com os níveis de concentração do efluente de saída, o NH_4^+ apresentou valores inferiores ao padrão máximo para lançamento de efluente em corpos hídricos, conforme CONAMA n° 430/2011.

Foi verificado também os níveis de volatilização de NH_3 (*Free NH₃*), importante parâmetro ao se medir a eficiência de tratamento. A volatilização de NH_3 é um mecanismo utilizado para se remover bases nitrogenadas em efluentes, e a reação ocorre principalmente com o aumento do pH e temperatura do meio de cultivo.

Ao se analisar os resultados obtidos, a maior eficiência encontrada no FBR1 10 mL L⁻¹ - 97,3 ($\pm 0,7$), teve uma volatilização em torno de 38,57 %, com pH 9 e temperatura de 26,4 °C. Já a maior volatilização 61,7%, do tratamento FBR1 30 mL L⁻¹ apresentou eficiência de cerca de 96 ($\pm 0,5$)% na remoção de NH_4^+ . Isso evidencia que, em FBRs com água resíduária menos concentradas (10 mL L⁻¹) a *Free NH₃* foi o fator de maior impacto na eficiência do tratamento, ao passo que os demais tratamentos em que se aumentaram a concentração da água resíduária e adicionaram suplementação de 2% de CO₂ tiveram maiores remoções de N. Ressalta-se que o N é assimilado para síntese de proteína, produtividade de biomassa, levando a melhora na taxa de crescimento e diminuição do tempo de duplicação de células.

Tal situação foi verificada ao se utilizar microalgas *Spirulina platensis* DHR 20 em tratamento de água resíduária da bovinocultura digerida anaerobicamente por Souza *et al.* (2020), com eficiências de 90 a 99%, e a volatilização não influenciou na remoção e eficiência dos tratamentos.

Todavia, cabe ressaltar que em todos os tratamentos em que se adicionou CO₂ houve uma redução significativa nas taxas de volatilização de amônio, com pH médio entre pH 8 – 8,1, enquanto os tratamentos sem suplementação de 2% de CO₂ foi de pH 9 – 9,5.

Para a DQO e o COT os dados apresentaram menores eficiências quando comparadas aos demais parâmetros, sendo obtido eficiências entre 78 e 83%. O comportamento entre os dois parâmetros foi similares, sendo os melhores tratamentos: FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, FBR1 20 mL L⁻¹ e FBR1 20 mL L⁻¹, com resultados para DQO de 82,3 (±0,1)%; 82,8 (±0,1)%; 83 (±0,1)% e COT de 82,2 (±0,1)%; 82,6 (±0,1)%; 82,3 (±0,1)%, respectivamente.

A eficiência da *Chlorella* sp. em remover esses compostos significa que a microalga consegue consumir ou degradar a maior parte da matéria orgânica, sólidos e demais nutrientes ali presentes, utilizando ainda o carbono orgânico para produção de sua biomassa. Lacerda Farias *et al.* (2023) obtiveram eficiências de remoção de 95 (±6)% para DQO e 84 (±0,2)% para COT. De forma semelhante, de Souza *et al.* (2023) relataram remoções variando entre 76,9% e 79%, para DQO e COT respectivamente.

Apesar das variações observadas, a eficiência da *Chlorella* sp. em biorremediar a DQO e o COT presente na água residuária de leite de soja podem ser consideradas elevadas, sobretudo considerando que foram alcançadas em curtos tempos de retenção hidráulica.

3.5 Composição de ácidos graxos

A composição de ácidos graxos é uma importante etapa para averiguação da qualidade do biodiesel produzido, resultado da extração lipídica (Figura 5). Os ácidos graxos podem ser classificados em ácidos saturados (SFA), ácidos monoinsaturados (MUFA) e ácidos poli-insaturados (PUFA). No decorrer do experimento foram quantificados 10 SFA, 4 MUFA e 1 PUFA (Tabela 7).

Entre os ácidos graxos listados, os seguintes são classificados como ácidos graxos saturados (SFA): ácido heptanodióico (ácido subérico), ácido octanodióico (ácido sebácico), ácido octanoico (ácido caprílico), ácido nonanoico (ácido pelargônico), ácido nonanodióico (ácido azelaíco), ácido tetradecanoico (ácido mirístico), ácido hexadecanoico (ácido palmítico), ácido octadecanoico (ácido esteárico), ácido eicosanoico (ácido araquídico) e ácido docosanoico (ácido behênico). Esses compostos não contêm ligações duplas entre átomos de carbono e estão totalmente saturados com átomos de hidrogênio.

São classificados como ácidos graxos monoinsaturados (MUFA): ácido 10-octadecenoico (ácido vacênico), ácido 9-octadecenoico (ácido oleico), ácido 8-octadecenoico

(ácido elaídico) e ácido 15-octadecenoico (nome sistemático; sem nome comum). Esses ácidos graxos contêm uma única ligação dupla em sua cadeia hidrocarbonada, o que contribui para um ponto de fusão mais baixo em comparação com os saturados.

Por fim, o único ácido graxo poli-insaturado (PUFA) presente na lista é o ácido 9,12-octadecadienoico (ácido linoleico), que contém duas ligações duplas. Essa característica estrutural está associada a uma maior reatividade e a um papel mais relevante em funções fisiológicas e no valor nutricional.

Além desses parâmetros, outros também são fundamentais para determinação da qualidade do biodiesel, sendo eles: número de cetano (NC), índice de saponificação (SV, mg KOH g⁻¹), índice de iodo (IV), ponto de entupimento a frio (CFPP, °C); ponto de névoa (*Cloud Point* - CP, °C), estabilidade oxidativa (OS, h), poder calorífico superior (HHV, MJ kg⁻¹), viscosidade cinemática (ν , mm² s⁻¹), éster metílico de ácido graxo (FAME) e densidade (ρ , g cm⁻³). Os resultados desses indicadores de qualidade podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Propriedades físico-químicas do biodiesel extraído de microalgas *Chlorella* sp. cultivadas em água residuária sintética da indústria de leite de soja sob as concentrações de 10, 20 e 30 mL L⁻¹, em condição de ausência e existência de suplementação de 2% de CO₂ (FBR1 e FBR2CO₂).

Índices do biodiesel	ASTM D6751-23a	ANP	FBR1 10 mL L ⁻¹	FBR1 20 mL L ⁻¹	FBR1 30 mL L ⁻¹
Número de Cetano (NC)	> 45	> 48	56,34	69,6	64,93
SFA	ND	ND	13	90	36
MUFA	ND	ND	86	0	35
PUFA	ND	ND	0	0	14
SV (mg KOH g ⁻¹) - máx.	0,3	0,5	0,199	0,234	0,174
VI - máx.	ND	< 120	77,33	0	56,83
CFPP (°C)	15	0 a 20	-12,39	53,58	10,86
OS (h)	> 6	> 13	4,46	7,7	5,35
HHV (MJ kg ⁻¹)	ND	< 120	39,18	34,07	33,56
ν (mm ² s ⁻¹)	1,9 a 6	3,5 a 5	1,38	0,92	1,17
ρ (g cm ⁻³)	0,86 a 0,9	0,86 a 0,9	0,86	0,78	0,74
FAME			99	90	71

Índices do biodiesel	ASTM D6751-23a	ANP	FBR2CO ₂ 10 mL L ⁻¹	FBR2CO ₂ 20 mL L ⁻¹	FBR2CO ₂ 30 mL L ⁻¹
Número de Cetano (NC)	> 45	> 48	64,79	72,74	64,33
SFA	ND	ND	76	65	69
MUFA	ND	ND	0	13	28
PUFA	ND	ND	0	0	2
SV (mg KOH g ⁻¹) - máx.	0,3	0,5	0,295	0,188	0,222
VI - máx.	ND	< 120	0	11,69	28,8
CFPP (°C)	15	0 a 20	-16,48	8,34	28,45
OS (h)	> 6	> 13	7,7	7,27	6,54
HHV (MJ kg ⁻¹)	ND	< 120	25,65	29,99	38,53
ν (mm ² s ⁻¹)	1,9 a 6	3,5 a 5	0,07	0,88	1,25
ρ (g cm ⁻³)	0,86 a 0,9	0,86 a 0,9	0,67	0,68	0,86
FAME			76	78	97

ASTM D6751-23a e ANP - valores dos parâmetros recomendados de qualidade do biodiesel, conforme as diretrizes previstas em suas respectivas legislações. SFA - ácido graxo saturado (%); MUFA - ácido graxo monoinsaturado (%); PUFA - ácido graxo poli-insaturado (%); SV - valor de saponificação (mg g⁻¹); VI - valor de iodo, CFPP - ponto de entupimento do filtro frio (°C); OS - estabilidade de oxidação (h); HHV - valor de aquecimento superior (MJ kg⁻¹); ν - viscosidade cinemática (mm² s⁻¹); ρ - densidade (g cm⁻³); FAME - éster metílico de ácido graxo; salienta-se que CFPP no Brasil é variável conforme cada estado unidade da federação – UF; e, ND - não determinado.

De acordo com as recomendações da norma ANP (2024), a densidade do biodiesel deve compreender entre 0,86 e 0,9. Os tratamentos que apresentaram valores dentro do limite estabelecido foi o FBR1 10 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, ambos com 0,86 g cm⁻³. Os demais apresentaram menor densidade ao limite inferior estipulado padrão. A densidade em proporções ideais de ácidos graxos saturados e insaturados oferece alta qualidade ao biodiesel, garantido eficiência de ignição e produção energética (Anahas *et al.*, 2025).

O número de cetano (NC) mede a qualidade de ignição do biodiesel indicando a sua eficiência e rapidez na combustão do motor. Esse parâmetro se relaciona entre o intervalo de tempo da injeção e o tempo de ignição. Quanto maior o número de cetano mais rápida a resposta de ignição, menor tempo de ignição, favorecendo assim a partida a frio do motor, e caso o NC seja menor, maior será o atraso na ignição. Todavia, cabe-se ressaltar que NC muito elevados, pode-se favorecer a combustão irregular e maior emissão de fuligem (Liu *et al.*, 2022).

As normas ASTM D6751 (2024) e ANP (2024), definiram que os padrões de NC devem ser maiores que 45 e 48, respectivamente. Em todos os tratamentos o NC ficou dentro dos padrões estabelecidos, com valores que variaram de 56,34 (FBR1 10 mL L⁻¹) a 72,74 (FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹). Ou seja, esse indicador de qualidade do biodiesel obtido nos respectivos tratamentos indicam um ótimo desempenho no tempo de ignição.

Os Números de Cetano (NCs) calculados nesta pesquisa mostraram-se semelhantes aos resultados destacados por Mekonnen *et al.* (2024), sendo o tratamento FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, o que apresentou o melhor desempenho com um NC de 72,74. Esse valor é superior aos obtidos por Mekonnen *et al.* (2024) em biodiesel produzido a partir de diversas matérias-primas, como coco (66,30 ± 1,04), palma (62,50 ± 0,94), azeitona (58,60 ± 0,88), canola (48,50 ± 0,73), milho (48,28 ± 0,72) e soja (47,00 ± 0,71).

Além disso, os valores obtidos nesta pesquisa também superaram os de outros estudos com microalgas, como os de Mello *et al.* (2024), que cultivaram *Arthrosphaera platensis* DRH 20 em água residuária da bovinocultura digerida anaerobicamente e os de Khosravinia *et al.* (2023), que cultivaram *Chlorella vulgaris* em lago de água salina, obtendo NC de 51 e 55,38 respectivamente. Tal resultado evidencia o elevado potencial da suplementação de CO₂ em cultivos de *Chlorella* sp. a fim de se extrair lipídio de sua biomassa para produção para a produção de biodiesel de alta qualidade, com características superiores às de diversas matérias-primas convencionais e alternativas.

Outro parâmetro importante da qualidade do biodiesel é a viscosidade cinemática (ν – $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$), ela determina a qualidade de atomização do combustível e o desgaste do sistema que se fornece combustível. Esse parâmetro quando elevado faz com que a atomização do combustível piore e aumente a emissão de poluentes, entretanto, em níveis muito baixos dificultará a formação de uma pequena camada de óleo nas superfícies das peças, acelerando o desgaste do sistema responsável por fornecer o combustível (Liu *et al.*, 2022).

Diante disso, as normas ASTM D6751 (2024) e ANP (2024) estipularam limites inferiores e superiores de 1,9 a 6 e 3,5 a 5 $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$, os quais todos os tratamentos se apresentaram fora dos padrões mínimos estabelecidos, sendo necessário adoção de medidas, como a mistura com outro diesel, ou biodiesel afim de atender a legislação. Tal hipótese foi testada por Arunprasad e Elango (2020), os quais verificaram a viscosidade para o biodiesel de microalgas de 3,912; 3,913 e 3,91 $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$, na qual o primeiro foi a mistura de B20 sendo 20% de biodiesel e 80% de diesel, e os demais compostos do biodiesel e aditivos de Óxido de magnésio - MgO em concentrações de B20 +50 ppm de nanopartículas, e B20 + 100 ppm de nanopartículas, respectivamente.

Todos os tratamentos apresentaram valor de iodo (VI) menores que o estabelecido pela norma ANP (2024), menos de 120 g de Iodo/100 g, evidenciando baixa susceptibilidade a oxidação. Sendo isso evidenciado no cálculo de estabilidade oxidativa (OS) que mostrou valores abaixo e próximo ao limite mínimo da norma ASTM D6751 (2024), foram eles: 5,35 (FBR1 30 mL L^{-1}) e 6,54 (FBR2CO₂ 30 mL L^{-1}), tais valores sofreram influência dos ácidos Linoleico (C18:2, ω -6) e Linolênico (C18:3, ω -3). Essa afirmação justifica-se pelo fato dos PUFAs serem considerados responsáveis por reduzir o tempo de oxidação e rendimento do biodiesel (Khosravinia *et al.*, 2023). Os demais tratamentos FBR1 10 mL L^{-1} , FBR2CO₂ 10 mL L^{-1} , FBR1 20 mL L^{-1} , FBR2CO₂ 20 mL L^{-1} apresentaram melhor estabilidade oxidativa por não haver PUFAs em sua composição. Todavia, ressalta-se que pelas recomendações da norma ANP (2024), esses valores estão abaixo do mínimo para os padrões de qualidade do biodiesel.

O ponto de entupimento de filtro a frio (CFPP) é o parâmetro que indica a temperatura mínima abaixo da qual o biodiesel começa a formar cristais e que pode levar ao entupimento do filtro de combustível. Pela norma ANP (2024) o CFPP para evitar a cristalização deve estar entre 0 °C e 20 °C a depender da região, enquanto pela ASTM D6751 (2024) esse valor é de 15 °C.

Os FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, FBR1 30 mL L⁻¹ foram os que tiveram melhor índice de CFPP, estando sob condições para uso na região sul do país em certos períodos do ano. O desfavorecimento desse parâmetro pode ser explicado pelo alto teor de ácidos graxos saturados, que em grandes proporções afetam negativamente essa propriedade (Girardi, 2019). Tal fato pode ser verificado no tratamento FBR1 20 mL L⁻¹, com SFA – 90%, e por consequência o valor do CFPP foi de 53,58 °C, e em caso contrário, com maiores ácidos insaturados, o biodiesel se tornaria mais fluido.

3.6 Balanço de Massa

Além disso foi realizado um balanço de massa, levando em consideração uma empresa que processe 50.000 Kg de soja ao dia para produção de leite vegetal. E uma geração de efluentes de 6 L/Kg.d¹ de soja processada. As Figuras 7 e 8 estão apresentados os balanços, levando em consideração os tratamentos que obtiveram maior produtividade de biodiesel e bioetanol.

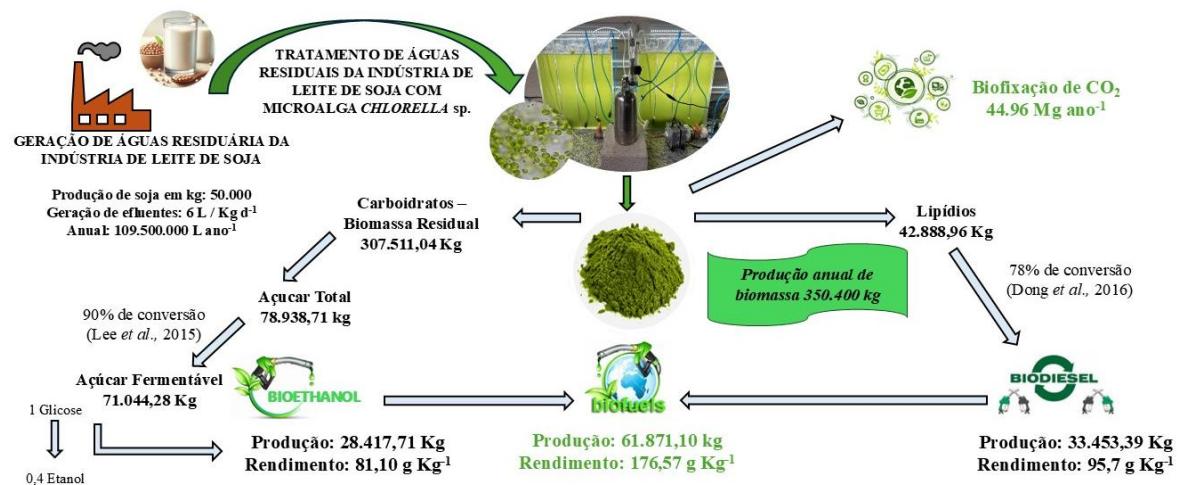


Figura 7: Balanço de massa e melhor produtividade de biodiesel – FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹.

Observa-se por meio da Figura 7, que o FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹, situação projetada com base no balanço de massa teórico, foi a que apresentou o maior impacto na produção de biodiesel, com uma produtividade de 33.453,39 Kg de biodiesel e 28.417,71 Kg de bioetanol, acumulando uma produção total de biocombustível ao ano de 61.871,10 Kg, com rendimento de 176,57 g Kg⁻¹.

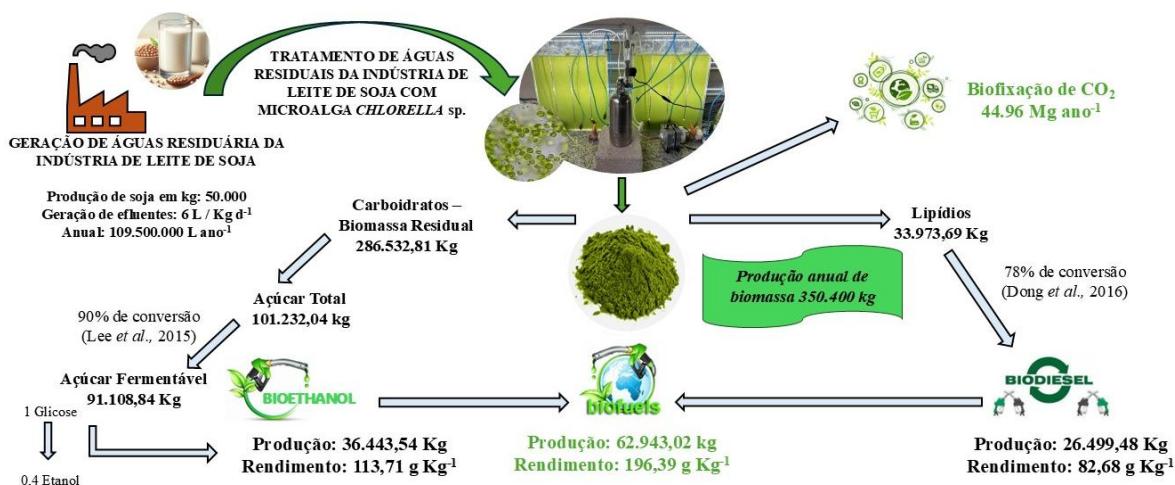


Figura 8: Balanço de massa e melhor produtividade de biodiesel – FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹.

Quanto a Figura 8, verifica-se que o FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, situação projetada com base no balanço de massa teórico, foi a que apresentou o maior impacto na produção de bioetanol, tendo uma produtividade de 36.443,54 Kg, *versus* 26.499,48 Kg anuais para o biodiesel. Resultando numa produtividade anual e rendimento de biocombustíveis totais de 62.943,02 Kg e 196,39 g Kg⁻¹.

Vale destacar que as duas projeções geradas demonstram que os tratamentos com maiores volumes e suplementação de CO₂ foram mais eficazes em termos de produtividade. Isso sugere que maiores rendimentos de biocombustível podem ser alcançados com a combinação de volumes maiores e adição de CO₂ ao meio de cultivo.

O desenvolvimento de uma produção sustentável de biocombustível a partir de microalgas está intimamente ligado não apenas à eficiência biológica, mas também aos aspectos operacionais e logísticos do processo, uma vez que as refinarias de biocombustível podem estar localizadas em regiões distantes das estações de tratamento de efluentes, onde a biomassa de microalgas será produzida. É amplamente reconhecido que o cultivo de microalgas em águas residuárias oferece benefícios ambientais claros; no entanto, a transição do laboratório para a escala industrial pode enfrentar desafios operacionais. Entre eles, a integração entre a produção de biomassa e o processamento a jusante desempenha um papel crucial na determinação da viabilidade global do sistema.

Em termos de viabilidade econômica, pesquisas recentes sobre análise de ciclo de vida (ACV) de biocombustível para aviação produzido a partir de microalgas demonstraram que a logística de transporte da biomassa de microalgas é o principal desafio ambiental na produção

do biocombustível (Fortier *et al.*, 2014). O transporte dessa biomassa até as refinarias contribui significativamente para as emissões de gases de efeito estufa. Soluções como a produção do biocombustível na própria estação de tratamento, como um processo integrado, poderiam mitigar essas emissões, além de aproveitar recursos locais, como o metano biogênico (Vasudevan *et al.*, 2012; Rickman *et al.*, 2013). No entanto, isso exigiria maior capacitação técnica e coordenação entre unidades descentralizadas.

Do ponto de vista da transição energética e da economia circular, o uso de microalgas cultivadas em águas residuárias representa uma abordagem promissora para reduzir a dependência de combustíveis fósseis, mitigar impactos ambientais e valorizar resíduos industriais. A integração dessa tecnologia em cadeias produtivas sustentáveis pode contribuir para a descarbonização do setor energético e a criação de novos modelos de bioeconomia, alinhados às metas globais de desenvolvimento sustentável.

Além disso, é necessário destacar que o uso da microalga *Chlorella* sp., cultivada em efluente de leite de soja, é um tema recente. Compreende-se também que poucos estudos abordam esse tipo específico de efluente, que possui alta carga orgânica e ampla disponibilidade em países produtores de soja, como o Brasil. Esse método inovador oferece uma alternativa sustentável para o reaproveitamento de resíduos agroindustriais, com potencial tanto para a produção de biocombustível quanto para o tratamento de águas residuárias em regiões com alta concentração de agroindústrias.

A partir desses apontamentos comprehende-se que pesquisas futuras devem aprofundar a viabilidade técnico-econômica desses processos, incluindo escalabilidade, otimização da produtividade de biomassa e avaliação do ciclo de vida, garantindo uma alternativa competitiva e ambientalmente responsável para a matriz energética.

4 CONCLUSÃO

O tratamento FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ demonstrou a maior eficiência na biorremediação, com remoção significativa de N, NH₄⁺, DQO e COT, além de apresentar menor valor de NH₃ livre (7,24), reduzindo o risco de toxicidade por amônio para as microalgas. Com base nos parâmetros das normas ASTM D6751 (2024) e da ANP (2024), avaliou-se o desempenho dos diferentes tratamentos (FBR1 10 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 10 mL L⁻¹, FBR1 20 mL L⁻¹, FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, FBR1 30 mL L⁻¹ e FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹) quanto ao rendimento e qualidade do biodiesel produzido a partir de *Chlorella* sp.. Os resultados indicaram que todos os tratamentos apresentaram propriedades compatíveis com a produção de biodiesel, com o FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ atendendo à maioria dos parâmetros normativos e demonstrando um desempenho superior. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a influência dos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) na qualidade do biodiesel, visando aprimorar suas características e garantir conformidade com os limites normativos. Adicionalmente, o tratamento FBR2CO₂ 30 mL L⁻¹ também apresentou o maior rendimento para bioetanol, seguido pelo FBR2CO₂ 20 mL L⁻¹, reforçando seu potencial para produção de biocombustíveis. Sob a ótica ambiental, a aplicação deste modelo contribui para a mitigação de impactos, como a redução das emissões de gases de efeito estufa, a biofixação de CO₂ e o aproveitamento de resíduos, em consonância com as diretrizes da bioeconomia, da economia circular e da transição energética.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-MALEK, F. et al. Microorganism-mediated algal biomass processing for clean products manufacturing: Current status, challenges and future outlook. **Fuel**, v. 311, n. September 2021, p. 122612, 2022.

ABDEL-LATIF, H. M. R. et al. The effectiveness of *Arthrosphaera platensis* and microalgae in relieving stressful conditions affecting finfish and shellfish species: An overview. **Aquaculture Reports**, v. 24, n. February, p. 101135, 2022.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução nº 968, de 15 de maio de 2024**. Estabelece a especificação do biodiesel e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos agentes econômicos que comercializem o produto em território nacional. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-920-2023-estabelece-a-especificacao-do-biodiesel-e-as-obrigacoes-quanto-ao-controle-da-qualidade-a-serem-atendidas-pelos-agentes-economicos-que-comercializem-o-produto-em-territorio-nacional?origin=instituicao>. Acesso em: 26 jun. 2025.

AKTER, S. et al. Bioethanol production from water-soluble and structural carbohydrates of normal and high sugary corn stovers harvested at three growth stages. **Energy Conversion and Management**, v. 221, n. July, p. 113104, 2020.

ALMEIDA, C. J. et al. Biotechnological assessment of culture conditions on the stress-induced carotenoid production of *Dunaliella salina* and growth kinetics of chlorophyceae microalgae strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 23. ed. Washington, DC: APHA, 2017.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **ASTM D6751 – 23A: Standard Specification for Biodiesel Fuel Blendstock (B100) for Middle Distillate Fuels**. 2024. Disponível em: <https://www.astm.org/d6751-23a.html>. Acesso em: 26 jun. 2025.

ANAHAS, A. M. P.; PRASANNABALAJI, N.; MURALITHARAN, G. Unlocking the potential of coal mine microalgae strains: Enhanced biodiesel production and CO₂ sequestration through cultivation optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 192, n. September 2024, p. 107489, 2025.

ARUNPRASAD, J.; ELANGO, T. Performance and emission characteristics of engine using *Navicula* Sp. Algae oil methyl ester with MgO nanoparticles. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 3164–3168, 2020.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 2. ed. Boca Raton: **CRC Press**, 2006.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/b16544>.

BEIGBEDER, J. B.; LAVOIE, J. M. Effect of photoperiods and CO₂ concentrations on the cultivation of carbohydrate-rich *P. kessleri* microalgae for the sustainable production of bioethanol. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 58, n. December 2021, p. 101934, 2022.

BOUWER, H.; CHANEY, R. L. Land treatment of wastewater. **Advances in Agronomy**, v. 26, p. 133–176, 1974. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(08\)60870-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(08)60870-6). Acesso em: 26 jun. 2025.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 430/2011, de 13 de maio de 2011. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**, p. 8, 2011.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

CAVALETT, O. **Análise do Ciclo de Vida da Soja**., 2008. Disponível em: <https://www.unicamp.br/fea/ortega/extensao/Tese-OtavioCavalett.pdf>

CHANG, W. et al. Mixotrophic cultivation of microalgae to enhance the biomass and lipid production with synergistic effect of red light and phytohormone IAA. **Renewable Energy**, v. 187, p. 819–828, 2022.

CHINI ZITTELLI, G. et al. **Valuable pigments from microalgae: phycobiliproteins, primary carotenoids, and fucoxanthin**. [s.l.] Springer International Publishing, 2023. v. 22

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, v. 167, n. 3, p. 201–214, 2013.

CHIU, S. Y. et al. Reduction of CO₂ by a high-density culture of Chlorella sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3389–3396, 2008.

CONDOR, B. E. et al. Effects of carbon dioxide concentration and swine wastewater on the cultivation of Chlorella vulgaris FSP-E and bioethanol production from microalgae biomass. **Applied Energy**, v. 369, n. May, p. 123617, 2024.

CONVERTI, A. et al. Chemical Engineering and Processing : Process Intensification Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. v. 48, p. 1146–1151, 2009.

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, 2018.

DE SOUZA, D. S. et al. New methods to increase microalgae biomass in anaerobic cattle wastewater and the effects on lipids production. **Biomass and Bioenergy**, v. 176, n. October 2022, p. 106915, 2023.

DING, W. et al. Journal of Water Process Engineering Pollutant removal and resource recovery of co-cultivated microalgae *Chlorella* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* for marine aquaculture wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 67, n. September, p. 106182, 2024.

DONG, T. et al. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. **Algal Research**, v. 19, p. 316–323, 2016.

DOS SANTOS, M. G. B. et al. Microalgae Biomass Production for Biofuels in Brazilian Scenario: A Critical Review. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 1, p. 23–42, 2021.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. CO₂ Biofixation via *Spirulina* sp. Cultures: Evaluation of Initial Biomass Concentration in Tubular and Raceway Photobioreactors. **Bioenergy Research**, v. 13, n. 3, p. 939–943, 2020.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EMERSON, K.; RUSSO, R. C.; LUND, R. E.; THURSTON, R. V. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379–2383, 1975.

ESIPOVICH, A. L. et al. Processing of lipid-enriched microalgae *Chlorella* biomass into biofuels and value-added chemicals. **Fuel**, v. 381, n. PB, p. 133484, 2025.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture – Systems at breaking point: Main report. Rome, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cb9910en>.

FEBRIENI, V. N.; SEDJATI, S.; YUDIATI, E. Optimization of light intensity on growth rate and total lipid content of *Chlorella vulgaris*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 584, n. 1, p. 012040, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/584/1/012040>.

FORTIER, M. O. P. et al. Life cycle assessment of bio-jet fuel from hydrothermal liquefaction of microalgae. **Applied Energy**, v. 122, n. July 2011, p. 73–82, 2014.

GALDEANO, M. C. et al. Obtenção de Extrato de Soja com Menor Produção de Resíduos Industriais. **Comunicado Técnico 212**, v. Novembro, p. 1–4, 2015.

GHAFFAR, I. et al. A review on the sustainable procurement of microalgal biomass from wastewaters for the production of biofuels. **Chemosphere**, v. 311, n. P2, p. 137094, 2023.

GIRARDI, J. C. Otimização do ponto de entupimento de filtro a frio de biodiesel de babaçu. 2019.

GONÇALVES, B. Z. Tratamento de efluente de laticínio em reator de leito estruturado aeróbio. p. 52, 2017.

GUPTA, A. K. et al. Biosynthesis and extraction of high-value carotenoid from algae. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 26, n. 6, p. 171–190, 2021.

HENA, S. et al. Dairy farm wastewater treatment and lipid accumulation by *Arthrosphaera platensis*. **Water Research**, v. 128, p. 267–277, 2018.

HINTZ, N. H.; ZEISING, M.; STRIEBEL, M. Changes in spectral quality of underwater light alter phytoplankton community composition. **Limnology and Oceanography**, v. 66, n. 9, p. 3327–3337, 2021.

IEA. **Análise Energética Global: Emissões de CO2 em 2021**. Disponível em: <<https://www.iea.org/reports/global-energy-review-co2-emissions-in-2021-2>>.

IEVINA, B.; ROMAGNOLI, F. Bioresource Technology Unveiling underlying factors for optimizing light spectrum to enhance microalgae growth. **Bioresource Technology**, v. 418, n. September 2024, p. 131980, 2025.

IPCC. **Ações urgentes contra mudança climática são necessárias para garantir um futuro habitável, alerta IPCC**. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/224004-acoes-urgentes-contra-mudanca-climatica-sao-necessarias-para-garantir-um-futuro-habitavel>>. Acesso em: 15 out. 2023.

JAIN, D. et al. Bioresource Technology Short Communication CO 2 fixation and production of biodiesel by *Chlorella vulgaris* NIOCCV under mixotrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 273, n. September 2018, p. 672–676, 2019.

KHAIRUDDIN, F. et al. Evaluation on microalgae for the production of bio-chemicals and electricity. **Chemosphere**, v. 350, n. November 2023, p. 141007, 2023.

KHOSRAVINIA, S. et al. Bioprospecting of Ten Microalgae Species Isolated from Saline Water Lake for Evaluation of the Biodiesel Production. **Bioenergy Research**, p. 1090–1103, 2023.

KIM, M. et al. Cultivation of *Chlorella* sp. HS2 using wastewater from soy sauce factory. **Chemosphere**, v. 342, n. September, 2023.

LACERDA FARIAS, S. et al. Remoção de nutrientes em sistema simbótico microalga-bactéria: influência da adição de CO₂, O₂ e tipo de cultura. **Revista DAE**, v. 71, n. 240, p. 157–170, 2023.

LEE, O. K.; OH, Y. K.; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 22–27, 2015.

LEE, S. Y.; STUCKEY, D. C. Separation and biosynthesis of value-added compounds from food-processing wastewater: Towards sustainable wastewater resource recovery. **Journal of Cleaner Production**, v. 357, n. January, p. 131975, 2022.

LIEUTAUD, C. et al. Fast non-invasive monitoring of microalgal physiological stage in photobioreactors through Raman spectroscopy. **Algal Research**, v. 42, n. June, p. 101595, 2019.

LIN, H.; WANG, Y.; DONG, Y. Journal of Environmental Chemical Engineering A review of methods , influencing factors and mechanisms for phosphorus recovery from sewage and sludge from municipal wastewater treatment plants. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 111657, 2024.

LIU, H. et al. Valorization of the microalgae fixing CO₂ from flue gas by co-hydrothermal liquefaction with high-protein microalgae : Denitrogenation of bio-oil by ash and high energy recovery. **Fuel**, v. 340, n. September 2022, p. 127566, 2023.

LIU, J. et al. An overview of polyoxymethylene dimethyl ethers as alternative fuel for compression ignition engines. **Fuel**, v. 318, n. November 2021, p. 123582, 2022.

MAKOWSKA, M.; DZIOSA, K. Environmental Technology & Innovation Influence of different pyrolysis temperatures on chemical composition and graphite-like structure of biochar produced from biomass of green microalgae Chlorella sp. **Environmental Technology & Innovation**, v. 35, n. March, p. 103667, 2024.

MEKONNEN, K. D.; ENDRIS, Y. A.; ABDU, K. Y. Alternative Methods for Biodiesel Cetane Number Valuation: A Technical Note. **ACS Omega**, v. 9, n. 6, p. 6296–6304, 2024.

MELLO, C. DE et al. Pollution control and biodiesel production with microalgae: new perspectives on the use of flat panel photobioreactors regarding variation in volume application rate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, n. 49, p. 58973–58987, 2024.

NUR, M. M. A. et al. Innovative strategies for utilizing microalgae as dual-purpose biofertilizers and phycoremediators in agroecosystems. **Biotechnology Reports**, v. 45, n. November 2024, p. e00870, 2025.

RAEESOSSADATI, M. J. et al. CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. **Algal Research**, v. 6, n. PA, p. 78–85, 2014.

RICKMAN, M. et al. Life-cycle and techno-economic analysis of utility-connected algae systems. **Algal Research**, v. 2, n. 1, p. 59–65, 2013.

ROSLI, S. S. et al. Optimum interaction of light intensity and CO₂ concentration in bioremediating N-rich real wastewater via assimilation into attached microalgal biomass as the feedstock for biodiesel production. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 141, p. 355–365, 2020.

SA, C. et al. Morphology , composition , production , processing and applications of Chlorella vulgaris : A review. v. 35, p. 265–278, 2014.

SARANYA, D.; SHANTHAKUMAR, S. Green microalgae for combined sewage and tannery effluent treatment: Performance and lipid accumulation potential. **Journal of Environmental Management**, v. 241, n. March, p. 167–178, 2019.

SARAVANAN, A. et al. Strategies for enhancing the efficacy of anaerobic digestion of food industry wastewater: An insight into bioreactor types, challenges, and future scope. **Chemosphere**, v. 310, n. September 2022, p. 136856, 2023.

SARWER, A. et al. **Algal biomass valorization for biofuel production and carbon sequestration: a review**. [s.l.] Springer International Publishing, 2022. v. 20

SATHASIVAM, R. et al. Saudi Journal of Biological Sciences Microalgae metabolites : A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 709–722, 2019.

SGORLON, J. G.; RIZK, M. C.; BERGAMASCO, R. Avaliação da DQO e da relação C / N obtidas no tratamento anaeróbio de resíduos fruti-hortícolas. p. 421–424, 2011.

SILVA, M. C. C. DE P. E et al. Remoção De Nitrogênio Amoniacal Por Chlorella Sp. Em Diferentes Diluições De Lixiviado De Aterro Sanitário/Amoniacal Nitrogen Removal By Chlorella Sp. in Different Dilutions of Sanitary Terry Dilution. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 86620–86631, 2020.

STEWART, P., FRANKLIN, M., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nat Rev Microbiol** 6, 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.

TAKESHITA, T. et al. Bioresource Technology Starch and lipid accumulation in eight strains of six Chlorella species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 158, p. 127–134, 2014.

TOMAR, S. et al. Microalgae: A promising source for biofuel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 53, n. August, p. 102877, 2023.

VASSALLE, L. et al. Chemosphere Can high rate algal ponds be used as post-treatment of UASB reactors to remove micropollutants ? v. 248, 2020.

VASUDEVAN, V.; STRATTON, R. W.; PEARLSON, M. N. Supporting Information (SI) for : Environmental Performance of Algal Biofuel Technology Options. p. 1–35, 2012.

WANG, Y. et al. Novel hybrid alcohol-dominated reaction network for highly selective conversion of CO₂ into ethene. **Chem Catalysis**, v. 2, n. 5, p. 933–935, 2022.

WANG, Y.; TIBBETTS, S. M.; MCGINN, P. J. Microalgae as sources of high-quality protein for human food and protein supplements. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 1–18, 2021.

XIE, D. et al. Chlorella vulgaris cultivation in pilot-scale to treat real swine wastewater and mitigate carbon dioxide for sustainable biodiesel production by direct enzymatic transesterification. **Bioresource Technology**, v. 349, n. February, p. 126886, 2022.

YIN, X. et al. Biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate enhanced by counter-current pulsed ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 53–58, 2015.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121–132, 2014.