

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

JAIRO PEREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR

PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS CULTIVADAS COM VINHAÇA

**DOURADOS/MS
2021**

JAIRO PEREIRA DE OLIVEIRA JUNIOR

PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE MICROALGAS CULTIVADAS COM VINHAÇA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental na área de concentração Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega

**DOURADOS/MS
2021**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que amo, em
especial a minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre me abençoar, guiar, amparar e me fortalecer durante toda minha vida, garantindo a minha persistência frente a todos os obstáculos, sem Ele a conclusão deste trabalho não seria possível.

A toda minha família pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos da minha formação acadêmica, pessoal e profissional, sempre acreditando no meu potencial e na minha capacidade de resiliência.

Aos amigos que, em todas as circunstâncias, acreditaram em mim e me incentivaram a persistir em todos os casos, sempre dispostos a me auxiliar nos momentos de precisão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega, pelo incentivo, auxílio e, acima de tudo, pela confiança depositada em mim durante toda a execução deste trabalho.

A mim, por independente de tudo, nunca ter deixado de tentar novamente e, sobretudo, perseverar até o fim.

EPÍGRAFE

“Deus não nos inspira sonhos irrealizáveis.”
Santa Terezinha do Menino Jesus.

RESUMO

A crescente busca pela mitigação do consumo de combustíveis fósseis, responsáveis por impactos ambientais negativos causados pela dispersão de seus poluentes atmosféricos, impulsionou a demanda por biocombustíveis nos últimos anos. Neste cenário, o biodiesel vem ganhando destaque, pois além de ser uma alternativa promissora em substituição aos derivados do petróleo, o mesmo pode ser produzido por diversas matérias-primas, como as microalgas. Esses microorganismos vêm sendo estudados para essa finalidade por possuírem um considerável teor lipídico, além de não necessitarem de grandes áreas para o seu cultivo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* com vinhaça diluída, verificando seu potencial de remediação de nutrientes e incremento de sua fração lipídica, para produzir um biodiesel segundo a regulamentação vigente. Dessa forma, estudaram-se diferentes diluições de vinhaça para o cultivo de *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, sendo 5, 10 e 15% (v v⁻¹) e N:P:K (20:5:20) 1% (v v⁻¹) como padrão de comparação. O cultivo ocorreu por 30 dias, com intensidade luminosa controlada, aeração constante e fotoperíodo 12/12h (claro/escuro). Após esta etapa, realizou-se a recuperação da biomassa seguindo uma série de operações unitárias (coagulação/floculação/decantação/filtração/secagem). A partir da biomassa seca foi realizada a extração lipídica avaliando o potencial de extração de diferentes solventes em conjunto com a agitação magnética ou ultrassom. O biodiesel foi produzido por transesterificação direta e analisado por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama, possibilitando a identificação e quantificação do perfil de ácidos graxos do mesmo. Os resultados obtidos indicaram que a vinhaça com diluição de 10% (v v⁻¹) mostrou-se a mais promissora para aplicação como meio de cultivo desta espécie de microalga, uma vez que a mesma garantiu uma boa taxa de crescimento celular, bem como uma elevada produtividade de biomassa e rendimento lipídico. Além disso, a *Chlorella sorokiniana* alcançou taxas de remoção de nutrientes superiores a 75% para amônia, nitrito, nitrato e fosfato, tornando-se uma alternativa ao tratamento da carga orgânica da vinhaça. Considerando o biodiesel produzido, o mesmo enquadra-se nos padrões de regulamentação analisados dispostos pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), demonstrando potencial de uso em determinadas regiões do Brasil, como no Mato Grosso do Sul. Diante das circunstâncias aqui expressas, conclui-se que a *Chlorella sorokiniana* cultivada com vinhaça diluída é uma alternativa eficaz para a produção de biodiesel.

Palavras-chave: biocombustível; extração de lipídios; efluentes; remoção de nutrientes.

ABSTRACT

The growing search for mitigating the consumption of fossil fuels responsible for negative environment impacts caused by the dispersion of their atmospheric pollutants, increased the demand for biofuels in recent years. In this scenario, biodiesel has been gaining prominence, as in addition to being a promising alternative to replace petroleum derivatives, it can be produced from various raw materials, such as microalgae. These microorganisms have been studied for this purpose because they have a considerable lipid content, also they do not require large areas for cultivation. Therefore, the purpose of this work was to carry out the cultivation of the microalgae *Chlorella sorokiniana* with diluted vinasse, verifying its potential for nutrient remediation and increase of its lipid fraction, to produce a quality biodiesel according to current regulations. Thus, different dilutions of vinasse were studied for the cultivation of *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, being 5, 10 and 15% (v v⁻¹) and N: P: K (20: 5: 20) 1% (v v⁻¹) as a standard for comparison. Cultivation took place for 30 days, with controlled light intensity, constant airflow and 12/12h photoperiod (light/dark). After this step, biomass recovery was carried out following a series of unit operations (coagulation/flocculation/decantation/filtration/drying). From dry biomass, lipid extraction was performed, evaluating the potential of extraction of different solvents together with magnetic stirring or ultrasound. Biodiesel was produced by direct transesterification and analyzed through gas chromatography coupled with a flame ionization detector, enabling the identification and quantification of its fatty acid profile. The results obtained indicated that vinasse with a 10% dilution (v v⁻¹) proved to be the most promising for application as a culture medium for this microalgae species, as it guaranteed a good cell growth rate, as well as a significant biomass productivity and lipid yield. In addition, *Chlorella sorokiniana* achieved nutrient removal rates above 75% for ammonia, nitrite, nitrate and phosphate, making it an alternative for treating the organic load of vinasse. Considering the biodiesel produced, it fits the regulatory standards of the National Agency for Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP), demonstrating potential use in certain regions of Brazil, such as Mato Grosso do Sul. , it is concluded that *Chlorella sorokiniana* cultivated with diluted vinasse is an effective alternative for the production of biodiesel.

Keywords: biofuel; stillage; removal of nutrients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostras em operação de recuperação da biomassa do cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> com vinhaça 10% (v v ⁻¹) ou N: P: K (20: 5: 20).	31
Figura 2 – Incremento da biomassa seca ao longo do período de cultivo.....	35
Figura 3 - Curvas de crescimento das culturas de <i>Chlorella sorokiniana</i> com N: P: K (20: 5: 20) e Vinhaça 5, 10 e 15% (v v ⁻¹).....	36
Figura 4 – Correlação entre a biomassa microalgal seca e a absorbância a 680 nm para os diferentes tratamentos com vinhaça (v v ⁻¹) e N: P: K (20: 5: 20).....	37
Figura 5 – Composição bioquímica da <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada com vinhaça 10% (v v ⁻¹) e N: P: K (20: 5: 20) 1% (v v ⁻¹).....	39
Figura 6 – Mecanismos de remoção de amônia durante o crescimento de microalgas.....	42
Figura 7 – Rendimentos obtidos nos diferentes modelos de extração lipídica.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos de cultivos de microalgas e suas características.	17
Tabela 2 - Comparação entre os métodos de rompimento da parede celular microalgal.	23
Tabela 3 - Componentes extraídos por cada solvente orgânico.	24
Tabela 4 - Propriedades de biodieseis de diferentes microalgas e soja ...	27
Tabela 5 - Composição das amostras do cultivo com <i>Chlorella sorokiniana</i>	29
Tabela 6 - Crescimento e produtividade da <i>Chlorella sorokiniana</i> nas condições estudadas.	37
Tabela 7 - Produtividade de biomassa de <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes meios de cultivo.	39
Tabela 8 - Concentração inicial e final de nutrientes e taxa de remoção.	417
Tabela 9 - Comparação aos valores dos compostos após cultivo com vinhaça diluída com os padrões regulamentadores vigentes.	43
Tabela 10 - Identificação e quantificação dos ácidos graxos do biodiesel.	46
Tabela 11 - Propriedades do biodiesel de microalgas e óleo de soja.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Microalgas	14
3.2	Métodos de cultivo.....	15
3.3	Modelos de cultivo.....	16
3.4	Condições nutricionais no cultivo de microalgas	17
3.5	Cultivo de microalgas em efluentes.....	19
3.5.1	Vinhaça.....	20
3.6	Recuperação da biomassa	21
3.7	Teor lipídico de microalgas	22
3.8	Biodiesel de microalgas	24
3.9	Propriedades do biodiesel de microalgas.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Tratamento da microalga	29
4.2	Crescimento celular, composição da biomassa e remoção de nutrientes.....	29
4.3	Recuperação da biomassa	30
4.4	Extração de lipídios	31
4.5	Produção de biodiesel e análise do perfil de ácidos graxos	32
4.6	Predição das propriedades do biodiesel produzido.....	32
4.7	Análise estatística	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Crescimento celular e composição da biomassa.....	35
5.2	Remoção de nutrientes durante o cultivo.....	40
5.3	Influência do solvente na extração lipídica.....	44
5.4	Perfil e composição de ácidos graxos	46
5.5	Propriedades do biodiesel produzido	47
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

O aumento da concentração dos poluentes dispersos na atmosfera e a diminuição da disponibilidade dos combustíveis fósseis reforçam a necessidade da busca por combustíveis menos poluentes e oriundos de fontes renováveis. O biodiesel, nesta perspectiva, surge como alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, por poder ser produzido a partir de diversas matérias-primas renováveis, e pela menor emissão de poluentes quando considerado o seu ciclo de produção e consumo (HYPPOLITO et al., 2021).

Segundo Mahlia et al. (2020), o biodiesel é um éster proveniente da associação de um óleo extraído de vegetais, oleaginosas ou resíduos gordurosos, com um álcool, tornando-se um produto de uma reação de transesterificação. Nesse contexto, há inúmeras fontes de matéria-prima que podem ser destinadas a fabricação desse biocombustível, demonstrando, desta forma, ser um combustível renovável em potencial no território nacional.

Estudos realizados identificam as microalgas como uma excelente alternativa para produção de biodiesel (NASSEF et al., 2019; WANG et al., 2019). Dentre as principais características das microalgas, Chisti (2007) ressalta o seu considerável teor lipídico, a capacidade de duplicação da biomassa em curto intervalo de tempo e o menor espaço ocupado para seu cultivo em relação às demais oleaginosas destinadas a este fim.

Para o cultivo destes organismos em laboratório é necessário a utilização de fontes de nutrientes adequadas. Nos dias atuais, fontes alternativas vêm sendo testadas em substituições as fontes de nutrientes convencionais, como é o caso da vinhaça. A vinhaça é um efluente industrial conhecido por suas consideráveis concentrações de macro e micronutrientes, sendo esses essenciais para o desenvolvimento de espécies vegetais, como as microalgas (CANDIDO; BERNARDO; LOMBARDI, 2021).

Concluída a etapa de cultivo de microalgas, deve-se realizar a extração lipídica e a produção do biodiesel. Em seu estudo, Dantas e colaboradores (2010), constataram que o metanol apresentou-se como um dos melhores solventes para extração de componentes de microalgas em associação a ondas ultrassônicas. Contudo, Silva (2013) classificou o etanol como o melhor solvente para extração de óleo de microalgas, também afirmando que ao reduzir o volume do etanol pela metade, o seu potencial de extração não é alterado, o que o torna econômica e ambientalmente viável.

Após a extração dos lipídios microalgais, é realizado o processo reacional de transesterificação do óleo obtido. Segundo Mofijur et al. (2021), a transesterificação é a reação de um triacilglicerídeo com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, resultando em ésteres de ácidos graxos e glicerol. Na literatura, grande parte dos trabalhos

utilizam catalisadores básicos na reação, tais como hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH), onde há maiores níveis de rendimento.

Perante o exposto, este trabalho utilizou a vinhaça como meio de cultivo de microalgas destinadas a obtenção de óleo para a produção de biodiesel. Com esta finalidade foram estudadas as taxas de remoção de nutrientes da vinhaça durante o cultivo, bem como os melhores solventes para a extração do óleo da biomassa microalgal, visando bons rendimentos e um processo ambientalmente adequado e limpo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de produção de biodiesel a partir de microalgas cultivadas com vinhaça.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade da vinhaça como fonte de nutrientes para o cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana*;
- Verificar o percentual de remoção de nutrientes da vinhaça durante o período de cultivo;
- Avaliar a produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{Dia}^{-1}$) e o rendimento (g L^{-1}) de biomassa utilizando métodos de recuperação da biomassa;
- Identificar e quantificar o perfil de ácidos graxos do biodiesel produzido por *Chlorella sorokiniana* cultivada com vinhaça 10% (v v⁻¹);
- Analisar a influência do perfil de ácidos graxos nas propriedades do biodiesel produzido;
- Estimar e comparar a qualidade do biodiesel produzido segundo as normas regulamentadoras vigentes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microalgas

De acordo com Tang et al. (2020), as microalgas englobam microrganismos eucariontes e procariontes fotossintetizantes, compostos em sua maioria fitoplanctônica. As mesmas se desenvolvem principalmente em meio aquático e possuem inúmeras características, formas e funções ecológicas (GANESAN et al., 2020). Tang et al. (2020), descrevem em seu trabalho que as microalgas são microrganismos unicelulares, que podem se agrupar em formas coloniais e filamentosas. Além disso, possuem elevada tolerância a variações de pH, turbidez, temperatura e concentração de O₂ e CO₂.

Segundo Levasseur, Perré e Pozzobon (2020), as algas e microalgas compõem a base da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos. Ademais, os microrganismos em questão são responsáveis por cerca de 50 a 60% da produção de oxigênio no mundo. As microalgas são englobadas em classes distintas, as três classes mais abundantes são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas douradas (*Chrysophyceae*) e as algas verdes (*Chlorophyceae*) (XU et al., 2020).

Chiesa (2019) descreve em seu trabalho que algumas espécies de microalgas possuem a capacidade de alterar suas condições metabólicas em função das mudanças ambientais. De Alva et al. (2018) relatam que as condições de cultivo variam em função da espécie, variando suas especificidades físicas, químicas e biológicas. Nesse sentido, ao iniciar um cultivo deve-se buscar as condições ótimas para a espécie trabalhada, buscando um crescimento celular bem sucedido.

A biomassa microalgal vem sendo utilizada em aplicações comerciais diversas, como a produção de vitaminas, enzimas, carotenoides, clorofila, ésteres, entre outros (CHIESA, 2019). Atualmente, sua principal finalidade é a utilização da biomassa na produção de biocombustíveis (UDAIYAPPAN et al., 2017).

Em meio às alternativas de matéria prima para produção de biocombustíveis, as microalgas enquadram-se como um insumo tecnicamente viável, tornando-se alvo do setor energético (CHIESA, 2019). Dentre os biocombustíveis que podem ser produzidos a partir do substrato microalgal, ressaltam-se o biodiesel, bioetanol, e biohidrogênio (UDAIYAPPAN et al., 2017).

Além da utilização das microalgas na produção de biocombustíveis, Mustafa et al. (2021), salientam que as mesmas podem ser aplicadas em processos de biorremediação e biofertilização. Essas aplicações distintas são garantidas em função do seu elevado teor de

lipídios e carboidratos, bem como sua capacidade de adaptação a diferentes condições de cultivo e efetiva fixação de CO₂.

Nesta perspectiva, nota-se que as microalgas demonstram maiores vantagens sobre as culturas tradicionais, ressaltando-se o cultivo em locais impróprios para a agricultura, maior taxa de crescimento em função do tempo de cultivo, condições nutricionais menos exigentes, meios de cultivos de baixo custo, possibilidade de cultivo acoplado a tratamento de águas residuárias, entre outras (BARSANTI; GUALTIERI, 2018; BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017).

3.2 Métodos de cultivo

A determinação do sistema de cultivo é extremamente importante, uma vez que o método possui grande influência nos custos operacionais (ZHUANG et al., 2018). Segundo Tan et al. (2018), o sistema de cultivo adotado deve prezar pelo crescimento celular em conjunto com o alcance de características que garantem um desenvolvimento eficiente, como a distribuição de luz, minimização dos custos, redução dos riscos de contaminação, entre outros. Os métodos de cultivo de microalgas dividem-se em sistemas abertos ou fechados.

Os sistemas abertos, de forma geral, apresentam menores custos e baixa necessidade energética, porém possuem maiores riscos de contaminação e menor controle das condições operacionais. Dentre os sistemas abertos, existem os sistemas naturais, como lagos e lagoas, e os sistemas artificiais, denominados como *raceway* (TAN et al., 2020).

Os sistemas abertos para cultivo de microalgas possibilitam menores exigências operacionais, possuindo maior simplicidade para sua utilização (GONZÁLEZ-CAMEJO, 2021). A estrutura desses tanques varia de acordo com as necessidades, podendo ser escavados e revestidos com impermeabilizantes ou modelos em alvenaria (MAGRO et al., 2021).

Existem algumas adversidades enfrentadas em sistemas abertos, como risco de contaminação, evaporação, baixa produtividade, ambiente não controlado, demanda elevada de área para instalação e adequação limitada de espécies (MAGRO et al., 2021). As espécies disponíveis para esse método são limitadas por consequência das condições ambientais extremas, como alta salinidade e alcalinidade do meio. Em função dessas limitações, houve um aumento na utilização de fotobiorreatores fechados, buscando suprir os problemas dos cultivos abertos (HUANG et al., 2017).

Os fotobiorreatores são classificados em dois modelos principais, sendo os tubulares e em placas (MAGRO et al., 2021). Em função da estrutura desse modelo, os mesmos garantem

melhores resultados em relação a densidade celular, sucesso alcançado devido uma melhor efetividade no controle das condições ambientais do meio (HUANG et al., 2017).

Segundo Yen et al. (2019), há diversas maneiras de se construir os fotobiorreatores, podendo ser de vidro ou plástico, em forma horizontal, vertical, cônica ou inclinado. Ao relacionar este modelo com os sistemas abertos, os fotobiorreatores garantem uma maior concentração celular devido a distribuição de luz mais eficiente e menores riscos de contaminação. As principais adversidades enfrentadas pelos sistemas fechados são o controle de oxigênio dissolvido e CO₂ ao longo do sistema, e gradientes de pH.

3.3 Modelos de cultivo

O perfil de crescimento celular bem como as características bioquímicas das microalgas são diretamente influenciados pelo tipo de cultivo adotado, o qual pode variar entre fototrófico, heterotrófico e mixotrófico (TAN et al., 2020).

De acordo com Masojídek et al. (2021), em cultivos fototróficos a microalga supre sua necessidade a partir da energia química do processo de fotossíntese. Para isso, a mesma utiliza radiação ultravioleta, como a luz solar, e carbono inorgânico como fonte de carbono, como o CO₂.

O cultivo fototrófico é o mais comum no crescimento de microalgas (MASOJÍDEK et al., 2021). Na literatura, cultivos do tipo fototrófico proporcionaram teores lipídicos de 5 a 60% da biomassa seca, variando de acordo com a espécie cultivada (MATA et al., 2010). Além de resultados promissores em características de interesse econômico, este modelo de cultivo também recebe destaque pelo seu cunho ambiental, dado que o CO₂ atmosférico passa a ser utilizado no desenvolvimento da biomassa microalgal para posterior produção de biocombustíveis (PATEL et al., 2020).

Apesar de ser um modelo de cultivo viável ambiental e economicamente, o mesmo pode apresentar algumas adversidades, como insuficiência na intensidade luminosa e na concentração de CO₂ no meio. Tal situação impacta negativamente na produtividade do cultivo e, conseqüentemente, na concentração de biomassa seca (MASOJÍDEK et al., 2021).

No cultivo heterotrófico, ao contrário do fototrófico, as microalgas utilizam o carbono orgânico como fonte de carbono e, também, como fonte de energia química, evitando os problemas inerentes à limitação da intensidade luminosa (HU et al., 2018). Chen e Jiang (2017), relatam que além de sanar os problemas oriundos da baixa iluminação, o tipo de cultivo em questão vem apresentando resultados positivos na concentração de biomassa, destacando-se frente ao modelo fototrófico. No trabalho de Xu et al. (2006), ao alterar o

cultivo fototrófico para heterotrófico, os pesquisadores alcançaram um aumento de 40% no percentual lipídico de *Chlorella protothecoides*, demonstrando a eficácia deste modelo.

Ao avaliar os pontos negativos de cultivos heterotróficos, vale ressaltar que devido a necessidade de adição de uma fonte de carbono orgânico, os custos de projeto podem aumentar, podendo inviabilizar a produção de biomassa e suas aplicações distintas (AZIZ et al., 2020). Todavia, é possível observar na literatura soluções alternativas para essas fontes de carbono, como as fontes residuais (ALI et al., 2021).

Algumas espécies podem crescer em concomitância aos dois modelos de cultivos citados anteriormente (fototrófico e heterotrófico). Nesse cenário, a microalga utiliza compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de carbono, em conjunto com o processo de fotossíntese como fonte de energia química. Este cultivo descrito é denominado como mixotrófico (PATEL et al., 2019; ZHAN; RONG; WANG, 2017). Na Tabela 1 estão sintetizadas as principais características dos diversos modelos de cultivo de microalgas.

Tabela 1 - Modelos de cultivos de microalgas e suas características.

Características	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
Fonte de carbono	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica
Fonte de energia	Luz	Orgânica	Luz e orgânica
Tipo de reator	Aberto ou biorreator	Fermentador	Fotobiorreator fechado
Principais desvantagens	Risco de contaminação Baixa densidade	Risco de contaminação Alto custo de substrato	Risco de contaminação Alto custo de substrato e equipamento

Fonte: Hakalin et al. (2014).

3.4 Condições nutricionais no cultivo de microalgas

O crescimento e a composição celular de microalgas são diretamente influenciados pelo meio de cultivo ao qual estão submetidas, nesse sentido, para que ocorra uma multiplicação celular eficiente é essencial que o meio ofereça concentrações de macro e micronutrientes necessárias ao metabolismo microalgal (DANESHVAR et al., 2018).

Pode-se afirmar que cultivos com um crescimento celular limitado é consequência de uma diminuição no processo fotossintético e, por conseguinte, na sua síntese proteica,

resultando, desta forma, no retardo da multiplicação celular (IASIMONE et al., 2018). Por outro lado, as restrições nutricionais podem possibilitar uma elevação da concentração de ácidos graxos, pois a energia química utilizada na divisão celular é transferida para o acúmulo de carboidratos e síntese de lipídios. Considerando a divisão celular, existem elementos essenciais que requerem maior atenção ao serem acrescentados ao meio de cultivo, pois as espécies e biomoléculas de interesse necessitam de faixas de concentração específicas para cada elemento (HANIFZADEH; GARCIA; VIAMAJALA, 2018).

Os nutrientes atuam em diferentes áreas da célula, como na formação da membrana plasmática, na estrutura das biomoléculas, nos processos energéticos e na regulação do metabolismo. A ausência ou baixa disponibilidade dos mesmos pode resultar em impactos negativos nas funções essenciais desses organismos (DARVEHEI; BAHRI; MOHEIMANI, 2018).

Segundo Chiesa (2019), na composição da biomassa microalgal há pelo menos 20 elementos químicos, alguns sendo encontrados em maiores concentrações, como N, P, K, H, O, S, Na, Ca e Mg, os demais estão presentes em menores concentrações, como Si, Fe, Mn, Mo, Cu, Co, Zn, B e V. Fontoura (2017), afirma que os nutrientes essenciais para possibilitar as condições limitantes de desenvolvimento celular são o C, N, P e alguns micronutrientes.

O carbono é o constituinte básico para a realização da síntese de todas as substâncias orgânicas da célula, como lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e vitaminas (CHAI et al., 2020). No cultivo, a única fonte de carbono disponível é o CO₂ oriundo da atmosfera ou de gases de combustão (CHIESA, 2019).

O nitrogênio é um nutriente fundamental ao considerar o metabolismo microalgal, o mesmo é o componente básico para a formação de proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, estando presente, de forma inorgânica, no interior das células algáceas e em diversas moléculas do metabolismo primário (CHIESA, 2019). Tal nutriente apresenta-se na forma da amônia (NH₃) e dos íons nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻) e amônio (NH₄⁺) (AN et al., 2020).

A disponibilidade de nitrogênio no meio influencia diretamente na síntese de lipídios de algas, a sua deficiência resulta em um decréscimo na concentração de proteínas e acréscimo no teor de lipídios (COSTA et al., 2018). Piorreck et al. (1984), observaram em seus estudos que baixas concentrações de nitrogênio proporcionaram grandes teores lipídicos, alcançando uma faixa entre 44 a 66% da biomassa seca em algas verdes. Além disso, houve uma tendência na síntese de lipídios, predominando os lipídios neutros e com baixo grau de insaturação. Em cultivos de *Chlorella* realizados no trabalho de Round (1973), a insuficiência

de nitrogênio causou o cessamento da divisão celular, todavia o percentual lipídico aumentou de 28 para 70%.

Além do nitrogênio, o fósforo é um importante nutriente no metabolismo e processos celulares de microalgas, como a síntese de ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, transferência de energia e moléculas intermediárias do metabolismo de carboidratos (KHANZADA, 2020). No metabolismo de microalgas, o fósforo, na maioria das vezes, encontra-se nas formas de dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) e hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), sendo assimilados em compostos por meio da fosforilação oxidativa, transformando a adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), moléculas responsáveis pela energia celular (SU, 2020).

A biomassa de microalgas contém cerca de 1% de fósforo, todavia este nutriente é um fator limitante no crescimento celular, tornando-se indispensável em seu cultivo (YAAKOB et al., 2021). A temperatura e a intensidade luminosa, segundo Powell et al. (2008), são fatores que regulam a capacidade de armazenamento de fósforo nas células de microalgas, além disso, os autores ainda demonstraram que a concentração de fósforo na biomassa seca de uma cultura de algas cultivadas em água residuária de laboratório encontrou-se na faixa de 0,41 a 3,16%, dependendo das condições submetidas no cultivo. No mesmo trabalho, Powell et al. (2008) identificaram que houve um acúmulo no teor de fósforo na forma de polifosfato após um incremento na temperatura de cultivo.

No cultivo de microalgas visando à obtenção de bons rendimentos de biomassa seca, se faz necessário o emprego de um meio de cultivo que forneça energia e compostos orgânicos essenciais ao desenvolvimento celular (TANGO, 2015). Segundo Khan, Shin e Kim (2018), os meios de cultivos aplicados na produção de microalgas são classificados em sintético, água com suplementação mineral e efluente em geral.

3.5 Cultivo de microalgas em efluentes

Os efluentes industriais, agrícolas e sanitários possuem elevadas concentrações de nutrientes até mesmo após os processos de tratamento a nível secundário. Os mesmos quando lançados em corpos receptores podem resultar em diversos impactos ambientais negativos, como a eutrofização do corpo hídrico, alterando a qualidade da água (SALGOT; FOLCH; 2018).

Os principais nutrientes presentes nos efluentes secundários e responsáveis pelos impactos ambientais em questão são o fósforo, nitrogênio e potássio (LI et al., 2019). Diante disso, a fim de sanar esses problemas removendo tais compostos, há alternativas de tratamento a nível terciário, como a cloração (ODJADJARE et al., 2018), osmose reversa

(AROLA et al., 2019), coagulação e floculação (OLIVEIRA et al., 2018), oxidação (MASROOR; MEHRVAR; EINMOZAFFARI, 2009), entre outros.

O tratamento a nível terciário garante uma considerável efetividade na remoção dos nutrientes descritos, porém o mesmo demanda um maior custo operacional, tornando-se, na maioria das vezes, não praticado. Além disso, deve-se prioritariamente buscar alternativas mais práticas, visando conformidade técnica, operacional e ambiental (TANGO, 2015).

Nesta perspectiva, o emprego de microalgas no tratamento de efluentes demonstra-se uma opção promissora, pois tais microrganismos utilizam os compostos nitrogenados e o fósforo para o seu desenvolvimento celular (PIRES et al., 2013). Ademais, as microalgas também possuem a capacidade de remover produtos químicos e orgânicos do meio, como os metais pesados, garantindo características extremamente positivas para esta finalidade (NOIE; LALIBERT; PROULX, 1992).

O cultivo de microalgas em efluentes diminui a demanda por água e por nutrientes sintéticos, e ganha destaque pela capacidade de transformar um passivo ambiental em um produto de interesse econômico (PIRES et al., 2013). Na literatura é possível observar diversos trabalhos que analisaram o cultivo de microalgas em efluentes industriais (BHATNAGAR et al., 2011; CHEIRSILP et al., 2011), agrícolas (HONGYANG et al., 2011; MARQUES et al., 2013) e sanitários (WANG et al., 2010; CHO et al., 2011; ARBIB et al., 2013; SHI et al., 2014), alcançando alta concentração celular microalgal, redução de custos e incremento do teor de lipídios.

Pires e colaboradores (2013) demonstram que a efetividade de remoção de nutrientes em efluentes a partir de microalgas segue os seguintes fatores: tipo e condições de cultivo, concentração inicial de microalgas, fonte de nutrientes, relação N/P, espécies predominantes e as características do efluente. As condições citadas são influenciadas e determinadas em função do efluente utilizado, e a sua produtividade está ligada ao tipo de espécie empregada ao cultivo (PITTMAN et al., 2011). Diante do exposto, vale salientar que a produção de bioenergia a partir de microalgas cultivadas em efluentes vem ganhando um avanço na atualidade.

3.5.1 Vinhaça

A vinhaça é um efluente oriundo da destilação de uma solução alcoólica chamada mosto fermentado (PENTEADO et al., 2017). O Brasil possui destaque ao considerar o volume da produção de cana-de-açúcar, aumentando sua produção a cada ano (AGRIANUAL, 2020). Medina et al. (2020) salientam que é gerado cerca de 10 a 12 litros de

vinhaça para cada litro de etanol produzido, tornando necessária uma destinação adequada para este efluente.

As características desse subproduto variam em função de diversos fatores, como a matéria prima, solo, clima e processo empregado na indústria para a produção do etanol. A composição básica da vinhaça é de 93% líquido e 7% sólidos em suspensão, contendo elevadas concentrações de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio e enxofre (MORAES CHITOLINA; HARDER, 2021).

A vinhaça é um efluente com elevada turbidez e com coloração parda, a turbidez da mesma aumenta conforme ocorre a sua oxidação pela exposição ao ar (POVEDA, 2014). A sua temperatura encontra-se na faixa de 85 a 90°C após o processo de destilação (ROSSETO, 1987). Seus índices de pH variam em torno de 3,5 a 5,0, essa condição é resultado da utilização de ácido sulfúrico na etapa de fermentação (ANA, 2009). Além das características citadas, de acordo com Poveda (2014), a vinhaça possui alta carga orgânica, refletindo em uma elevada Demanda Biológica de Oxigênio (DBO).

Diante do alto volume produzido a nível nacional, a vinhaça é empregada na fertirrigação, sendo aplicada em culturas canavieiras como forma de destinação técnica, econômica e ambientalmente viável, uma vez que a mesma é rica em macro e micronutrientes, proporcionando um possível aumento na produtividade de cana de açúcar (SOTO; BASSO; KIANG, 2017). Além da sua utilização na fertirrigação, na literatura é possível observar trabalhos que apresentam seu potencial de aplicação na produção de Biogás (SALOMON; LORA, 2009), biohidrogênio (FERNANDES et al., 2010), compostagem (BUSTAMANTE et al., 2008) e, segundo Andrade e Costa (2008), no cultivo de microalgas.

No trabalho de Okuba e colaboradores (1967a; 1967b), houve um considerável aumento na biomassa de *Chorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* cultivadas com vinhaça, além disso, houve redução de 90% da matéria orgânica dissolvida e decréscimo dos índices de DBO. Oliveira (1986; 1988), avaliou o cultivo de diversas espécies de microalgas em vinhaça, obtendo bons resultados em sua maioria, destacando-se as culturas de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*. Diante disso, vale salientar que seu uso no cultivo de microalgas em substituição ao adubo químico demonstra ser promissor.

3.6 Recuperação da biomassa

Após a etapa de cultivo, torna-se necessário promover a separação da biomassa do meio, para esta finalidade é aplicada uma série de operações unitárias, como a floculação, sedimentação, centrifugação e filtração (MENEGAZZO et al., 2019). Na literatura é comum observar o emprego de diferentes métodos, bem como a combinação de etapas, alguns dos

mais utilizados são: floculação-sedimentação, floculação-flotação, floculação-filtração, floculação-sedimentação-filtração, biofloculação-flotação, entre outros (GRIMA et al., 2013; CHEN et al., 2011; PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013; UDUMAN et al., 2010; BRENNAN; OWENDE, 2010).

Segundo Rawat et al. (2011), a escolha pelo método de recuperação é determinada em função das características da espécie de microalga cultivada, como tamanho das células, densidade celular e qualidade esperada para o produto. Além das características descritas, um fator de considerável relevância é a umidade da biomassa, uma vez que a mesma influencia na viabilidade econômica desta etapa (MOHN, 1978).

3.7 Teor lipídico de microalgas

A biomassa de microalgas pode ser composta por até 75% de teor lipídico (FERREIRA et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2013; TALEBI et al., 2013). Os lipídios são responsáveis por diversas funcionalidades celulares e podem ser classificados como polares, apolares, neutros e de reserva (VEILLETI et al., 2018). Considerando o grupo dos lipídios polares, o mesmo é composto pelos fosfolipídios e glicolipídios. Os lipídios apolares e neutros são integrados por moléculas que não possuem grupos carregados, sendo os triacilgliceróis (TAG), glicerídeos, esteróis e carotenoides (TANG et al., 2020).

Em microalgas, os lipídios são comumente compostos por glicerol ou ácidos graxos, os ácidos graxos contém entre 10 a 24 carbonos, classificados como cadeia média (C10-C14), cadeia longa (C16-C18) e cadeia muito longa (C20). Os mesmos ainda são classificados em função do grau de insaturação, na qual os ácidos graxos com ausência de insaturação são denominados saturados (SFA), os que apresentam somente uma ligação insaturada denominam-se como monoinsaturados (MUFA) e os que possuem duas ou mais ligações insaturadas são os poli-insaturados (PUFA) (DESHMUKH; KUMAR; BALA, 2019).

Existem interações distintas em lipídios, sendo as pontes de hidrogênio e forças eletrostáticas em lipídios polares, e forças de Van Der Waals em lipídios apolares e neutros (NIEUWENHUYZEN, 2015; PETKOV; GARCIA, 2007). Na realização da extração lipídica, essas interações devem ser rompidas para o alcance da efetividade, dessa forma, em sua maioria utiliza-se solventes orgânicos polares, como o metanol e etanol, para quebrar as pontes de hidrogênio em lipídios polares, e solventes orgânicos apolares, como o hexano, para romper interações hidrofóbicas em lipídios apolares e neutros (CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016; LI et al., 2014).

A extração lipídica em microalgas diferencia-se de outras matérias-primas, como alguns vegetais e alimentos, por conta da sua parede celular rígida e diversidade de lipídios

(WU et al., 2017). Diante disso, torna-se necessário a aplicação de métodos específicos capazes de romper a estrutura da parede celular e liberar os lipídios (BREUER; EVERS, 2013), tornando-se uma espécie de pré-requisito para uma extração eficiente.

Há duas classes de métodos para rompimento da parede celular, sendo os mecânicos e não mecânicos (ALHATTAB; KERMANSHAHI-POUR; BROOKS, 2019). A classe de métodos mecânicos é composta pela prensagem, micro-ondas, ultrassom, homogeneização em alta pressão e moinho de bolas, e o grupo dos métodos não mecânicos engloba a quebra química, enzimática e o choque osmótico (D’ALESSANDRO et al., 2016; MUBARAK et al., 2015;). Os diferentes métodos citados estão apresentados na Tabela 2, visando uma comparação quanto aos custos operacionais, efeitos na extração lipídica e vantagens x desvantagens.

Tabela 2 - Comparação entre os métodos de rompimento da parede celular microalgal.

Métodos	Custos Operacionais	Elevação de Rendimento
Prensagem	Baixo a mediano	Baixo
Micro-ondas	Mediano a elevado	Baixo
Ultrassom	Mediano a elevado	Baixo
Homogeneização em alta pressão	Mediano a elevado	Baixo
Moinho de bolas	Baixo a mediano	Baixo
Quebra química	Mediano a elevado	Mediano a elevado
Quebra enzimática	Elevado	Mediano a elevado
Choque osmótico	Elevado	Baixo a mediano

Fonte: Adaptado de Brennan e Owende (2010), Kim et al., (2013) e Mubarak et al., (2015).

Diante do exposto, a pesquisa por métodos que demandam menor energia e alcançam alta eficiência no rompimento da parede celular de microalgas e, dessa forma, que proporcionam um maior rendimento da extração lipídica, deve ser direcionado pelo propósito das biomoléculas e das características de cada espécie, sendo necessário, em alguns casos, a combinação de diferentes métodos (FONTOURA, 2017).

O processo de extração lipídica de microalgas é tido como uma etapa de considerável importância na produção de biodiesel (GALADIMA; MURAZA, 2014). A extração é influenciada pelas condições de cultivo e pela recuperação da biomassa microalgal, desta forma, a eficiência dessas etapas garantem uma redução de custos na extração, bem como um incremento no teor de lipídios extraídos (FONTOURA, 2017).

O método a ser utilizado na extração lipídica deve visar à redução da degradação dos lipídios extraídos, nesse sentido, segundo Fontoura (2017), o método deve apresentar um curto período de tempo e ser termolábil. Dentre as tecnologias para esta finalidade, uma das principais é a partir do uso de solventes orgânicos, técnica amplamente utilizada em escala laboratorial (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

Em processos de extração por solventes, a fração de óleo é extraída por repetidas lavagens com solventes orgânicos, a qual pode ser realizada de maneira isolada ou em conjunto com outros métodos, visando o melhor rendimento de óleo (FONTOURA, 2017). Há algumas características que devem ser avaliadas na escolha do solvente a ser utilizado, tais como: baixa toxicidade, imiscibilidade em água e seletividade ao separar o óleo de materiais indesejáveis (D'OCA et al., 2011; KING et al., 2002).

Os solventes orgânicos podem extrair classes lipídicas distintas, em função de sua polaridade (D'OCA et al., 2011). Os solventes polares mais utilizados são metanol, etanol, acetona e acetato de etila, e os solventes apolares são hexano, clorofórmio, benzeno, tolueno e éter dietílico. Na Tabela 3 está apresentado o solvente orgânico e os componentes que ele é capaz de extrair.

Tabela 3 - Componentes extraídos por cada solvente orgânico.

Solvente	Componente extraído
Metanol	Fosfolipídios e glicolipídios
Etanol	Fosfolipídios e glicolipídios
Hexano	Hidrocarbonetos e triacilglicerídeos
Clorofórmio	Hidrocarbonetos, carotenoides, clorofila, esteróis, triacilglicerídeos e aldeídos

Fonte: D'OCA et al. (2011).

Os lipídios de microalgas são, em sua maioria, lipídios apolares, todavia encontram-se também lipídios polares no citoplasma microalgal, tornando promissor o uso de misturas de solventes visando à extração de todas as classes lipídicas. Bligh e Dyer (1959) desenvolveram um método que é amplamente aplicado na extração e quantificação de lipídios totais, o mesmo utiliza uma mistura de clorofórmio:metanol 2:1 (v v⁻¹) e é capaz de extrair todas as classes lipídicas, tornando-se um dos métodos mais otimistas para esta finalidade.

3.8 Biodiesel de microalgas

O biodiesel é um biocombustível que surge como alternativa a utilização do diesel, podendo ser produzido a partir de diferentes matrizes, como gordura animal, óleo de fritura, óleo vegetal, entre outras fontes de lipídios, dessa forma, esse conteúdo é submetido a uma

reação orgânica de transesterificação com um álcool (metanol ou etanol), resultando em Ésteres Metílicos ou Etílicos de Ácidos Graxos (FAME ou FAEE) (GEBREMARIAM; MARCHETTI, 2018).

No Brasil, a maior parcela do biodiesel é produzida a partir da soja, seguida pelo óleo de fritura, entretanto, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) tem o objetivo de fundamentar a cadeia de produção na variedade de material graxo existente ao longo do território nacional (FRANCO et al., 2013). Há diversas opções passíveis de serem utilizadas, destacando-se entre essas, as microalgas (SINGH et al., 2020).

As potencialidades do uso de microalgas na produção de biodiesel são diversas, como alta taxa de crescimento e produtividade lipídica, baixo custo com fontes nutricionais, sendo passíveis de serem cultivadas com efluentes, e facilidade de cultivo, uma vez que não demandam grandes espaços territoriais para seu cultivo, sobressaindo-se, dessa forma, pela não disputa por terras agricultáveis (MENEGAZZO; FONSECA, 2019).

Há diversas metodologias destinadas à produção do biodiesel de microalgas, algumas das reações orgânicas responsáveis pela sua produção são a transesterificação, a esterificação, a esterificação seguida de transesterificação, a hidroesterificação ou ainda, da realização da extração do óleo e transesterificação em uma única etapa, conhecida como transesterificação *in situ* (MOFIJUR et al. 2021), sendo a transesterificação a mais utilizada atualmente.

Em óleos vegetais, a transesterificação é a reação de um triacilglicerídeo com um álcool na presença de uma base ou ácido forte, resultando em ésteres de ácidos graxos e glicerol. Na literatura, grande parte dos trabalhos utilizam catalisadores básicos, tais como hidróxido de potássio e sódio, visando maiores níveis de rendimento (HOYDONCKX, 2004). No trabalho de Knothe e colaboradores (2006), é discutido que a opção comumente utilizada para o processo é o hidróxido de potássio como catalisador da reação e o ácido fosfórico na etapa de neutralização (KNOTHE et al., 2006).

A fase de determinação do álcool a ser utilizado no processo de transesterificação deve ser cautelosa. Bondioli (2004) e Hoydonckx et al. (2004) utilizam, preferencialmente, o metanol. Embora a grande parcela da literatura utilize majoritariamente o metanol, Lima (2004) obteve bons resultados utilizando o etanol, demonstrando ser uma boa alternativa, sobretudo quando considerado o âmbito ambiental, uma vez que o etanol é um combustível renovável.

Considerando o perfil de ácidos graxos do biodiesel de microalgas, verifica-se em diversos estudos (SOARES et al., 2014; DOAN; SIVALOGANATHAN; OBBARD, 2011; NASCIMENTO et al., 2013; SYDNEY et al., 2011), cadeias carbônicas entre C14 e C24

predominantemente. Tal característica é determinante na configuração de inúmeras características do biodiesel (SYDNEY et al., 2011), apontando que possivelmente, cada espécie de microalga garante um biodiesel singular, resultante das influências de seu perfil de ácidos graxos.

3.9 Propriedades do biodiesel de microalgas

No mundo existem padrões e regulamentações que regem os parâmetros de qualidade do biodiesel, no Brasil é a ANP 45/2014, na Europa a EM 14214 e nos Estados Unidos a ASTM (American Society for Testing and Materials) D67513. Todas elas servem para garantir a padronização das características do biodiesel e a sua qualidade. O atendimento as regulamentações requer a realização de diversas análises, as quais demandam tempo, altos custos e, muitas vezes, grande volume de amostras (CHISTI, 2014).

O alto volume de amostras demandado para realização de análises detalhadas torna-se uma barreira em algumas matérias-primas emergentes, como é o caso das microalgas, uma vez que em estudos, acaba não sendo produzida grandes quantidades de biomassa seca e, conseqüentemente, baixos volumes de lipídios extraídos (CHISTI, 2014). Em contrapartida, a literatura dispõe de diversas pesquisas nas quais as propriedades do biodiesel são preditas a partir de características sobre o perfil e composição de ácidos graxos, principalmente para biodiesel produzido a partir de microalgas (MENEGAZZO et al., 2020; ISLAM et al., 2013a; KNOTHE, 2012; RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLOJACOB, 2012; TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014; ISLAM et al., 2013b). Nesta perspectiva, as propriedades são determinadas com o emprego de equações empíricas precisas e confiáveis (SALIM et al., 2011; RAMOS et al., 2009; RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLOJACOB, 2012; TALEBI; TABATABAEI; CHISTI, 2014).

Na Tabela 4 estão apresentadas algumas características de biodieseis produzidos a partir de diferentes espécies de microalgas e de soja. As propriedades determinadas pelo perfil e composição do ácido graxo são o índice de saponificação, número de cetano, grau de insaturação, índice de iodo, índice de saponificação, poder calorífico, ponto de nuvem, ponto de entupimento filtro a frio, viscosidade cinemática, densidade e estabilidade oxidativa.

Tabela 4 - Propriedades de biodieseis de diferentes microalgas e óleo de soja.

Propriedades	Padrão	Soja	<i>Scenedesmus dimorphos</i>	<i>Chlorella protothecoides</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
SFA (%)	-	15,00	18,10	22,79	52,15
MUFA (%)	-	24,70	17,40	19,23	37,51
PUFA (%)	-	60,30	64,50	36,19	10,33
GI	-	-	-	91,60	58,17
IS (mg L ⁻¹)	-	51,70	37,10	54,57	61,83
II (g I ₂ /100g)	-	-	195,70	163,37	199,37
NC	-	-	183,70	111,75	52,63
FCLS	-	-	3,80	4,93	1,57
PEFF (°C)	Até 9	-	-4,60	-0,99	-10,81
PN (°C)	-	0,00	-	3,51	-
PC (MJ Kg ⁻¹)	-	39,79	40,20	-	-
V (mm ² s ⁻¹)	3,00 – 6,00	4,10	3,60	-	-
D (g cm ⁻³)	0,85 – 0,90	0,81	0,90	-	-
Referência	ANP 45/2015	Ramírez- Verduzco; Rodríguez- Rodríguez; Jaramillojacob, 2012	Islam et al., 2013b	Talebi et al., 2013	Nascimento et al., 2013

SFA: ácidos graxos saturados, MUFA: ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: ácidos graxos poli-insaturados, GI: grau de insaturação, IS: índice de saponificação, II: índice de iodo, NC: número de cetano, FCLS: fator de cadeia longa saturada, PEFF: ponto de entupimento de filtro à frio, PN: ponto de nuvem, PC: poder calorífico, V: viscosidade cinemática, D: densidade.

De acordo com Knothe (2005) e Ramos et al. (2009), em cadeias carbônicas, quanto menor o grau de insaturação (GI) e maior o comprimento da cadeia, melhor será a qualidade do biodiesel. Concentrações elevadas de ácidos graxos saturados contribuem para uma viscosidade (V) em desconformidade com a regulamentação, sendo um parâmetro diretamente relacionado ao GI. O comprimento da cadeia do ácido graxo, bem como suas insaturações, influenciam fortemente nas características de fluxo a frio do combustível, como o ponto de nuvem (PN) e ponto de entupimento de filtro a frio (PEFF).

O índice de iodo (II) e de saponificação (IS) são afetados pela massa molecular e o percentual de cada ácido graxo (MUFA ou PUFA). Por conseguinte, o II e o IS influenciam

intimamente no número de cetano (NC) que diz respeito a capacidade de queima rápida do combustível após ser injetado. O II e o GI também impactam na estabilidade oxidativa do biodiesel (RAMOS et al., 2009; KNOTHE, G.; KRAHL, J.; GERPEN, 2010; RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLOJACOB, 2012). Por fim, o poder calorífico (PC) eleva-se em altas concentrações de ácidos graxos saturados de cadeia longa (ISLAM et al., 2013b).

Diante das circunstâncias aqui expressas, nota-se a importância que cada ácido graxo possui nas propriedades do biodiesel, impactando consideravelmente na determinação de todo o processo para uma produção bem sucedida do mesmo. Além disso, vale salientar ainda que além da espécie, deve-se avaliar cautelosamente as suas condições de cultivo, os métodos de recuperação da biomassa e, sobretudo, o método mais efetivo na conversão dos lipídios em biodiesel.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tratamento da microalga

A espécie de microalga utilizada para o cultivo foi a *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, a mesma estava isolada no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). A *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 foi cultivada por um período de 30 dias, em erlenmeyers com volume de 2 litros, utilizando vinhaça diluída como meio de cultivo, com concentrações equivalentes a 5, 10 e 15% (v v⁻¹). Como padrão de comparação, utilizou-se o adubo químico N:P:K (20:5:20) a uma concentração de 1% (v v⁻¹). Todos os tratamentos ocorreram em triplicata.

Os ensaios permaneceram em meio não axênico, com aeração constante proveniente de um soprador eletrônico modelo PS-950, marca Minjiang, com um fluxo de ar equivalente a 125 L h⁻¹ para cada amostra, temperatura média de 25,6°C e regime de fotoperíodo 12/12h claro/escuro com intensidade luminosa equivalente a 2400 lux.

Na Tabela 5 está apresentada detalhadamente a composição das amostras de cada ensaio. As diluições foram realizadas em relação ao volume de 1800 mL, desconsiderando o volume de 200 mL representado pelo inócuo da microalga.

Tabela 5 – Composição das amostras do cultivo com *Chlorella sorokiniana*.

Tratamento (v v ⁻¹)	Concentração (%)	Meio de cultivo (mL)	Água (mL)	Inócuo (mL)	Volume Total (mL)
	5	90	1710	200	2000
Vinhaça	10	180	1620	200	2000
	15	270	1530	200	2000
N:P:K (20:5:20)	1	18	1782	200	2000

4.2 Crescimento celular, composição da biomassa e remoção de nutrientes

A multiplicação celular das microalgas durante o cultivo foi determinada a partir da densidade ótica (DO) e biomassa microalgal seca. A absorvância foi analisada no comprimento de onda de 680 nm em intervalos de 5 dias até o término do cultivo, para isso foi utilizada um espectrofotômetro UV/Visível da marca Rayleigh, modelo UV-9200. Após todas as leituras, para identificar a fase exponencial de crescimento foi verificada a região linear sob a curva de ln(DO) versus tempo a partir do software Microsoft Office Excel 2016.

A determinação do crescimento máximo específico (μ_{\max}) foi realizada a partir da inclinação da reta e o tempo de duplicação (TD) foi determinado pela relação entre $\ln(2)/\mu_{\max}$.

Visando verificar se o aumento da absorvância do meio refletia o aumento da biomassa, avaliou-se concomitantemente o incremento da biomassa seca durante o cultivo, para isso, coletou-se amostras de cada replicata, dos diferentes tratamentos, a cada 5 dias. Dessa forma, 50 mL de cada amostra foram centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos, após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e a biomassa foi submetida ao processo de secagem em estufa a uma temperatura de 60 °C até massa constante. Após obtenção dos resultados, verificou-se a correlação linear entre a absorvância a 680 nm e a biomassa microalgal seca a partir do teste de Pearson.

Ao término do cultivo a composição celular foi analisada, desta forma, foram quantificados os teores de proteína, carboidratos e cinzas, segundo as metodologias da *Association of Official Analytical Chemists* (2005). Para determinação de proteínas foi utilizado o método de micro-Kjeldahl, com fator de correção de 6,25, cinzas pela queima em mufla a uma temperatura de 800°C e teor de carboidratos por meio da diferença da composição centesimal. O conteúdo lipídico foi determinado a partir do método de Bligh e Dyer (1959) adaptado por D'Oca et al. (2011).

A remoção de nutrientes da vinhaça durante o cultivo foi realizada por meio de análises físico-químicas determinando a concentração de amônia, nitrito, nitrato e fosfato, no início e no término do período de cultivo. A quantificação se deu a partir da Equação 1 apresentada a seguir.

$$E (\%) = \left(1 - \frac{X_2}{X_1}\right) * 100 \quad (1)$$

Onde:

E – taxa de remoção de nutriente (%);

X_2 – Concentração de nutrientes no início do cultivo;

X_1 – Concentração de nutrientes no término do cultivo.

4.3 Recuperação da biomassa

A recuperação da biomassa de *Chlorella sorokiniana* do meio de cultivo foi realizada a partir de um conjunto de operações unitárias composto por coagulação/floculação, decantação, filtração e secagem. Considerando a coagulação/floculação, foi utilizado o cloreto férrico hexahidratado com concentração de 0,75 g L⁻¹ como agente flocculante (MENEGAZZO; GELINSKI; FONSECA, 2021), após a adição do mesmo, foi promovida a

agitação do meio de forma manual, dividindo-se entre agitação rápida e lenta, com uma duração de 2 min cada.

Após o procedimento de floculação, as amostras permaneceram em repouso durante 24 h para a realização da operação de decantação das células microalgais (Figura 1), ao término deste período, o sobrenadante foi drenado e a fração contendo as células decantadas foi filtrada em filtro de tecido. Posteriormente, as células contidas no filtro foram acondicionadas em capsulas de porcelana previamente pesadas e encaminhadas à estufa, a uma temperatura de 60°C até massa constante. Após a secagem, a biomassa foi armazenada a -4 °C até sua utilização.

Figura 1 – Amostras submetidas a decantação da biomassa de *Chlorella sorokiniana* com vinhaça 10% (v v⁻¹) e N:P:K (20:5:20) 1% (v v⁻¹).



Fonte: o autor (2021).

Ao término da secagem, as capsulas foram retiradas da estufa e resfriadas em dessecador, onde permaneceram por 30 minutos. Em seguida, foram pesadas em balança analítica e obteve-se a biomassa seca (mg).

4.4 Extração de lipídios

Para realização da extração dos lipídios das microalgas, foi utilizada a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) adaptada por D'Oca et al. (2011). Visando a determinação da melhor eficiência do processo, foram analisados solventes distintos, sendo eles a mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v v⁻¹), metanol, etanol e hexano, com o objetivo de determinar qual proporcionaria a maior quantidade de óleo extraído por massa de microalga seca.

Dessa forma, foi adicionado 0,05 g de biomassa seca de microalgas e 1,50 mL de solvente químico a temperatura ambiente. A reação ocorreu sobre agitação magnética (400 rpm) ou banho de ultrassom (42 kHz de frequência) durante um intervalo de tempo de 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. Por fim, a fração orgânica foi recolhida e levada a estufa a 60°C para evaporação do solvente. A biomassa resultante no tubo de ensaio foi submetida ao processo de re-extração.

4.5 Produção de biodiesel e análise do perfil de ácidos graxos

A produção do biodiesel ocorreu a partir da reação orgânica de transesterificação direta. Diante disso, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 g de biomassa microalgal seca, em seguida, adicionou-se 3 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a uma concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol anidro (CH_3OH). Após adição dos reagentes descritos, os tubos de ensaio foram submetidos ao aquecimento a uma temperatura equivalente a 90°C durante 10 min.

Concluído o período de aquecimento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo para adição de 9 mL da mistura esterificante e reaquecimento a 90°C por 10 min. Ao término desse período, as amostras foram resfriadas novamente em banho de gelo e foi adicionado 5 mL de hexano e 2 mL de água destilada. Por fim, os tubos foram agitados manualmente por 30 s e acondicionados em uma estante até a completa separação de fases entre as misturas presentes no meio.

Após a formação de fases, a superior, composta pelos ácidos graxos e hexano, foi transferida para GC *vial* e encaminhada para análise em cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama (LIU et al., 2015, WAHLEN; WILLIS; SEEFELDT, 2011). Para promover a separação dos ácidos graxos foi utilizada a coluna capilar ZebronTMZB-FFAP polar (30m x 0,32 mm 0,25 μm *film thickness*; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Foi utilizado o Hélio como gás de arraste, o qual se deslocou a uma velocidade de 35 cm s^{-1} . O sistema de temperatura programado para a separação foi a de forno inicial da coluna em 150°C , durante 3 min, rampa de aquecimento a $1,5^\circ\text{C min}^{-1}$ até 240°C , mantido por 15 min. O detector e injetor (amostragem de $2 \mu\text{L}$ cada e relação de 10:1) trabalharam em temperatura constante de 250°C por 78 min.

Os compostos presentes nas amostras foram identificados e quantificados a partir da comparação dos tempos de retenção e picos com os padrões estabelecidos pela Marine Oil Test Mix e FAME (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) (ASGHARPOUR; RODGERS; HESTEKIN, 2015). As frações em massa foram normalizadas a porcentagem em função do total de ácidos graxos.

4.6 Predição das propriedades do biodiesel produzido

A análise cromatográfica permitiu a quantificação e identificação da composição de ácidos graxos presentes no biodiesel produzido e, a partir disso, foi possível determinar as características do mesmo, como o grau de instauração (GI), número de cetano (NC), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS), ponto de nuvem (PN), ponto de entupimento de filtro à frio (PEFF), poder calorífico (PC), viscosidade cinemática (ν) e densidade (ρ). As

propriedades descritas foram determinadas a partir de equações empíricas, a precisão e confiabilidade dessas já foram comprovadas por Talebi; Tabatabaei e Chisti (2014), Ramirez-Verduzco; Rodriguez-Rodrigues e Jaramillo-Jacob (2012) e Ramos et al., (2009).

O número de cetano (CN) foi determinado a partir da Equação 2, conforme descrito a seguir.

$$CN = 46,3 + \left(5,458/IS\right) - \left(0,225/II\right) \quad (2)$$

O Índice de Saponificação (IS) e o Índice de Iodo (II) utilizados na equação 2 foram determinados a partir da Equação 3 e 4, conforme apresentado a seguir.

$$IS = \sum (560 \times Ni) / Mi \quad (3)$$

$$II = \sum (254 \times D Ni) / Mi \quad (4)$$

Nas Equações 3 e 4, Mi representa o valor da massa molecular do éster graxo e Ni é a porcentagem do éster graxo particular na amostra de óleo. O Grau de Insaturação (GI) foi estabelecido a partir do cálculo utilizando as quantidades de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) presentes no óleo em porcentual em peso, conforme representado na Equação 5.

$$GI = MUFA + (2 \times PUFA) \quad (5)$$

O Fator Saturado de Cadeia Longa (LCSF) e o Ponto de Obstrução do Filtro Frio (CFPP) foram determinados a partir das Equação 6 e 7, respectivamente.

$$LCSF = (0,1 \times C16) + (0,5 \times C18) + (1,0 \times C20) + (1,5 \times C22) + (2,0 \times C24) \quad (6)$$

$$CFPP = (3,1417 \times LCSF) - 16,477 \quad (7)$$

O Ponto de Nuvem (CP) baseia-se no porcentual de C16:0 presente no perfil de ácidos graxos e foi calculado a partir da Equação 8.

$$CP = (0,526 \times C16) - 4,992 \quad (8)$$

A Viscosidade Cinemática (ν) na temperatura de 40°C foi determinada pela Equação 9.

$$\ln(v) = \sum Ni(-12,503 + (2,496 \times \ln Mwi) - 0,178 \times Di) \quad (9)$$

A Densidade (ρ) na temperatura de 20°C foi determinada pela Equação 10.

$$\rho = \sum Ni(0,8463 + (4,9/Mwi) + 0,0118 \times Di) \quad (10)$$

O Poder Calorífico (PC) foi estimado por meio da Equação 11, conforme descrito a seguir.

$$PC = \sum Ni(46,19 - (1794/Mwi) - 0,21 \times Di) \quad (11)$$

Para as Equações 9, 10 e 11, a variável Mwi representa o peso molecular do ácido graxo, Ni diz respeito a porcentagem do ácido graxo e Di é a quantidade de duplas ligações presentes no determinado ácido graxo.

4.7 Análise estatística

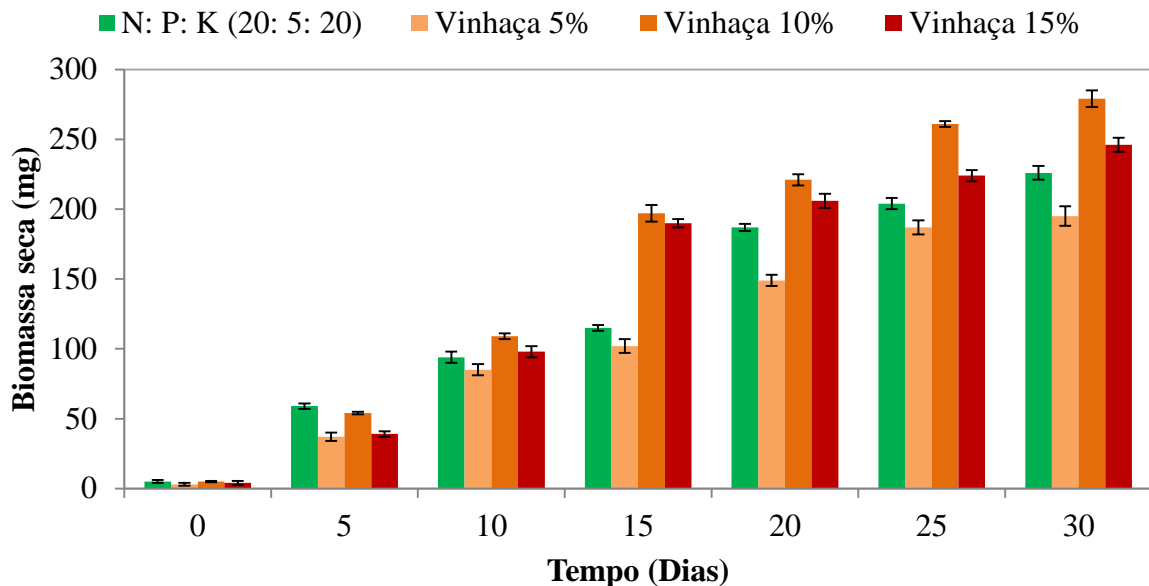
Os dados obtidos em todos os experimentos foram empregados a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Microsoft Office Excel 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento celular e composição da biomassa

A adaptação da *Chlorella sorokiniana* a vinhaça e, conseqüentemente, o seu crescimento celular, foram acompanhados durante todo o período de cultivo, seguindo, para isto, a análise da quantidade de biomassa seca a cada 5 dias, conforme exposto na Figura 2.

Figura 2 – Incremento da biomassa seca ao longo do período de cultivo.



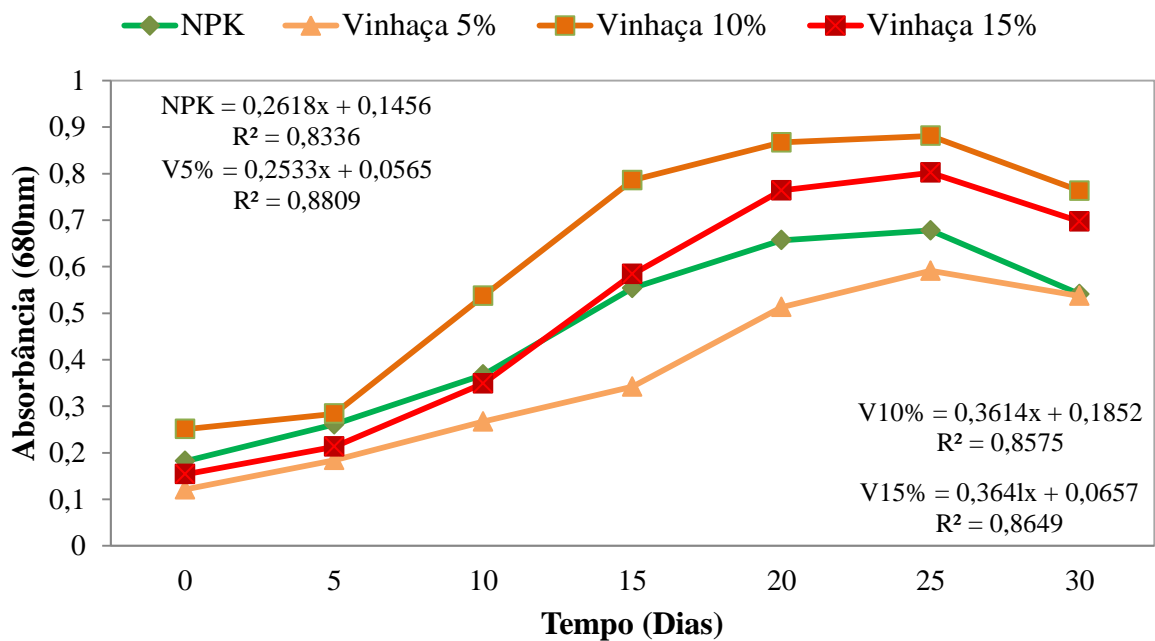
Na Figura 2, as culturas submetidas ao cultivo com vinhaça diluída demonstraram uma boa adaptação ao meio de cultivo e, por conseguinte, um incremento positivo na biomassa seca ao término do experimento, possuindo destaque o tratamento com vinhaça 10% ($v v^{-1}$), o qual garantiu os melhores resultados do trabalho. Ansilago et al. (2021) também constataram a evolução do crescimento celular e o incremento da biomassa seca de *Chlorella sorokiniana* cultivada com vinhaça 1% ($v v^{-1}$) em meio não axênico, indicando que o meio de cultivo em questão possui potencial de aplicação no cultivo de microalgas dessa espécie.

Ramirez, Farenzen e Trierweiler (2014) analisaram o cultivo da microalga *Scenedesmus sp.* com vinhaça nas diluições de 12,5, 25,0, 37,5 e 50,0% e identificaram o aumento da biomassa em todas as concentrações testadas, todavia as concentrações mais elevadas demonstraram um menor crescimento em comparação as menores concentrações, destacando que os cultivos com esse efluente deve ser realizado com um volume de até 40% ($v v^{-1}$). A condição observada se explica a partir do modelo de cultivo empregado, bem como pelas características da vinhaça, o cultivo ocorreu de forma mixotrófica, realizando fotossíntese e consumindo carbono orgânico como fontes de energia, a vinhaça possui uma coloração marrom e alta turbidez (ANSILAGO et al., 2021), tais características influenciam

na captação de luz a partir das microalgas, impedindo a penetração da mesma no meio, impactando negativamente no processo de fotossíntese e, portanto, na multiplicação celular das mesmas.

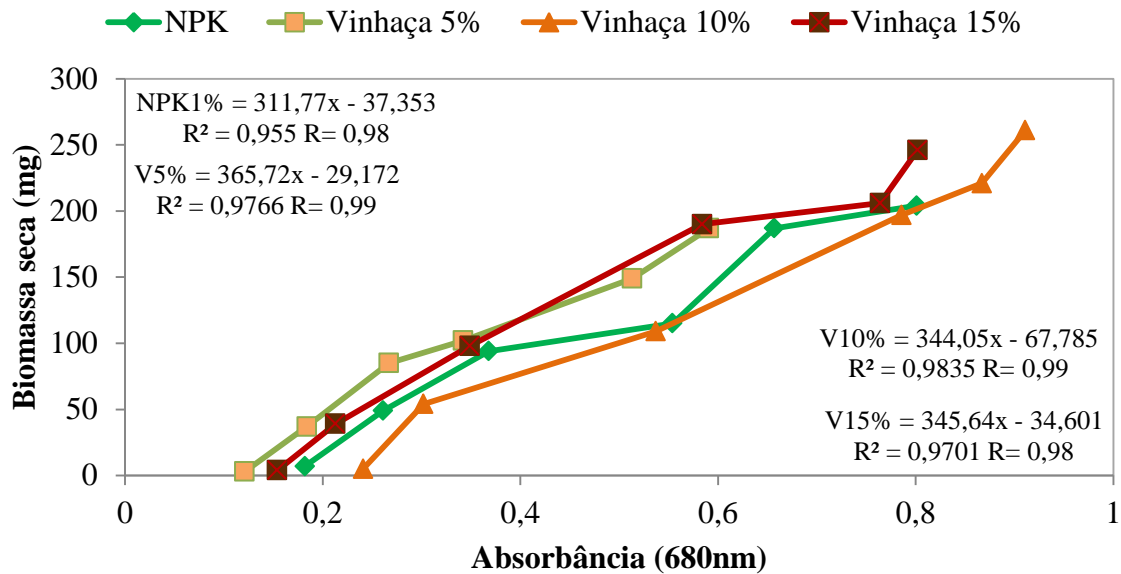
Além do incremento da biomassa seca, a variação da absorvância também foi acompanhada ao longo dos dias de cultivo para todos os ensaios com vinhaça e para o controle, de acordo com o apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Curvas de crescimento das culturas de *Chlorella sorokiniana* com N:P:K (20:5:20) e Vinhaça 5, 10 e 15% (v v⁻¹).



A Figura 3 destaca o perfil de crescimento apresentado pela *Chlorella sorokiniana* de acordo com as variações da absorvância a cada 5 dias de cultivo. Pode-se observar que, com exceção do controle, todos os ensaios apresentaram curvas de crescimento com 4 fases distintas, iniciando-se com a fase de indução (0 a 5 dias), seguida pela fase exponencial (5 a 20 dias), passando pela fase estacionária (20 a 25 dias) e, por último, a fase de declínio (25 a 30 dias). Visando confirmar a correlação entre o aumento da absorvância ao longo do experimento com o acréscimo da biomassa seca, foi confeccionado um diagrama e executado o teste de Pearson, conforme demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Correlação entre a biomassa seca e a absorbância a 680 nm para os diferentes tratamentos com vinhaça (v v⁻¹) e N: P: K (20: 5: 20).



Na Figura 4 identifica-se que a biomassa seca se eleva em função do aumento da absorbância a 680 nm, fato este que foi confirmado pelo teste de Pearson, o qual alcançou coeficientes de correlação equivalentes a 0,98, 0,99, 0,99 e 0,98 para os ensaios com o controle e a vinhaça nas diluições de 5, 10 e 15%, respectivamente. O teste de Pearson indica a associação linear entre duas variáveis, essa associação é representada pelo coeficiente de correlação linear (R), conforme Figueiredo Filho e Silva Junior (2009), quanto mais próximo de 1, maior a correlação entre as variáveis estudadas, diante disso, pode-se afirmar que a biomassa seca aumenta de forma proporcional a elevação da absorbância a 680 nm.

A partir dos dados apresentados na Figura 3, procedeu-se também a determinação do crescimento máximo específico, o tempo de duplicação e a produtividade de biomassa para cada tratamento estudado, todos os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 - Crescimento e produtividade da *Chlorella sorokiniana* nas condições estudadas.

Tratamento	μ_{\max} (Dia ⁻¹)	Tempo de Duplicação (Dia)	Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ Dia ⁻¹)
N:P:K (20:5:20) 1%	0,26 ± 0,03	2,65 ± 0,04	150,67 ± 1,02
Vinhaça 5% (v v ⁻¹)	0,25 ± 0,02	2,74 ± 0,03	136,67 ± 2,08
Vinhaça 10% (v v ⁻¹)	0,36 ± 0,01	1,92 ± 0,02	186,01 ± 1,79

Vinhaça 15% (v v ⁻¹)	0,36 ± 0,01	1,92 ± 0,02	174,12 ± 3,03
-------------------------------------	-------------	-------------	---------------

O ensaio com a vinhaça na diluição de 10% (v v⁻¹) foi o que garantiu a maior produtividade de biomassa segundo os valores expressos na Tabela 6, alcançando 186,01 ± 1,79 mg L⁻¹ Dia⁻¹ enquanto o controle obteve uma produtividade de 150,67 ± 1,02 mg L⁻¹ Dia⁻¹. Visando atestar se a produtividade de biomassa encontra-se em uma faixa considerável de eficiência, o tratamento que apresentou os melhores resultados (vinhaça 10% v v⁻¹) foi comparado com a produtividade de *Chlorella sorokiniana* cultivada em diferentes meios de cultivo (Tabela 7).

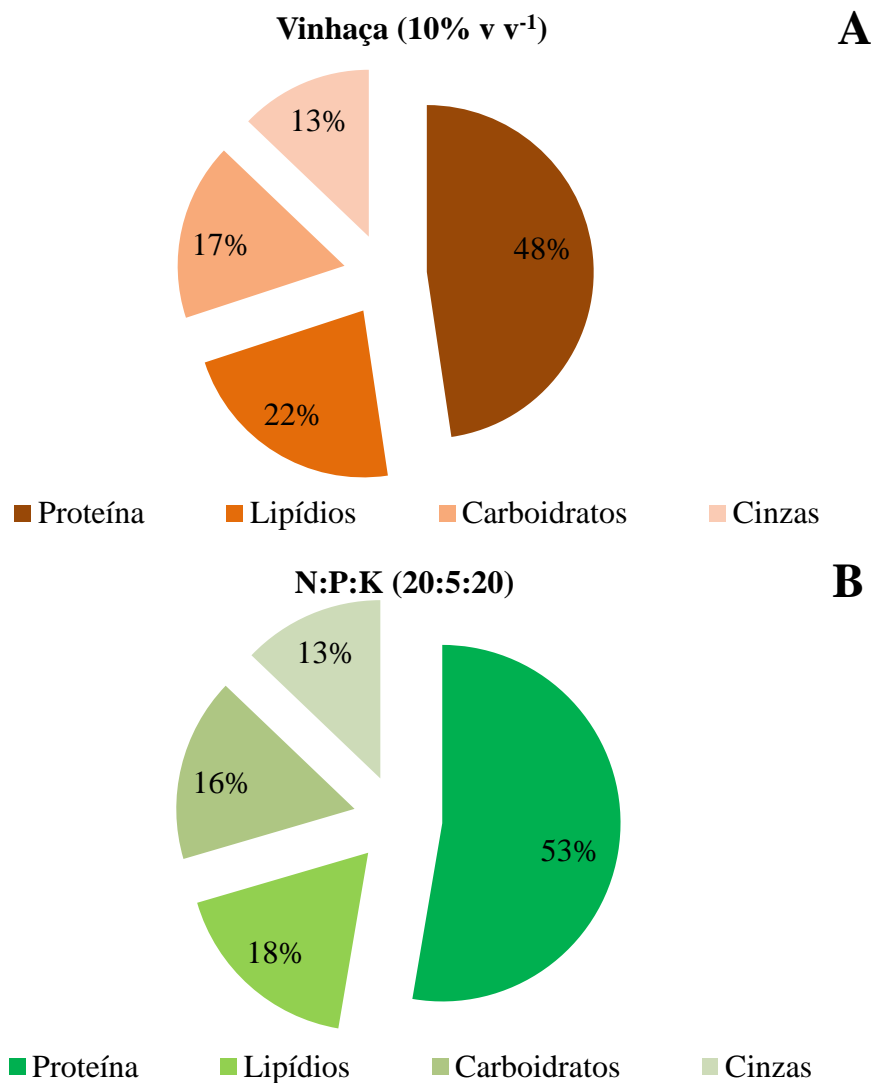
Tabela 7 – Produtividade de biomassa de *Chlorella sorokiniana* em diferentes meios de cultivo.

Espécie	Meio de cultivo	Produtividade de biomassa (mg L ⁻¹ D ⁻¹)	Referência
<i>Chlorella sorokiniana</i> CTT 7727	Vinhaça 10% (v v ⁻¹)	186	Este trabalho
<i>Chlorella sorokiniana</i> DOE 1412	Sintético otimizado PE-001a	119	Qiu et al. (2017)
<i>Chlorella sorokiniana</i> 211-8k	Águas residuárias municipais e de suinocultura	130	Leite et al. (2019)
<i>Chlorella sorokiniana</i> MB-1-M12	Águas residuárias da cultura de camarão com adição de nutrientes	190	Cheng et al. (2019)
<i>Chlorella sorokiniana</i> AK-1	Dejeto suíno peneirado com adição de nutrientes	290	Chen et al. (2020)
<i>Chlorella sorokiniana</i> LBA#39	Digestato suíno	198	Dinnebier et al. (2021)

Com base no referencial teórico apresentado na Tabela 7, pode-se afirmar que a vinhaça diluída mostrou-se uma alternativa promissora para o cultivo de *Chlorella sorokiniana* CTT 7727, tendo como objetivo o crescimento celular da mesma, visto que a microalga estudada se adaptou positivamente ao meio de cultivo, além de possibilitar uma produtividade de biomassa dentro da média encontrada na literatura para diferentes meios de cultivo alternativos. Vale salientar ainda que cada efluente possui características únicas, variando em seus parâmetros físicos, químicos e biológicos, sobretudo na disponibilidade de nutrientes presentes nos mesmos, influenciando no crescimento celular da microalga.

Ademais, a composição celular da biomassa microalgal seca foi analisada, visando a verificação da existência de influência do meio de cultivo nas características bioquímicas da *Chlorella sorokiniana*, desta forma foi utilizada a biomassa do tratamento com diluição de vinhaça 10% (v v⁻¹) (Figura 5a) e do controle (Figura 5b).

Figura 5 - Composição bioquímica da *Chlorella sorokiniana* cultivada com vinhaça (10% v v⁻¹) (A) ou N:P:K (20:5:20) (B).



Ao observar a Figura 5, nota-se que a grande parcela de biomoléculas presente na célula da *Chlorella sorokiniana* é composta por proteínas, entretanto, a segunda maior concentração (22% em vinhaça 10% (v v⁻¹) e 18% em N:P:K (20:5:20)) é representada por lipídios, indicando o seu potencial de uso para a produção de biodiesel. Além disso, ressalta-se que o tratamento com vinhaça possibilitou uma maior fração lipídica em relação ao controle, tal fato se explica possivelmente pelo estresse bioquímico causado pela vinhaça, uma vez que o N:P:K dispõe de concentrações ótimas para o metabolismo de microalgas enquanto que a vinhaça, apesar de rica em nutrientes, pode não oferecer concentrações ideais para as exigências nutricionais da *Chlorella sorokiniana*.

Acerca do estresse bioquímico, Al-Rashed et al. (2016) destacam que o nitrogênio é considerado um dos nutrientes limitantes no crescimento e no metabolismo microalgal. Na ausência ou concentração limitada do mesmo, as microalgas podem alterar naturalmente o seu metabolismo como forma de resposta ao estresse causado (CHEN et al., 2017). Diante disso, quando a oferta de nitrogênio não é suficiente para a síntese proteica, o excesso de carbono proveniente da fotossíntese é direcionado para moléculas de armazenamento, como lipídios e carboidratos (SCOTT et al., 2010), justificando, possivelmente, o maior percentual de lipídios no ensaio com vinhaça.

5.2 Remoção de nutrientes durante o cultivo

O crescimento celular de microalgas sofre influência de uma série de parâmetros, entre eles, a intensidade luminosa e a concentração de nutrientes no meio de cultivo. Considerando os teores de amônia, nitrito, nitrato e fosfato, pode-se afirmar que a *Chlorella sorokiniana* obteve bons resultados de remoção durante o período de cultivo, alcançando valores de remoção superiores a 70% para todos os nutrientes avaliados no cultivo com vinhaça 10% (v v⁻¹), conforme apresentado no gráfico da Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração inicial e final de nutrientes e taxa de remoção.

Nutriente	N:P:K (20:5:20)			Vinhaça 10% (v v ⁻¹)		
	Início (mg L ⁻¹)	Fim (mg L ⁻¹)	Remoção (%)	Início (mg L ⁻¹)	Fim (mg L ⁻¹)	Remoção (%)
Amônia	589,42 ±	47,15 ± 0,89	92,00	67,24 ±	2,02 ±	97,00
	2,31			0,76	0,24	
Nitrito	345,67 ±	62,22 ± 0,74	82,00	1,43 ±	0,21 ±	85,00
	1,09			0,18	0,03	
Nitrato	643,18 ±	141,50 ±	78,00	44,16 ±	8,39 ±	81,00
	3,16			1,01	0,49	

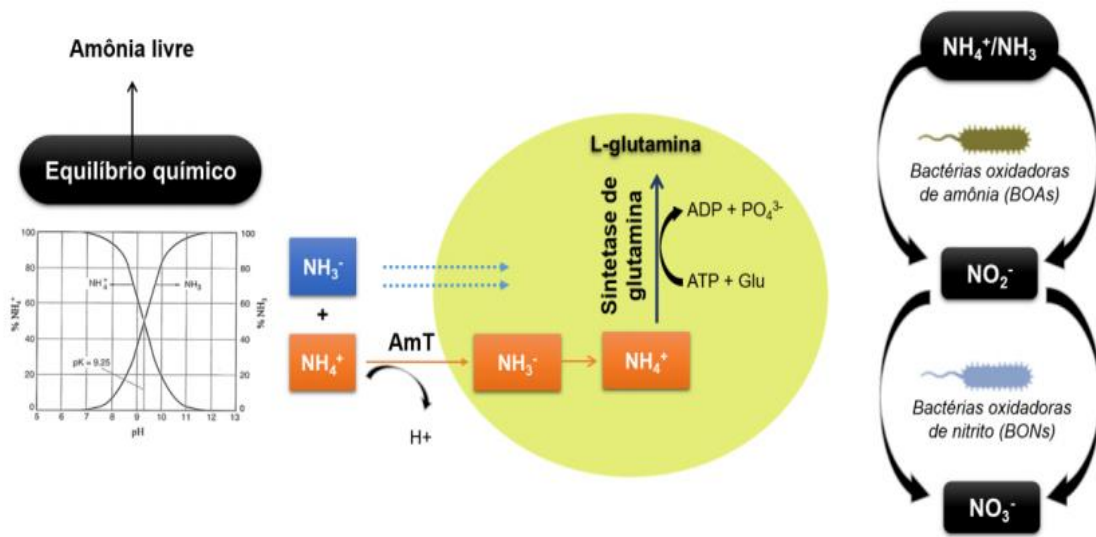
Fosfato	167,48 ± 1,42	75,37 ± 0,93	55,00	2,19 ± 0,14	0,48 ± 0,08	78,00
---------	------------------	--------------	-------	----------------	----------------	-------

O acompanhamento do consumo de nutrientes em cultivos de microalgas pode ser monitorado pela determinação da concentração destes no meio de cultivo (FIERRO; SÁNCHEZ-SAAVEDRA; COPALCÚA, 2008). Conforme observado na Tabela 8, a *Chlorella sorokiniana* alcançou resultados promissores na remoção de todos os nutrientes avaliados. No tratamento com vinhaça, houve uma considerável depleção da concentração de amônia no meio, a qual possuía uma concentração inicial de 67,24 mg L⁻¹ chegando a 2,02 mg L⁻¹ no término do experimento, alcançando uma remoção equivalente a 97%.

Acerca da depleção de amônia, Dinnebier et al. (2021) analisaram a remediação de nitrogênio amoniacal no cultivo de *Chlorella sorokiniana* em digestato de suinocultura, a qual variou de 988 mg L⁻¹ no início do experimento para 187 mg L⁻¹ ao término, uma remoção equivalente a 81%, inferior a alcançada neste trabalho.

O uso de algas na remoção ou biotransformação de nutrientes de águas residuárias é denominado como ficorremediação (MOREIRA; MARQUES, 2020). Acerca da ficorremediação, Dinnebier et al. (2021) destaca três mecanismos principais de remoção de nitrogênio amoniacal, sendo eles: assimilação pela célula microalgal em sua síntese metabólica, volatilização da amônia livre e nitrificação, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Mecanismos de remoção de amônia durante o crescimento de microalgas.



Fonte: Dinnebier et al. (2021).

Na fitorremediação de vinhaça a partir de microalgas, o nitrogênio amoniacal demonstra-se como o composto preferido para ser incorporado pela célula, pois na sua assimilação há uma menor demanda energética, visto que a mesma não requer a realização da reação redox, sendo assimilada naturalmente pela microalga (YUAN, 2016; LUO et al., 2016). Tal fato justifica os melhores resultados de remoção obtidos pela amônia em relação ao nitrito e nitrato.

Considerando o tratamento com vinhaça, a concentração de nitrito variou de 1,43 para 0,21 mg L⁻¹ ao fim dos 30 dias de cultivo, um percentual de remoção equivalente a 85%. Bertoldi et al. (2007) analisaram a remoção de nitrito pela microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes diluições de uma solução hidropônica residual a uma temperatura média de 25°C e iluminação constante. O cultivo garantiu uma depleção na concentração de nitrito equivalente a 84,5%, variando de 0,27 mg L⁻¹ no início para 0,04 mg L⁻¹ ao término. Tais resultados possuem o percentual de remoção semelhantes ao deste estudo e indicam a potencialidade da aplicação de microalgas na remediação desse composto em efluentes diversos.

Bertoldi et al. (2007) também avaliaram o consumo de nitrato no mesmo experimento citado anteriormente, resultando em uma remoção de 80,5% ao término do cultivo (226,00 e 44,07 mg L⁻¹ no início e término do experimento, respectivamente). Este resultado corrobora com o deste trabalho, considerando os percentuais de remoção, no qual o cultivo utilizando vinhaça 10% (v v⁻¹) removeu 81% do nitrato presente no meio (44,16 e 8,39 mg L⁻¹ no início e término do experimento, respectivamente).

O nitrato é o composto que possui menor afinidade de assimilação por algas quando considerado as diferentes formas de nitrogênio inorgânico, fato confirmado por Drexler et al. (2014) onde os autores avaliaram a capacidade de remoção de nitrato e nitrogênio amoniacal a partir da *Chlorella sorokiniana* cultivada em efluente de Estação de Tratamento de Águas Residuárias (ETAR) durante 12 dias. Foram obtidas taxas de remoção equivalente a 10% para nitrato (3,50 mg L⁻¹ no início e 3,15 mg L⁻¹ ao término do cultivo), por outro lado, a remoção de nitrogênio amoniacal foi de 98% (24,00 mg L⁻¹ no início e 0,48 mg L⁻¹ ao término do cultivo), comportamento semelhante ao apresentado neste estudo, confirmando novamente a preferência metabólica por amônia em microalgas. Ressalta-se que os valores absolutos e o percentual de remoção apresentaram discrepância com o deste trabalho, fato explicado pela variação do tempo de cultivo inferior, visto que neste trabalho foi equivalente a 30 dias.

Acerca da concentração de fosfato, para o cultivo com vinhaça 10% (v v⁻¹) a mesma variou de 2,19 mg L⁻¹ para 0,48 mg L⁻¹, demonstrando uma taxa de remoção de 78%. Tais resultados encontram-se inferiores aos obtidos por Drexler et al. (2014), onde o teor de fosfato foi de 32,00 mg L⁻¹ no início do cultivo a 1,28 mg L⁻¹ ao término dos 12 dias de cultivo, removendo cerca de 96% de fosfato a partir da *Chlorella sorokiniana* cultivada em efluente de ETAR.

O percentual de remoção de fosfato foi o que garantiu o menor resultado em relação aos outros nutrientes analisados, este fato corrobora com o estudo de Bashan e Bashan (2010), destacando que a remoção de compostos nitrogenados por microalgas é mais eficiente em relação aos compostos fosforados. Os valores após a remediação dos nutrientes da vinhaça também foram comparados aos parâmetros de lançamento de efluentes vigentes na legislação brasileira (Tabela 9), a fim de confirmar se a fitorremediação a partir da *Chlorella sorokiniana* pode ser uma alternativa de tratamento para vinhaça.

Tabela 9 – Comparação aos valores dos compostos após cultivo com vinhaça diluída com os padrões regulamentadores vigentes.

Nutriente	Este estudo (mg L ⁻¹)	Padrão (mg L ⁻¹)	Referência
Amônia	2,02	≤ 20,00	CONAMA 430/11
Nitrito	0,21	≤ 1,00	CONAMA 357/05
Nitrato	8,39	≤ 10,00	CONAMA 357/05
Fósforo Total	0,48*	≤ 0,02 ^a ou ≤ 0,10 ^b	CONAMA 357/05

Legenda: *Valor referente a fosfato; ^aambiente lêntico; ^bambiente lótico.

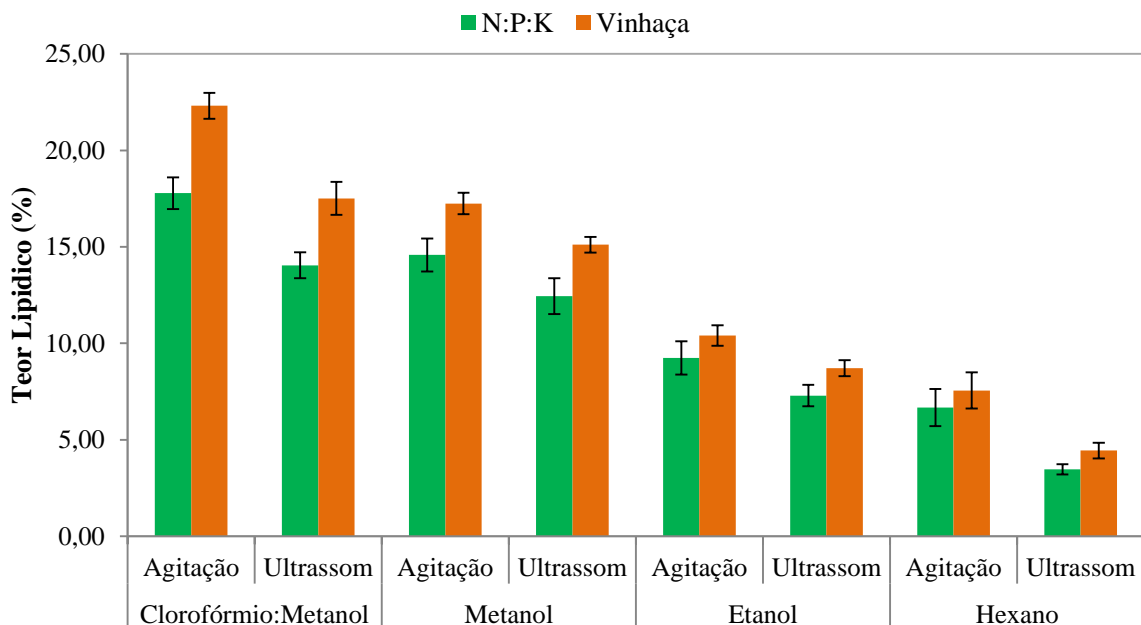
Segundo a Tabela 9, nota-se que a remoção de nutrientes da vinhaça foi bem sucedida, alcançando concentrações finais em concordância aos padrões de regulamentação

estabelecidos para amônia, nitrito e nitrato. Entretanto, o fosfato encontra-se em desconformidade com a determinação da resolução nº 357 de 2005, do Conselho Nacional de Meio Ambiente, todavia o valor representa o teor de fósforo total, enquanto o composto determinado neste estudo indica a concentração de fosfato. Considerando que o fósforo total é representado pela soma entre o fosfato e o fósforo orgânico dissolvido, há possibilidade da amostra se enquadrar no padrão apresentado.

5.3 Influência do solvente na extração lipídica

De acordo com Richmond (2004), Nichols (1965) e Becker (2004), as microalgas do gênero *Chlorella* alcançam um teor lipídico na faixa de 20 a 30% do seu peso seco, quando cultivadas em condições controladas, isto é, temperatura, intensidade luminosa e concentração de nutrientes no meio que favorecem o seu desenvolvimento. Considerando a *Chlorella sorokiniana*, a extração lipídica foi avaliada por métodos diversos, conciliando rompimento celular e solventes químicos, visando determinar qual garantiria o maior potencial de extração. Os rendimentos obtidos demonstraram diferenças em cada modelo analisado e estão apresentados no gráfico da Figura 7. Ressalta-se que para análise do teor lipídico e produção de biodiesel foi utilizada a biomassa seca proveniente do cultivo com vinhaça 10% v⁻¹, visto que a mesma foi a que garantiu os melhores resultados no cultivo.

Figura 7 - Rendimentos obtidos nos diferentes modelos de extração lipídica avaliados.



Analisando os resultados apresentados no gráfico, conclui-se que a vinhaça demonstrou ser um excelente meio para cultivar microalgas, sobretudo da espécie *Chlorella sorokiniana*, uma vez que além de garantir bons resultados de crescimento celular,

proporcionou também um incremento na fração lipídica intracelular, conforme apresentado na Figura 7. O fato pode ser explicado pelo estresse bioquímico que o meio causa no desenvolvimento celular, uma vez que a mesma é rica em nutrientes, porém possui baixa concentração de nitrogênio, nutriente limitante para desenvolvimento de proteínas na célula (ADARME-VEJA et al., 2012).

Conforme demonstrado na Figura 7, o melhor rendimento foi o apresentado pela mistura Clorofórmio:Metanol 2:1 ($v v^{-1}$) com agitação magnética, alcançando um teor de $17,78 \pm 0,81$ e $22,31 \pm 0,67\%$ para o ensaio com o N:P:K (20:5:20) e com a vinhaça 10% ($v v^{-1}$), respectivamente. Tais valores confirmam a seletividade do solvente na extração de lipídios intracelulares. Essa mistura é utilizada no método de Bligh e Dyer (1959), a mesma é capaz de extrair todas as classes de lipídios presentes na célula, uma vez que une um solvente polar com outro apolar, expandido a sua seletividade e, conseqüentemente, elevando os rendimentos. Todavia, este método convencional limita-se na inviabilidade em aplicação industrial, devido aos altos custos de solvente e a alta toxicidade (D'OCA et al. 2011; PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2001).

Verificando todos os teores apresentados na Figura 7, é possível afirmar que a agitação magnética mostrou-se mais eficaz em relação a ultrassom, garantindo resultados mais promissores na maior parte dos ensaios. Esse fato pode ser explicado pela maior homogeneização do meio e o choque celular causado, garantindo uma maior relação solvente-soluto, resultando, desta forma, em uma maior extração (FONTOURA, 2017).

Na literatura, encontram-se diversos métodos de extração por solvente passíveis de serem aplicados na extração lipídica de microalgas (SOUZA SILVA, 2014; D'OCA et al., 2011; PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2001). No trabalho de SOUZA SILVA (2014), empregou-se a extração por solvente utilizando a mistura de clorofórmio e metanol em conjunto com diversos métodos de rompimento celular, como resultado, o ultrassom foi o menos eficiente, obtendo os menores teores, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

D'Oca et al. (2011) avaliaram diferentes solventes aliados a agitação magnética na extração lipídica de *Chlorella pyrenoidosa*. A melhor extração foi a partir da mistura clorofórmio:metanol 2:1 ($v v^{-1}$), seguida pelo metanol, etanol e hexano. Considerando o cultivo com vinhaça 10% ($v v^{-1}$), ao comparar o percentual lipídico extraído pelo metanol ($17,24 \pm 0,56\%$) e etanol ($10,40 \pm 0,53\%$), nota-se que a maior parte dos lipídios de *Chlorella sorokiniana* encontra-se na forma de lipídio polar, justificando a maior efetividade alcançada na extração com o metanol. Contudo, vale ressaltar a maior conveniência do uso do etanol,

uma vez que o mesmo é proveniente de fontes renováveis, além de possuir um baixo custo e baixa toxicidade (D'OCA et al., 2011). O hexano, um solvente apolar, foi o responsável pelos menores valores de rendimento, confirmando assim a baixa concentração de lipídios de natureza apolar na *Chlorella sorokiniana*.

5.4 Perfil e composição de ácidos graxos

O biodiesel da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada em vinhaça foi submetido a análises cromatográficas visando a determinação dos principais Ácidos Graxos (AGs) presentes no mesmo. A quantificação em massa foi normalizada em função do total de ácidos graxos identificados, sendo, neste trabalho, o ácido palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), conforme apresentado na Tabela 10. A quantificação de ácidos graxos foi comparada a outras matrizes convencionalmente utilizadas, visando um padrão de comparação para o biodiesel produzido.

Tabela 10 – Identificação e quantificação dos ácidos graxos do biodiesel.

Ácido Graxo	<i>Chlorella sorokiniana</i> (%)	Soja (%)	Palma (%)
C14:0	1,16	0,00	1,10
C16:0	44,18	11,40	42,70
C16:1	4,15	0,00	0,00
C17:0	0,00	0,00	0,20
C18:0	3,19	3,60	4,50
C18:1	23,42	25,20	39,40
C18:2	16,54	53,60	10,60
C18:3	5,69	6,20	0,10
C20:0	0,00	0,00	0,39
C20:1	0,00	0,00	0,20
C22:0	0,00	0,00	0,60
C24:0	1,67	0,00	0,10
C24:1	0,00	0,00	0,10
Referência	Autor (2021)	Ramos et al. (2009)	Ramos et al. (2009)

Conforme observado na Tabela 10, as menores parcelas identificadas no biodiesel de *Chlorella sorokiniana* foram apresentadas pelo C14:0 e C24:0, uma característica em conformidade com a literatura (D'OCA et al., 2011; PETKOV; GARCIA, 2007), a qual ressalta que o percentual desses AGs não ultrapassa 2% em microalgas de água doce. Hu et al. (2008) descrevem que, de forma semelhante as plantas superiores, os ácidos graxos mais

abundantes em microalgas como *Chlorella* encontram-se na faixa entre C16 e C18, corroborando com os resultados obtidos e apresentados na Tabela 10.

O perfil de ácidos graxos e a fração presente dos mesmos é de fundamental importância para a qualidade do biodiesel, os Ácidos Graxos mais convencionais em biodieseis, segundo Knothe (2005), são o ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linolênico (C18:3), validando os resultados obtidos neste estudo, visto que as maiores parcelas correspondem aos AGs citados.

Há algumas propriedades que impactam diretamente na qualidade do biodiesel, algumas das principais são a quantidade de cada FAME, o comprimento da cadeia do AG, bem como o número de duplas ligações (CHISTI, 2007; KNOTHE, 2005). Considerando os AGs saturados mais presentes no biodiesel estudado (C14:0, C16:0 e C18:0), salienta-se que os mesmos são mais propensos a solidificação em baixas temperaturas, influenciando nas propriedades de Ponto de Entupimento de Filtro a Frio (PEFF) e Ponto de Nuvem (PN). Todavia, essa condição não impossibilita o seu uso, apenas configura limitação de utilização em países tropicais (SILVA et al., 2014; KNOTHE, 2005).

A estabilidade oxidativa tende a ser superior em biodiesel com maior parcela de ácidos graxos insaturados. Além disso, conforme Rawat et al. (2013) e Suppes (2010), o Número de Cetano (NC) tende a ser mais adequado em função da concentração de AGs com cadeia carbônica insaturada, elevando assim a eficiência de ignição e queima do combustível, visto que o NC é um indicador desta finalidade.

5.5 Propriedades do biodiesel produzido

O biodiesel produzido foi analisado e suas propriedades foram estimadas empiricamente, os parâmetros determinados foram o grau de insaturação, número de cetano, índice de saponificação, índice de iodo, fator de cadeia longa saturada, ponto de entupimento de filtro a frio, ponto de nuvem, poder calorífico, viscosidade e densidade. Visando confirmar a qualidade do biodiesel produzido, o mesmo foi comparado com outras matrizes convencionais, como o óleo de soja e de outras microalgas, conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 – Propriedades do biodiesel de microalgas e óleo de soja.

Propriedades	Padrão	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Chlorella</i>	Óleo de Soja
		<i>sorokiniana</i> (Este trabalho)	<i>sorokiniana</i>	<i>vulgaris</i>	
SFA (%)	-	50,20	48,03	52,15	15,00
MUFA (%)	-	27,57	24,64	37,51	24,70
PUFA (%)	-	22,23	27,00	10,33	60,30
GI	-	72,03	78,64	58,17	-
IS (mg L ⁻¹)	-	206,14	208,06	61,83	51,70
II (g I ₂ /100g)	-	80,87	81,95	199,37	-
NC	-	46,32	54,09	52,63	-
FCLS	-	9,35	8,29	1,57	-
PEFF (°C) *	8,00 – 14,00	12,91	9,57	-10,81	-
PN (°C)	-	18,25	15,88	-	0,00
PC (MJ Kg ⁻¹)	-	38,97	39,18	-	39,79
V (mm ² s ⁻¹)	3,00 – 6,00	4,10	3,65	-	4,10
D (g cm ⁻³)	0,85 – 0,90	0,88	0,87	-	0,81
Referência	ANP 45/2014	Autor (2021)	Menegazzo et al. (2020)	Nascimento et al. (2013)	Ramírez- Verduzco et al. (2012)

SFA: ácidos graxos saturados, MUFA: ácidos graxos monoinsaturados, PUFA: ácidos graxos poli-insaturados, GI: grau de insaturação, IS: índice de saponificação, II: índice de iodo, NC: número de cetano, FCLS: fator de cadeia longa saturada, PEFF: ponto de entupimento de filtro à frio em MS, PN: ponto de nuvem, PC: poder calorífico, V: viscosidade cinemática, D: densidade.

O biodiesel de *Chlorella sorokiniana* encontra-se de acordo com a regulamentação ANP 45/2014, uma vez que todos os parâmetros calculados apresentaram-se em conformidade com os limites estabelecidos pela mesma. Este fato ressalta o potencial de utilização do perfil e composição dos ácidos graxos em aplicação as equações empíricas, possibilitando uma estimativa das especificidades do biodiesel desta espécie de microalga, corroborando com o estudo de Menegazzo (2017).

Acerca do perfil de ácidos graxos, Chisti (2007) destaca que a concentração, comprimento da cadeia carbônica e número de insaturações, influenciam diretamente nos parâmetros do biodiesel. O Grau de Insaturação é indicado pelo Índice de Iodo (II), o II aumenta proporcionalmente ao aumento da quantidade de ácidos graxos insaturados (CHUA et al., 2016; MENEGAZZO et al., 2015). Neste estudo, o II apresentou-se moderado, contrastando-se frente ao biodiesel de soja (RAMÍREZ-VERDUZCO; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ; JARAMILLO-JACOB, 2012; RAMOS et al., 2009), fato este explicado pela maior parcela expressa pelos ácidos graxos saturados.

O comprimento da cadeia, o grau de insaturação, o número de duplas ligações e o peso molecular dos AGs, influenciam no comportamento do Número de Cetano (NC). O NC diz respeito ao potencial de queima do combustível após injeção, quanto maior o NC melhor será a capacidade de ignição e menor será a geração de poluentes atmosféricos (WANG et al., 2012). O NC apresentado pela *Chlorella sorokiniana* encontra-se dentro da faixa apresentada por microalgas do mesmo gênero e em conformidade com as regulamentações vigentes.

O Poder Calorífico (PC), segundo Knothe et al. (2005); Ramírez-Verduzco, Rodríguez-Rodríguez, Jaramillo-Jacob (2012); Chua et al. (2016), é convencionalmente utilizado para determinar o conteúdo energético e eficiência do combustível. Tal parâmetro reflete a quantidade de calor liberada na combustão de 1 g de combustível para gerar dióxido de carbono e água. Islam et al. (2013) relatam que o PC de microalgas encontra-se na faixa de 36 a 39 MJ Kg⁻¹, corroborando com o valor determinado para o biodiesel deste trabalho, ratificando a qualidade e potencial de uso do mesmo.

A viscosidade e a densidade, segundo a ANP 45/2014, devem ser enquadradas na faixa de 3,0 a 6,0 mm² s⁻¹ e 0,85 a 0,90 g cm⁻³, respectivamente. No biodiesel deste estudo, a viscosidade foi equivalente a 4,10 mm² s⁻¹ e a densidade igual a 0,88 g cm⁻³, estando em consonância com a norma vigente, refletindo a sua capacidade de uso e a eficácia de rendimento, uma vez que esses parâmetros impactam diretamente no consumo de combustível, visto que quanto menor os seus valores, menos combustível será injetado, proporcionando o mesmo rendimento com menores volumes.

O padrão estabelecido para o Ponto de Nuvem (PN) demonstra a temperatura recomendada para que o combustível não inicie um processo de solidificação (TALEBI et al., 2013). O Ponto de Entupimento de Filtro a Frio (PEFF), por sua vez, reflete a temperatura na qual ocorre a cristalização ou solidificação suficiente para promover o entupimento do filtro de combustível (ISLAM et al., 2013). Estes dois parâmetros, segundo Chuah et al. (2016), determinam limites de temperatura capazes de garantir o estado líquido do biodiesel,

variando, desta forma, em função do país, região e estação climática. O biodiesel produzido neste estudo obteve um potencial de uso como B100 no estado de Mato Grosso do Sul, visto que sua faixa de PEFF exigida varia entre 8 e 14°C.

Acerca dos padrões regulamentados pela ABNT 45/2015, o biodiesel de *Chlorella sorokiniana* cultivada com vinhaça diluída possui qualidade em conformidade ao estabelecido para ser utilizado como B100 no estado de Mato Grosso do Sul, tornando-se uma alternativa promissora meio aos combustíveis fósseis, sobretudo o óleo diesel, bem como frente aos demais biodieseis produzidos por culturas convencionais, como o óleo de soja.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microalgas estão se tornando uma alternativa promissora para finalidades biotecnológicas distintas. Considerando a *Chlorella sorokiniana*, a mesma demonstrou ser uma boa opção de uso para cultivo com vinhaça visando a multiplicação celular e incremento da fração lipídica para produção de biodiesel, visto que sua composição bioquímica apresentou um maior teor de lipídios quando comparado ao controle utilizando o adubo químico N:P:K (20:5:20). Além disso, ressalta-se que o cultivo com o efluente agroindustrial garantiu uma produtividade de biomassa superior ao controle, alcançando um maior teor de biomassa seca, confirmando mais uma vez sua potencialidade para esta aplicação.

Considerando as concentrações de nutrientes presentes na vinhaça e, conseqüentemente, a capacidade de remoção dos mesmos a partir da *Chlorella sorokiniana*, foram obtidas taxas de remoção eficientes para amônia, nitrato, nitrito e fosfato, compostos presentes em alta quantidade no efluente. Destacando, desta forma, a aptidão das microalgas em realizar esse tipo de tratamento.

A extração lipídica avaliou o potencial de extração de diferentes solventes em combinação com diferentes métodos de rompimento celular, seguindo uma metodologia convencional para esta finalidade. Os resultados demonstraram as classes lipídicas predominantes na espécie estudada, visto que a agitação magnética proporcionou uma melhor eficácia de extração, indicando sua maior eficiência no rompimento da parede celular, e que os lipídios intracelulares são majoritariamente polares, dado que os rendimentos de extração aumentaram em concomitância ao aumento de polaridade do solvente.

O perfil e composição de ácidos graxos influenciam diretamente nas propriedades do biodiesel, neste estudo, o perfil apresentado encontra-se em conformidade com o referencial teórico para esta espécie de microalga, não demonstrando variações significativas. As propriedades apresentadas pelo biodiesel corroboram com a regulamentação proposta pela ANP 45/2014, certificando a qualidade do mesmo e indicando seu potencial de uso em determinadas regiões do Brasil, como no estado de Mato Grosso do Sul.

Diante das circunstâncias aqui expressas, pode-se afirmar que a espécie de microalga estudada cultivada com vinhaça diluída nas condições de tratamento apresentadas, mostrou-se uma opção interessante visando a produção de biodiesel, pois a mesma garantiu uma boa adaptação ao meio, remediação do efluente industrial e utilização dos seus nutrientes em seu desenvolvimento celular, considerável incremento em seu teor lipídico, bem como um biocombustível em conformidade com a regulamentação nacional, atestando o seu potencial para esta finalidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, Shazia et al. Resource recovery from industrial effluents through the cultivation of microalgae: A review. **Bioresource technology**, p. 125461, 2021.
- AL-RASHED, Sarah A. et al. Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 6, p. 706-712, 2016.
- AN, Mei et al. Effects of nitrogen forms and supply mode on lipid production of microalga *Scenedesmus obliquus*. **Energies**, v. 13, n. 3, p. 697, 2020.
- ANSILAGO, Mônica et al. Enhancing secondary metabolite production by *Chlorella sorokiniana* using an alternative medium with vinasse. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, p. e49710515237-e49710515237, 2021.
- AROLA, Kimmo et al. Treatment options for nanofiltration and reverse osmosis concentrates from municipal wastewater treatment: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 22, p. 2049-2116, 2019.
- AZIZ, Md Maniruzzaman A. et al. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, p. 109621, 2020.
- BARSANTI, Laura; GUALTIERI, Paolo. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable?. **Algal research**, v. 31, p. 107-115, 2018.
- BHUYAR, Prakash et al. Cultivo de microalgas utilizando efluente de moenda de óleo de palma como meio de crescimento para produção de lipídios com efeito do suprimento de CO₂ e intensidade de luz. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-9, 2019.
- BLIGH, E. G; DYER, W. J; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Journal of Biochemistry and Physiology**, Canadá, p.37, 1959.
- BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New biotechnology**, v. 39, p. 90-98, 2017.
- BREUER, G.; EVERS, W. A. C.; et al. Analysis of Fatty Acid Content and Composition in Microalgae. *Journal of Visualized Experiments*, v. 80, p. e50628, 2013.
- CANDIDO, Camila; BERNARDO, André; LOMBARDI, Ana Teresa. Otimização e comparação qualitativa de dois pré-tratamentos da vinhaça visando ao cultivo de microalgas. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, n. 2, p. 359-367, 2021.
- CHAI, Wai Siong et al. Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: A review. **Environmental Pollution**, p. 116236, 2020.
- CHEN, Bailing et al. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—a review. **Bioresource technology**, v. 244, p. 1198-1206, 2017.

- CHEN, C.-Y. et al. Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresource Technology*, v. 302, p. 122814, abr. 2020.
- CHEN, Hao-Hong; JIANG, Jian-Guo. Lipid accumulation mechanisms in auto-and heterotrophic microalgae. ***Journal of agricultural and food chemistry***, v. 65, n. 37, p. 8099-8110, 2017.
- CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. *Bioresource Technology*, v. 275, p. 109–122, 2019.
- CHIESA, Jaqueline Elise Garcia et al. Avaliação dos efeitos causados pelas diferentes condições de cultivo nas microalgas *scenedesmus* sp. E *chlorella* sp. Mediante a potencialização de teor lipídico. 2019.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. ***Biotechnology Advances***, v. 25, p. 294-306, 2007.
- CHUAH, L. F. et al. Influence of fatty acids content in non-edible oil for biodiesel properties. *Clean Technologies and Environmental Policy*, v. 18, n. 2, p. 473–482, 2016.
- COSTA, Samantha Serra et al. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. ***International journal of biological macromolecules***, v. 116, p. 552-562, 2018.
- D’ALESSANDRO, E. B. et al. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 58, p. 832-841, 2016.
- D’OCA, M. G. M.; VIÊGAS, C. V.; LEMÕES, J. S.; MIYASAKI, E. K.; MORÓN-VILLARREYES, J. A.; PRIMEL, E. G.; ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. ***Biomass Bioenergy***, v. 35, p.1533-1538, 2011.
- DANESHVAR, Ehsan et al. Microalgal growth and nitrate removal efficiency in different cultivation conditions: Effect of macro and micronutrients and salinity. ***Journal of Environmental Chemical Engineering***, v. 6, n. 2, p. 1848-1854, 2018.
- DARVEHEI, Pooya; BAHRI, Parisa A.; MOHEIMANI, Navid R. Model development for the growth of microalgae: A review. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***, v. 97, p. 233-258, 2018.
- DE ALVA, Manuel Sacristán et al. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. ***Algal Research***, v. 34, p. 97-103, 2018.
- DESHMUKH, Suchit; KUMAR, Ritunesh; BALA, Kiran. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. ***Fuel Processing Technology***, v. 191, p. 232-247, 2019.
- DINNEBIER, Helga Cristina Fuhrmann et al. Phycoremediation and biomass production from high strength swine wastewater for biogas generation improvement: An integrated bioprocess. ***Bioresource Technology***, v. 332, p. 125111, 2021.

- DREXLER, Ivy LC et al. Implications of nutrient removal and biomass production by native and augmented algal populations at a municipal wastewater treatment plant. **Water science and technology**, v. 70, n. 7, p. 1152-1160, 2014.
- FERREIRA, Gabriela F. et al. Biomass and lipid characterization of microalgae genera *Botryococcus*, *Chlorella*, and *Desmodesmus* aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-15, 2019.
- FIGUEIREDO FILHO, Dalson Britto; SILVA JÚNIOR, José Alexandre. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.
- FONTOURA, J. T. DA. Crescimento de microalgas em efluente de curtume : remoção de nutrientes , viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual. [s.l.] Tese (Doutorado em Engenharia: Departamento de Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- GANESAN, Ramya et al. A review on prospective production of biofuel from microalgae. **Biotechnology Reports**, p. e00509, 2020.
- GONZÁLEZ-CAMEJO, Josué et al. Outdoor microalgae-based urban wastewater treatment: Recent advances, applications, and future perspectives. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Water**, v. 8, n. 3, p. e1518, 2021.
- HAKALIN, N. et al. Enhancement of cell growth and lipid content of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. by optimizing nitrogen, phosphorus and vitamin concentrations for biodiesel production. **Natu Science**; p. 1044–1054. 2014.
- HANIFZADEH, MohammadMatin; GARCIA, Elena Cerdan; VIAMAJALA, Sridhar. Production of lipid and carbohydrate from microalgae without compromising biomass productivities: Role of Ca and Mg. **Renewable Energy**, v. 127, p. 989-997, 2018.
- HU, Jianjun et al. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 1, p. 54-67, 2018.
- HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, v. 54, n. 4, p. 621–39, 2008.
- HUANG, Qingshan et al. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. **Engineering**, v. 3, n. 3, p. 318-329, 2017.
- HYPOLITO, Marcel Lúcio et al. Produção e caracterização das misturas do diesel com biodiesel de óleo de milho. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 14, n. 4, p. 1-16, 2021.
- IASIMONE, F. et al. Effect of light intensity and nutrients supply on microalgae cultivated in urban wastewater: Biomass production, lipids accumulation and settleability characteristics. **Journal of environmental management**, v. 223, p. 1078-1085, 2018.
- ISLAM, M. A. et al. Influence of fatty acid structure on fuel properties of algae derived biodiesel. *Procedia Engineering*, v. 56, p. 591–596, 2013.

- KHAN, Muhammad Imran; SHIN, Jin Hyuk; KIM, Jong Deog. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018.
- KHANZADA, Zareen T. Remoção de fósforo de lixiviado de aterro por microalgas. **Relatórios de biotecnologia**, v. 25, p. e00419, 2020.
- KIM, J. et al. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 6, p. 862–76, 2013.
- KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 1059– 1070, 2005.
- LEITE, L. DE S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggyery wastewater treatment in Brazil. *Journal of Water Process Engineering*, v. 31, p. 100821, 2019.
- LEVASSEUR, Wendie; PERRÉ, Patrick; POZZOBON, Victor. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology advances**, v. 41, p. 107545, 2020.
- LI, Gang et al. Nutrients removal and biomass production from anaerobic digested effluent by microalgae: A review. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 12, n. 5, p. 8-13, 2019.
- MAGRO, FRANCISCO G.; FREITAG, JOÃO F. ; BERGOLI, ANDRÉ ; COSTA, JORGE ALBERTO VIEIRA ; COLLA, LUCIANE M. . Microalgae Consortia for Post-treating Effluent of Anaerobic Digestion of Cattle Waste and Evaluation of Biochemical Composition of Biomass. *BioEnergy Research JCR*, v. 1, p. 1-1, 2021.
- MAHLIA, T. M. I. et al. Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 118, p. 109526, 2020.
- MASOJÍDEK, Jiří et al. Changes in photosynthesis, growth and biomass composition in outdoor *Chlorella g120* culture during the metabolic shift from heterotrophic to phototrophic cultivation regime. **Algal Research**, v. 56, p. 102303, 2021.
- MASROOR, M.; MEHRVAR, M. e EIN-MOZAFFARI, F. An Overview of the Integration of Advanced Oxidation Technologies And Other Processes For Water And Wastewater Treatment. **International Journal of Engineering**, v. 3, n. 2, p. 120- 146, 2009.
- 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, p. 217–232. 2010.
- MEDINA, Eliel Cunha et al. Reuso da vinhaça na produção de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 14, n. 4, p. 4154-4161, 2020.
- MENEGAZZO, M. L. et al. Production of biodiesel via methyl and ethyl routes from Nile tilapia and hybrid Sorubim crude oils. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 3, n. 1, p. 150–154, 2015.

- MENEGAZZO, Mariana Lara et al. Cultivo de *Chlorella sorokiniana* para extração de óleo e produção de biodiesel. 2017.
- MENEGAZZO, Mariana Lara et al. Evaluation of *Chlorella sorokiniana* cultivated in outdoor photobioreactors for biodiesel production. **Biofuels**, p. 1-6, 2020.
- MENEGAZZO, Mariana Lara; FONSECA, Gustavo Graciano. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 87-107, 2019.
- MENEGAZZO, Mariana Lara; GELINSKI, Jane Mary Lafayette Neves; FONSECA, Gustavo Graciano. Evaluation of methods of biomass recovery and lipid extraction for microalgae. In: **Phycobiotechnology**. Apple Academic Press, 2021. p. 215-250.
- MOFIJUR, M. et al. Effect of nanocatalysts on the transesterification reaction of first, second and third generation biodiesel sources-A mini-review. **Chemosphere**, p. 128642, 2020.
- MORAES CHITOLINA, Gustavo; HARDER, Márcia Nalesso Costa. Avaliação da viabilidade do uso de vinhaça como adubo. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 10, n. 2, p. 08-24, 2021.
- MOREIRA, Icaro Thiago Andrade; MARQUES, Isadora Machado. BIORREMEDIAÇÃO DE ÁREAS COSTEIRAS IMPACTADAS POR PETRÓLEO. **Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, v. 18, 2020.
- MUBARAK, M.; SHAIJA, A.; SUCHITHRA, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, v. 7, p. 117–123, 2015.
- MUSTAFA, Shazia et al. Microalgae biosorption, bioaccumulation and biodegradation efficiency for the remediation of wastewater and carbon dioxide mitigation: Prospects, challenges and opportunities. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, p. 102009, 2021.
- NASSEF, Ahmed M. et al. Fuzzy-modeling with Particle Swarm Optimization for enhancing the production of biodiesel from Microalga. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 41, n. 17, p. 2094-2103, 2019.
- NOIE, J. D.; LALIBERT, G. e PROULX, D. Algae and waste water. *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures*, p. 247-254, 1992.
- ODJADJARE, Ejovwokoghene Collins et al. Evaluation of pre-chlorinated wastewater effluent for microalgal cultivation and biodiesel production. **Water**, v. 10, n. 8, p. 977, 2018.
- OLIVEIRA, Gislayne Alves et al. Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond. **Bioresource technology**, v. 259, p. 334-342, 2018.
- PATEL, Anil Kumar et al. Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. **Bioresource technology**, v. 282, p. 245-253, 2019.
- PATEL, Anil Kumar et al. Recent advancements in mixotrophic bioprocessing for production of high value microalgal products. **Bioresource technology**, p. 124421, 2020.

- PENTEADO, Mauricio Cabral et al. Análise do potencial de geração de biogás a partir da biodigestão anaeróbia da vinhaça e bagaço de cana. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 3, n. 1, p. 26-33, 2017.
- PETKOV, G.; GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, n. 5, p. 281–285, 2007.
- PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environmental Science Pollution Research*, 20(8), p. 5096- 5105, 2013.
- QIU, R. et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, v. 28, p. 192–199, dez. 2017.
- RAMIREZ, Nelzy Neyza Vargas; FARENZEN, Marcelo; TRIERWEILER, Jorge Otávio. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. *Agriculture, Agribusiness and Biotechnology. Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 57, 2014.
- RAMÍREZ-VERDUZCO, L. F.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, J. E.; JARAMILLO-JACOB, A. D. R. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel*, v. 91, n. 1, p. 102–111, 2012.
- RAMOS, M. J. et al. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 1, p. 261–8, 2009.
- RAWAT, I. et al. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444–467, 2013.
- SALGOT, Miquel; FOLCH, Montserrat. Wastewater treatment and water reuse. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 2, p. 64-74, 2018.
- SCOTT, Stuart A. et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current opinion in biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277-286, 2010.
- SINGH, Digambar et al. A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. **Fuel**, v. 262, p. 116553, 2020.
- SOTO, Miguel Alfaro; BASSO, Juliana Broggio; KIANG, Chang Hung. Impacto da Fertirrigação da Cana-De-Açúcar por Vinhaça nas Propriedades Físicas, Químicas e Hidráulicas do Solo. **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**, p. 103, 2017.
- SU, Yanyan. Revisitando o metabolismo do carbono, nitrogênio e fósforo em microalgas para tratamento de águas residuais. **Ciência do Meio Ambiente Total** , p. 144590, 2020.
- SUPARMANIAM, Uganeeswary et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, p. 109361, 2019.
- SUPPES, G. J. *The Biodiesel Handbook*. [s.l.] Elsevier, 2010.
- TALEBI, A. F. et al. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Research*, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TALEBI, Ahmad Farhad; TABATABAEI, Meisam; CHISTI, Yusuf. BiodieselAnalyzer: a user-friendly software for predicting the properties of prospective biodiesel. **Biofuel Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 55-57, 2014.

TAN, Jia Sen et al. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 116-129, 2020.

TAN, Xiao-Bo et al. Lipids production and nutrients recycling by microalgae mixotrophic culture in anaerobic digestate of sludge using wasted organics as carbon source. **Bioresource technology**, v. 297, p. 122379, 2020.

TAN, Xin Bei et al. Cultivation of microalgae for biodiesel production: a review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 17-30, 2018.

TANG, Doris Ying Ying et al. Green technology for the industrial production of biofuels and bioproducts from microalgae: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-19, 2020.

TANG, Doris Ying Ying et al. Potential utilization of bioproducts from microalgae for the quality enhancement of natural products. **Bioresource technology**, v. 304, p. 122997, 2020.

UDAIYAPPAN, Ainil Farhan Mohd et al. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. **Journal of Water Process Engineering**, v. 20, p. 8-21, 2017.

WANG, L. et al. Influence of fatty acid composition of woody biodiesel plants on the fuel properties. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, v. 40, n. 4, p.397–404, 2012.

WANG, Qing et al. Growth enhancement of biodiesel-promising microalga *Chlorella pyrenoidosa* in municipal wastewater by polyphosphate-accumulating organisms. **Journal of Cleaner Production**, v. 240, p. 118148, 2019.

WU, Jingcheng et al. Extração aprimorada de lipídios de microalgas com mistura ecologicamente correta de metanol e acetato de etila para produção de biodiesel. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 71, p. 323-329, 2017.

XU, Zhanpeng et al. Classification, identification, and growth stage estimation of microalgae based on transmission hyperspectral microscopic imaging and machine learning. **Optics Express**, v. 28, n. 21, p. 30686-30700, 2020.

YAAKOB, Maizatul Azrina et al. Influência de nitrogênio e fósforo no crescimento de microalgas, biomassa, lipídios e produção de ácidos graxos: uma visão geral. **Células**, v. 10, n. 2, pág. 393, 2021.

YEN, Hong-Wei et al. Design of photobioreactors for algal cultivation. In: **Biofuels from algae**. Elsevier, p. 225-256. 2019.

ZHAN, Jiao; RONG, Junfeng; WANG, Qiang. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International journal of hydrogen energy**, v. 42, n. 12, p. 8505-8517, 2017.

ZHUANG, Lin-Lan et al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, p. 1110-1119, 2018.