

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

DISSERTAÇÃO

CULTIVO DE MICROALGAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DA
BOVINOCULTURA: AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO E
CO₂ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDIOS

ALICE AZEVEDO LOMEU

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

CULTIVO DE MICROALGAS EM ÁGUA RESIDUÁRIA DA
BOVINOCULTURA: AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE OZÔNIO E
CO₂ NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E LIPÍDEOS

ALICE AZEVEDO LOMEU

Sob a Orientação do Professor

Henrique Vieira de Mendonça

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

Seropédica, RJ

Dezembro de 2022

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

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

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

A845a Azevedo Lomeu, Alice, 1992-
Cultivo de microalgas em água residuária da
bovinocultura: avaliação da aplicação de ozônio e CO2
na produção de biomassa e lipídeos/ Alice Azevedo
Lomeu. - Cataguases, 2022.
46 f.: il.

Orientador: Henrique Vieira de Mendonça.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Engenharia Agrícola
e Ambiental, 2022.

1. Tratamento de águas residuárias da
agroindústria. 2. Microalgas. 3. Biocombustíveis. 4.
Tratamento com ozônio. 5. Bioeconomia. I. Vieira de
Mendonça, Henrique, 1984-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
2. -Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental
III. Título.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA E
AMBIENTAL

ALICE AZEVEDO LOMEU

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 14/12/2022

Membros da Banca:

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

Conan Ayade Salvador, D.Sc, UFRRJ

Paula Peixoto Assemany, D.Sc, UFLA



Emitido em 14/12/2022

HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 72/2022 - IT (12.28.01.27)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 10/01/2023 11:02)

CONAN AYADE SALVADOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEPTOENG (12.28.01.00.00.00.44)
Matrícula: ###318#2

(Assinado digitalmente em 09/01/2023 14:43)

HENRIQUE VIEIRA DE MENDONCA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEPTOENG (12.28.01.00.00.00.44)
Matrícula: ###331#3

(Assinado digitalmente em 14/01/2023 10:16)

PAULA PEIXOTO ASSEMANY
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.656-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **72**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão: **09/01/2023** e o código de verificação: **8e0aceb017**

*A minha família que caminhou
junto comigo nesta etapa.
Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Francisco e Angela, que sempre apoiaram minhas escolhas com amor e compreensão. Ao meu irmão Daniel, minha irmã Monique e minha cunhada Ana Cláudia pelo companheirismo, diversão e apoio. Ao meu sobrinho Davi que traz alegria e jovialidade a minha vida.

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

Ao professor Marcone Augusto Leal de Oliveira e a Olívia Brito de Oliveira Moreira do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) da UFJF, por terem prestado uma ajuda imensurável no desenvolvimento deste trabalho.

À professora Marisa Fernandes Mendes e Isabela Cristina Porto Assumpção do PPGEQ/UFRRJ, à professora Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa, ao professor Ormino Domingues Gamalho, ao Paulo Cezar da Cunha Júnior (PC) do DTA/UFRRJ pelo auxílio em análises realizadas neste trabalho.

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

Às minhas companheiras de laboratório, Denise de Souza e Vitória Clem, pela parceria, auxílio e apoio na realização deste trabalho. À Marcela pela ajuda nos momentos difíceis e por ter sido a maior incentivadora nessa minha caminhada pela pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola e Ambiental (PGEAAmb) pela oportunidade especialização e por toda colaboração na minha formação profissional, grato a todos os funcionários, professores e pesquisadores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à AGEVAP pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Aos amigos, familiares e a todos que de alguma forma contribuíram para a conquista desse sonho.

Muito obrigada!

RESUMO

LOMEU, Alice Azevedo. **Cultivo de microalgas em água residuária da bovinocultura: avaliação da aplicação de ozônio e CO₂ na produção de biomassa e lipídeos**. 2022, 49p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola e Ambiental). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

O aumento da demanda por energia acarreta em um aumento do consumo de combustíveis fósseis. Contudo, as jazidas de petróleo do planeta em breve atingirão patamares insustentáveis, abrindo a porta para obtenção de biocombustíveis, como os produzidos a partir de microalgas. Neste estudo, água residuária da bovinocultura (ARB) foi utilizada para o cultivo de um mix de microalgas em fotobiorreatores de coluna. Foram realizadas sete rodadas de experimentos com a adição de CO₂ (ControleCO₂), aplicação de ozônio por 10, 20 e 30 minutos (O₃T10, O₃T20 e O₃T30) e uma combinação dos dois tratamentos anteriores (O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂). A massa seca produzida variou de 1,40 a 18,63 g L⁻¹ e biofixação de CO₂ de 30,47 a 4.828,68 mg L⁻¹ d⁻¹. Alto percentual de lipídios foi registrado, atingindo 48% em O₃T30 e O₃T20, indicando que houve stress nas microalgas expostas a água residuária ozonizada, culminando na acumulação de lipídios. Carboidratos variaram de 21,67 a 30%. O ácido graxo C16:0 foi o detectado em maiores concentrações em todos os experimentos. O₃T30, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂ registraram valores menores que 12% para C18:3, enquadrando-se nos requisitos da EN 14214. Remoções de até 100% foram registradas para N-NH₃, 99,62% para P, 91,74% para DQO e 98,6% para fenóis. O CO₂ foi o fator decisivo na produtividade de biomassa, contudo a aplicação de ozônio foi o fator que influenciou no conteúdo lipídios. Os resultados mostraram que a ARB é uma alternativa promissora para o cultivo de microalgas e a produção de biocombustíveis em quantidade e qualidade expressivamente relevantes frente ao cenário atual de cultivo de microalgas em águas residuárias.

Palavras-chave: águas residuárias, biorremediação, biodiesel, ácidos graxos.

ABSTRACT

LOMEU, Alice Azevedo. **Microalgae cultivation in cattle wastewater: evaluation of ozone application and CO₂ in the biomass production and lipids**. 2022, 49p. Dissertation (Master's in Agricultural and Environmental Engineering). Institute of Technology, Engineering Department, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

The increased demand for energy results in an increase in fossil fuel consumption. However, the planet's oil deposits will soon reach unsustainable levels, presenting an opportunity for biofuels. In this study, cattle wastewater (CWW) was used to cultivate a microalgae consortium in photobioreactors. Seven rounds of experiments were carried out with the addition of CO₂ (ControleCO₂), ozone application for 10, 20 and 30 minutes (O₃T10, O₃T20 and O₃T30) and a combination of CO₂ and ozone (O₃T10CO₂ and O₃T20CO₂). Maximum dry biomass (18.63 g L⁻¹) and CO₂ biofixation (8,047.79 mg L⁻¹ d⁻¹) were obtained in O₃T20CO₂. 48% of lipid was registered in O₃T30 and O₃T20, indicating that microalgae were stressed when exposed to ozonized wastewater. C16:0 was detected in higher concentrations in all experiments. O₃T30, O₃T10CO₂ and O₃T20CO₂ had values for C18:3 in accordance with the requirements of EN 14214. Removals of up to 100% for NH₃-N, 99.6% for P and 91.7% for COD were recorded. CO₂ was the main factor regarding the biomass productivity, however was the ozone application that influenced the lipid content. The results show that the CWW is a promising alternative to microalgae cultivation and biodiesel production in significantly quantity and quality in comparison to the current scenario of microalgae cultivation.

Key words: wastewater, bioremediation, biodiesel, fatty acids

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de uma lagoa de alta taxa.....	5
Figura 2: Representação esquemática dos fotobiorreatores (a) tubulares, (b) painel e (c) coluna	6
Figura 3: Local de coleta da água residuária	12
Figura 4: (a) Meio de suporte plástico utilizado no processo de ozonização; (b) Procedimento de ozonização da água residuária; (c) Água residuária ozonizada em diferentes tempos, da direita para a esquerda: ARB, O ₃ T10, O ₃ T20 e O ₃ T30	13
Figura 5: (a) Fotobiorreatores; (b) Inóculo de microalgas cultivadas no meio sintético F2 ...	14
Figura 6: (a) Amostras antes da secagem; (b) Amostras após secagem na estufa	15
Figura 7: (a) Peneira utilizada na separação da biomassa; (b) Centrifuga utilizada para separação da biomassa; (c) Antes e depois da separação pelo processo de centrifugação.....	17
Figura 8: Processo de secagem da biomassa	17
Figura 9: Extração de lipídios.....	18
Figura 10: Processo de identificação dos ácidos graxos livres (a) Preparação das amostras; (b) Amostras no banho térmico a 65°C; (c) Secagem das amostras a temperatura ambiente; (d) Transferência das amostras para o balão de 5 mL; (e) Amostras no <i>vial</i> prontas para ir ao EC; (f) Amostras no EC prontas para injeção.....	20
Figura 11: Abundância relativa das espécies de microalgas encontradas em cada fotobiorreator	21
Figura 12: Total de ácidos de graxos em cada FBR, representados em porcentagem (m/m) .	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparativo da produção de óleo entre diferentes matérias-primas.....	10
Tabela 2: ARB e OARB usadas como meio de cultura nos experimentos.....	12
Tabela 3: Parâmetros cinéticos e biofixação de CO ₂ dos FBR. Desvio padrão entre parêntesis	23
Tabela 4: Volatilização média da amônia em cada FBR. Desvio padrão em parêntesis.....	25
Tabela 5: Quantificação das macromoléculas presente na biomassa. Desvio padrão entre parêntesis	26
Tabela 6: Composição dos ácidos graxos em cada FBR apresentados em porcentagem (m/m) considerando o total de ácidos graxos produzido. Desvio padrão em parêntesis.....	28
Tabela 7: Eficiência total de remoção dos parâmetros analisados em FBR. Desvio padrão entre parêntesis	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Breve histórico do cultivo de microalgas	4
2.2	Tipos de cultivo	4
2.3	Sistemas de cultivo	5
2.4	Microalgas como matéria-prima	7
2.5	Biocombustíveis no Brasil	9
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Água residuária	11
3.2	Cepa de microalgas	12
3.3	Ozonização da água residuária	13
3.4	Condições operacionais dos fotobiorreatores	14
3.5	Parâmetros de crescimento da biomassa	15
3.6	Biofixação de CO ₂	16
3.7	Métodos analíticos	16
3.7.1	Análises dos parâmetros na água residuária	16
3.7.2	Colheita e secagem da biomassa	17
3.7.3	Extração de lipídios e carboidratos	17
3.8	Análises de ácidos graxos livres	18
3.8.1	Eletroforese capilar	18
3.8.2	Preparação das amostras	19
3.8.3	Quantificação de ácidos graxos e análises estatísticas	20
3.9	Análises estatísticas	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Abundância relativa	21
4.2	Parâmetros cinéticos e biofixação de CO ₂	23
4.3	Volatilização da amônia	24
4.4	Composição macromolecular	25
4.5	Análise de qualidade do biodiesel	27
4.6	Biorremediação	29
5	CONCLUSÃO	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis são responsáveis pela emissão de cerca de 6 bilhões de toneladas de CO₂ na atmosfera todo ano (MONDAL et al., 2017). De acordo com os dados da Agência Internacional de Energia - IEA (2019), o ano de 2018 marcou um aumento de 1,9% nas emissões de CO₂ relacionadas à geração energia e nesse mesmo ano apenas 14% de toda a energia consumida no mundo veio de uma fonte renovável (IEA, 2020). Projeções para o ano de 2050 preveem que a demanda por energia cresça 28% (EIA, 2017).

Esforços globais tem sido feito para que a emissão de gases de efeito estufa (GEE) sejam reduzidas. O mais recente foi o Acordo de Paris, em 2015. Assinado por 196 países, incluindo o Brasil, esse acordo tem por objetivo principal limitar o aumento da temperatura global a 1,5°C, comparando-se com o período pré-industrial, por meio da diminuição das emissões de gases de efeito estufa (GEE) (UNFCCC, 2021). Em 2021, ocorreu a COP 26 em Glasgow, Escócia, onde os países reafirmaram seu compromisso feito na assinatura do Acordo de Paris (UNFCC, 2022). Para que as metas estabelecidas para redução das emissões de GEE sejam atingidas, é preciso que haja uma mudança de paradigma no setor de energia. Nesse contexto, os biocombustíveis se apresentam como uma alternativa bastante atrativa, em especial os de terceira geração via microalgas (DE MENDONÇA et al., 2021)

Os biocombustíveis podem ser classificados em quatro gerações, de acordo com sua matéria-prima. O bioetanol é o biocombustível mais comum da primeira geração (1G), sendo o Brasil um dos maiores produtores no mundo, com a cana de açúcar como principal matéria-prima (WILOSO; HEIJUNGS; DE SNOO, 2012).

Contudo, o grande problema dos biocombustíveis da 1G é que os mesmos competem por área com a produção de alimentos. Além disso, podem causar impactos negativos na biodiversidade, emissões de CO₂ e outros poluentes devido à degradação do solo, risco de contaminação por conta do uso de fertilizantes e pesticidas, além de demandar consumo de água (CORREA et al., 2017; DOMINGUEZ-FAUS et al., 2009; SEARCHINGER et al., 2008).

Os biocombustíveis de segunda geração (2G) se apresentam como uma alternativa para acabar com a competição por alimento, pois são produzidos a partir da biomassa lignocelulósica, como resíduos agrícolas e industriais. A principal desvantagem que essa geração apresenta é que os processos de conversão da matéria-prima em biocombustíveis ainda não são tão eficientes em termos de energia e custos, se comparados com os da 1G (GANGULY; SARKHEL; DAS, 2021).

Já os biocombustíveis de terceira geração (3G) utilizam microrganismos como as microalgas como matéria-prima. Diversos tipos de biocombustíveis podem ser produzidos a partir das microalgas, como bioetanol, biodiesel, biogás e bio-óleo (CHOWDHURY; LOGANATHAN, 2019). A taxa fotossintética das microalgas é maior se comparadas com plantas superiores, o que implica em uma maior taxa de crescimento da biomassa, com o tempo de cultivo sendo de dias (DE MENDONÇA et al., 2021), uma vantagem sobre as culturas terrestres, que levam meses/anos para atingir seu ponto de maturação/colheita. Diferentemente da 1G, a produção de biocombustíveis da 3G não requer área agricultável, a biomassa pode ser produzida durante todo o ano e não há demanda por água potável, já que podem ser produzidos durante o tratamento de águas residuárias, inclusive as geradas na produção de gado. No Brasil, segundo Correa et al. (2017) para atender a demanda de gasolina e óleo combustível destilados no ano de 2010, um sistema de microalgas necessitaria de 24,4% da área necessária para uma cultura de cana de açúcar.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2021), a produção de laticínios foi de 906 milhões de toneladas em 2020, um aumento de 2% em relação ao ano anterior. Com o aumento da produção de leite há, conseqüentemente, o aumento da produção de águas residuárias da bovinocultura (ARB) que na atualidade ainda representa um grande problema ambiental, quando não tratadas e dispostas no meio ambiente (de Mendonça et al., 2022). Esses efluentes apresentam DQO podendo chegar a 10.000 mg L^{-1} , concentrações de nitrogênio total variando de 200 até 2.000 mg L^{-1} , amônia variando entre 110 a 1.200 mg L^{-1} e fósforo total podendo atingir valores em torno de 600 mg L^{-1} (DE MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017; DE SOUZA et al., 2021; LV et al., 2018; REN et al., 2021). Altas cargas orgânicas e presença de nutrientes como nitrogênio e fósforo, são as características que fazem com que esses efluentes tenham grande potencial poluidor. No entanto, essas mesmas características os tornam suscetíveis meio de cultura para produção de microalgas (SUTHERLAND et al., 2018). Maroneze, et al. (2014) afirmam que as taxas de carbono/nitrogênio e nitrogênio/fósforo presentes nesses efluentes são favoráveis ao crescimento de microalgas. De acordo com Sutherland e Ralph (2019), nos últimos anos microalgas têm sido utilizadas também para biorremediação de componentes emergentes, como antibióticos humanos e veterinários.

Além da biorremediação das águas residuárias, uma das grandes vantagens da utilização de microalgas é sua capacidade de biofixação de CO_2 por meio da fotossíntese. Microalgas tem de 10 a 50 vezes mais capacidade de armazenar CO_2 comparadas com plantas terrestres

(RAEESOSSADATI et al., 2014), podendo o cultivo ser suplementado com CO₂ proveniente de fontes industriais, representando uma alternativa para remediar as emissões desse gás (DEVI; MOHAN, 2012). Segundo Chisti (2013), com aproximadamente 1,5 bilhões de toneladas de CO₂ é possível produzir quase 82 milhões de toneladas de biomassa. Outra vantagem é a possível produção de vários bioprodutos a partir da biomassa, dentre esses produtos estão os biocombustíveis, ração para animais, biofertilizantes, biopolímeros, cosméticos e pigmentos (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019; CALIJURI et al., 2022; DÍAZ et al., 2022).

O ozônio é um oxidante poderoso, comumente utilizado nos tratamentos de águas residuárias para remoção de turbidez e cor, esterilização e decomposição oxidativa de compostos orgânicos recalcitrantes (GAN et al., 2014). No cultivo de microalgas cultivadas em águas residuária, o ozônio é utilizado como pré-tratamento para clarificação da água residuária, com o intuito de facilitar a passagem da luz pelo meio e favorecer o processo de fotossíntese. Cheng et al. (2016), utilizaram ozônio como pré-tratamento de água residuária proveniente de um reator UASB com o intuito de clarificar o efluente para o cultivo de *Chlorella* PY-ZU1 e aumentar as remoções de DQO, NH₃-N e P. Os autores observaram um aumento na produtividade de biomassa na água residuária ozonizada, bem como na remoção dos parâmetros analisados.

O tratamento de efluentes com microalgas se alia aos conceitos de bioeconomia e economia circular, que pregam produções mais sustentáveis com reaproveitamento dos resíduos (KERSHAW et al., 2021). Nesse contexto, o presente estudo propõe métodos de cultivo de mix de microalgas, tendo como substrato água residuária da bovinocultura, sujeita a aplicação de aditivos como CO₂ e o tratamento prévio com O₃. Além de ser utilizado como pré-tratamento, a aplicação de ozônio também objetivava desencadear estresse na biomassa. Até onde se verificou, não foram encontrados estudos que apresentaram abordagem similar em relação ao O₃. A partir dos experimentos propostos analisou-se a quantidade de lipídios (totais e ácidos graxos) e carboidratos na biomassa produzida, sendo assim proposta a melhor rota de produção de biocombustíveis e seu rendimento. Foram também avaliadas as concentrações de carbono na biomassa para análise da biofixação de CO₂ e a capacidade do mix de microalgas biorremediar a água residuária com e sem a adição de O₃.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve histórico do cultivo de microalgas

Microalgas são microrganismos unicelulares fotossintetizantes. A primeira menção ao cultivo de microalgas com o intuito de produção de energia data da época da segunda guerra mundial, contudo foi apenas nos anos 70 que essa matéria-prima começou a ganhar espaço, graças a crise energética que se abateu no mundo (DAHIYA, 2020), no entanto há registros do povo Asteca utilizando microalgas como fonte de alimento (GANTAR e SVIRČEV, 2008).

Do ponto de vista da geração de energia, as microalgas não eram tidas como matéria-prima economicamente viável no começo do século 21, devido ao seu grande consumo de energia nos processos de colheita e conversão em biocombustíveis (MONDAL et al., 2022). Embora muito ainda tenha que ser feito para tornar o processo mais viável, os autores afirmam que o cultivo de microalgas se tornou mais factível com os avanços da ciência. Hoje, o mercado global de microalgas chega a mais de 30 mil toneladas de biomassa produzida por ano (JANSSEN; WIJFFELS; BARBOSA, 2022).

2.2 Tipos de cultivo

Microalgas podem ser cultivadas em três diferentes modalidades, sendo, cultivo heterotrófico, autotrófico ou mixotrófico. O cultivo autotrófico é aquele em que a biomassa necessita de luz para assimilar o carbono inorgânico e produzir energia, processo conhecido como fotossíntese. Já no modo heterotrófico, o carbono orgânico é metabolizado pela biomassa, sem que haja necessidade de luz. E finalmente, o cultivo mixotrófico acontece quando os dois modos citados anteriormente são combinados, onde a biomassa assimila tanto o carbono orgânico quanto o inorgânico (LI et al., 2019).

De acordo com Ruiz et al. (2022), o cultivo heterotrófico leva vantagem sob o autotrófico, já que a produtividade de biomassa e de lipídios é consideravelmente maior no primeiro. Barros et al. (2019) utilizaram o cultivo de *Chlorella vulgaris* em modo heterotrófico e autotrófico e avaliaram a possibilidade de cultivo em fotobiorreatores de painel de 100 m³. Enquanto o experimento autotrófico levou 13 dias para obter uma massa seca de 1,27 g L⁻¹, o experimento heterotrófico levou 7 dias e produziu massa seca de 174,5 g L⁻¹. Os autores sugerem que uma fase inicial de cultivo heterotrófico seja utilizada para se obter uma maior concentração de biomassa. Já para o cultivo autotrófico, a sugestão é que seja feito em escala real, nos fotobiorreatores de painel de 100 m³, isso permitiria atingir os mesmos níveis de

produção de proteína e pigmentos vistos em cultivos exclusivamente autotróficos em um intervalo de tempo consideravelmente menor.

Em relação ao cultivo mixotrófico, Pawar (2016) afirma que esse modo se mostra mais prático ao se considerar tratamento de águas residuárias em grande escala. Abreu et al. (2012) compararam o cultivo mixotrófico com autotrófico de *Chlorella vulgaris* em água residuária de laticínio. A produtividade de biomassa no ambiente mixotrófico e autotrófico foi de $0,75 \pm 0,01$ e $0,10 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente. Os autores atribuíram essa diferença à presença de glicose no meio mixotrófico. Yu et al. (2022) desenvolveram um modelo cinético para comparar a taxa de crescimento da biomassa e produção de lipídios da espécie *Chlorella sorokiniana* em modo heterotrófico e mixotrófico, concluindo que o modo mixotrófico obteve melhor desempenho.

Salientar-se que para o cultivo de microalgas, deve se levar em consideração não apenas o tipo de cultivo a ser utilizado, mas também o tipo de substrato, a espécie de microalga e o sistema de cultivo.

2.3 Sistemas de cultivo

Os sistemas de cultivo de microalgas são comumente categorizados em dois: sistemas abertos, representados pelas lagoas e os sistemas fechados, representados por fotobiorreatores. Segundo Yadala e Cremaschi (2016), as lagoas podem ser classificadas de acordo com seu *design* e operação em lagoas circulares, inclinadas ou de alta taxa. As lagoas de alta taxa são sistemas abertos, com profundidade variando de 0,15 até 0,5 m e com uma pá, que tem a função de promover a mistura do meio e ciclos de claro e escuro para otimizar o metabolismo das algas (BHATT et al., 2022). A Figura 1 mostra uma representação esquemática de uma lagoa de alta taxa. No contexto do tratamento de águas residuárias, Craggs, Sutherland e Campbell (2012) afirmam que as lagoas de alta taxa são as que apresentam resultados mais consistentes.

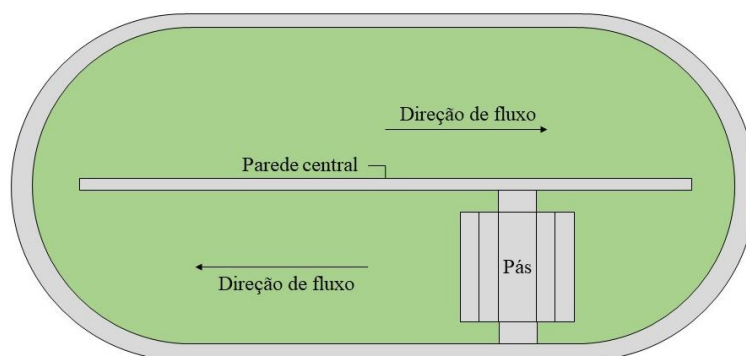


Figura 1: Representação esquemática de uma lagoa de alta taxa

As principais vantagens das lagoas são que possuem baixos requisitos de energia e baixos custos de implementação e operação (BHATT et al., 2022; COUTO et al., 2021). Contudo, nesses sistemas não é possível ter controle absoluto sob o meio, já que são sistemas abertos estão sujeitos a contaminação por outras espécies de microalgas e microrganismos (YADALA E CREMASCHI, 2016). As lagoas também são afetadas por fatores climáticos, como chuvas, iluminação e temperatura (JEBALI et al., 2018). Além disso, há grande perda de água por evaporação e difusão de CO₂ (LEONG; HUANG; CHANG, 2021). Sutherland et al. (2020) utilizaram três lagoas de alta taxa com tamanhos diferentes: mesocosmo (1,5 m³), escala piloto (90 m³) e escala real (2.900 m³). Em relação ao NH₄-N, os autores notaram que as lagoas mesocosmo e em escala piloto tiveram maiores remoções ao se comparar com a de escala real. Já em relação a remoção de matéria orgânica a lagoa em escala real teve um desempenho maior comparada com as outras duas.

Fotobiorreatores são sistemas fechados com injeção de ar para mistura e oxigenação do meio. Os fotobiorreatores podem ser tubulares (Figura 2a), de painéis (Figura 2b) ou de coluna (Figura 2c).

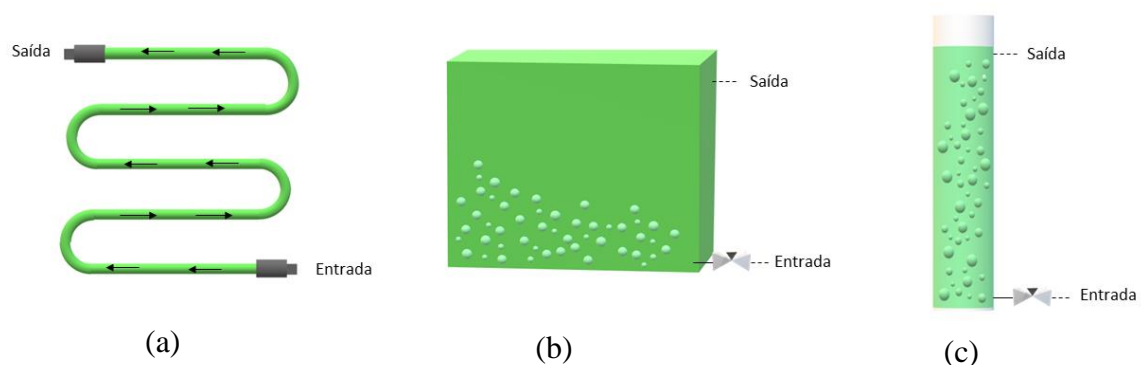


Figura 2: Representação esquemática dos fotobiorreatores (a) tubulares, (b) painel e (c) coluna

Por serem sistemas fechados os fotobiorreatores proporcionam um maior controle do ambiente, além de não serem tão susceptíveis as mudanças de clima como as lagoas. Outra vantagem é que o risco de contaminação é baixo e possuem maiores produtividades de biomassa (BHATT et al., 2022). Contudo, os custos de implementação e energia são altos quando comparados aos sistemas abertos.

Muitos autores buscam otimizar o processo de cultivo de microalgas adaptando e criando novos *designs* para fotobiorreatores. Yaqoubnejad, Rad e Taghavijeloudar (2021) propuseram um fotobiorreator de painel hexagonal (HAFP) que objetivava aumentar a produtividade de biomassa e fixação de CO₂. Os autores compararam os resultados encontrados

no HAFP com um fotobiorreator de painel comum (TFP) e encontraram que a produtividade de biomassa foi maior em 61% e a biofixação de CO₂ de 70% no HAFP comparado com o TFP. Já Chin-On et al. (2022) utilizaram fotobiorreatores de painéis em formato V para o cultivo de microalgas em locais de baixa latitude e avaliaram a captura de luz solar nesses locais. Os autores chegaram à conclusão que a produtividade de biomassa nos painéis em V foi 1,4 vezes maior se comparada com um painel horizontal.

Thuy Lan Chi et al. (2022) avaliaram a produtividade de biomassa e de lipídios cultivando *Chlorella sp.* em fotobiorreatores e lagoas. Os autores registraram uma produtividade de biomassa maior nos fotobiorreatores em comparação com as lagoas, 0,121 g L⁻¹ e 0,067 g L⁻¹, respectivamente. Em relação aos lipídios totais, os autores registraram valores similares para os dois sistemas, 23,32% para os fotobiorreatores e 23,35% para as lagoas. Contudo, em relação a produtividade de lipídios, os fotobiorreatores tiveram um desempenho melhor, registrando valores de 0,028 g L⁻¹ d⁻¹, enquanto nas lagoas os valores registrados foram de 0,019 g L⁻¹ d⁻¹. Davis, Aden e Pienkos (2011) realizaram uma análise técnico-econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel em fotobiorreatores e lagoas. O custo de produção de óleo bruto para a lagoa foi de US\$ 8,52/gal, enquanto a produção em fotobiorreatores foi de aproximadamente o dobro desse custo, US\$ 18,10/gal.

Os custos de produção em fotobiorreatores são maiores se comparados com as lagoas, contudo apesar das otimizações que vem sendo feitas ao longo dos anos nos sistemas de lagoas, as mesmas não conseguem obter o mesmo nível de produtividade de biomassa que os fotobiorreatores (PAWAR, 2016).

2.4 Microalgas como matéria-prima

Microalgas podem servir como matéria-prima para uma gama de bioprodutos, desde produtos voltados para alimentação até para o setor de energia. Os componentes bioativos que podem ser extraídos dessa biomassa são diversos, mas são associados com a composição da mesma. Lipídios (7 – 65%), proteínas (5 – 74%), carboidratos (8 – 70%), vitaminas e pigmentos (1 – 14%) configuram essa composição (CALIJURI et al., 2022; SIDDIKI et al., 2022).

Os lipídios presentes na biomassa podem ser utilizados na produção de biodiesel ou na alimentação humana, através da sua fração poliinsaturada. Singh, Kumar e Sharma, (2019) obtiveram 98,41% de conversão de óleo de *Anabaena* PCC 7120 em biodiesel. Kings et al. (2017) encontraram conversão em biodiesel a partir da microalga *Euglena sanguínea* de 98,6%. Já Behera et al. (2020) obtiveram 94,91% de conversão com um consórcio de microalgas (*Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Synechocystis sp.*, *Spirulina sp.*).

Os carboidratos podem ser utilizados na produção de bioetanol ou biohidrogênio. Hossain, Zaini e Indra Mahlia (2019) produziram 58,90 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ de bioetanol a partir do cultivo de *Chlorella vulgaris* em FBRs em uma área de 2 ha. Megawati et al. (2022) conseguiram obter conversão de 94,21% ou 4,80 g L⁻¹ por meio da fermentação de glicose presente na microalga *Chlorella*. Bala Amutha e Murugesan (2011) obtiveram 220 mL L⁻¹ de hidrogênio com microalga *Chlorella vulgaris*.

Os principais pigmentos encontrados nas microalgas utilizados para fins comerciais são a clorofila e os carotenoides. De acordo com Ferruzzi e Blakeslee (2007), a clorofila tem propriedades curativas e anti-inflamatórias, por isso atraem a atenção da indústria alimentícia e farmacêutica. Já os carotenoides são utilizados para dar coloração a alimentos, como sorvetes, laticínios ou até em cosméticos, como batons e delineadores (SPOLAORE et al., 2006). Na indústria de cosméticos, as microalgas são também utilizadas em cremes *anti-aging*, produtos para cuidados com a pele, emolientes, protetores solares e produtos para cabelo (KHOLSSI et al., 2021). Dianursanti e Pramadhanti (2020) avaliaram o componente antibactericida de um sabonete com extrato de *Spirulina platensis* e concluíram que extrato encontrado se provou eficiente contra o crescimento de bactérias.

Microalgas são organismos ricos em nutrientes, podendo ser uma fonte sustentável de biofertilizantes. O fósforo, por exemplo, é um nutriente essencial em fertilizantes, porém é um recurso não renovável e de difícil obtenção (CASTRO et al., 2020; SOLOVCHENKO et al., 2016). Em se tratando do nitrogênio, os fertilizantes nitrogenados contribuem para as mudanças climáticas devido a emissão de óxido nitroso, gás de efeito estufa (FAGODIYA et al., 2017). Tendo isso em vista, microalgas se apresentam como uma alternativa a fertilizantes minerais, já que são microrganismos capazes de acumular N e P. Khan et al. (2019) fizeram uma projeção para produção de biofertilizante a partir de *C. minutíssima* cultivada em efluente doméstico, em uma lagoa com área de 1 ha. Os resultados mostraram que seria possível acumular de N, P e K 22.958, 4.498 e 1.095 kg ha⁻¹ a⁻¹, respectivamente, com uma economia com fertilizantes químicos de US\$ 55.840 ha⁻¹ a⁻¹. Castro et al. (2020) analisaram os impactos ambientais de biofertilizante a base de microalgas comparado com um fertilizante superfosfato triplo (TSP). Dentre os impactos analisados (esgotamento de recursos fósseis, ecotoxicidade da água, ecotoxicidade do solo, formação de material particulado, eutrofização, acidificação do solo e mudanças climáticas) o biofertilizante teve desempenho superior ao TSP, com destaque para mudanças climática e ecotoxicidade do solo.

Microalgas também são uma excelente fonte para suplementação alimentar, já que possuem altos teores de lipídios, carboidratos, proteínas, vitaminas e até ômega-3. Pereira et al. (2020) avaliaram a inserção de uma suplementação alimentar a base de *Tetraselmis sp.* CTP4 na criação de peixes dourados (*Sparus aurata*). Os autores concluíram que o suplemento teve um desempenho melhor em relação ao coeficiente de digestibilidade e plasma cortisol do que a dieta de controle (ração de soja). Em seu estudo, de Mendonça et al. (2018) concluíram que as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* poderiam ser utilizadas para suplementação alimentar de animais devido ao alto teor de proteína encontrada na biomassa, 68 e 150 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Além da suplementação para animais, microalgas também podem ser utilizadas em dietas humanas, contudo apenas algumas espécies são consideradas para esse fim, sendo elas *Spirulina (Arthrospira platensis)*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella luteoviridis*, *Odontella aurita* e *Tetraselmis chui* (ZANELLA e VIANELLO, 2020).

A aplicabilidade das microalgas é bastante vasta, podem ser utilizadas para geração de energia, pela indústria farmacêutica, na suplementação alimentar e ainda no sequestro de CO₂ e tratamento de águas residuárias. O mercado global de microalgas está estimado entre US\$ 3,8 e 5,4 bilhões (BRASIL et al., 2017), com os principais atores concentrados no continente americano, especialmente nos Estados Unidos e na Europa (DE MENDONÇA et al., 2021).

2.5 Biocombustíveis no Brasil

A produção de biodiesel utilizando microalgas como matéria-prima apresenta muitas vantagens, como por exemplo, a não necessidade de áreas agricultáveis, o sequestro de CO₂, menores tempos de cultivo, entre outras. Além disso, microalgas tem maiores produção de óleo quando comparadas com plantas terrestres. Um comparativo dessa diferença é mostrado na Tabela 1. É possível notar que a produção de óleo em microalgas supera em muito a produção em culturas comumente utilizadas para produção de biodiesel, como a palma e a soja, por exemplo.

Tabela 1: Comparativo da produção de óleo entre diferentes matérias-primas

Produtor de óleo	Produção de óleo (L ha⁻¹)
Milho	172
Algodão	325
Soja	446
Girassol	952
Mamona	1.413
Coco	2.689
Palma	5.366
Microalga	100.000

Fonte: (DE MENDONÇA et al., 2021; GANESAN et al., 2020; KATIYAR et al., 2017)

Além de não demandarem áreas agricultáveis, sistemas de cultivo de microalgas demandam áreas menores que as culturas comumente utilizadas na produção de biocombustíveis, foi a conclusão feita por Correa et al. (2017). Os autores fizeram uma estimativa da área necessária para que a produção de biodiesel atingisse a demanda de gasolina em diversos países. Comparando a área necessária para cultivo de microalgas com a de soja, coco (biodiesel) e cana-de-açúcar (bioetanol) e nesses cenários, no caso do Brasil, descobriram que a área demandada pelo sistema de microalgas foi menor, sendo equivalente a 3% da soja, 24,4% da cana-de-açúcar e 20,4% do coco. Ainda, em uma mesma área, microalgas são capazes de produzir matéria-prima para diferentes tipos de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (DE MENDONÇA et al., 2022).

Apesar dessas vantagens, a utilização de microalgas como matéria-prima ainda apresenta obstáculos, principalmente o processo de conversão em biodiesel. O processo mais utilizado é o de transesterificação, que é uma reação reversível, que ocorre quando o triglicérido reage preferencialmente com um álcool primário, geralmente o metanol ou etanol, para formar um éster (biodiesel) e glicerol. Diversas são as tecnologias que podem ser empregadas para otimizar a reação de transesterificação, contudo mesmo com auxílio dessas tecnologias o processo de produção de biodiesel de 3G enfrenta problemas para ser implementado em escala real. No Brasil, para ser considerado biodiesel, a conversão mínima deve ser de 96,5% (ANP, 2014). Esse valor elevado nem sempre é atingido, já que não existe um jeito único de proceder na conversão, principalmente quando se considera a conversão em grandes escalas.

Em uma análise técnico-econômica, Tredici et al. (2016) avaliaram a produção de *Tetraselmis suecica* em uma planta de 1 ha. A análise dos autores mostrou que a produção de 36 t de biomassa custaria €12,4 kg⁻¹. Os autores observaram que em um local com clima mais favorável (temperaturas mais elevadas, como a maioria das regiões do Brasil), o custo poderia

ser reduzido pela metade. Além disso, ao aumentar a produção para uma área de 100 ha, os custos diminuiriam para €5,1 kg⁻¹. Os resultados deste estudo são promissores, pois mostram que aumentar a produção pode acarretar em uma diminuição do custo de produção.

No caso do Brasil, para que esse setor cresça são necessárias a criação de políticas públicas que incentivem a produção desse biocombustível, como aconteceu com o etanol, na época do ProÁlcool. Em 2004, o governo federal criou o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), que buscava introduzir o biodiesel na matriz energética do país. Essa introdução foi realizada através da mistura do biodiesel ao diesel (BRASIL, 2021). Contudo, foi apenas em 2008 que a mistura se tornou obrigatória e de lá até 2021, a porcentagem de mistura cresceu de 2 para 13%, com expectativa de chegar a 15% até o ano de 2023 (ANP, 2021).

A criação do RenovaBio foi uma iniciativa tomada pelo governo federal após a assinatura do Acordo de Paris, que busca incentivar a produção e uso de biodiesel no país, bem como regular o mercado de biocombustíveis (DENNY, 2020; RODRIGUES, 2021). Grangeia, Santos e Lazaro (2022) recomendam que haja uma revisão das políticas e objetivos do programa devido as incertezas que tomaram conta do mercado depois da pandemia de Covid-19. Apesar dessas incertezas, o volume de biodiesel comercializado no Brasil no ano de 2020 cresceu 11,5% em relação à 2019, contrastando com a retração de 5,97% do mercado nacional de combustíveis (ANP, 2021), indicando o grande potencial que o país tem para crescer neste setor.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Água residuária

A água residuária da bovinocultura (ARB) foi coletada na Fazendinha Agroecológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizada no município de Seropédica/RJ (coordenadas: 22° 45 21" S; 43° 40 28" W). A água residuária foi coletada logo após o tratamento por decantação em uma esterqueira (Figura 3).



Figura 3: Local de coleta da água residuária

Em alguns experimentos a água residuária foi ozonizada (OARB) (ver item 3.3). A caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo é mostrado na Tabela 2. Todos os parâmetros foram analisados de acordo com APHA (2017).

Tabela 2: ARB e OARB usadas como meio de cultura nos experimentos

ARB	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	P	PO ₄	C ₆ H ₆ OH	K	DQO
	mg L ⁻¹						
S/T	978,3	13,1	135,0	413,9	14,2	592,1	1.249,6
O ₃ T10	630,0	18,2	24,9	76,3	7,2	368,6	873,2
O ₃ T20	524,0	14,2	14,3	43,8	28,1	318,8	900,8
O ₃ T30	124,0	13,7	12,0	36,7	2,3	356,3	875,6
ARB	pH	Temperatura	CE	Turbidez	Salinidade	Cor aparente	
	-	°C	μS cm ⁻¹	uT	ppm	uC	
S/T	6,8	22,9	1.572	459,5	784,0	10.065,8	
O ₃ T10	7,6	18,0	1.384	92,0	702	1.980,0	
O ₃ T20	6,9	18,5	1.375	137,3	681	1.986,7	
O ₃ T30	7,3	17,8	1.386	280,0	682	2.556,7	

ARB: água residuária da bovinocultura; OARB: água residuária da bovinocultura ozonizada; S/T: sem tratamento; DQO: demanda química de oxigênio; CE: condutividade elétrica

3.2 Cepa de microalgas

O inóculo utilizado nos fotobiorreatores era previamente composto apenas pela espécie *Arthrospira platensis* DHR 20, retirada do banco de cultivo do Laboratório de Monitoramento Ambiental II, localizado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Como o intuito dos experimentos era trabalhar com um mix de microalgas, o inóculo foi contaminado com uma água do lago da Fazendinha Agroecológica. A identificação das espécies presentes foi feita ao final de cada rodada de experimento, com um microscópio com resolução de ampliação 40x-1000x e a determinação das espécies foi feita com base em Bicudo e Menezes

(2017). Após a identificação das espécies foi feita a quantificação da abundância relativa das espécies.

O inóculo foi cultivado em meio sintético, Nutrient Guillard F2 concentrado (GUILLARD e RYTHER, 1962), aplicando-se aos frascos (Erlenmeyer de 1 L) com iluminação natural ($150 \pm 30 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-2}$) e agitação para mistura homogênea do meio e da microalga, feita por um compressor de ar Sebo SB-988 (China), com vazão de $0,5 \text{ L min}^{-1}$. Ao final dos experimentos, 250 mL foram separados para serem utilizados como inóculos nos experimentos subsequentes, sob a concentração de aproximadamente $3,32 \text{ g L}^{-1}$.

3.3 Ozonização da água residuária

A ozonização da ARB teve o intuito de reduzir a cor aparente/turbidez, facilitando a passagem de luz e assim favorecendo o crescimento da biomassa. Os tempos de ozonização foram determinados para evitar a não remoção de nutrientes, de acordo com os resultados encontrados em estudos anteriores, conduzidos por de Souza et al. (2020). Cada batelada de ozonização foi realizada aos pares em reatores de 1 litro, onde foi inserido o meio de suporte plástico (Figura 4a) para maximizar a transferência de gás/líquido (Figura 4b). Os reatores receberam aproximadamente 800 mL de água residuária e 5 mL de antiespumante a base de silicone. A aplicação do ozônio foi feita com Ozone Disinfecter, modelo HF116 (China), com taxa de $2.000 \text{ mg O}_3 \text{ h}^{-1}$. Para cada experimento foram feitas 4 repetições. A comparação entre a água residuária sem aplicação de ozônio e com ozonizações em 10, 20 e 30 minutos ($\text{O}_3\text{T}10$, $\text{O}_3\text{T}20$ e $\text{O}_3\text{T}30$, respectivamente) pode ser vista na Figura 4c.

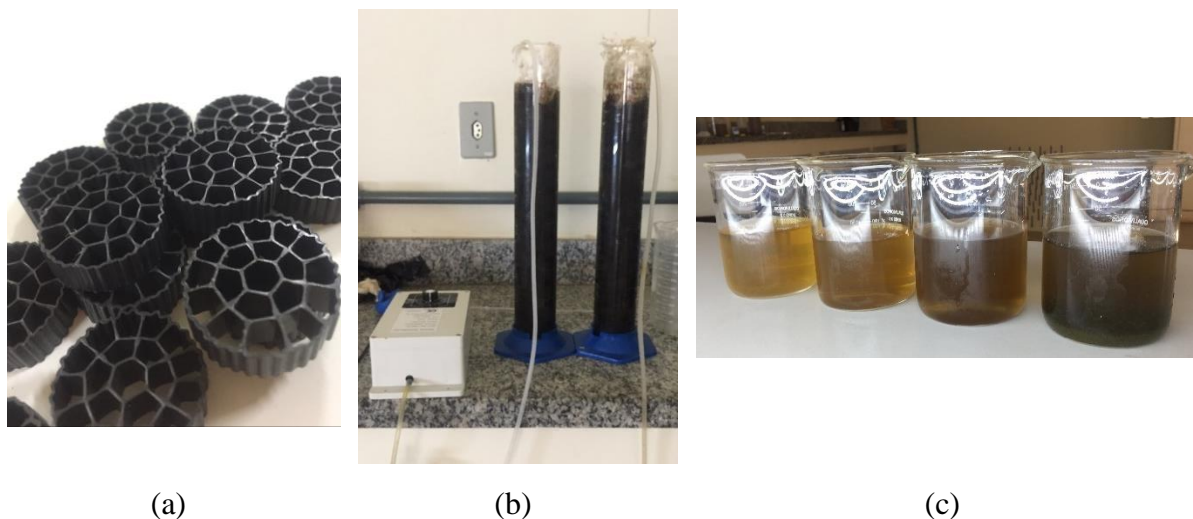


Figura 4: (a) Meio de suporte plástico utilizado no processo de ozonização; (b) Procedimento de ozonização da água residuária; (c) Água residuária ozonizada em diferentes tempos, da direita para a esquerda: ARB, $\text{O}_3\text{T}10$, $\text{O}_3\text{T}20$ e $\text{O}_3\text{T}30$

O processo de ozonização tinha o objetivo de remoção de cor aparente e turbidez para facilitar a passagem da luz. Observando os dados da Tabela 2, é possível notar um abatimento nas concentrações desses parâmetros na OARB.

3.4 Condições operacionais dos fotobiorreatores

Foram utilizados 4 fotobiorreatores (FBR) idênticos, denominados R1, R2, R3 e R4, com volume útil de 1,6 L cada (Figura 5a), desse volume, 250 mL era de inóculo obtido inicialmente no pré-cultivado em meio sintético Guillard F2 (GUILLARD e RYTHER, 1962) (Figura 5b) por 45 dias com iluminação natural, com fotoperíodo de 12h e 1,350 L era ARB, ozonizada ou não. A partir da segunda batelada de produção de microalgas, era deixado o volume de 250 mL ao fundo de cada FBR para servir como inóculo para a próxima batelada.

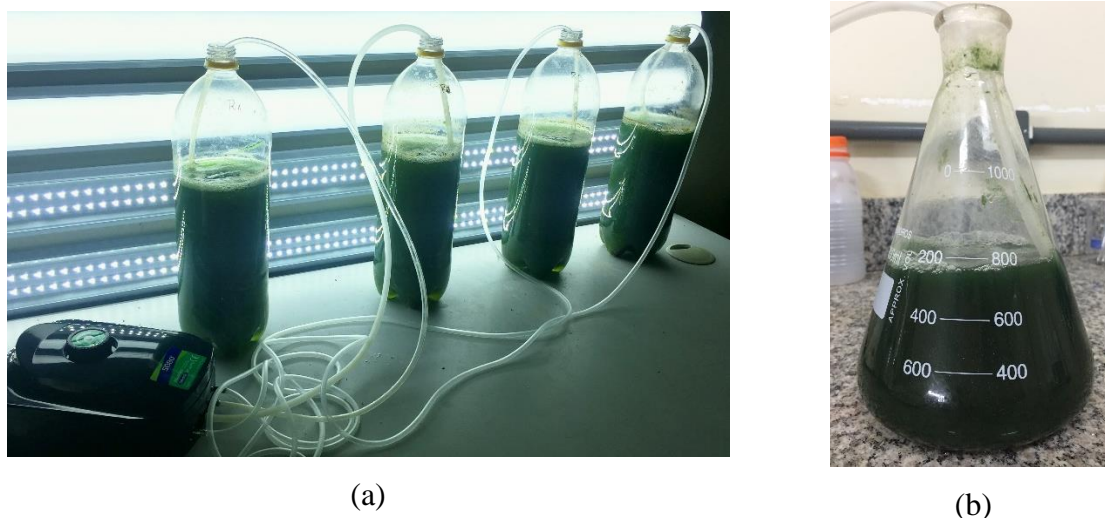


Figura 5: (a) Fotobiorreatores; (b) Inóculo de microalgas cultivadas no meio sintético F2

Os quatro FBR foram operados em regime de batelada, sendo misturados por uma bomba de ar que injetava 1 L min^{-1} de oxigênio em cada unidade experimental. A iluminação foi feita com 4 lâmpadas de LED posicionadas verticalmente (Figura 5a) aproximadamente 5 cm atrás dos FBRs. A iluminação foi mantida 24 h d^{-1} com intensidade de, com intensidade total de $326,10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ medida com um Lux-MeterPhywe, (Germany). Foram analisadas 7 condições experimentais, sendo: Controle, onde não houve intervenções (somente adição da ARB), Controle CO_2 , com a adição de 9,0 g de CO_2 por dia em cada FBR, $\text{O}_3\text{T10}$, $\text{O}_3\text{T20}$ e $\text{O}_3\text{T30}$ com a ARB ozonizada previamente por 10, 20 e 30 minutos, respectivamente e $\text{O}_3\text{T10CO}_2$, $\text{O}_3\text{T20CO}_2$, com ozonização prévia da ARB de 10 e 20 minutos, respectivamente, e adição de 9,0 g de CO_2 por dia. Seis capsulas de CO_2 de 1,5 g cada com 99% de pureza (SunSun, China) foram utilizadas para se obter os 9,0 g de CO_2 adicionados aos FBRs. Quatro repetições foram realizadas para cada condição experimental.

A condição experimental O₃T30CO₂ (ARB ozonizada a 30 e adição de 9,0 g de CO₂ por dia) não foi realizada pois foi observada que com a ARB ozonizada a 30 minutos a perda de nutrientes era maior que a desejada, o que não justificaria a realização dessa condição experimental.

3.5 Parâmetros de crescimento da biomassa

As curvas de crescimento da biomassa foram determinadas em função da massa seca e da densidade ótica (DO), medida em um espectrofotômetro (1105 Bel Photonics – Itália) à 670 nm em triplicatas. O tempo de cultivo foi determinado com base na estabilização dos parâmetros citados acima, com duração de 4 dias para os experimentos ControleCO₂, O₃T10, O₃T20, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂, 5 dias para Controle e 7 dias para O₃T30. A massa seca (MS) foi medida por diferença de peso antes e depois da secagem. As amostras de 15 mL foram secas em estufa à 105°C por 24h (Figura 6). As análises foram feitas em duplicatas.

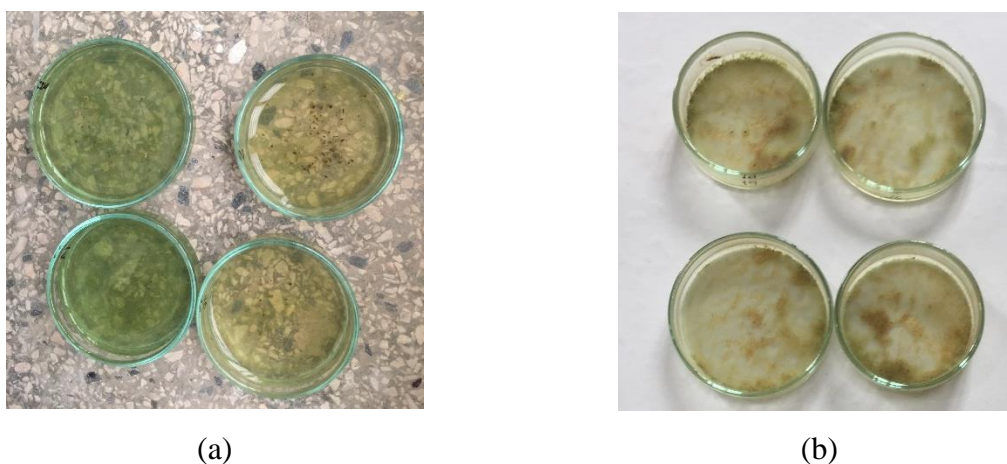


Figura 6: (a) Amostras antes da secagem; (b) Amostras após secagem na estufa

Para cada experimento, foram obtidas as equações (1-7) de correlação entre a biomassa seca Y (g L⁻¹) e a densidade ótica (DO_{670nm}):

$$\text{Controle: } Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 1,2332 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 1,6068; \text{ com } r^2 = 0,99 \quad (1)$$

$$\text{ControleCO}_2: Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 41,076 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 13,257; \text{ com } r^2 = 0,94 \quad (2)$$

$$\text{O}_3\text{T10: } Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,7161 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 0,8661; \text{ com } r^2 = 0,97 \quad (3)$$

$$\text{O}_3\text{T20: } Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,7798 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 1,6918; \text{ com } r^2 = 0,97 \quad (4)$$

$$\text{O}_3\text{T30: } Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 0,2851 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 1,1361; \text{ com } r^2 = 0,89 \quad (5)$$

$$\text{O}_3\text{T10CO}_2: Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 2,7238 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 3,3008; \text{ com } r^2 = 0,95 \quad (6)$$

$$\text{O}_3\text{T20CO}_2: Y \text{ (g L}^{-1}\text{)} = 10,531 \text{ (DO}_{670\text{nm}}\text{)} + 7,9547; \text{ com } r^2 = 0,99 \quad (7)$$

A taxa de crescimento específica máxima (μ_{\max}) da biomassa foi determinada por meio da inclinação do gráfico da DO.

O tempo de duplicação (Td) foi calculado por meio da equação (8):

$$Td = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} \quad (8)$$

Onde: Td é o tempo de duplicação (d); μ_{\max} é a taxa de crescimento máximo da biomassa (d^{-1}).

A produção volumétrica (Pv) foi calculada utilizando a equação (9):

$$Pv = \frac{X_f - X_i}{T_f - T_i} \quad (9)$$

Onde: Pv é a produtividade volumétrica ($g L^{-1} d^{-1}$); $X_f - X_i$ é a diferença entre a concentração final e inicial de biomassa ($g L^{-1}$); $T_f - T_i$ é o intervalo de tempo de duração experimento (d).

O Td e a Pv foram calculados de acordo com (DE MENDONÇA et al., 2022).

3.6 Biofixação de CO₂

A biofixação de CO₂ foi estimada com base na concentração de carbono orgânico (C) presente na biomassa (Equação 10). As contrações de C nas biomassas foram determinadas por análise elementar utilizando equipamento Elementar Vario EL III, German.

$$R_{CO_2} (mg L^{-1} d^{-1}) = Pv \times C \times \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (10)$$

Onde: R_{CO_2} é a biofixação de CO₂ ($mg L^{-1} d^{-1}$); Pv é a produtividade volumétrica ($g L^{-1} d^{-1}$); C é concentração de carbono na biomassa (%); M_{CO_2} é a massa molar do CO₂ ($g mol^{-1}$); e M_C é a massa molar do carbono ($g mol^{-1}$).

A equação (10) foi retirada do estudo de Tang et al.(2011).

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Análises dos parâmetros na água residuária

As análises de NH₄⁺, NO₃⁻, fósforo total (P), PO₄, fenóis, DQO, cor aparente e turbidez foram realizadas de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 2017) e pH, temperatura, condutividade elétrica (CE) e salinidade com Sonda AKSO multiparamétrica (China). Todos esses parâmetros foram analisados ao final do tratamento depois do processo de colheita.

A volatilização da amônia foi calculada com base no pH e temperatura médios (com base nos dados diários), por meio da equação (11) (EMERSON et al., 1975):

$$\frac{FreeNH_3}{TotalNH_4} = \frac{100}{1 + 10^{\left\{ \left(0,09018 + \frac{2719,92}{T + 273,2} \right) - pH \right\}}} \quad (11)$$

3.7.2 Colheita e secagem da biomassa

A separação da ARB e a biomassa foi feita utilizando uma peneira com abertura de 0,074 mm (Granutest, Brasil) (Figura 7a), quando necessário foi feita a separação por centrifugação (ZZDK Instrument 800-1, China), durante 5 minutos a 4.000 rpm (Figura 7b). A Figura 7c mostra o antes e depois da separação pelo processo de centrifugação, com a biomassa depositada no fundo do tubo.

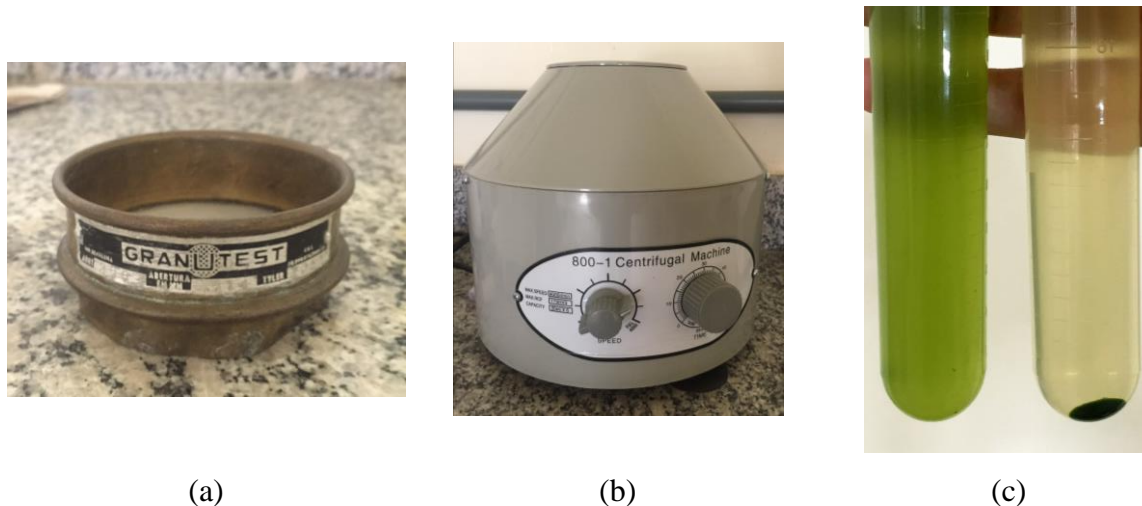


Figura 7: (a) Peneira utilizada na separação da biomassa; (b) Centrifuga utilizada para separação da biomassa; (c) Antes e depois da separação pelo processo de centrifugação

Após a colheita, a biomassa foi liofilizada à -40°C (Liotop L 101), conforme mostrado na Figura 8 abaixo.



Figura 8: Processo de secagem da biomassa

3.7.3 Extração de lipídios e carboidratos

Posteriormente, os lipídios totais foram quantificados através da extração soxhlet, feita em triplicata, utilizando aproximadamente, 50 mL de solvente, hexano HPCL, com o processo

de refluxo tendo a duração de 4 horas (Figura 9). Após a extração o solvente foi evaporado e recuperado em um rotaevaporador (Buchi Waterbath B-480, Alemanha).



Figura 9: Extração de lipídios

As análises de carboidratos foram feitas seguindo a metodologia de Dubois et al. (1956). A metodologia consiste em um método colorimétrico, precedido por hidrólise ácida. Após esse processo são adicionados a um tubo 2 mL da amostra, 0,05 mL de solução de fenol 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Depois que a solução esfria até a temperatura ambiente é levada para medição à 490 nm. Neste estudo as análises foram feitas em laboratório externo.

3.8 Análises de ácidos graxos livres

3.8.1 Eletroforese capilar

Neste trabalho, o conteúdo de ácidos graxos livres foi determinado por meio de um procedimento alternativo de eletroforese capilar com detecção UV validado anteriormente (EC-UV) (AMORIM et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2003; SATO et al., 2021). O método oficial de determinação do conteúdo de ácidos graxos livres, óleos e gorduras (AOAC 969.33) é baseado na análise de ésteres de metil por cromatografia gasosa. Contudo, o uso da EC-UV tem sido utilizada para análise de ácidos graxos nas últimas décadas devido a sua simplicidade, ampla aplicabilidade e as vantagens sustentáveis, como utilização de menos reagentes (OLIVEIRA et al., 2014; TAVARES, 1995).

Para as análises foi utilizada água deionizada por um sistema de osmose reversa (Quimis, São Paulo, Brasil). Metanol foi adquirido de Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), Acetonitrila e 1-octanol de Merck (Rio de Janeiro, Brasil) e o hidróxido de sódio (NaOH) de Synth (São Paulo, Brasil). Polioxietilenoglicol dodecil éter (Brij® 35) and dodecilbenzeno

sulfonato de sódio (SDBS) e todos os padrões de ácidos graxos: C16:0 (palmítico), C18:0 (esteárico), C18:1 n-9 (oleico), C18:2 n-6 (linoleico) foram comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

O equipamento de Eletroforese capilar Agilent 7100 (Califórnia, EUA) equipado com um detector de diodo array (DAD) configurado em 224,0 nm foi utilizado para análise das cadeias de ácidos graxos. A temperatura do cartucho foi mantida à 25 °C. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente com pressão aplicada de 12 mbar por 4,0 s, a voltagem de separação foi de + 19 kV. Capilar de sílica fundida com revestimento externo de poli imida (NST, São Paulo, Brasil) com 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento útil), 75 µm de diâmetro interno e 360 µm de diâmetro externo. Como eletrólito de fundo (BGE) foi utilizada uma solução tampão de fosfato de 15 mmol L⁻¹ (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,8), 4 mmol L⁻¹ SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ Brij® 35, 45% (v/v) acetonitrila e 2,1% (v/v) 1-octanol (AMORIM et al., 2019).

3.8.2 Preparação das amostras

Para o cálculo do conteúdo de ácidos graxos, as amostras foram preparadas segunda a metodologia de Prado, Porto e Oliveira (2017). Aproximadamente 100 mg de cada amostra foi individualmente saponificada em 2,0 mL de solução metanólica de hidróxido de sódio (0.5 mol L⁻¹), que foi posta em banho térmico com agitação (75 – 80 °C) por 25 minutos. A solução resultante foi transferida para tubo de ensaio de 5,0 mL e completada com metanol. Antes da injeção, cada amostra foi diluída em metanol 1:1 (v/v). As análises foram feitas em triplicata. Todo o processo descrito acima é mostrado na Figura 10.

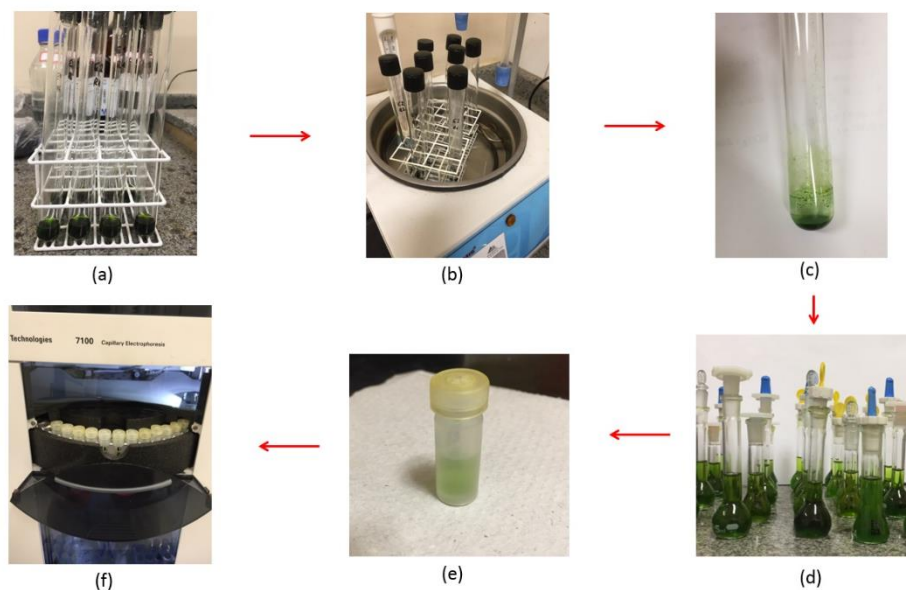


Figura 10: Processo de identificação dos ácidos graxos livres (a) Preparação das amostras; (b) Amostras no banho térmico a 65°C; (c) Secagem das amostras a temperatura ambiente; (d) Transferência das amostras para o balão de 5 mL; (e) Amostras no *vial* prontas para ir ao EC; (f) Amostras no EC prontas para injeção

3.8.3 Quantificação de ácidos graxos e análises estatísticas

O conteúdo de ácidos graxos foi calculado diretamente por meio de curvas de calibração externas construídas considerando o método dos mínimos quadrados ordinários (OLS). Os dados foram coletados a partir da análise aleatória de triplicatas autênticas das soluções da mistura padrão pelo método CZE-UV. A linearidade foi avaliada considerando tanto a independência do coeficiente de correlação (r), a homoscedasticidade e a falta de ajuste para cada ácido graxo como pressupostos estatísticos. Os limites de detecção e quantificação foram avaliados pela relação sinal/ruído seguindo um protocolo padronizado (DE SOUZA et al., 2020b; SATO et al., 2021). Cada experimento foi realizado em quatro réplicas autênticas, assim, todas as amostras foram então preparadas seguindo o procedimento supracitado e analisadas em triplicata. Todos os resultados quantitativos de ácidos graxos são expressos considerando a média global de todas as análises realizadas para cada experimento.

3.9 Análises estatísticas

Os resultados experimentais para as curvas de crescimento da biomassa foram avaliados por barras de erros e o teste de Tuckey (com 5% de significância) foi aplicado para os poluentes orgânicos e nutrientes, taxa de crescimento máximo e tempo de duplicação da biomassa, lipídios e carboidratos totais.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Abundância relativa

A abundância relativa das espécies de microalgas identificadas nos experimentos é apresentada na Figura 11. Em todos os reatores foram encontrados *Arthrospira platensis* DHR 20, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*. A espécie *Euglenas sp.*, foi identificada nos reatores de Controle (3,21%), ControleCO₂ (0,33%), O₃T10CO₂ (0,23%) e O₃T20CO₂ (0,70%). A ausência dessa espécie nos reatores com aplicação de ozônio (O₃T10, O₃T20 e O₃T30) indica que essa espécie teve intolerância as concentrações residuais de ozônio utilizadas nesse estudo.

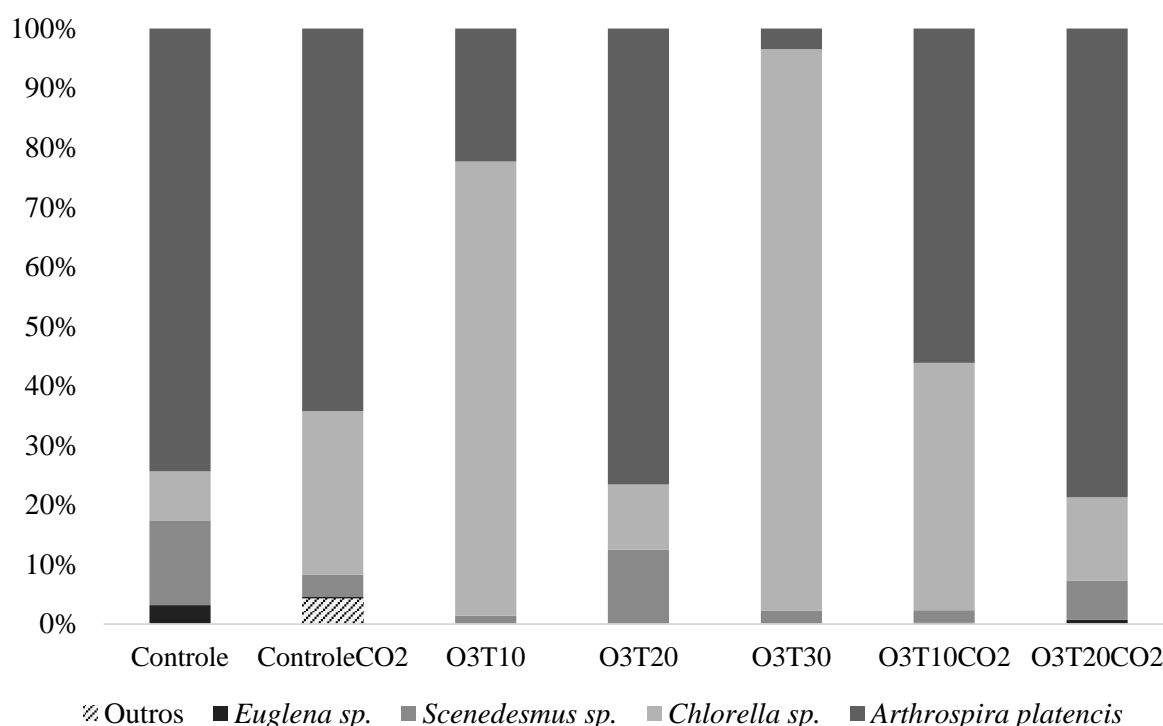


Figura 11: Abundância relativa das espécies de microalgas encontradas em cada fotobiorreator

Foi observado uma predominância da *Arthrospira platensis* DHR 20 na maioria dos reatores, com exceção dos reatores O₃T30 e O₃T10. Uma das prováveis causas desse acontecimento pode ter sido devido ao fato da concentração de ozônio no experimento O₃T30 ter sido um fator inibidor ao crescimento da *Arthrospira platensis* DHR 20, fazendo com que a *Chlorella sp.* predominasse. O reator O₃T10 apresentou uma configuração similar ao reator O₃T30, com predominância da espécie *Chlorella sp.*. Isso ocorreu devido ao fato do inóculo utilizado no reator O₃T10 ser proveniente do reator O₃T30, inóculo esse retirado após a finalização do experimento. Esse fator explica a também predominância de *Chlorella sp.* no reator O₃T10.

A predominância de *Chlorella sp.* no reator O₃T30 pode ter se dado devido ao fato da espécie acumular mais lipídios que a *Arthrospira platencis*. Em geral, microalgas do gênero *Chlorella* podem acumular lipídios de 2 até 63% (AGGARWAL; REMYA, 2022; DEBNATH et al., 2021; YIN et al., 2020), enquanto a *Spirulina platencis* de 4 até 16% (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A maior presença de lipídios na *Chlorella sp.* garante uma reserva de energia a célula, o que pode ter assegurado maior adaptabilidade a espécie a concentração de ozônio no reator O₃T30.

Resultados semelhantes para *Chlorella vulgaris* foram encontrados por , Chegukrishnamurthi et al. (2020), onde os autores avaliaram a aplicação de ozônio para remoção de bactérias e a interferência no crescimento da dessa espécie. Os autores fizeram aplicações de ozônio similares aos deste estudo, com tempos de 10 e 30 minutos e concentrações variando de 0,2 - 1 g h⁻¹. Eles concluíram que após o tratamento com ozônio 90-95% das células de microalgas estavam disponíveis, indicando que a espécie *Chlorella vulgaris* não sofreu com a aplicação do ozônio. Os autores atribuíram esse fato a complexa parede celular desta espécie.

Em relação a espécie *Scenedesmus sp.*, mesmo com sua presença sendo registrada em todos os reatores, os valores encontrados não foram relevantes comparados com os resultados encontrados para a *Arthrospira platencis* DHR20 e *Chlorella sp.* A concentração residual de ozônio em O₃T20 não parece ter afetado o crescimento dessa espécie. Contudo, no reator O₃T30, a concentração residual de ozônio atuou como inibidor do crescimento da *Scenedesmus sp.* como ocorreu com a *Arthrospira platencis* DHR20. *Scenedesmus sp.* pode acumular de 12 até 23% de lipídios (CAI, PARK e LI, 2013; DE MENDONÇA et al., 2022) o que pode explicar a dificuldade que essa espécie encontrou para crescer nesse ambiente. Baixos valores também foram registrados em O₃T10 e O₃T10CO₂. Como discutido anteriormente, o inóculo utilizado em O₃T10 foi proveniente do reator O₃T30 e no reator O₃T10CO₂, o inóculo foi proveniente do reator O₃T10, e por conta disso foram registradas baixas representatividades de *Scenedesmus sp.* nesses dois reatores.

Nesse estudo, o tempo de ozonização exerceu influência em qual espécie de microalga predominou. O mesmo não pode ser afirmado para a adição de CO₂, já que o dióxido de carbono parece não ter tido influência na abundância relativa das espécies de microalgas.

4.2 Parâmetros cinéticos e biofixação de CO₂

As duas maiores taxa de crescimento foram registradas nos experimentos O₃T20CO₂ e O₃T10 (Tabela 3), com 2,51 e 2,24 d⁻¹, respectivamente, sem diferença significativa entre elas ($p \geq 0,05$), o que acarretou em tempos de duplicação (Td) menor nesses dois experimentos, 0,28 e 0,31 d, respectivamente.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos e biofixação de CO₂ dos FBR. Desvio padrão entre parêntesis

FBR	MS 0 (g L ⁻¹)	MS (g L ⁻¹)	Produtividade volumétrica (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Taxa de crescimento específica (d ⁻¹)	Td (d)	C (%)	RCO ₂ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
Controle	2,11 (0,05)	3,21 (0,05)	0,275	0,51 (0,047)	1,37 (0,127)	41,33 (0,01)	417,28
ControleCO ₂	4,79 (2,40)	16,52 (0,49)	3,912	0,43 (0,061)	1,64 (0,258)	45,83 (0,03)	6.573,77
O ₃ T10	1,17 (0,10)	1,48 (0,08)	0,102	2,24 (0,125)	0,31 (0,017)	43,50 (0,01)	163,04
O ₃ T20	1,94 (0,10)	2,46 (0,08)	0,171	0,51 (0,265)	1,58 (0,603)	46,67 (0,01)	292,79
O ₃ T30	1,30 (0,20)	1,40 (0,06)	0,018	0,77 (0,115)	0,91 (0,130)	45,33 (0,03)	30,47
O ₃ T10CO ₂	1,15 (0,03)	7,99 (0,22)	2,278	1,88 (0,147)	0,37 (0,027)	50,33 (0,02)	4.203,41
O ₃ T20CO ₂	5,37 (0,31)	18,63 (0,21)	4,419	2,51 (0,321)	0,28 (0,032)	49,67 (0,02)	8.047,79

FBR: fotobiorreator; MS 0: Massa seca no primeiro dia; MS: Massa seca no último dia; Td: Tempo de duplicação; RCO₂: biofixação de CO₂

A aplicação do ozônio pode ter influenciado positivamente na μ_{\max} e Td. Isso pode ter ocorrido devido a remoção de turbidez da ARB, o que facilitou a passagem de luz pelo meio de cultivo, garantindo que a biomassa crescesse de forma mais acelerada. de Souza et al. (2021) obtiveram uma taxa de crescimento máxima de 0,41 d⁻¹ e tempo de duplicação de 1,67 d, para *Arthrospira platensis* DHR 20 cultivada em água residuária de bovinocultura pré-tratada em reator UASB e com o fotobiorreator tendo temperatura controlada de $30 \pm 2,6$ °C. Gao et al. (2021) reportaram μ_{\max} e tempos de duplicação de 0,35 d⁻¹ e 1,98 d para *Chlorella sorokiniana* cultivada em água residuária de frigorífico diluída em água destilada, respectivamente. As taxas de crescimento encontrada nos estudos citados foram menores que as encontradas nesse estudo, evidenciando que a aplicação de ozônio influenciou positivamente a taxa de crescimento e o tempo de duplicação da biomassa. A combinação do ozônio e o CO₂ também impactaram positivamente as taxas de crescimento. A clarificação da água residuária e a presença de uma fonte alternativa de alimento proporcionaram condições favoráveis para que a biomassa crescesse rapidamente.

Observando a Tabela 3, pode-se constatar que a microalga aumentou muito pouco sua biomassa nas condições de cultivo em O₃T10, O₃T20 e O₃T30, ficando evidente que houve inibição de crescimento ocasionado pela presença de ozônio na água residuária. Esses experimentos apresentaram as menores produtividades volumétrica, 0,0183, 0,1022 e 0,1711 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Uma forma de contornar a baixa produtividade nos FBRs com água

ozonizada foi adição de CO₂. Os experimentos O₃T20CO₂ e O₃T10CO₂ apresentaram relevantes produtividades volumétricas, 2,278 e 4,419 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente, indicando que a suplementação de CO₂ pode contornar os problemas de inibição do meio de cultivo proporcionados pela água residuária ozonizada. Segundo Lu et al. (2020), o limite máximo da concentração de CO₂ no meio depende da espécie de microalga. Os resultados encontrados em termos de produtividade volumétrica de biomassa, evidenciaram que o CO₂ foi o fator essencial no aumento da produção de biomassa, com os três reatores com adição de CO₂, ControleCO₂, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂ apresentando as maiores produtividades 3,912, 2,278 e 4,419 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Assim sendo, relevantes produtividades em biomassa podem ser alcançadas com adição pequena de CO₂ para suprir a demanda de carbono das células, já que o carbono inorgânico é uma fonte alternativa de alimento para a biomassa (DE MENDONÇA et al., 2021).

As concentrações de carbono na biomassa variaram de 41,33 a 50,33% (Tabela 3), valores próximos aos 50% comumente encontrados em microalgas (DE SOUZA et al., 2021; DUARTE; FANKA; COSTA, 2020). A biofixação de CO₂ (RCO₂) foi maior nos FBR com adição do carbono inorgânico, O₃T20CO₂, ControleCO₂ e O₃T10CO₂, com valores 8.047,79, 6.573,77 e 4.203,41 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Já os reatores que apresentaram as menores RCO₂ foram os com a menor produtividade volumétrica, O₃T10 e O₃T30. Yadav et al. (2020) encontraram RCO₂ de 0,281 ± 0,02 g L⁻¹ d⁻¹ com o cultivo *Chlorella* sp. em efluente doméstico, avicultura e suinocultura com a aplicação de 10% CO₂ (v/v). Jin et al. (2021) observaram RCO₂ em 6 espécies diferentes de microalgas (*C. sorokiniana* XJ02, *C. sorokiniana* GS03, *Chlorella* sp. NM01, *H. riparia* SX01, *D. communis* GS05 e *S. obliquus* NM02) cultivadas no meio BG-11, com aplicação de 15% de CO₂ (v/v) e registraram biofixação de 0,34 ± 0,01, 0,46 ± 0,01, 0,35 ± 0,01, 0,71 ± 0,01, 0,37 ± 0,01 e 0,20 ± 0,01 g L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Os autores atribuíram a maior RCO₂ na espécie *H. riparia* SX01 a adaptação da espécie a concentração de CO₂ aplicada. Os resultados encontrados nesse estudo foram 20 a 40 vezes maiores que os reportados por Jin et al. (2021) e Yadav, Panda e Sen (2020), evidenciando o grande potencial desse mix de microalgas como alternativa para fixar CO₂.

4.3 Volatilização da amônia

A volatilização da amônia é um dos mecanismos de remoção de nitrogênio em sistemas de tratamento com microalgas. Ela ocorre quando o pH e a temperaturas do meio aumentam (CAI; PARK; LI, 2013). Nos experimentos realizados, as maiores taxas de volatilização foram registradas em O₃T20, O₃T10CO₂, com 73,49 e 65,55% (Tabela 4), respectivamente, sem diferença significativa entre ambos ($p \geq 0.05$). Ledda et al. (2015) registraram perda amônia de

68,70, 73,95 e 65,56%, cultivando *Chlorella sp.* Em digestato de esterco de suíno, digestato derivado das frações líquidas obtidas por centrifugação e ultrafiltração, respectivamente. Markou et al. (2014) encontraram perdas de amônia similares ao deste estudo, variando de 17 a 80%, com o cultivo de *A. platensis* em meio Zarrouk. Os autores atribuíram parte desta perda à agitação pela injeção de ar, o que também foi realizado nos experimentos deste estudo. As bolhas de ar injetas promovem o *stripping* da amônia, ou seja, a mesma é carreada.

ControleCO₂ teve o menor pH médio entre os FBRs, 8,51 e a menor perda de amônia, 17,65%. Uma das possíveis causas para isso é que a adição de CO₂ ao meio pode ter um efeito de controle de pH (DE MENDONÇA et al., 2018). A temperatura também desempenha um papel vital na volatilização da amônia. Tanto o FBR Controle, quanto O₃T30 registraram pH médio de 9,09, mas com temperaturas médias diferentes, 25,33 e 27,11°C, respectivamente. Essa diferença de temperatura resultou em diferentes porcentagens para a volatilização da amônia, 43,78 e 56,63%, respectivamente.

Tabela 4: Volatilização média da amônia em cada FBR. Desvio padrão em parêntesis

FBR	pH	T (°C)	NH ₃ livre (%)
Controle	9,09 _(0,03)	25,33 _(0,72)	43,78 _(2,66)
ControleCO ₂	8,51 _(0,05)	25,88 _(0,77)	17,65 _(1,83)
O ₃ T10	9,34 _(0,07)	24,58 _(0,57)	46,99 _(3,39)
O ₃ T20	9,61 _(0,14)	26,66 _(0,09)	73,49 _(6,53)
O ₃ T30	9,09 _(0,06)	27,11 _(0,23)	56,63 _(4,51)
O ₃ T10CO ₂	9,52 _(0,03)	24,20 _(1,02)	65,55 _(3,14)
O ₃ T20CO ₂	9,21 _(0,02)	24,68 _(0,62)	49,40 _(2,14)

FBR: fotobioreator; T: temperatura

4.4 Composição macromolecular

As maiores porcentagens de carboidratos acumulados pela biomassa foram registradas nos experimentos O₃T10CO₂, O₃T30, O₃T20CO₂ e Controle (Tabela 5), respectivamente, sem diferença significativa entre eles ($p \geq 0,05$). A síntese de carboidratos pode ser associada a atividade fotossintética da biomassa (DE CARVALHO SILVELLO et al., 2022). No presente estudo, a adoção de iluminação constante (24 h d⁻¹ a 326,10 μmol m⁻² s⁻¹) favoreceu a síntese dessas moléculas. Além disso, Debnath et al. (2021) afirmam que o cultivo mixotrófico favorece a síntese de carboidratos, devido a presença de uma fonte alternativa de alimento além do CO₂, ou seja, do carbono orgânico solúvel biodegradável.

Tabela 5: Quantificação das macromoléculas presente na biomassa. Desvio padrão entre parêntesis

FBR	Lipídios (%)	Produtividade de lipídios (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Carboidratos (%)	Produtividade de carboidratos (g L ⁻¹ d ⁻¹)
Controle	26,67 (2,08)	0,0734	28,00 (2,65)	0,0771
ControleCO ₂	11,67 (1,53)	0,4564	21,67 (1,53)	0,8475
O ₃ T10	21,66 (12,84)	0,0221	23,00 (1,00)	0,0235
O ₃ T20	48,03 (7,31)	0,0822	26,33 (0,58)	0,0451
O ₃ T30	48,16 (3,59)	0,0088	29,00 (1,00)	0,0053
O ₃ T10CO ₂	14,08 (2,71)	0,3206	30,00 (2,00)	0,6833
O ₃ T20CO ₂	11,27 (5,69)	0,4981	28,67 (1,53)	1,2668

Em relação ao acúmulo de lipídios, dois experimentos registraram porcentagens elevadas, O₃T30 e O₃T20, com 48,16% e 48,03%, respectivamente, sem diferença estatística ($p \geq 0,05$). A presença residual de ozônio na água residuária nesses dois experimentos desencadearam estresse na biomassa, causando acúmulo de lipídios em sua matriz celular, fator que explica as elevadas concentrações desta macromolécula que não é habitual de ser tão elevada em biomassa de microalgas cultivadas em águas residuárias.

No experimento O₃T30, a menor concentração inicial de nutrientes para o cultivo (124 mg L⁻¹ de NH₄⁺ (Tabela 2)), associado à volatilização de amônia, podem ter sido fatores que contribuíram para acumular lipídios na biomassa, uma vez que quanto menor a entrada de N no sistema de cultivo, menor o acúmulo de proteínas e maior a tendência de produção de carboidratos e acúmulo de lipídios (DE MENDONÇA et al., 2018). A menor disponibilidade de nutrientes é um dos fatores mais conhecidos que acarretam em um maior acúmulo de lipídios (CHHANDAMA et al., 2021). Além disso, o experimento teve predominância de *Chlorella sp.* (Figura 11), espécie que tende a acumular mais lipídio em sua matriz celular se comparada a *Spirulina platensis* (DÍAZ et al., 2022; KATIYAR et al., 2017; WOOD, 2021), espécie que predominou na maioria dos outros experimentos (Figura 11). No caso de experimento O₃T20, foi registrado a maior porcentagem de volatilização da amônia, 73,5% (Tabela 5). A perda de nitrogênio por volatilização da amônia gerou um ambiente com pouca disponibilidade desse nutriente, o que proporcionou estresse na biomassa, o que por sua vez favorece a síntese de lipídios.

No experimento O₃T10, o percentual de lipídios foi cerca de metade do valor obtido nos experimentos O₃T30 e O₃T20 (Tabela 5). Ainda assim, ao crescer na OARB sujeita a menor tempo de contato com ozônio, os valores de lipídios ainda estiveram ordem de grandeza maior quando comparados aos outros experimentos sem ozônio, comprovando que adição de microalgas neste tipo de substrato de fato maximiza o acúmulo de lipídios nas células, em especial no mix de algas utilizados na presente pesquisa.

Purba et al. (2022) encontraram valores similares e maiores aos registrados nos reatores O₃T30 e O₃T20 para lipídios de $46,38 \pm 2,20\%$ e $57,82 \pm 1,29\%$, ao cultivar *C. vulgaris* NIES-1269 e *D. maximus* CN06 em efluente doméstico, respectivamente. Cheng et al. (2016) também registraram aumento do acúmulo de 31,1% de lipídios em *Chlorella* PY-ZU1 cultivada em efluente não diluído de resíduos de comida digeridos em um digestor anaeróbio pré-tratado com ozônio. Ambos estudos justificam a alta porcentagem de lipídios devido a uma condição de estresse causada pela baixa concentração de nutriente. Essa mesma conclusão pode ser atribuída aos reatores O₃T30, que tinha baixa concentração inicial de NH₄⁺ e para o reator O₃T20 que teve grande perda de amônia por meio da volatilização.

A presença de CO₂ nos experimentos acarretou uma maior produtividade de biomassa (Tabela 3), mas o mesmo não foi observado em se tratado do conteúdo de lipídios (Tabela 5). Resultados semelhantes foram reportados por Liu et al., (2020), que cultivaram quatro espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus dimorphus*) em efluente de uma unidade de tratamento de efluentes, com aplicação de 10% de CO₂ e observaram um aumento da biomassa, mas não das porcentagens de lipídios acumulados. A presença de uma fonte adicional de alimento (carbono inorgânico via CO₂ aplicado) proporcionou um ambiente mais favorável ao crescimento para as microalgas, diminuindo o acúmulo de lipídeos pela biomassa. Contudo, as maiores produtividades volumétricas de lipídios foram registradas nos experimentos que obtiveram maiores produtividades volumétricas de biomassa, ControleCO₂, O₃T20CO₂ e O₃T10CO₂ (Tabela 5), respectivamente, justamente por conta dessa maior produtividade volumétrica de biomassa. Maiores produtividades de biomassa, muitas vezes podem compensar os menores acúmulos de lipídio nelas presentes (de Souza et al., 2021). Zhang et al. (2018) observaram que águas residuárias com maiores disponibilidades de nutrientes tendem a ter maior produtividade de biomassa, porém menor acúmulo de lipídios, como também registrado na presente pesquisa (Tabela 5).

4.5 Análise de qualidade do biodiesel

Diferentes classes de ácidos graxos de cadeia longa promovem uma melhora na qualidade do biodiesel a baixas temperaturas, como por exemplo estabilidade oxidativa, ponto de obstrução de filtro a frio e número de cetano (PATEL, JOUN e SIM, 2020). A Figura 12 apresenta os resultados encontrados para a quantidade de ácidos graxos (FA) presentes nas amostras de cada FBR. Nota-se que os experimentos O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂ foram os que tiveram maiores concentrações de FA, 18,7% e 13,2%, respectivamente.

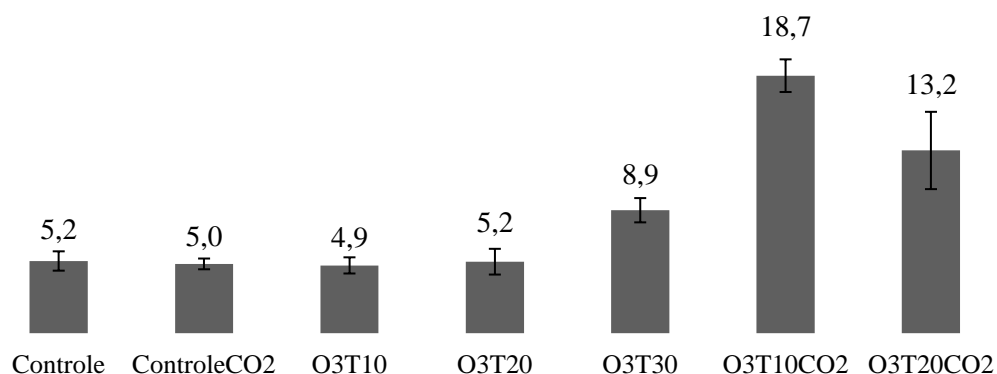


Figura 12: Total de ácidos de graxos em cada FBR, representados em porcentagem (m/m)

Em todos os FBR, o perfil de ácidos graxos que apresentou maior representatividade foi o ácido palmítico (C16:0), chegando a valores superiores a 70% nos reatores O₃T20, O₃T10, Controle e ControleCO₂ (Tabela 6). De acordo com Arutselvan et al. (2021), o C16:0 é o ácido mais desejado, já que o mesmo ajuda a melhorar a estabilidade oxidativa e fluxo a frio do combustível. Essas mesmas propriedades também podem ser atribuídas ao ácido esteárico (C18:0) (DE MENDONÇA et al., 2022). O C18:0 foi detectado apenas nos dois FBRs com a presença de ozônio e CO₂, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂. No caso em que foi detectado, esse ácido apresentou a segunda maior representatividade no perfil de FA.

Tabela 6: Composição dos ácidos graxos em cada FBR apresentados em porcentagem (m/m) considerando o total de ácidos graxos produzido. Desvio padrão em parêntesis

Ácido graxo	Nome usual	FBR						
		Controle (%)	ControleCO ₂ (%)	O ₃ T10 (%)	O ₃ T20 (%)	O ₃ T30 (%)	O ₃ T10CO ₂ (%)	O ₃ T20CO ₂ (%)
C16:0	Palmítico	71,1 _(10,2)	75,9 _(2,67)	71,3 _(2,75)	70,8 _(5,94)	53,0 _(2,57)	48,5 _(1,74)	51,1 _(4,02)
C18:0	Esteárico	-	-	-	-	-	26,8 _(0,63)	29,2 _(3,63)
C18:1	Oleico	-	-	2,2 _(2,35)	-	31,1 _(1,64)	12,6 _(0,41)	3,65 _(1,58)
C18:2	Linoleico	8,85 _(3,80)	9,45 _(1,36)	8,2 _(2,57)	8,9 _(3,51)	5,7 _(0,54)	4,39 _(0,17)	4,39 _(0,60)
C18:3	Linolênico	20,0 _(8,16)	14,6 _(3,56)	16,3 _(1,09)	20,2 _(7,54)	10,1 _(1,71)	7,65 _(2,40)	11,1 _(1,51)

Um dos requisitos exigidos pela norma europeia EN 14214 para garantir a estabilidade oxidativa do biodiesel é que a presença de ácido linolênico (C18:3), deve ter concentração máxima de 12%. Tendo isso em vista, os FBRs O₃T30, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂ foram os únicos a se enquadrar nesta condição, apresentando 10,1, 7,65 e 11,1%, respectivamente (Tabela 6). Como alternativa para os reatores que apresentaram valores superiores aos exigidos na norma europeia (Controle, ControleCO₂, O₃T10 e O₃T20) poderia ser feita a mistura do biodiesel produzido com outro biocombustível, com por exemplo, o óleo de palma que possui alta estabilidade oxidativa (DEY et al., 2021). Realizar a mistura entre biocombustíveis e atingir

proporções ideais entre os ácidos graxos saturados e insaturados pode se apresentar como uma solução efetiva para essa problemática (CHANDRA et al., 2021). Outra opção para os reatores que apresentaram C18:3 maior que 12% é a utilização dessa biomassa como ração para animais. Segundo Fawcett et al. (2022) os ácidos linoleico e linolênico são os únicos ácidos poli-insaturados essenciais nas dietas. A utilização de microalgas como ração para animais vem provando uma alternativa bastante atrativa e sustentável (LU et al., 2021). Os resultados encontrados nesse estudo para C18:2 e C18:3 nos reatores Controle, ControleCO₂, O₃T10 e O₃T20 são favoráveis a utilização dessa biomassa como ração para animais.

C16:0, C18:3n6 e C18:1n9-9 foram os principais ácidos graxos encontrados por Cardoso et al. (2021) quando cultivaram *Spirulina sp.* LEB18 em águas residuárias de aquicultura e diferentes concentrações de meio Zarrouk. Chandra et al. (2021) registraram a presença, principalmente, de C16:0, C16:1, C18:0, C18:2, e C18:3 em policultura de microalgas cultivadas em águas residuárias de laticínios. Os autores concluíram que as policulturas se mostraram ser mais promissoras na produção de biodiesel que monoculturas. Geralmente isto ocorre em função da competição interespecífica entre as microalgas cultivadas.

Os resultados encontrados neste estudo mostram que as condições experimentais testadas podem apresentar alternativas bem-sucedidas na produção de biodiesel, contudo mais estudos (escala piloto e escala real) seriam necessários para desenvolver o conceito de biorrefinaria.

4.6 Biorremediação

As remoções de NH₄⁺ atingiram eficiências superiores a 99% em todos os experimentos, com o melhor cenário, O₃T10, tendo 100% de remoção. As altas taxas de remoção de NH₄⁺ podem ser explicadas pela volatilização da amônia (Tabela 7), devido aos altos valores de pH registrados, assim como a assimilação de nitrogênio pelas microalgas e o processo de nitrificação ocasionado devido a ação de bactérias nitrificantes. Ao variar o tempo de detenção hidráulica, em 9, 12, 15, 18 e 21 dias, Silveira et al. (2021) encontraram remoções acima de 90% para N-NH₄⁺ para todos os tempos de detenção, cultivando microalgas em águas residuárias de suínos pré-tratados em reatores UASB. Além disso, os autores também registraram aumento da concentração de N-NO₃⁻ em todos os experimentos.

O₃T30, O₃T10, ControleCO₂ e Controle, registraram remoções de NO₃⁻ 20,4 ± 9,9%, 64,0 ± 7,3%, 65,6 ± 9,7% e 85,8 ± 5,7%, respectivamente. O₃T20, O₃T10CO₂ e O₃T20CO₂ apresentam valores negativos (Tabela 7) devido ao maior registro da concentração de nitrato na água residuária após o tratamento com as microalgas em comparação com as concentrações de

NO_3^- contidas no meio de cultivo inicial. Isso pode ocorrer devido a ação das bactérias nitrificantes, que transformam o NH_4^+ em NO_2^- e NO_3^- através do processo de nitrificação (VARGAS-ESTRADA et al., 2021).

As maiores remoções de P e PO_4^- foram registradas nos experimentos Controle e $\text{O}_3\text{T30}$, sem diferença significativa entre eles ($p \geq 0,05$). A baixa remoção de P e PO_4^- no experimento Controle CO_2 pode ser explicada pela presença do CO_2 . Há dois mecanismos de remoção de fósforo no tratamento com microalgas, a assimilação de P pela biomassa e a precipitação (MOUSAVI et al., 2018). A precipitação de fósforo ocorre devido ao aumento do pH, resultante principalmente da atividade fotossintética das microalgas. Com a presença de CO_2 , a acidificação do dióxido de carbono impacta o pH, o que pode acarretar na diminuição da precipitação de fósforo (KONG et al., 2021).

$\text{O}_3\text{T10}$, $\text{O}_3\text{T20CO}_2$, Controle, $\text{O}_3\text{T10CO}_2$, $\text{O}_3\text{T20}$, tiveram remoções de 91,7%, 88,9%, 87,6%, 84,1% e 78% de DQO respectivamente, sem diferença significativa entre eles ($p \geq 0,05$). Em paralelo, as remoções de COT foram de 91,2%, 88,9%, 87,3%, 84,1% e 77,5%, para os mesmos experimentos citados anteriormente. Lv et al. (2018) obteve remoções de DQO de 62,30%, 46,99%, 25,95%, 20,77% e 55,18% para cinco espécies de microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum sp. GD*, *Parachlorella kessleri TY*, *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda*, respectivamente, cultivadas em água residuária de bovinocultura.

Os fenóis são considerados poluentes por apresentarem propriedades antimicrobianas (LINDNER; PLEISSNER, 2019). Nos experimentos realizados, as remoções de fenóis variaram de 30,1% a 98,6%. Os quatro melhores resultados $\text{O}_3\text{T20}$, $\text{O}_3\text{T30}$, Controle e $\text{O}_3\text{T10CO}_2$ (Tabela 7), não apresentaram diferença significativa entre eles ($p \geq 0,05$). Os resultados encontrados indicam que as espécies de microalgas utilizadas neste estudo não demonstraram inibições por conta da presença de fenóis. Caprio et al. (2018) encontraram remoção de fenóis, cultivando *Scenedesmus sp.* em água de torneira com água residuária de cultivo de oliveira (9% v/v) em regime de batelada, de 66 % ($\pm 3\%$). Cultivando *Chlorella vulgaris* em lixiviado de aterrado pré-tratado com precipitação química, Viegas et al. (2021) encontraram remoção máxima de fenol de 70,4%.

Águas residuárias de bovinocultura apresentam altos valores de turbidez e cor aparente. As remoções de turbidez e cor foram altas, variando de 69,62 a 83,21% e de 54,78 a 95,51%, respectivamente. Para a turbidez as maiores remoções foram registradas nos experimentos $\text{O}_3\text{T30}$, Controle e $\text{O}_3\text{T20CO}_2$. Já para o parâmetro cor aparente, as maiores remoções foram nos experimentos Controle, $\text{O}_3\text{T20CO}_2$ e $\text{O}_3\text{T30}$. Apesar desses dois parâmetros terem

apresentados porcentagens altas de remoção, as concentrações finais foram altas acima de 10 uT para turbidez e acima de 400 uC (Tabela 7) para cor aparente em todos os experimentos, indicando que um tratamento adicional seria necessário para o abatimento da carga de sólidos. A aplicação do ozônio teve impacto direto nesses dois parâmetros, ao se analisar as concentrações iniciais desses, é possível observar um abatimento em relação aos outros dois reatores que não tiveram a água residuária ozonizada previamente.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que o tratamento de águas residuárias da bovinocultura utilizando microalgas é uma alternativa promissora para o tratamento dessa tipologia de água residuária, comprovada por um abatimento relevante da carga poluidora e nutrientes.

Tabela 7: Eficiência total de remoção dos parâmetros analisados em FBR. Desvio padrão entre parêntesis

FBR	N-NH ₃			NO ₃			DQO			COT			C ₆ H ₅ OH		
	AT	DT	ET	AT	DT	ET	AT	DT	ET	AT	DT	ET	AT	DT	ET
	(mg L ⁻¹)		(%)	(mg L ⁻¹)		(%)	(mg L ⁻¹)		(%)	(mg L ⁻¹)		(%)	(mg L ⁻¹)		(%)
Controle	1.311,50	4,82	99,63 _(0,49) ^a	13,29	1,88	85,83 _(5,69) ^a	1.868,50	232,35	87,56 _(1,67) ^b	468,43	59,39	87,32 _(1,67) ^b	18,13	1,21	93,35 _(1,28) ^b
ControleCO ₂	645,00	0,75	99,88 _(0,03) ^a	12,89	4,43	65,64 _(9,72) ^{ab}	630,60	254,83	59,59 _(13,72) ^b	158,95	65,01	59,10 _(13,61) ^b	10,29	4,07	60,47 _(5,12) ^c
O ₃ T10	630,00	0,02	100,00 _(0,00) ^a	18,16	6,53	64,02 _(7,28) ^{ab}	873,18	72,15	91,74 _(5,46) ^a	219,59	19,34	91,19 _(5,42) ^a	7,17	3,73	47,99 _(5,29) ^c
O ₃ T20	524,00	0,11	99,99 _(0,01) ^a	14,18	32,01	-125,78 _(124,96) ^c	900,80	198,53	77,96 _(3,37) ^{ab}	226,50	50,95	77,51 _(3,35) ^{ab}	28,07	0,39	98,60 _(0,97) ^{ab}
O ₃ T30	124,00	0,21	99,98 _(0,02) ^a	13,73	12,18	20,43 _(9,86) ^{ab}	875,55	259,00	70,42 _(11,48) ^b	220,19	56,75	74,23 _(11,41) ^b	2,30	0,05	98,04 _(3,91) ^a
O ₃ T10CO ₂	630,00	1,92	99,70 _(0,13) ^a	18,16	20,60	-13,41 _(4,67) ^{bc}	7.700,00	1.221,45	84,14 _(1,18) ^d	1,926,3	306,66	84,08 _(1,18) ^d	7,17	0,58	91,88 _(2,53) ^{ab}
O ₃ T20CO ₂	524,00	2,44	99,53 _(0,10) ^a	14,18	18,16	-28,13 _(4,42) ^{bc}	7.700,00	851,53	88,94 _(0,22) ^c	1,926,3	214,18	88,88 _(0,22) ^c	28,07	19,61	30,14 _(2,46) ^d

FBR	PO ₄			P			Cor aparente			Turbidez		
	AT	DT	ET	AT	DT	ET	AT	DT	ET	AT	DT	ET
	(mg L ⁻¹)		(%)	(mg L ⁻¹)		(%)	(uC)		(%)	(uT)		(%)
Controle	758,38	2,89	99,62 _(0,41) ^a	247,35	0,94	99,62 _(0,41) ^a	17.116,67	768,33	95,51 _(0,32) ^c	621,00	44,78	92,79 _(1,29) ^b
ControleCO ₂	69,41	50,72	26,94 _(7,61) ^c	22,65	16,55	26,94 _(7,61) ^b	3.015,00	1.029,00	65,87 _(0,86) ^c	298,00	47,82	83,95 _(0,42) ^b
O ₃ T10	76,25	8,54	88,80 _(11,21) ^{ab}	24,87	2,79	88,80 _(11,21) ^a	1.980,00	611,67	69,11 _(2,10) ^b	92,00	10,80	88,27 _(0,82) ^a
O ₃ T20	43,78	9,55	78,19 _(2,67) ^{ab}	14,29	3,12	78,19 _(2,67) ^a	1.986,67	898,33	54,78 _(6,01) ^d	137,30	41,71	69,62 _(4,41) ^b
O ₃ T30	36,69	1,85	94,97 _(4,83) ^a	11,97	0,60	94,97 _(4,83) ^a	2.556,67	505,00	80,25 _(2,83) ^{ab}	280,00	19,00	93,21 _(2,38) ^a
O ₃ T10CO ₂	76,25	23,47	69,22 _(4,88) ^b	24,87	7,66	46,39 _(8,50) ^b	1.980,00	598,33	76,60 _(1,51) ^b	92,00	10,11	89,01 _(0,58) ^a
O ₃ T20CO ₂	43,78	9,97	77,24 _(4,62) ^{ab}	14,29	3,25	77,24 _(4,61) ^a	1.986,67	407,50	84,06 _(0,98) ^a	137,30	10,95	92,02 _(2,51) ^a

FBR: fotobioreator; AT: água residuária antes do tratamento; DT: água residuária depois do tratamento; ET: eficiência total de remoção do parâmetro; DQO: demanda química de oxigênio; COT: carbono orgânico total; ^{a,b,c,d,e} letras iguais representam valores estatisticamente iguais (p ≥ 0,05)

5 CONCLUSÃO

O mix de microalgas cultivados na ARB com aplicação de ozônio e CO₂ apresentou resultados promissores para a biofixação de CO₂ e produção de biodiesel. A biorremediação da ARB apresentou remoções significativas para os parâmetros analisados. Ficou claro pelos dados obtidos que a concentração residual de ozônio inibiu o crescimento da biomassa, contudo também desencadeou estresse na biomassa fazendo com que houvesse um aumento no acúmulo de lipídios. O oposto foi observado para o caso do CO₂. A disponibilidade de um nutriente extra proporcionou maior crescimento da biomassa, mas as concentrações de lipídios foram baixas comparadas com os outros reatores. Recomenda-se que estudos futuros avaliem uma configuração onde ambos recursos satisfaçam a produtividade de biomassa e de lipídios. A sugestão é que seja feita um cultivo em duas etapas; com a primeira para aumentar a produtividade de biomassa utilizando CO₂ e a segunda para desencadear estresse na biomassa com a aplicação de ozônio. O perfil de ácidos graxos demonstrou que o biodiesel produzido apresenta grande potencial. No mais, o conceito de biorrefinarias deve ser considerado para estudos futuros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.
- AGGARWAL, M.; REMYA, N. The State-of-the-Art Production of Biofuel from Microalgae with Simultaneous Wastewater Treatment: Influence of Process Variables on Biofuel Yield and Production Cost. **BioEnergy Research**, v. 15, n. 1, p. 62–76, 2022.
- AMORIM, T. L.; DUARTE, L. M.; CHELLINI, P. R.; DE OLIVEIRA, M. A. L. A validated capillary electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements. **LWT**, v. 114, p. 108380, 2019.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO E GÁS NATURAL. Biodiesel. **.Net**, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel>>. Acesso em: 01 novembro de 2021.
- ANP – AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO E GÁS NATURAL (2014). Resolução nº 45 de 25 de agosto de 2014. Dispõe sobre a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 3 de 2014 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. In: Diário Oficial da União, Brasília, DF.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 23rd. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- ARUTSELVAN, C.; NARCHONAI, G.; PUGAZHENDHI, A.; LEWIS, O.; THAJUDDIN, N. Evaluation of microalgal strains and microalgal consortium for higher lipid productivity and rich fatty acid profile towards sustainable biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 339, n. July, p. 125524, 2021.
- BALA AMUTHA, K.; MURUGESAN, A. G. Biological hydrogen production by the algal biomass *Chlorella vulgaris* MSU 01 strain isolated from pond sediment. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 194–199, jan. 2011.
- BARKIA, I.; SAARI, N.; MANNING, S. R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. **Marine Drugs**, v. 17, n. 5, p. 304, 2019.
- BARROS, A.; PEREIRA, H.; CAMPOS, J.; MARQUES, A.; VARELA, J.; SILVA, J. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.
- BEHERA, B.; SELVAM S. M.; DEY, B.; BALASUBRAMANIAN, P. Algal biodiesel production with engineered biochar as a heterogeneous solid acid catalyst. **Bioresource Technology**, v. 310, n. January, 2020.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gênero de Algas de Águas Continentais no Brasil**. 3ª ed. São Carlos: RiMa Editora, 2017.
- BHATT, A.; KHANCHANDANI, M.; RANA, M. S.; PRAJAPATI, S. K. Techno-economic analysis of microalgae cultivation for commercial sustainability: A state-of-the-art review. **Journal of Cleaner Production**, v. 370, p. 133456, 2022.
- BRASIL, B. S. A. F.; DE SIQUEIRA, F. G.; SALUM, T. F. C.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. **Algal Research**, v. 25, p. 76–89, jul. 2017.

BRASIL – Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2021). Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/biodiesel/programa-nacional-de-producao-e-uso-do-biodiesel-pnpb>>. Acesso em 01 novembro 2021.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 2013.

CALIJURI, M. L. SILVA, T. A.; MAGALHÃES, I. B.; PEREIRA, A. S. A. P.; MARANGON, B. B.; ASSIS, L. R.; LORENTZ, J. F. Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. **Chemosphere**, v. 305, p. 135508, out. 2022.

CARDOSO, L. G.; DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V.; DE JESUS, D. A.; LEMOS, P. V. F.; DRUZIAN, J. I. Spirulina sp. as a Bioremediation Agent for Aquaculture Wastewater: Production of High Added Value Compounds and Estimation of Theoretical Biodiesel. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 1, p. 254–264, 2021.

CASTRO, J. S.; CALIJURI, M. L.; FERREIRA, J.; ASSEMANY, P. P.; RIBEIRO, V. J. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of The Total Environment**, v. 724, p. 138138, 2020.

CHANDRA, R.; PRADHAN, S.; PATEL, A.; GHOSH, U. K. An approach for dairy wastewater remediation using mixture of microalgae and biodiesel production for sustainable transportation. **Journal of Environmental Management**, v. 297, p. 113210, 2021.

CHEGUKRISHNAMURTHI, M.; SHAHABAZUDDIN, M.; SREEVATHSAN, S.; SARADA, R.; MUDLIAR, S. N. Ozonation as non-thermal option for bacterial load reduction of Chlorella biomass cultivated in airlift photobioreactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 276, p. 123029, 2020.

CHENG, J.; YE, Q.; XU, J.; YANG, Z.; ZHOU, J.; CEN, K. Improving pollutants removal by microalgae Chlorella PY-ZU1 with 15% CO₂ from undiluted anaerobic digestion effluent of food wastes with ozonation pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 273–279, 2016.

CHHANDAMA, M. V. L.; SATYAN, K.B.; CHANGMAI, B.; VANLALVENI, C.; ROKHUM, S. L. Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. **Bioresource Technology Reports**, v. 15, p. 100771, 2021.

CHIN-ON, R. C.; BARBOSA, M. J.; WIJFFELS, R. H.; JANSSEN, M. A novel V-shaped photobioreactor design for microalgae cultivation at low latitudes: Modelling biomass productivities of Chlorella sorokiniana on Bonaire. **Chemical Engineering Journal**, v. 449, p. 137793, 2022.

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

CHOWDHURY, H.; LOGANATHAN, B. Third-generation biofuels from microalgae: a review. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 20, p. 39–44, 2019.

CORREA, D. F.; BEYER, H. L.; POSSINGHAM, H. P.; THOMAS-HALL, S. R.; SCHENK, P. M. Biodiversity impacts of bioenergy production: Microalgae vs. first generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 1131–1146, 2017.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P.; CECON, P. R. Evaluation of high rate ponds operational and design strategies for algal biomass production and domestic wastewater

- treatment. **Science of The Total Environment**, v. 791, p. 148362, 2021.
- CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 329–337, 2012.
- DAHIYA, A. **Algae biomass cultivation for advanced biofuel production**. In: DAHIYA, A. *Bioenergy: Biomass to Biofuels and Waste to Energy*, 2^a ed, Elsevier, 2020.
- DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3524–3531, 2011.
- DE CARVALHO, M. A. S.; GONÇALVES, I. S.; AZAMBUJA, S. P. H.; COSTA, S. S.; SILVA, P. G. P.; SANTOS, L. O.; GOLDBECK, R. Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126304, 2022.
- DE MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H.; MARQUES, I. P. R.; DOS REIS, A. J. D. 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, ago. 2018.
- DE MENDONÇA, H. V.; ASSEMAN, P.; ABREU, M.; COUTO, E.; MACIEL, A. M.; DUARTE, R. L.; DOS SANTOS, M. G. B.; REIS, A. Microalgae in a global world: New solutions for old problems? **Renewable Energy**, v. 165, p. 842–862, 2021.
- DE MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H. Production of Energy and Biofertilizer from Cattle Wastewater in Farms with Intensive Cattle Breeding. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 2, p. 72, 2017.
- DE MENDONÇA, H. V.; OTENIO, M. H.; MARCHÃO, L.; LOMEU, A.; DE SOUZA, D. S.; REIS, A. Biofuel recovery from microalgae biomass grown in dairy wastewater treated with activated sludge: The next step in sustainable production. **Science of The Total Environment**, v. 824, p. 153838, 2022.
- DE MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H. Production of Energy and Biofertilizer from Cattle Wastewater in Farms with Intensive Cattle Breeding. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 2, p. 72, 2017.
- DE OLIVEIRA, M. A. L.; SOLIS, V. E. S.; GIOIELLI, L. A.; POLAKIEWICZ, B.; TAVARES, M. F. M. Method development for the analysis of trans-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. **ELECTROPHORESIS**, v. 24, n. 10, p. 1641–1647, 2003.
- DE OLIVEIRA, M.; PORTO, B.; FARIA, I.; DE OLIVEIRA, P.; DE CASTRO, P. B.; CASTRO, R.; SATO, R. 20 Years of Fatty Acid Analysis by Capillary Electrophoresis. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14094–14113, 2014.
- DE SOUZA, D. S.; MACIEL, A. M.; OTENIO, M. H.; DE MENDONÇA, H. V. Optimization of Ozone Application in Post-Treatment of Cattle Wastewater from Organic Farms. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 231, n. 7, 2020.
- DE SOUZA, D. S.; VALADÃO, R. C.; DE SOUZA, E. R. P.; BARBOSA, M. I. M. J.; DE MENDONÇA, H. V. Enhanced *Arthrospira platensis* Biomass Production Combined with Anaerobic Cattle Wastewater Bioremediation. **Bioenergy Research**, v. 15, n. 1, p. 412–425, 2021.
- DE SOUZA, J. C. Q.; CHELLINI, P. R.; VIÇOSA, A. L.; DE SOUZA, M. V. N.; DE

- OLIVEIRA, M. A. L. Simultaneous separation of artesunate and mefloquine in fixed-dose combination tablets by CZE-UV. **Analytical Methods**, v. 12, n. 47, p. 5709–5717, 2020.
- DEBNATH, C.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B.; MISHRA, U.; NARAYANASAMY, S.; MUTHURAJ, M. Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111464, 2021.
- DENNY, D. M. T. Competitive renewables as the key to energy transition—RenovaBio: the Brazilian biofuel regulation. *In: The Regulation and Policy of Latin American Energy Transitions*. INC, 2020, p. 223–242.
- DEVI, M P.; MOHAN, S V. CO₂ supplementation to domestic wastewater enhances microalgae lipid accumulation under mixotrophic microenvironment: Effect of sparging period and interval. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 116–123, 2012.
- DEY, S.; REANG, N. M.; DAS, P. K.; DEB, M. A comprehensive study on prospects of economy, environment, and efficiency of palm oil biodiesel as a renewable fuel. **Journal of Cleaner Production**, v. 286, p. 124981, 2021.
- DIANURSANTI; PRAMADHANTI, D. Utilization of microalgae *Spirulina platensis* as anti-bacterial compound in soap. **AIP Conference Proceedings**, v. 2255, p. 040020, 2020.
- DÍAZ, V. LEYVA-DÍAZ, J. C.; ALMÉCIJA, M. C.; POYATOS, J. M.; DEL MAR MUÑO, M.; MARTÍN-PASCUAL, J. Microalgae bioreactor for nutrient removal and resource recovery from wastewater in the paradigm of circular economy. **Bioresource Technology**, v. 363, p. 127968, 2022.
- DI CAPRIO, F.; ALTIMARI, P.; PAGNANELLI, F. Integrated microalgae biomass production and olive mill wastewater biodegradation: Optimization of the wastewater supply strategy. **Chemical Engineering Journal**, v. 349, p. 539–546, 2018.
- DOMINGUEZ-FAUS, R.; POWERS, S. E.; BURKEN, J. G; ALVAREZ, P. J. The Water Footprint of Biofuels: A Drink or Drive Issue? **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 9, p. 3005–3010, 2009.
- 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, 4 set. 2020.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- EIA - U.S. ADMINISTRAÇÃO DE INFORMAÇÕES SOBRE ENERGIA. EIA projects 28% increase in world energy use by 2040. **.Net**, 2017. Disponível em: <<https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=32912>>. Acesso em: 17 fevereiro 2022.
- FAGODIYA, R. K.; PATHAK, H.; KUMAR, A.; BHATIA, A.; JAIN, N. Global temperature change potential of nitrogen use in agriculture: A 50-year assessment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44928, 21 abr. 2017.
- FAO - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA. Dairy Market Review. **.Net**, 2021. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/cb7982en/cb7982en.pdf>>. Acesso em: 28 junho 2021.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1–12, jan. 2007.

- GAN, K., XIAOQING M., XU, Y., WANG, H. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 285–290, nov. 2014.
- GANESAN, R. MANIGANDAN, S.; SAMUEL, M. S.; SHANMUGANATHAN, R.; BRINDHADEVI, K.; LAN CHI, N. T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. A review on prospective production of biofuel from microalgae. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00509, 2020.
- GANGULY, P.; SARKHEL, R.; DAS, P. The second- and third-generation biofuel technologies: comparative perspectives. **Sustainable Fuel Technologies Handbook**, p. 29–50, 2021.
- GANTAR, M.; SVIRČEV, Z. MICROALGAE AND CYANOBACTERIA: FOOD FOR THOUGHT. **Journal of Phycology**, v. 44, n. 2, p. 260–268, abr. 2008.
- GAO, K.; LIU, Q.; GAO, Z.; Xue, C.; QIAN, P.; DONG, J.; GAO, Z.; DENG, X. A dilution strategy used to enhance nutrient removal and biomass production of *Chlorella sorokiniana* in frigon wastewater. **Algal Research**, v. 58, p. 102438, 2021.
- GRANGEIA, C.; SANTOS, L.; LAZARO, L. L. B. The Brazilian biofuel policy (RenovaBio) and its uncertainties: An assessment of technical, socioeconomic and institutional aspects. **Energy Conversion and Management: X**, v. 13, p. 100156, 2022.
- HOSSAIN, N.; ZAINI, J.; INDRA MAHLIA, T. M. Life cycle assessment, energy balance and sensitivity analysis of bioethanol production from microalgae in a tropical country. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109371, nov. 2019.
- IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. World Energy Outlook. **.Net**, 2019. Disponível em: <<https://iea.blob.core.windows.net/assets/98909c1b-aabc-4797-9926-35307b418cdb/WEO2019-free.pdf>>. Acesso em: 28 junho 2021.
- IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Data and statistics. **.Net**, 2020. Disponível em: <https://www.iea.org/data-and-statistics?country=WORLD&fuel=Energy_supply&indicator=TPESbySource>. Acesso em: 26 outubro 2020.
- JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. Microalgae based production of single-cell protein. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 75, p. 102705, 2022.
- JEBALI, A.; ACIÉN, F. G.; RODRIGUEZ, E. B.; OLGUÍN, E. J.; SAYADI, S.; MOLINA, E. G. Pilot-scale outdoor production of *Scenedesmus* sp. in raceways using flue gases and centrate from anaerobic digestion as the sole culture medium. **Bioresource Technology**, v. 262, p. 1–8, 2018.
- JIN, X.; GONG, S.; CHEN, Z.; XIA, J.; XIANG, W. Potential microalgal strains for converting flue gas CO₂ into biomass. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 1, p. 47–55, 2021.
- KATIIYAR, R.; GURJAR, B R; BISWAS, S.; PRUTHI, V.; KUMAR, N.; KUMAR, P. Microalgae: An emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 1083–1093, 2017.
- KERSHAW, E. H.; HARTLEY, S.; MCLEOD, C.; POLSON, P. The Sustainable Path to a Circular Bioeconomy. **Trends in Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 542–545, 2021.
- KHAN, S. A.; SHARMA, G. K.; MALLA, F. A.; KUMAR, A.; RASHMI GUPTA, N.

- Microalgae based biofertilizers: A biorefinery approach to phycoremediate wastewater and harvest biodiesel and manure. *Journal of Cleaner Production*, v. 211, p. 1412–1419, 2019.
- KHOLSSI, R. RAMOS, P. V.; MARKS, E. A. N.; MONTERO, O.; RAD, C. 2Biotechnological uses of microalgae: A review on the state of the art and challenges for the circular economy. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 36, p. 102114, set. 2021.
- KINGS, A. J.; RAJ, R. E.; MIRIAM, L. R. M.; VISVANATHAN, M. A. Cultivation, extraction and optimization of biodiesel production from potential microalgae *Euglena sanguinea* using eco-friendly natural catalyst. *Energy Conversion and Management*, v. 141, p. 224–235, jun. 2017.
- KONG, W.; SHEN, B.; LYU, H.; KONG, J.; MA, J.; WANG, Z.; FENG, S. Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae. *Journal of Cleaner Production*, v. 292, p. 125975, 2021.
- LEDDA, C.; IDÀ, A.; ALLEMAND, D.; MARIANI, P.; ADANI, F. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Research*, v. 12, p. 68–73, 2015.
- LEONG, Y. K.; HUANG, C.; CHANG, J. Pollution prevention and waste phycoremediation by algal-based wastewater treatment technologies: The applications of high-rate algal ponds (HRAPs) and algal turf scrubber (ATS). *Journal of Environmental Management*, v. 296, p. 113193, 2021.
- LI, K.; LIU, Q.; FANG, F.; LUO, R.; LU, Q.; ZHOU, W.; HUO, S.; CHENG, P.; LIU, J.; ADDY, M.; CHEN, P.; CHEN, D.; RUAN, R. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, v. 291, p. 121934, 2019.
- LINDNER, A. V.; PLEISSNER, D. Utilization of phenolic compounds by microalgae. *Algal Research*, v. 42, p. 101602, 2019.
- LIU, X.; CHEN, G.; TAO, Y.; WANG, J. Application of effluent from WWTP in cultivation of four microalgae for nutrients removal and lipid production under the supply of CO₂. *Renewable Energy*, v. 149, p. 708–715, 2020.
- LU, W.; ALAM, M. A.; LIU, S.; XU, J.; SALDIVAR, R. P. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂ from livestock farms: A review. *Science of The Total Environment*, v. 716, p. 135247, 2020.
- LV, J.; LIU, Y.; FENG, J.; LIU, Q.; NAN, F.; XIE, S. Nutrients removal from undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 264, p. 311–318, 2018.
- MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 259–265, 2014.
- MARONEZE, M. M.; BARIN, J. S.; DE MENEZES, C. R.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Scientia Agricola*, v. 71, n. 6, p. 521–524, 2014.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
- MEGAWATI; BAHLOWAN, Z. A. S.; DAMAYANTI, A.; PUTRI, R. D. A.; TRIWIBOWO,

- B.; PRASETIAWAN, H.; AJI, S. P. K.; PRAWISNU, A. Bioethanol production from glucose obtained from enzymatic hydrolysis of *Chlorella* microalgae. **Materials Today: Proceedings**, v. 63, p. S373–S378, 2022.
- MONDAL, M.; GOSWAMI, S.; GHOSH, ASHMITA; O. G.; TIWARI, O. N.; DAS, P.; GAYEN, K.; MANDAL, M. K.; HALDER, G. N. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 99, 2017.
- MONDAL, S.; BERA, S.; MISHRA, R.; ROY, S. Redefining the role of microalgae in industrial wastewater remediation. **Energy Nexus**, v. 6, n. April, p. 100088, 2022.
- MOUSAVI, S.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M.; SEIFI, M. H. Cultivation of newly isolated microalgae *Coelastrum* sp. in wastewater for simultaneous CO₂ fixation, lipid production and wastewater treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 4, p. 519–530, 2018.
- PATEL, A. K.; JOUN, J.; SIM, S. J. A sustainable mixotrophic microalgae cultivation from dairy wastes for carbon credit, bioremediation and lucrative biofuels. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123681, 2020.
- PAWAR, S. Effectiveness mapping of open raceway pond and tubular photobioreactors for sustainable production of microalgae biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 62, p. 640–653, 2016.
- PEREIRA, H.; SARDINHA, M.; SANTOS, T.; GOUVEIA, L.; BARREIRA, L.; DIAS, J.; VARELA, J. Incorporation of defatted microalgal biomass (*Tetraselmis* sp. CTP4) at the expense of soybean meal as a feed ingredient for juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Algal Research**, v. 47, p. 101869, maio 2020.
- PRADO, T. L. A.; PORTO, B. L. S.; OLIVEIRA, M. A. L. Method optimization for trans fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation. **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 958–965, 2017.
- PURBA, L. D. A.; OTHMAN, F. S.; YUZIR, MOHAMAD, S. E.; IWAMOTO, K.; ABDULLAH, N.; SHIMIZU, K.; HERMANA, J. Enhanced cultivation and lipid production of isolated microalgae strains using municipal wastewater. **Environmental Technology & Innovation**, v. 27, p. 102444, 2022.
- RAEESOSSADATI, M J; AHMADZADEH, H; MCHENRY, M P; MOHEIMANI, N. R. CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. **Algal Research**, v. 6, p. 78–85, 2014.
- REN, Q.; CHEN, X.; YUMMINAGA, Y.; WANG, N.; YAN, W.; LI, Y.; LIU, L.; SHI, J. Effect of operating conditions on the performance of multichannel ceramic ultrafiltration membranes for cattle wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, p. 102102, 2021.
- RODRIGUES, A. C.C. Policy, regulation, development and future of biodiesel industry in Brazil. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 4, p. 100197, 2021.
- RUIZ, J.; WIJFFELS, R. H.; DOMINGUEZ, M.; BARBOSA, M. J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy. **Algal Research**, v. 64, p. 102698, 2022.
- SATO, R. T.; ALVES, J. B.; AMORIM, T. L.; OLIVEIRA, M. A. L. A capillary electrophoresis method for free fatty acids screening and acidity determination in biodiesel. **ELECTROPHORESIS**, v. 42, n. 9–10, p. 1135–1142, 2021.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R. A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. H. Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1238–1240, 2008.

SIDDIKI, S. Y. A.; MOFIJUR, M.; KUMAR, P. S.; AHMED, S. F.; INAYAT, A.; KUSUMO, F.; BADRUDDIN, I. A.; KHAN, T. M. Y.; NGHIEM, L.D.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, p. 121782, jan. 2022.

SILVEIRA, C. F.; DE ASSIS, L. R.; DE SOUSA OLIVEIRA, A. P. CALIJURI, M. L. Valorization of swine wastewater in a circular economy approach: Effects of hydraulic retention time on microalgae cultivation. **Science of The Total Environment**, v. 789, p. 147861, 2021.

SINGH, R.; KUMAR, A.; SHARMA, Y. C. Biodiesel synthesis from microalgae (*Anabaena* PCC 7120) by using barium titanium oxide (Ba_2TiO_4) solid base catalyst. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121357, set. 2019.

SOLOVCHENKO, A.; VERSCHOOR, A. M.; JABLONOWSKI, N. D.; NEDBAL, L. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 550–564, 2016.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

SUTHERLAND, D. L.; PARK, J.; HEUBECK, S.; RALPH, P. J.; CRAGGS, R. J. Size matters – Microalgae production and nutrient removal in wastewater treatment high rate algal ponds of three different sizes. **Algal Research**, v. 45, p. 101734, 2020.

SUTHERLAND, D. L.; HEUBECK, S.; PARK, J.; TURNBULL, M. H.; CRAGGS, R. J. Seasonal performance of a full-scale wastewater treatment enhanced pond system. **Water Research**, v. 136, p. 150–159, 2018.

SUTHERLAND, D. L.; RALPH, P. J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants - Opportunities and challenges. **Water Research**, v. 164, p. 114921, 2019.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química nova**, v. 19, 1995.

THUY LAN CHI, N.; MATHIMANI, T.; MANIGANDAN, S.; SHANMUGAM, S.; THI, N. H.; CAM, T., N.; ALI, S. A.; CHINNATHAMBI, A.; BRINDHADEVI, K.; CHANASUT, U.; WHANGCHAI, K. Small scale photobioreactor, outdoor open pond cultivation of *Chlorella* sp. and harvesting at log and stationary growth phase towards lipids and methyl ester production. **Fuel**, v. 319, p. 123813, 2022.

TREDICI, M. R.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; BASSI, N.; SAMPIETRO, G. Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant. **Algal Research**, v. 19, p. 253–263, 2016.

UNFCCC - UNITED NATIONS CLIMATE CHANGE. The Paris Agreement. **.Net**, 2021. Disponível em: <<https://unfccc.int/process-and-meetings/the-paris-agreement/the-paris-agreement>>. Acesso em: 26 junho 2021.

UNFCCC - UNITED NATIONS CLIMATE CHANGE. The Glasgow Climate Pact – Key Outcomes from COP26. **.Net**, 2022. Disponível em: <<https://unfccc.int/process-and->

meetings/the-paris-agreement/the-glasgow-climate-pact-key-outcomes-from-cop26?gclid=CjwKCAjwkaSaBhA4EiwALBgQaISG6kijZSIL2nzwRxCGRSAYWZvwMWEiSWnpSwwa3CVK7POYsynN7RoCCQgQAvD_BwE>. Acesso em: 20 julho 2022.

VARGAS-ESTRADA, L.; LONGORIA, A.; OKOYE, P. U; SEBASTIAN, P. J. Energy and nutrients recovery from wastewater cultivated microalgae: Assessment of the impact of wastewater dilution on biogas yield. **Bioresource Technology**, v. 341, p. 125755, 2021.

VIEGAS, C.; NOBRE, C.; MOTA, A.; VILARINHO, C.; GOUVEIA, L.; GONÇALVES, M. A circular approach for landfill leachate treatment: Chemical precipitation with biomass ash followed by bioremediation through microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 3, p. 105187, 2021.

WILOSO, E. I.; HEIJUNGS, R.; DE SNOO, G. R. LCA of second generation bioethanol: A review and some issues to be resolved for good LCA practice. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 5295–5308, 2012.

WOOD, D. A. Microalgae to biodiesel - Review of recent progress. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, 2021.

YADALA, S.; CREMASCHI, S. A Dynamic Optimization Model for Designing Open-Channel Raceway Ponds for Batch Production of Algal Biomass. **Processes**, v. 4, n. 2, p. 10, 2016.

YADAV, G.; PANDA, S. P.; SEN, R.. Strategies for the effective solid, liquid and gaseous waste valorization by microalgae: A circular bioeconomy perspective. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 6, p. 104518, 2020.

YAQOUBNEJAD, P.; RAD, H. A.; TAGHAVIJELOUDAR, M. Development a novel hexagonal airlift flat plate photobioreactor for the improvement of microalgae growth that simultaneously enhance CO₂ bio-fixation and wastewater treatment. **Journal of Environmental Management**, v. 298, p. 113482, 2021.

YIN, Z.; ZHU, L.; LI, S.; HU, T.; CHU, R.; MO, F.; HU, D.; LIU, C.; LI, B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122804, 2020.

YU, L.; LI, T.; MA, J.; ZHAO, Q.; WENSEL, P.; LIAN, J.; CHEN, S. A kinetic model of heterotrophic and mixotrophic cultivation of the potential biofuel organism microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, v. 64, p. 102701, 2022.

ZANELLA, L.; VIANELLO, F. Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103919, maio 2020.

ZHANG, Q.; YU, Z.; ZHU, L.; YE, T.; ZUO, J.; LI, X.; XIAO, B.; JIN, S. Vertical-algal-biofilm enhanced raceway pond for cost-effective wastewater treatment and value-added products production. **Water Research**, v. 139, p. 144–157, 2018.