



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



**AVALIAÇÃO DO USO DE MICROALGAS NA REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E METAIS DE EFLUENTE CONTENDO SORO DE
QUEIJO**

Tamires de Almeida Pires

UBERLÂNDIA
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO USO DE MICROALGAS NA REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E METAIS DE EFLUENTE CONTENDO SORO DE
QUEIJO**

Tamires de Almeida Pires

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Regina Xavier Batista

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

UBERLÂNDIA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P667a Pires, Tamires de Almeida, 1992-
2019 Avaliação do uso de microalgas na remoção de nutrientes e metais de efluente contendo soro de queijo [recurso eletrônico] / Tamires de Almeida Pires. - 2019.

Orientadora: Fabiana Regina Xavier Batista.

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.3010>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. 2. Microorganismos. 3. Laticínios. 4. Soro de queijo. 5. Microalgas. I. Batista, Fabiana Regina Xavier, 1976-, (Orient.). II. Cardoso, Vicelma Luiz, 1960-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU: 66.0

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

DEFESA DE: Dissertação de Mestrado Acadêmico, 05/2019, PPGEQ

DATA: 14 de fevereiro de 2019 - 09:00

DISCENTE: 11712EQU012 - Tamires de Almeida Pires

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo da recuperação de carga orgânica e de metais em efluentes aquosos utilizando microalgas

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos Químicos

LINHA DE PESQUISA: Engenharia Bioquímica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Avaliação do potencial tecnológico da produção de etanol por algas verdes

Às 09 horas do dia 14 de fevereiro do ano de 2019, na sala 1K224 - *Campus* Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM; Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros - FEQUI/UFU; Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU; Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU, coorientadora e Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa, Profa. Dra. Fabiana Regina Xavier Batista, apresentou a Comissão Examinadora e a Candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata aprovada e se estabeleceu novo título para o trabalho: Avaliação do uso de microalgas na remoção de nutrientes e metais de efluente contendo soro de queijo.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 15 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU - Orientadora

Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU - Coorientadora

Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM

Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros - FEQUI/UFU

Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2019, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2019, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Andrade Lemos, Usuário Externo**, em 14/02/2019, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2019, às 11:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2019, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0979209** e o código CRC **31F9E75E**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela minha vida, pelas oportunidades e por me proporcionar desenvolver este trabalho.

Agradeço aos meus pais, Roberto e Lucimeire, por todo amor, apoio e incentivo. Por sempre acreditarem em mim e torcerem pelas minhas vitórias. À minha irmã, Talita, pelo companheirismo e estar sempre ao meu lado.

Ao meu marido, André, pelo seu amor, apoio, paciência e colaboração. Sempre me dando forças e fazendo eu me sentir capaz de chegar cada vez mais longe.

Ao Teddy, meu “cãopanheiro” de todas as horas.

Agradeço a todos os professores e funcionários da PPGEQ/UFU pelo auxílio. Em especial às minhas orientadoras, Fabiana e Vicelma, pela disponibilidade, dedicação e por todo o conhecimento repassado.

Às minhas amigas Amanda e Suellen, pela companhia, carinho e compreensão. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Aos colegas de laboratório pela amizade, risadas, auxílio. Sou muito feliz por ter convivido com vocês ao longo desse tempo.

Às alunas de iniciação científica, Lauana, Amanda, Gabriela e Daniela, por toda a ajuda prestada. Vocês foram muito importantes na realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida. À Capes, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro. Ao Banco de Microrganismos Aidar & Kutner, do Instituto oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP) por ceder as microalgas utilizadas.

Enfim, minha eterna gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento faz com que elas se sintam humildes”

Leonardo Da Vinci

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Microalgas	5
3.1.1 Condições de cultivo	6
3.1.2 Sistemas de cultivos	10
3.1.3 Fatores que influenciam a produção de biomassa	12
3.1.4 Bioprodutos e Aplicações das microalgas	18
3.1.5 Microalgas e o tratamento de efluentes	21
3.2 Águas residuais.....	23
3.2.1 Processos de tratamentos de efluentes.....	25
3.3 Soro de queijo e o tratamento de efluentes.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Microalgas e meio de cultivo.....	32
4.2 Cultivo do inóculo	33
4.3 Caracterização do efluente da indústria de laticínio.....	33
4.4 Avaliação do potencial de remoção de nutrientes e carga orgânica do meio de cultivo padrão	35
4.5 Cultivo da microalga no soro de queijo bruto e coagulado	35
4.6 Avaliação da superconcentração de inóculo para tratamento do soro de queijo	35
4.7 Metodologia analítica	36
4.7.1 Contagem biológica de célula	36
4.7.2 Determinação da densidade de biomassa	36
4.7.3 Determinação da clorofila total	36
4.7.4 Determinação de Fósforo solúvel	37
4.7.5 Determinação de Proteína total.....	38
4.7.6 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO).....	39
4.7.7 Determinação de sólidos totais, fixos e voláteis.....	40
4.7.8 Determinação de Metais	41
4.7.9 Determinação de açúcares e etanol.....	41
4.7.10 Determinação da Turbidez.....	41
4.7.11 Determinação da Condutividade	41
4.7.12 Determinação de Carbono e Nitrogênio Total.....	42
4.7.13 Determinação do pH.....	42
4.8 Determinação de parâmetros cinéticos: máxima taxa específica de crescimento e tempo de duplicação.....	42
4.9 Determinação da eficiência de remoção	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Curva de crescimento e remoção de nutrientes em meio de cultivo padrão.....	44

5.1.1 <i>Spirulina platensis</i>	44
5.1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	45
5.2 Caracterização do soro de leite	47
5.3 Ensaio com soro de queijo bruto.....	49
5.4 Ensaio com soro de queijo coagulado.....	55
5.5 Ensaio com aumento de inóculo	68
6 CONCLUSÃO	77
7 ETAPAS FUTURAS	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICE 1.....	94
Apêndice 1.1 Curva de calibração da microalga <i>Spirulina platensis</i>	94
Apêndice 1.2 Curva de calibração da microalga <i>C. vulgaris</i>	95
Apêndice 1.3 Curvas de calibração para análise de proteína.....	96
Apêndice 1.4 Curva de calibração para análise de Demanda Química de Oxigênio.....	97
Apêndice 1.5 Curva de calibração para análise de fósforo	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases do crescimento de um microrganismo.	8
Figura 2. Fotobiorreatores em sistema aberto.	11
Figura 3. Fotobiorreatores em sistema fechado.	12
Figura 4. Esquema dos ensaios para avaliação do potencial de microalgas no tratamento de efluentes.	34
Figura 5. Curva de crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i>	44
Figura 6. Curva de crescimento da alga verde <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BBM.	46
Figura 7. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo bruto.	52
Figura 8. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo bruto.	52
Figura 9. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo.	53
Figura 10. Variação da concentração de fósforo do meio ao longo dos dias de cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo soro de queijo.	54
Figura 11. Curva de crescimento celular da <i>Chlorella vulgaris</i> ao longo dos dias de cultivo em meio BBM e meio contendo soro de queijo coagulado.	56
Figura 12. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.	58
Figura 13. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.	58
Figura 14. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.	64
Figura 15. Variação da concentração de Fósforo ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.	65
Figura 16. Aumento do teor de clorofila na microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.	66
Figura 17. Aumento do teor de proteína na microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.	66
Figura 18. Redução do teor de carbono pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.	67
. Figura 19. Redução do teor de nitrogênio pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.	67
Figura 20. Redução do teor de fósforo pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.	68

Figura 21. Redução da demanda química de oxigênio pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado. .	68
Figura 22. Curva de Crescimento Celular da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio BBM e em meio contendo 10% de soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.....	69
Figura 23. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.....	71
Figura 24. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.	71
Figura 25. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e diferentes concentrações de inóculo.	72
Figura 26. Variação da Concentração de Fósforo ao longo do cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.	73
Figura 27. Variação do pH dos meios de cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> com aumento de inóculo e contendo 10% de soro de queijo.....	76
Figura 28. Curva de Calibração da microalga <i>Spirulina platensis</i>	94
Figura 29. Curva de Calibração da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	95
Figura 30. Curva de calibração para baixas concentrações de proteína.....	96
Figura 31. Curva de calibração para altas concentrações de proteína.	96
Figura 32. Curva de calibração da Demanda Química de Oxigênio.....	97
Figura 33. Curva de Calibração da concentração de Fósforo.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de diferentes fontes de alimentos e algas (% em peso seco).	5
Tabela 2. Produtos sintetizados por microalgas e suas aplicações.	6
Tabela 3. Remoção de nitrogênio e fósforo nos cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes.	27
Tabela 4. Características físico-químicas de soros de ricota coletados no Vale do Taquari. Fonte: Bald et al., 2014.	29
Tabela 5. Características físico-químicas de efluentes gerados em diferentes indústrias de laticínios. Fonte: Minas Ambiente/CETEC (2000).	30
Tabela 6. Composição do meio Bold's Basal Medium.	32
Tabela 7. Composição do meio Zarrouk.	33
Tabela 8. Composição da solução A ₅ utilizada na produção do meio Zarrouk.	33
Tabela 9. Variação da quantidade de carbono, fósforo, nitrogênio do meio de cultivo e acúmulo de clorofila e proteína no interior da célula da microalga <i>Spirulina platensis</i>	45
Tabela 10. - Variação da quantidade de carbono, fósforo, nitrogênio do meio de cultivo e acúmulo de clorofila e proteína no interior da célula da microalga <i>C. vulgaris</i>	47
Tabela 11. Caracterização do soro de queijo bruto e coagulado.	48
Tabela 12. Concentração de clorofila no primeiro e último dia do ensaio de <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de leite em diferentes concentrações.	49
Tabela 13. Produção de etanol (g/L) pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio suplementado com soro de queijo.	51
Tabela 14. Variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do meio, dada em g/L, ao longo dos dias de cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo soro de queijo.	53
Tabela 15. Variação do teor de lactose (g/L) no meio de cultivo com soro de queijo utilizando a microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	55
Tabela 16. Concentração de clorofila total no primeiro e último dia do ensaio de <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado em diferentes concentrações.	56
Tabela 17. Concentração de proteína (mg/L) ao longo do ensaio com <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo em soro de queijo coagulado em diferentes concentrações. .	57
Tabela 18. Produção de etanol (g/L) pela microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio suplementado com soro de queijo coagulado.	57
Tabela 19. Variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) longo dos dias de cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.	64
Tabela 20. Variação do teor de lactose (g/L) no meio de cultivo contendo soro de queijo coagulado utilizando a microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	65

Tabela 21. Concentração de clorofila no primeiro e último dia do ensaio de <i>Chlorella vulgaris</i> em soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.....	70
Tabela 22. Concentração de proteína (mg/L) ao longo do cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> em soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.....	70
Tabela 23. Variação da Demanda Química de Oxigênio do meio ao longo dos dias de cultivo da <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.....	73
Tabela 24. Remoção de metais, em seis dias de cultivo, em ensaios com diferentes concentrações de inóculo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio contendo 10% de soro de queijo coagulado.	74
Tabela 25. Variação do teor de lactose em g/L nos cultivos da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em meio com 10% de soro.....	76

RESUMO

As microalgas têm se mostrado promissoras para diversas aplicações devido à sua elevada capacidade de absorver ou adsorver diversos componentes presentes no meio em que se encontram e por sintetizarem produtos de alto valor comercial. Como seu cultivo apresenta baixo custo e fácil manutenção, a avaliação de seu potencial em diversas aplicações tecnológicas tornou-se relevante. Os principais nutrientes requeridos pelo metabolismo desses microrganismos são carbono, nitrogênio e fósforo. Tais elementos encontram-se presentes em efluentes de diversas indústrias como, por exemplo, no soro de queijo e no efluente final da indústria de laticínios. Sendo assim, o cultivo das microalgas em águas residuais com o objetivo de diminuir os teores destes componentes é uma alternativa possível para o seu tratamento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de microalgas tratarem o efluente da indústria de laticínios. O primeiro ensaio foi realizado utilizando a alga verde *Chlorella vulgaris* e a cianobactéria *Spirulina platensis* em meio de cultivo padrão. Posteriormente, seguiu-se com os ensaios com a *C. vulgaris* em meio contendo soro de queijo bruto e pré-tratado por coagulação. Sendo que, 0,1 g/L da microalga foi inoculada em diferentes concentrações de soro de queijo diluído em meio BBM. Por último, foi avaliado a eficiência do aumento da concentração de inóculo, nos valores de 0,2, 0,4 e 1,0 g/L para o tratamento do efluente. Utilizou-se, nesse caso, meio contendo 10% de soro de queijo coagulado. A capacidade das microalgas em tratar o efluente foi medida através das análises de remoção de carbono, nitrogênio, fósforo, DQO, lactose e metais (Mg, Na, Ca, K e Fe) do meio. Avaliou-se, também, a produção de proteína, etanol, biomassa e clorofila. Nos ensaios preliminares, as duas microalgas removeram carbono, nitrogênio e fósforo, mostrando-se capazes de serem utilizadas no tratamento de águas residuais. Como a *C. vulgaris* apresentou uma taxa de crescimento maior e resultados promissores nos ensaios em meio de cultivo padrão, ela foi utilizada no tratamento de efluente contendo soro de queijo. Nos ensaios com efluente bruto, a máxima remoção alcançada foi: 50% de carbono, 59% de nitrogênio, 90% de DQO, 53% de fósforo e 76% de lactose. Ocorreu a produção de etanol (os meios com presença de 25, 50 e 100% de soro de queijo), clorofila (em meio BBM e meio contendo 1% de soro) e proteína (em meio BBM e na presença de 1 e 10% de soro). Para o soro pré-tratado por coagulação, não houve aumento na remoção desses elementos em relação ao soro bruto, contudo, houve aumento no acúmulo de clorofila, etanol e proteína. O aumento da concentração de inóculo resultou em incrementos na redução de carbono no meio, chegando a 89%, e nitrogênio, a 78%. Nesse caso, obteve-se, também, a remoção de metais pela alga verde, o que não foi possível nos ensaios anteriores. Dessa forma, pode-se concluir que as microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* possuem grande potencial para tratamento de efluentes, sendo que esta última se mostrou capaz de remover compostos presentes no efluente da indústria de laticínio que levam à poluição do meio ambiente. Além disso, em certas condições, foi possível a produção de compostos de interesse comercial como etanol, clorofila e proteína.

Palavras-chaves: Microrganismos. Laticínio. Carbono. Nitrogênio. Fósforo. Metais.

ABSTRACT

Microalgae have shown promise for several applications due to their high capacity to absorb or adsorb diverse components present into the medium where they are found and for synthesizing products of high commercial value. Since its cultivation presents low cost and easy maintenance, the evaluation of its potential in diverse technological applications has become relevant. The main elements required by the metabolism of these microorganisms are carbon, nitrogen and phosphorus. As these components are present in effluents from several industries such as cheese whey and final effluent from the dairy industry, the cultivation of these microorganisms in order to reduce the levels of such elements is a possible alternative for treatment waste. Moreover, the aim of the current work was to evaluate the ability of microalgae to treat the effluent from the dairy industry. The first assay was performed using *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* in standard culture medium. Subsequently, assays were performed with *C. vulgaris* in medium containing cheese whey with and without treatment. Since, 0.1 g/L of the microalga was inoculated at different concentrations of cheese whey diluted in BBM medium. Finally, the efficiency of increases in the inoculum concentration was evaluated, at concentrations of 0.2, 0.4 and 1.0 g/L, in the effluent treatment. In this case, medium containing 10% of whey cheese was used. The microalgae capacity was measured through carbon, nitrogen, phosphorus, COD, lactose and metal removal analyzes. It was also evaluated the production of protein, ethanol, biomass and chlorophyll. In the preliminary tests, both microalgae removed carbon, nitrogen and phosphorus, being able to be used in the treatment of wastewater. As *C. vulgaris* presented a higher growth rate and promising results in assays with basal medium, it was used in the treatment of cheese whey. In the effluent without treatment tests, maximum removal achieved was: 50% carbon, 59% nitrogen, 90% COD, 53% phosphorus and 76% lactose. Ethanol production (in the presence of 25, 50 and 100% cheese whey), chlorophyll (in BBM medium and medium containing 1% cheese whey) and protein (in BBM medium and in the presence of 1 and 10% of cheese whey) were verified. For the treated cheese whey, there was no increase in the removal of these elements in relation to the without treated cheese whey. However, there was accumulation of protein at all effluent concentrations. Increases in the inoculum concentration resulted in the reduction of carbon, reaching 89% and nitrogen, 78%. In this case, the removal of metals (Calcium, Iron, Magnesium, Potassium and Calcium) by green algae was also obtained, which was not possible in the previous tests. It can be concluded that the microalgae *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* have great potential for effluent treatment. The latter was able to remove compounds present in the effluent from the dairy industry that lead to pollution of the environment. In addition, under certain conditions, it was possible to produce compounds of commercial interest such as ethanol, chlorophyll and protein.

Keywords: Microorganisms. Dairy. Carbon. Nitrogen. Phosphor. Metals.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado o potencial das microalgas em diversas aplicações tecnológicas. Elas são capazes de absorver (MIYACHI et al., 1964; SAXEMA; MISRA, 2010) ou adsorver (EL-SHEEKH et al., 2015; AQUINO; STUCKEY, 2007) determinados elementos presentes em seu meio de cultivo devido às suas necessidades nutricionais ou por atração da superfície da célula (DELRUE et al., 2016). Os principais nutrientes requeridos para o metabolismo das microalgas e que podem ser removidos das águas residuais são carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) e é através deles que as microalgas se mantêm e produzem diferentes bioprodutos, como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas, lipídeos, carotenóides e clorofila.

Sendo assim, as microalgas podem ser usadas no tratamento de efluentes através da sua capacidade para remoção de bactérias coliformes, redução da demanda química (DQO) e bioquímica de oxigênio (DBO), remoção de N e/ou P e também para remoção de metais pesados (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012; PRIYA et al., 2014). O tratamento biológico com microalgas é particularmente atraente devido à sua capacidade fotossintética, convertendo energia solar em biomassas úteis e incorporando nutrientes que podem poluir o meio ambiente (DE LA NOÛE; DE PAUW, 1988; CHISTI, 2007; WANG et al., 2008; HAMEED; EBRAHIM, 2007).

A crescente demanda por produtos e serviços tem elevado drasticamente a atividade industrial, gerando cada vez mais resíduos. O aumento da poluição, a industrialização e o rápido desenvolvimento econômico impõem sérios riscos à disponibilidade e qualidade dos recursos hídricos em muitas áreas do mundo. Em termos de saúde, meio ambiente e economia, a luta contra a poluição tornou-se uma questão importante.

Faz-se necessário, então, aliar o desenvolvimento econômico com proteção ambiental, desenvolvendo novos produtos, novas alternativas de processos e técnicas eficientes no combate e remediação da poluição, tornando, assim, a atividade industrial menos impactante ao meio ambiente. Os processos biológicos tornaram-se uma opção interessante pela possibilidade de combinação entre o tratamento de águas residuais e a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, agregando valor ao processo final (QUEIROZ et al., 2011).

A ideia da utilização de microalgas no tratamento de efluentes não é recente, mas é ainda muito limitada em larga escala, ainda que esses microrganismos se mostrem muito eficientes

na remoção da carga orgânica do meio. Alguns autores (NEVES et al., 2013; QUEIROZ et al., 2007; KÖNING et al., 2014; SALES; ABREU et al., 2012; CHAVES et al., 2012) têm estudado a capacidade desses microrganismos no tratamento de efluentes, porém, ainda são poucos os estudos que avaliam a utilização do efluente de laticínios.

A atividade industrial do setor de laticínios está entre as maiores do mundo. Todo ano várias toneladas de leite são processadas para comercialização tanto do leite puro quanto para a produção de derivados. Durante o processamento, uma grande quantidade de efluente é gerada, seja pela lavagem dos equipamentos, derramamentos de produtos ou pelos subprodutos gerados na produção. Estima-se que a cada litro de leite processado são gerados de quatro a doze litros de efluentes (MARTINS NETO, 2018).

O subproduto de maior significância na indústria de laticínios é o soro gerado no processo de separação da caseína do leite para produção do queijo. Ele representa 80 a 90% do volume total de leite que entra no processo, possuindo 55% dos seus nutrientes. O soro de queijo possui elevada concentração de matéria orgânica e, por isso, deve ser encaminhado às plantas de tratamento de efluentes antes do lançamento em corpos hídricos. Portanto, a geração deste soro representa um custo de produção para as indústrias de laticínios (PRAZERE; CARVALHO, RIBAS, 2012).

Além do soro, os demais efluentes gerados nesse tipo de indústria apresentam altos teores de óleos e graxas, e se caracterizam pela presença de sólidos suspensos, matéria orgânica expressa como DBO e DQO, odor originado pela decomposição da caseína e metais como sódio, cálcio e ferro. Dessa forma, os resíduos gerados no processamento do leite são um grande problema ambiental, havendo a exigência do seu tratamento a fim reduzir os parâmetros que podem poluir o meio ambiente. Tanto o soro de queijo, quanto o efluente final gerado pela indústria de laticínios são compostos por altos teores de carbono, nitrogênio, fósforo, que são elementos requeridos pelo metabolismo das microalgas (BALD et al., 2014). Assim, o cultivo desses microrganismos com o objetivo de diminuir os teores de tais elementos é uma alternativa possível para tratamento desses efluentes.

Existem diversos fatores que influenciam a remoção de compostos do meio pelas microalgas. A espécie utilizada é um fator de grande influência devido às diferentes necessidades nutricionais nos diferentes microrganismos (LAVENS; SORGELOOS, 1996). As condições de cultivo, como temperatura, pH, nutrientes, luminosidade, também afetam a eficiência na atividade metabólica (NG et al., 2015). Dessa forma, é necessário encontrar as

condições mais adequadas para que o tratamento de efluentes por microalgas se torne uma alternativa aplicável.

Sendo assim, o presente trabalho buscou avaliar a utilização de microalgas para tratamento do soro de queijo, subproduto gerado na indústria de laticínios, através da remoção de carbono, nitrogênio, fósforo e metais e investigar a capacidade desses microrganismos em produzir compostos de alto valor comercial como clorofila, proteína e etanol.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial das microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* no tratamento do soro de queijo.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o crescimento das microalgas e a capacidade de remoção de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) e acúmulo de proteína e clorofila pela *S. platensis* e *C. vulgaris* quando cultivadas em meio basal padrão;
- Reduzir os teores de C, N, P, Demanda Química de oxigênio (DQO), lactose e metais (Na, Mg, K, Fe e Ca) e produzir metabólitos (proteína total, clorofila e etanol) através do cultivo da microalga em diferentes diluições do soro de queijo;
- Avaliar a influência do aumento da concentração de inóculo de microalgas no tratamento do soro de queijo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

As microalgas são organismos unicelulares ou coloniais fotossintéticos e estão naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos/úmidos (BRASIL, GARCIA, 2016). Podem ser encontradas em diferentes lugares, desde rios de água doce até lagos salgados e solos terrestres, apresentando-se como células isoladas, agrupadas formando colônias ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de célula. Estes microrganismos podem ou não apresentar motilidade ou ainda viver em associação simbiótica. Entretanto, a maioria são de vida livre e têm tolerância para uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentração de O₂ e CO₂. São considerados fundamentais para a manutenção da vida na Terra uma vez que participam, juntos das macrófitas aquáticas, da produção de maior parte do O₂ da atmosfera (FONTOURA, 2017).

As microalgas possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, etc.), sendo que essa composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga e aos fatores ambientais relacionados às condições de cultivo (MIAO; WU, 2006; ZAMALLOA et al., 2011). A Tabela 1 mostra a composição química de diferentes espécies em comparação com outras fontes alimentícias.

Tabela 1. Composição de diferentes fontes de alimentos e algas (% em peso seco).

Commodity	Proteína	Carboidrato	Lipídio
Levedura	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9

Fonte: Becker, 2004; Becker, 2007.

O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido. Existem citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo.

Essa diversidade também se reflete na composição bioquímica e, por isso, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (NORTON et al., 1996; PULZ; GROSS, 2004).

Segundo Brasil e Garcia (2016), a biomassa de algas possui alta produtividade, captura de carbono altamente eficiente, acúmulo de elevado teor de lipídeos ou amido, que podem ser utilizados para produção de biodiesel ou etanol, respectivamente, pode ser cultivada em água do mar, água salobra ou mesmo em águas residuais e produzidas sobre terras não agricultáveis. As microalgas também podem ser colhidas continuamente ao longo do ano em regiões tropicais.

A simplicidade na estrutura desses organismos permite seu rápido crescimento, despertando o interesse por aplicações biotecnológicas. Suas exigências nutricionais não são elevadas e o crescimento eficiente na presença de luz viabiliza sua produção em biorreatores abertos, com água de seu ambiente natural, permitindo uma produção economicamente competitiva.

Dessa forma, as microalgas podem ser usadas para elaboração de vários bioprodutos, tais como combustíveis, químicos, materiais, cosméticos, ração animal e suplementos alimentares. A Tabela 2 mostra alguns dos elementos sintetizados pelas microalgas e as possibilidades de aplicações. Além disso, esses microrganismos têm capacidade de consumir diversos componentes do meio de cultivo como carbono, fósforo e nitrogênio e adsorver elementos, como metais pesados, assim a aplicação para o tratamento de efluentes também é possível (LIMA et al. 2004).

Tabela 2. Produtos sintetizados por microalgas e suas aplicações.

Produto	Aplicação	Referência
Proteína	Alimentação humana ou animal	Soletto, 2005
Carboidrato	Etanol	BRENNAN; OWENDE, 2010
Lipídios	Biodiesel	AHMAD et al., 2011
Clorofila	Pigmentos	OLIVEIRA, 2012

3.1.1 Condições de cultivo

O cultivo de microalgas pode ser realizado por diferentes maneiras. Em cultura fotoautotrófica, as microalgas utilizam luz como fonte de energia e carbono inorgânico como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese (WANG; YANG; WANG, 2004; KANG et al., 2004).

O cultivo quimio-heterotrófico é realizado quando a espécie de microalga utiliza carbono orgânico como fonte de energia e de carbono. O crescimento heterotrófico aeróbio é um processo em que a assimilação de substratos orgânicos gera energia através da fosforilação oxidativa, acompanhada pelo consumo de oxigênio como o aceptor final de elétrons (KANG et al., 2004). Segundo Perez-Garcia e Bachan (2015), as vantagens do cultivo heterotrófico de microalgas, em comparação com o cultivo autotrófico são as seguintes:

- Maior taxa de crescimento e densidade de biomassa;
- Maior teor de lípidos por peso seco de células;
- Maior produtividade de biomassa por área de cultura;
- Projeto de biorreator de menor custo e mais simples;
- Processo de ampliação mais fácil;
- A possibilidade de manipular a composição da biomassa alterando o substrato orgânico do meio de cultura que estimula vias metabólicas e biossintéticas específicas;
- Potencial para remover carbono orgânico e outros compostos como nitrogênio e fósforo de efluentes.

O cultivo mixotrófico ocorre quando a microalga, sob fotossíntese, utiliza como fonte de carbono para o seu crescimento compostos orgânicos e CO₂ (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHEN et al., 2011b). Portanto, a autotrofia e a heterotrofia ocorrem simultaneamente (WANG et al., 2004). O CO₂ é fixado através da fotossíntese, que é influenciada pela iluminação, enquanto os compostos orgânicos são assimilados pela respiração aeróbica, que é afetada pela disponibilidade de carbono orgânico. Microalgas mixotróficas utilizam diferentes fontes de energia e carbono, podendo ser orgânicas ou inorgânicas e luz em diferentes combinações. A mixotrofia torna as microalgas mais flexíveis porque podem reunir demanda de carbono e energia por fontes orgânicas ou inorgânicas e luz simultaneamente (CHEN et al. 2011b). Em comparação com o crescimento de microalgas autotróficas comuns, abordagens heterotróficas e mixotróficas têm o potencial de fornecer maior biomassa e rendimento de compostos orgânicos valiosos

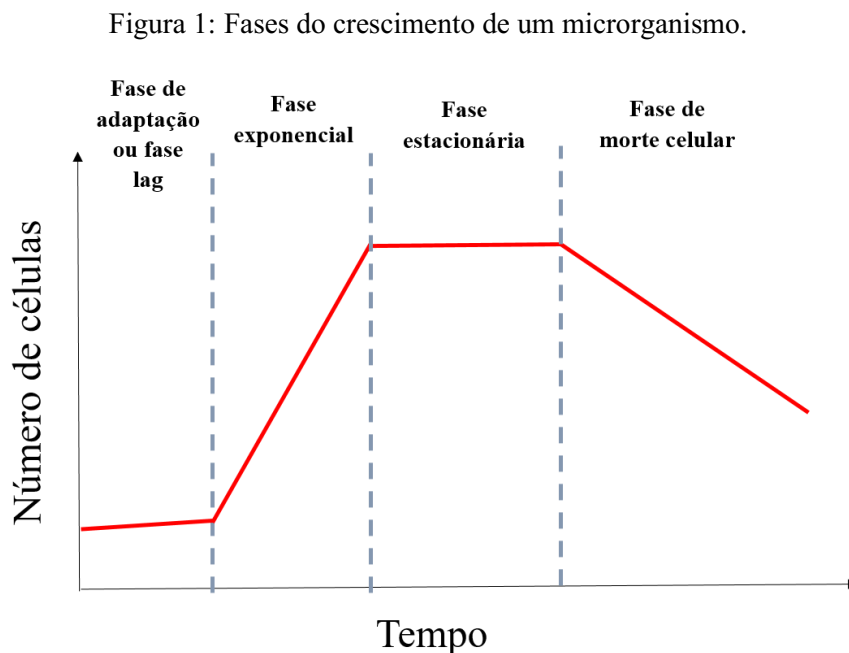
O crescimento mixotrófico oferece várias vantagens (PEREZ-GARCIA; BASHAN, 2015), como:

- Taxas de crescimento mais altas do que os regimes heterotróficos e autotróficos encurtando os ciclos de crescimento e produzindo maior biomassa;
- Fase de crescimento exponencial prolongada;

- Redução da biomassa perdida da respiração durante as horas escuras;
- Redução ou parada do efeito foto-inibitório;
- Flexibilidade para mudar o regime de cultivo para regimes heterotróficos ou autotróficos;
- Proteção contra dano foto-oxidativo estimulado pela acumulação de oxigênio em fotobiorreatores fechados.

Quanto às formas de condução dos cultivos, destacam-se os modos de operação em batelada, semicontínuo e contínuo. O cultivo em batelada é o mais simples para o cultivo de microalgas. Possui um tempo determinado e é caracterizado por modificações intensas na composição do meio de cultura e pelo efeito de sombreamento causado pela concentração celular. As células e os nutrientes são inoculados no meio no início do cultivo, não havendo nenhuma adição posterior (LOURENÇO, 2006).

No regime em batelada, as etapas de crescimento celular são bem definidas, conforme mostrado na Figura 1.



Fonte: A autora.

De acordo com Yuan-Kun, Hui (2004) e Lourenço (2006), essa curva típica de crescimento de microrganismos engloba, basicamente, quatro fases: adaptação, exponencial, estacionária e morte.

1 - Fase de adaptação ou fase *lag*: representa a fase de adaptação celular, ocorre devido ao período de adaptação fisiológica das células frente às modificações nas condições de cultivo ou à presença de células inviáveis no inóculo, podendo ser extensa na presença de compostos tóxicos ou de nutrientes dificilmente metabolizáveis.

2 - Fase exponencial ou fase *log*: é a fase de crescimento na qual a biomassa se duplica sucessivamente em intervalos regulares de tempo, as células se dividem como uma função exponencial do tempo, enquanto substratos, luz e temperatura adequada estiverem disponíveis.

3 - Fase estacionária: nesta etapa o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pelo acúmulo de produtos inibitórios do metabolismo. Como consequência, a velocidade de crescimento diminui e se iguala a taxa de morte. As microalgas mantêm por algum tempo a concentração de biomassa constante devido à utilização de reservas internas de nutrientes ou dos nutrientes que são libertados para o meio devido à lise de outras células.

4 - Fase de declínio ou de morte: é o resultado da depleção de nutrientes e do autossombreamento a um nível que não suporta o crescimento, bem como da possível ocorrência de um nível tóxico de metabólitos (YUAN-KUN; HUI, 2004; LOURENÇO, 2006).

Através da curva de crescimento, é possível calcular a taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de geração ou duplicação. O conhecimento desses parâmetros permite prever como evoluirá a concentração do microrganismo ao longo da fase exponencial. Além disso, podem dar indicação sobre a resposta do microrganismo às diversas condições ambientais incluindo a modificação do meio de cultura. O cálculo dos valores do tempo de duplicação e μ de um dado microrganismo, em condições de cultura diferentes, é útil, por exemplo, para selecionar as condições ótimas para o crescimento e estudar o efeito que uma determinada alteração das condições ambientais exerce sobre o crescimento do microrganismo.

Nos cultivos contínuos há um processo permanente de alimentação do meio de cultura e o volume de cultivo é mantido através da retirada de biomassa a uma vazão constante. A conservação do volume invariável no biorreator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, no qual a concentração de células e de substrato permaneça constante ao longo do tempo de operação (BORZANI et al., 2001). Neste processo ocorre um crescimento balanceado das microalgas, em que as células

são mantidas em estado exponencial. Porém, em muitos casos o modo de operação contínuo não se torna viável, econômica ou tecnicamente.

Uma aproximação desse processo contínuo é o modo semicontínuo, que consiste em um sistema em que há a retirada de produto e subsequente adição de meio de cultivo em intervalos de tempos periódicos. Esse procedimento é normalmente realizado com o cultivo na fase exponencial em que as células apresentam estado fisiológico muito favorável. Assim elas não irão sofrer com o efeito da diluição do meio de cultura, colocando o cultivo em um ciclo teoricamente sem limites (BORZANI et al., 2001; LOURENÇO, 2006). Este tipo de cultivo busca evitar o custo com o preparo de um novo inóculo para cada batelada, além de eliminar o tempo para obtenção do inóculo, bem como o consumo de nutrientes para tal (FONTOURA, 2017).

3.1.2 Sistemas de cultivos

Com relação ao cultivo de microalgas, atualmente são utilizados os fotobiorreatores, que podem ser classificados em dois tipos principais: sistemas abertos (tanques aerados de alta taxa e com extremidades elípticas (*raceway ponds*, lagos, etc), e sistemas fechados (tubular, reator em placa, cônico, piramidal, fermentador, etc) (DASGUPTA et al., 2010). A escolha do sistema é determinada pelas características do local de cultivo, pela espécie utilizada, quantidade de luz necessária, sistema de recuperação da biomassa e aplicação da biomassa (FONTOURA, 2017).

Nos sistemas abertos (Figura 2), as microalgas são cultivadas em lagoas ou tanques ao ar livre, expostos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação. São tanques geralmente rasos (profundidade que varia de 10 a 50 cm), de modo que permita a difusão de dióxido de carbono proveniente da atmosfera e a penetração da luz solar (CHISTI, 2007). Esse é o método de cultivo de microalgas em larga escala mais comumente empregado.

Figura 2. Fotobirreatores em sistema aberto.



Fonte: Bronzato, 2012.

Nos sistemas fechados (Figura 3) é possível o controle de diversos parâmetros importantes. As condições de cultivo, tais como: concentração de nutrientes, temperatura, luz, pH e injeção de CO₂ podem ser ajustadas para a obtenção de maior produção de biomassa de microalga em relação aos sistemas abertos (RAWAT et al., 2013). Esse sistema é o mais adequado para microalgas que podem ser rapidamente contaminadas por outros microrganismos, exceto para microalgas que conseguem sobreviver em condições ambientais extremas como alto pH, como a *Spirulina*, e alta salinidade, como a *Dunaliella*, ou podem crescer muito rapidamente em tanques abertos, como a *Chlorella* (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Figura 3. Fotobiorreatores em sistema fechado.



Fonte: Bronzato, 2012.

3.1.3 Fatores que influenciam a produção de biomassa

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. O ambiente deve ser condicionado para atender o maior número possível de exigências intrínsecas desse organismo, fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento e a síntese celular (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

Os parâmetros ótimos, assim como o intervalo tolerado, são específicos de cada espécie, assim, cada parâmetro deve ser determinado individualmente (LAVENS; SORGELOOS, 1996). Tais fatores não afetam apenas a fotossíntese e a produtividade da biomassa celular, mas também influenciam o metabolismo celular e, portanto, a alteração na composição celular. Portanto, ao cultivar microalgas, vários fatores devem ser considerados, e os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento de algas são: intensidade luminosa, temperatura, agitação, pH e concentração de nutrientes (NG et al., 2015).

3.1.3.1 Nutrientes

O meio de cultivo para microalgas é composto basicamente por macronutrientes tais como carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e fósforo, além de cálcio, magnésio, enxofre e potássio e micronutrientes tais como ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto. Sendo que

qualquer deficiência ou excesso nesses requisitos limitará seu crescimento (FONTOURA, 2017).

O meio de cultivo das microalgas deve conter quantidades suficientes de nutrientes, em proporções adequadas, para um crescimento propício. Os requerimentos nutricionais mínimos podem ser estimados a partir da fórmula molecular da biomassa desses microrganismos.

- **Carbono**

As microalgas são compostas em mais de 50% por carbono e, por isso, este é um dos nutrientes mais importantes no seu crescimento. Esse elemento é o constituinte principal das diversas substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, como proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas.

O crescimento das microalgas pode ser incrementado pela adição de fontes orgânicas e inorgânicas de carbono. Como fonte inorgânica tem-se o CO₂ e o bicarbonato de sódio. Sendo o primeiro absorvido por difusão, sem gasto de energia, já o segundo é absorvido ativamente, consumindo energia. Como fonte orgânica pode-se utilizar a glicose, acetato, lactato, aminoácidos, entre outros (OHSE et al., 2007).

Dos organismos fotossintetizantes, as microalgas são muito mais eficientes no uso do CO₂ que as plantas superiores, podendo fixar quantidades muito maiores por área de terra (OHSE et al., 2007). Através do processo fotossintético as microalgas captam a energia luminosa e a transformam em energia química, que é conservada na forma de ATP e NADPH e, na sequência estes compostos são usados como fonte de energia na redução do CO₂ para a síntese de carboidratos e outros compostos orgânicos (LEHNINGER, 1990). Assim, a quantidade de energia luminosa recebida pelo sistema fotossintético e a disponibilidade de CO₂ irão repercutir na quantidade de carbono que pode ser fixado, determinando, conseqüentemente, a taxa de crescimento e a produção de biomassa nas culturas microalgais.

As microalgas podem ser cultivadas no escuro, mas com suplementação no meio de cultura de alguma forma de carbono orgânico (glicose, acetato, lactato, por exemplo), que serve tanto como fonte energética quanto como fonte de carbono para a produção de biomassa (GARCIA, 2005). Dependendo da composição do meio de cultivo, o metabolismo da microalga é alterado e, conseqüentemente, a taxa de crescimento, a produtividade e, especialmente, a composição bioquímica da biomassa. Assim, além da questão da produtividade são necessários estudos do

valor nutricional da biomassa produzida nestas condições, bem como, dos custos operacionais (LEE, 2004).

Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), existe a necessidade de um melhor entendimento das diferenças metabólicas e dos requerimentos de energia e carbono pelas microalgas visando a produção de compostos com elevado valor.

- **Nitrogênio**

O azoto encontra-se numa variedade de substâncias biológicas importantes, como enzimas, peptídios, clorofila, moléculas de transferência de energia (trifosfato de adenosina - ATP, difosfato de adenosina - ADP) e material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA, ácido ribonucleico - RNA). As fontes inorgânicas são o nitrato (NO_3^-), o nitrito (NO_2^-), o amônio (NH_4^+), o amoníaco (NH_3) e o azoto gasoso (N_2) (CA; PARK; LI, 2013).

Microalgas requerem nitrogênio para crescer e construir biomassa. Esse elemento é essencial à constituição das proteínas estruturais e funcionais das células das algas (HU, 2004). Esses microrganismos podem assimilar nitrato, amônia e outras fontes orgânicas de nitrogênio, como ureia.

As microalgas absorvem nitratos por meio de um sistema comum de transporte de alta afinidade envolvendo a permease e, em menor extensão, a difusão. Uma vez dentro da célula, os nitratos são reduzidos a nitrito, que reduz ainda mais à amônia. Algumas microalgas podem fixar também o nitrogênio atmosférico (BECKER, 1994).

A utilização de fontes de nitrogênio inorgânico na forma reduzida (nitrogênio amoniacal) é energeticamente favorável em comparação com nitratos e nitritos, disponibilizando energia para o crescimento celular. Quando há disponibilidade de nitrogênio inorgânico no cultivo ocorre o aumento das concentrações de proteínas, carotenóides e clorofila, entretanto, conforme se limita o teor desse nutriente no meio, reduzem-se as quantidades dessas substâncias (LOURENÇO, 2006)

A deficiência de nitrogênio nas algas resulta em alterações no crescimento, nas respostas fisiológicas e na composição química. Por exemplo, há um aumento na produção de lipídios quando as células de algas são privadas de nitrogênio (SANTOS et al., 2003).

- **Fósforo**

O fósforo é um elemento necessário para o crescimento de microalgas, especialmente para gerar e transformar a energia metabólica. Sendo um elemento constituinte das células, nucleotídeos e ácidos. Apesar do conteúdo de fósforo nas microalgas ser menor que 1%, a sua deficiência no meio de cultivo é uma das maiores limitações do crescimento (GROBBELAAR, 2004).

A assimilação do fósforo por parte das microalgas ocorre principalmente em formas inorgânicas, como o ortofosfato (PO_4^{-3}) e os polifosfatos (LOURENÇO, 2006). Existem dois mecanismos através dos quais os fosfatos são incorporados à biomassa de microalgas: primeiro, a célula absorve ativamente os fosfatos para atender necessidades metabólicas e produzir diversos constituintes celulares; segundo, envolve uma absorção "de luxo", pois não é necessária. Esses fosfatos podem ser: solúveis em ácido e estão prontamente disponíveis para auxiliar no metabolismo e produção de DNA e proteínas ou podem ser insolúveis em ácido, sendo reservados para condições em que os níveis de fosfato no meio são limitados para o crescimento celular (POWELL et al., 2009).

As concentrações de fósforo para um ótimo crescimento diferem consideravelmente entre espécies, até mesmo não existindo fator externo limitante (RICHMOND, 2004). As microalgas são capazes de acumular de 8 a 16 vezes a quantidade mínima necessária, o que garante o crescimento da célula mesmo que novas fontes deste elemento não estejam disponíveis (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2007).

- **Micronutriente**

Os micronutrientes são necessários em menores quantidades. Elevadas concentrações destes elementos são tóxicas para a maioria das espécies. Assim, pequenas quantidades de manganês, cobre, ferro, zinco, boro, cloretos e níquel são frequentemente adicionadas aos meios de cultivo, juntamente com um agente quelante (por exemplo, ácido etilenodiamino tetraacético - EDTA), para prevenir a limitação ao crescimento por estes nutrientes (SANTOS, 2017).

3.1.3.2 Luminosidade

Como as plantas, as microalgas requerem luz como a principal fonte de energia para realizar a fixação do CO_2 na matéria orgânica no processo de fotossíntese. De acordo com

Behrens (2005), a luz é o principal fator a ser controlado na otimização do processo de crescimento, seguindo-se a temperatura, o pH e a presença de CO₂ e O₂ no meio.

Geralmente, a maior parte dos problemas no cultivo de microalgas está relacionada à intensidade da luz, pois a baixa intensidade causa a fotolimitação e níveis extremos de luminosidade podem produzir um efeito desfavorável ao crescimento, a chamada fotoinibição. O processo fotoinibitório ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin, assim as moléculas de clorofila ficam em estado excitado e acabam produzindo substâncias tóxicas às células como o peróxido de hidrogênio (MOLINA GRIMA et al., 1999; HIRAYAMA et al., 1996).

Para fotossíntese adequada, três variáveis de luz são importantes, tais como intensidade, qualidade espectral e fotoperíodo (período claro / escuro). Sendo que a fonte de luz pode ser de origem natural (luz solar) ou artificial (lâmpadas). Embora o fotoperíodo varie de organismo para organismo, para aplicações industriais relacionando a razão entre o custo da energia e a produção de biomassa correspondente, 12 a 15 horas de iluminação são consideradas o período ideal (HARUN et al. 2014).

Redaelli et al. (2011) estudaram a influência da intensidade luminosa (2200, 10000, 17000, 24500 lux) sobre a biofixação do carbono em *Chlorella minutissima*. Eles observaram que os melhores resultados foram obtidos para intensidade 17000 lux, atingido uma biomassa de 0,38 g/L e velocidade específica de crescimento de 0,61 dia⁻¹.

3.1.3.3 Temperatura

A temperatura é uma importante variável no cultivo das microalgas. É um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, além de influenciar na composição da biomassa e na estrutura dos componentes celulares.

Assim como todos os seres vivos, as algas apresentam taxa máxima de crescimento relacionada a uma determinada faixa de temperatura, que varia de acordo com a espécie e suas adaptações fisiológicas ao meio no qual vive. Em geral, abaixo ou acima destes valores ocorre redução na velocidade de crescimento, alterações metabólicas e fisiológicas e/ou morte celular.

Uma elevação da temperatura favorece a cultura até certo nível. O sobreaquecimento pode levar à inibição do crescimento devido à inativação por choque térmico das proteínas (MAHBOOB, et al., 2012). Temperaturas abaixo do nível ótimo de crescimento, geralmente,

aumentam o grau de insaturação dos lipídios nas membranas. Por outro lado, altas temperaturas induzem a produção de carotenóides. O aumento na temperatura nos cultivos também influencia o consumo de nitrogênio e carbono, bem como o tamanho celular (HU, 2004). Portanto, de acordo com Lourenço (2006), temperaturas constantes são desejáveis, pois proporcionam maior estabilidade nos experimentos, permitindo maior reprodutibilidade e previsibilidade das respostas das espécies.

De modo geral, a temperatura ótima para o cultivo de microalgas está entre 20 e 24 °C. Rukminasari (2013) verificou que a microalga *Scenedesmus* sp. atingiu uma maior densidade celular quando cultivada a 25 °C. Martinez et al. (2000) estudaram o efeito da temperatura na microalga *Scenedesmus obliquus*. Foram realizados cultivos em temperaturas de 20 °C, 25 °C, 30 °C e 35 °C. O estudo concluiu que esta microalga possui uma taxa de crescimento mais elevada a 30 °C.

3.1.3.4 Agitação

A mistura contínua da cultura é essencial para o sucesso da produção de microalgas e está relacionada a uma série de fatores que influenciam no crescimento e na produtividade da biomassa. É uma variável importante por proporcionar uma exposição mais homogênea à luz; aumentar a disponibilidade de nutrientes, os quais, sob agitação constante, não precipitam; evitar a sedimentação das microalgas, o que acarretaria exposição em excesso das camadas superiores e subexposição à luz das camadas inferiores (SOARES, 2010).

Dependendo do volume de cultura, a mistura é conseguida usando agitador em biorreatores ou agitador orbital fotossintético, mas para operações em grande escala como lagoas de canal adutor, as rodas de pás são mais adequadas (GOUVEIA 2011).

Apesar da agitação auxiliar, é possível realizar cultivos estáticos com excelentes rendimentos. Ansilago, Ottonelli e Carvalho (2016), cultivando a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em meio sem agitação e com presença de metais, demonstraram que essa microalga possui grande potencialidade para sua utilização em processos integrados de biorremediação de águas residuais e produção de biomassa algal. No cultivo estático em meio contendo efluente de UASB a *Chlorella* sp. L06 e a *Tetradismus* sp. L09 foram capazes de sobreviver e crescer, apresentando 25,0% de proteínas totais, 15,4% de lipídios totais e 14,8% de carboidratos totais. O cultivo dessas microalgas reduziu em até 93% de nitrogênio total e 95,4% de fósforo total, melhorando a qualidade do efluente através da conversão destes nutrientes em biomassa microalgácea (TORRES, 2014).

3.1.3.5 pH

O pH é uma variável que afeta a disponibilidade de vários elementos químicos, que podem não solubilizar e precipitar em função dessa variável. O pH favorável para o crescimento da maioria das microalgas é sempre próximo da neutralidade, para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (LOURENÇO, 2006). Os valores de pH baixos desempenham papel como inibidor enzimático no processo de fotossíntese (YANG et al., 2011). Segundo Becker (2004), o pH influencia a solubilidade do CO_2 e dos minerais, interferindo direta ou indiretamente no metabolismo das algas. Em meio aquoso, o carbono inorgânico pode se apresentar nas diferentes formas: CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- (bicarbonato) ou CO_3^{2-} (carbonato), sendo que as proporções desses elementos dependem do pH. Em pHs altos (básicos), as proporções de HCO_3^- ou CO_3^{2-} aumentam. Por outro lado, em uma cultura com pH ácido a disponibilidade de CO_2 aumenta, sendo essa molécula a fonte de carbono usada pelas algas.

A elevação gradativa do pH no meio de cultura é indicativa do crescimento microalgal. O incremento do pH ocorre devido à atividade biológica das células, o que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular, forçando um deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão (BERENGUEL et al., 2004).

A faixa de pH ideal para a maioria das espécies de alga está entre 5 e 9. Bakuei et al. (2015) verificaram máxima produção de biomassa de 3,23 g/L quando cultivaram *Scenedesmus* sp. a pH 8. Este valor de concentração de biomassa é, aproximadamente, o triplo do valor encontrado para o cultivo nos pHs 7, 7,5, e 8,5.

3.1.4 Bioprodutos e Aplicações das microalgas

As microalgas possuem diversas aplicações industriais. Devido à capacidade de sintetizar importantes compostos como proteínas, lipídios, vitaminas, pigmentos, esses microrganismos podem ser usados como fonte para síntese de vários bioprodutos, como combustíveis, químicos, materiais, cosméticos, ração animal e suplementos alimentares.

A composição bioquímica diversificada destes microrganismos está relacionada com a natureza de cada espécie e com as condições de cultivos, como nutrientes, temperatura, salinidade, fonte de carbono, intensidade luminosa, agitação, pH e fase de crescimento (NG et al., 2015).

Atualmente, os produtos obtidos a partir de algas abastecem principalmente os mercados de cosméticos, higiene pessoal, nutrição humana e animal. São produtos de valor agregado produzidos em pequena e média escala, principalmente na China, no Japão e nos Estados Unidos. Esses mercados movimentam mais de US\$ 10 bilhões por ano. Já a produção de microalgas constitui a vertente mais recente e crescente do cultivo de algas. A produção anual mundial de biomassa de microalgas triplicou no período de 2004 a 2013, quando atingiu a marca de 15 mil toneladas/ano (peso seco). As principais espécies cultivadas pertencem aos gêneros *Arthrospira (Spirulina)* e *Chlorella*, sendo utilizadas como fontes de pigmentos para a indústria de cosméticos ou como suplementos proteicos para a alimentação humana e aquicultura (BRASIL; GARCIA, 2016).

Embora já tenha sido demonstrada a viabilidade técnica de se produzir bioplásticos, polímeros e biocombustíveis, como biodiesel, etanol e bioquerosene, por meio de microalgas, tais processos ainda não apresentam custos de produção competitivos com derivados da indústria petroquímica. Os desafios tecnológicos atuais consistem principalmente no melhoramento genético de cepas, no desenvolvimento de métodos eficientes de cultivo, no controle de contaminação e na otimização dos processos de recuperação (BRASIL; GARCIA, 2016).

Além da produção de elementos de alto valor comercial, as microalgas podem ser aplicadas também no tratamento de efluentes, através da diminuição da carga orgânica e da remoção de elementos, como metais pesados, do meio. A seguir, são apresentados os principais bioprodutos sintetizados pelas microalgas e suas possíveis aplicações.

- **Proteína:**

Diversas espécies de microalgas destacam-se pelo elevado teor de proteínas, tais como *Synechococcus* sp. (63% base seca), *Spirulina maxima* (60 - 71% base seca) e *Chlorella vulgaris* (51 - 53% base seca). Esse alto teor de proteína faz com que esse microrganismo seja uma fonte promissora para produção de ração animal e suplementos alimentares, pois apresenta alta qualidade nutritiva e pode ser comparada com a de outras proteínas alimentares, devido ao seu perfil e proporção de aminoácidos. Estudos demonstram que a biomassa de algas é um valioso complemento ou como fonte substituinte de proteínas convencionais (farelo de soja, farinha de peixe, farelo de arroz, etc.) na ração animal (BECKER, 2007).

Coca et al. (2015) avaliaram a produção de *S. platensis* em meio de cultura mineral suplementado com vinhaça e verificaram que a adição de 1 kg/m³ de vinhaça aumentou

consideravelmente a produtividade de proteína quando comparado com a forma não suplementada. Salla et al. (2016) avaliaram os níveis de carboidratos e proteínas na biomassa da microalga *S. platensis* utilizando derivados do soro do leite, que contêm elevada concentração de lactose e níveis baixos de proteína. Os autores observaram um aumento nos níveis de carboidrato e uma redução do teor de proteína na biomassa.

- **Carboidrato**

O carboidrato é um componente metabolicamente ativo nas células microalgais, seja como molécula de armazenamento, sujeitos às alterações estruturais durante o ciclo de vida ou como componente estrutural da parede celular (CRAIGIE, 1990). Os carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma de glicose, celulose, amido, pectina, xilana, manana e outros polissacarídeos (STENGEL et al., 2011). Por sua composição com elevado teor em carboidratos, o uso de biomassa microalgal para fermentação constitui uma opção para a produção de bioetanol.

Várias espécies de microalgas, tais como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutíssima*, *Chlamydomona reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *Scenedesmus acutus*, *Tetraselmisem subcordiformis* e *Spirulina platensis* destacam-se por acumularem uma grande quantidade de carboidratos (mais que 40% do peso seco) (JOHN et al., 2011, RAZEGHIFARD, 2013; MARGARITES; COSTA, 2014; DRAGONE et al., 2011; SALLA et al., 2016).

- **Lipídios**

O conteúdo lipídico das células das microalgas varia, em média, de 10% a 40% em termos de biomassa seca, porém, alguns estudos relatam um conteúdo de lipídios de mais de 85% para certas espécies de microalgas (LUQUE et al., 2010; MAIRET et al., 2011).

A maioria das microalgas tem como componente majoritário de seus óleos os triglicerídeos (fração conversível em biodiesel), superior a 80%, com o perfil de ácidos graxos preponderante de cadeias contendo de 16 a 18 átomos de carbono (LIU et al., 2011; COUTO et al., 2010; FRANCO et al., 2013).

Segundo Knothe (2008), os ácidos graxos monoinsaturados são úteis para produção do biodiesel. Entretanto, as microalgas podem conter em sua composição ácidos graxos poliinsaturados que devem estar presentes em concentração moderada no biodiesel, devido à baixa estabilidade oxidativa (KNOTHE, 2011).

- **Pigmentos**

Os pigmentos são compostos químicos coloridos que absorvem e refletem certos comprimentos de onda da luz visível. Pertencem ao sistema fotossintético de microalgas, agindo como captadores de energia por meio da luz. Os principais pigmentos são agrupados em clorofilas, carotenoides e ficobilinas. As clorofilas estão presentes em todas as plantas superiores e algas fotossintéticas, enquanto que os carotenoides estão presentes na maioria das algas e as ficobilinas encontradas em cianobactérias e em algumas algas vermelhas (SPOLAORE et al., 2006).

Os carotenoides são substâncias que podem ser utilizados como moléculas antioxidantes. Esses pigmentos têm a capacidade de eliminar os radicais livres, protegendo assim as células e tecidos dos danos oxidativos. Podem ser úteis na prevenção da deterioração dos alimentos durante o processamento e armazenamento e também influenciar a sinalização celular que pode desencadear vias reguladoras sensíveis (RAO et al., 2010).

As clorofilas possuem atividade quelante e podem ser utilizadas como auxiliares na recuperação do fígado e tratamento da úlcera (PUOTINEN, 1999). Estima-se que em condições ótimas de crescimento as microalgas possam acumular até 4% em seu peso seco de clorofila (NAKANISHI, 2001).

Devido à forte coloração verde e da demanda dos consumidores por alimentos naturais, as clorofilas têm ganhado importância como aditivo alimentar. Incentivando as indústrias de alimentos à substituírem pigmentos artificiais pelos naturais, como à base de clorofila (DUFOSSÉ, 2006).

3.1.5 Microalgas e o tratamento de efluentes

Os cursos de água recebem poluição de muitas fontes diferentes, que variam tanto em vazão quanto em volume. A composição das águas residuais é uma mistura complexa de materiais naturais orgânicos e inorgânicos, bem como compostos produzidos pelo homem. Três quartos do carbono orgânico no esgoto estão presentes como carboidratos, gorduras, proteínas, aminoácidos e ácidos voláteis. Os constituintes inorgânicos incluem grandes concentrações de sódio, cálcio, potássio, magnésio, cloro, enxofre, fosfato, bicarbonato, sais de amônio e metais pesados (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN, 2012).

Biorremediação é uma alternativa ambientalmente amigável para a remediação de água e solo contaminados. O tratamento biológico pode ser realizado através do uso de bactérias,

fungos e algas para a remoção de poluentes (AZAB, 2008). A utilização de microalgas para biorremediação é efetiva devido à sua capacidade de converter energia solar em biomassa útil e assimilar nutrientes como fósforo e nitrogênio, que causam a eutrofização. A absorção de quantidades significativas desses nutrientes é devido à necessidade nutricional desses microrganismos para a síntese proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídios (LOURENÇO, 2006; WLEGAND et al, 2016)

O uso de microalgas para biorremediação apresenta diversas vantagens (TALBOT; DE LA NÖUE, 1993) tais como: utilização de energia barata e abundante (luz solar); produção de biomassa para alimentação animal; obtenção de produtos de alto valor agregados e de química fina.

A utilização de microalgas no processo de tratamento de águas residuais foi inicialmente proposta por Oswald e Gotaas (1957), mas ganhou impulso a partir da década de 80. Segundo Oswald (1988), uma análise das células das algas pode revelar uma percentagem de carbono (C) de 52,4%, hidrogênio (H) 7,4%, oxigênio (O) 29,7%, azoto (N) 9,2% e fósforo (P) 1,3% numa base de peso seco sem cinzas. Assim, a remoção de nutrientes, especialmente N e P, com microalgas é um processo lógico, sendo comum a sua utilização.

As possibilidades de aplicação das microalgas, no tratamento de águas residuais, são fundamentalmente três: remoção de nutrientes, desinfecção e remoção de metais pesados. Mais recentemente têm também sido efetuados alguns estudos sobre a utilização de microalgas na remoção de compostos orgânicos tóxicos, como fenóis e clorofenóis (HIROOKA et al., 2003; LIMA et al. 2004).

Uma grande variedade de espécies tem a capacidade de crescimento em ambientes sem luz, utilizando carbono orgânico como fonte de energia. Nestas condições, elas também consomem nitrogênio e fósforo em grandes quantidades, atuando como verdadeiros "biofiltros" destes nutrientes. Esse processo é capaz de produzir água em condição de quase potabilidade, ideal para reuso industrial (LI et al., 2013; BATISTA et. al., 2015; WANG et. al., 2010).

Os sistemas de algas podem tratar diferentes tipos de efluentes como: esgoto humano, resíduos de gado, resíduos agroindustriais e resíduos industriais, efluente de suinocultura e do processamento de alimentos e resíduos agrícolas. Além disso, também estão sendo desenvolvidos sistemas para a remoção de minerais tóxicos, como chumbo, cádmio, mercúrio, escândio, estanho, arsênico e bromo (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; 2012).

Segundo El-Sheekh (2015), as microalgas absorvem os metais através da adsorção desses elementos pela superfície da parede celular, em um rápido processo, que dura poucos segundos ou minutos. Esse processo é chamado adsorção física ou biossorção. Biossorção é definido como o processo natural de sólidos na retenção de metais em ambientes aquosos. Nas microalgas, o fenômeno ocorre devido às interações da parede celular, que apresenta carga elétrica negativa devido à presença de grupos ionizáveis como: carboxilas, hidroxilas, fosfatos e sulfatos, que têm a capacidade de interagir com íons metálicos. A biossorção envolve mecanismos de troca iônica e ligação covalente, sendo, portanto, esse processo considerado dependente da estrutura química e composição da parede celular. Como esses dois elementos variam com a espécie de microalgas, a biossorção também irá variar (GARNHAM, 1997; DINIS et al., 2004). Então, os íons são transportados, lentamente, para o interior do citoplasma, em um processo chamado quimiossorção. Isso faz com que as microalgas sejam eficientes na remoção de metais pesados.

A remoção de metais de uma água residual pode ser efetuada utilizando microalgas vivas e microalgas secas. Nesta última situação, apenas ocorre remoção por adsorção, não ocorrendo o processo de assimilação dos metais (TOBIN; WHITE; GADD, 1994).

A variedade de algas em estudos associados com a remoção ou detecção de metais pesados é elevada. Microalgas como a *Chlorella* e a *Scenedesmus*, com a sua larga área superficial são eficientes na remoção e recuperação de metais das águas (TAM et al., 1998).

Chong, Wong e Tom (2000) avaliaram a remoção de zinco e níquel de efluente utilizando diferentes espécies de microalgas, obtendo uma diminuição de 97 e 57% desses elementos, respectivamente. Em estudos realizados por Jia et. al (2016) obteve-se uma remoção de até 91% de nitrogênio e 88% de fósforo de um efluente suíno pela *Scenedesmus* sp. A *Chorella vulgaris* conseguiu remover altos níveis de nitrogênio, fósforo, níquel cádmio e zinco, de acordo com Santos (2017).

3.2 Águas residuais

A água pode ser usada pela indústria de diversas maneiras: na incorporação ao produto, lavagens de máquinas, tubulações e pisos, nos sistemas de resfriamento e geradores de vapor, no próprio processo industrial e nos vasos sanitários. Assim, os resíduos líquidos, ou águas residuais, são aquelas provenientes das zonas urbanas e industriais, após a sua utilização,

apresentando suas características naturais alteradas e com uma quantidade considerável de poluentes (TCHOBANOGLIOUS; BURTON; STENSEL, 2003).

O descarte das águas residuais e a devolução da substância para o meio ambiente exigem o devido tratamento da substância, de modo que ela volte a apresentar qualidade e limpeza adequadas para que seja lançada no corpo receptor (rio, lago ou mar) sem causar danos à saúde e ao ecossistema. A água não necessita de tratamento final somente quando é incorporada aos produtos ou evaporada. Nos demais casos, os efluentes líquidos industriais ou água residuária precisam ser tratados.

O tratamento das águas residuais, portanto, é um processo essencial para garantir a preservação ambiental e a manutenção da saúde humana. Os poluentes presentes neste tipo de água são eliminados por meio da aplicação de diversas técnicas que, combinadas, conseguem limpar a água e encaminhar a substância para reutilização na indústria, agricultura e até abastecimento doméstico.

Segundo CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2011), efluente é o termo usado para caracterizar os despejos líquidos provenientes de diversas atividades ou processos. Não podendo conferir ao corpo receptor características de qualidade em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e final, do seu enquadramento. Sendo que as metas obrigatórias para corpos receptores serão estabelecidas por parâmetros específicos.

Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedeçam as condições e padrões previstos pelo Conama (2011). Os parâmetros são:

- pH entre 5 a 9;
- Temperatura: inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura;
- Materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;

- Regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;
- Óleos e graxas: 1. óleos minerais até 20 mg/L; 2. óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L;
- Ausência de materiais flutuantes;
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C): remoção mínima de 60% de DBO sendo que este limite só poderá ser reduzido no caso de existência de estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor

3.2.1 Processos de tratamentos de efluentes

Para atender às legislações, as águas residuais necessitam de um tratamento antes do seu despejo no meio ambiente. O tratamento pode ocorrer através de processos biológicos, químicos, operações físicas e da combinação destes, a fim de remover matéria orgânica, sólidos suspensos, nutrientes (nitrogênio e fósforo) e organismos patogênicos (HAANDEL; LETTINGA, 1994).

O tratamento de efluentes se divide, basicamente, em duas grandes fases: a físico-química e a biológica. Os métodos físicos de tratamento são responsáveis pela remoção de sólidos flutuantes de dimensões relativamente grandes, de sólidos em suspensão, areias, óleos e gorduras. São caracterizados por métodos de separação de fases, sendo que este fato pode ocorrer através de gradeamento, peneiramento, sedimentação ou decantação e por flotação dos resíduos (CRESPILHO et al., 2004).

São considerados como processos biológicos, aqueles que necessitam da ação de microrganismos aeróbios ou anaeróbios, que visam à remoção da matéria orgânica e alguns nutrientes (compostos biodegradáveis).

No tratamento biológico aeróbio, os microrganismos, mediante processos oxidativos, degradam as substâncias orgânicas, que são assimiladas como fonte de energia. Nesse processo ocorre a utilização de O_2 para que ocorra a biodegradação. Dentre os processos aeróbios o processo de lodo ativado é o mais aplicado e também o de maior eficiência (SPERLING, 1997). Nos processos anaeróbios de tratamento de efluentes, diversos grupos de microrganismos, na ausência de oxigênio molecular, promovem a transformação de compostos orgânicos complexos (carboidratos, proteínas e lipídios) em produtos mais simples como o metano (CH_4), o gás carbônico (CO_2), água (H_2O), amônia (NH_3), gás sulfídrico (H_2S) e novas células bacterianas (CHERNICHARO, 1997; NETO, 2007).

Águas residuais contém nutrientes abundantes (nitrogênio, fósforo, carbono, entre outros), que são necessários para o crescimento das microalgas (CARDOSO; VIEIRA; MARQUES, 2011). Assim, o cultivo desses microrganismos em meios contendo efluente líquido é possível. Sendo uma alternativa para o seu tratamento, uma vez que as microalgas são capazes de consumir esses elementos.

A aplicação de microalgas tem demonstrado resultados positivos na remoção de azoto, fósforo e outros elementos (metais pesados) de águas residuais. Conforme mostrado na Tabela 3, diversos estudos têm demonstrado êxito na utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais.

Kimura et al (2018) demonstraram que a *Chlorella sorokiniana* pode ser cultivada usando efluente de digestão anaeróbica de macrófitas aquáticas colhidas do lago Biwa, com alto potencial para remoção de nutrientes inorgânicos. Zheng et al (2019), verificaram que a *Chlorella vulgaris* poderia eficientemente reciclar os nutrientes em águas residuais e produzir biomassa de valor agregado, para o tratamento de efluentes de amônia de alta resistência. Alguns estudos avaliaram também a capacidade de microalgas no tratamento de efluentes de laticínio (DING et al., 2014; DANESHVAR et al., 2018), que se mostraram bem eficientes.

Tabela 3. Remoção de nitrogênio e fósforo nos cultivos de microalgas em diferentes tipos de efluentes.

Microalga	Tipo de efluente	Remoção (%)		Referências
		Nitrogênio	Fósforo	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial da fabricação do ácido cítrico	94,4	90,6	LI et al. (2013)
<i>Chlorella sp</i>	Efluente municipal secundário	92	86	CHO et al. (2011)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Industrial de laticínio biodigerido	78,3	71,6	WANG et al. (2010)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Efluente municipal	98	100	BATISTA et al. (2015)
<i>Scenedesmus acutus</i>	Efluente municipal	92,4	64,3	SACRISTÁN DE ALVA et al.. (2013)

3.3 Soro de queijo e o tratamento de efluentes

Entre as atividades industriais que geram grandes quantidades de águas residuais temos a do setor de laticínios. O leite é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Nas últimas três décadas, a produção mundial aumentou mais de 50%, sendo de 798 milhões de toneladas em 2016. A Europa e a Ásia produziram juntas dois terços do leite, 67,5% do total. O continente americano respondeu por 22,7%, sendo que a América do Sul ficou com 7,8%. O leite africano representou 6,1% e a Oceania 3,7%. Entre os países, a Índia destacou-se como maior produtora mundial de leite em 2016, seguida pelos Estados Unidos, Paquistão e Brasil (ZOCCAL, 2018).

A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes atividades da economia brasileira, sendo produzido em quase todos os municípios do país, gerando milhões de empregos em todas as etapas da cadeia produtiva. Em 2017, o valor bruto da produção pecuária de leite foi de R\$ 29,9 bilhões (BRASIL, 2018). Esse resultado colocou a atividade leiteira em sexto lugar dentre os produtos agropecuários brasileiros. No setor industrial, as empresas de laticínios tiveram faturamento líquido de R\$ 70,2 bilhões, representando o segundo maior faturamento da indústria de alimentos no Brasil (ABIA, 2018)

Segundo o Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (1996),

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite constituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Aproximadamente 30% da produção mundial de leite destinam-se à fabricação de queijos e existem pelo menos 1.000 variedades diferentes do produto, sendo que as principais famílias são representadas pelos queijos Holandeses, Suíços, de massa filada, Cheddar e Parmesão, os quais correspondem a mais de 80% da produção mundial (FOX et. al., 2000; FOX; MCSWEENEY, 1998).

O líquido que sobra após a elaboração do queijo, ou seja, após precipitar a caseína (principal proteína do leite) e que compõe cerca de 85 a 95% de todo o leite é o soro, o qual contém 55% dos nutrientes do leite. Dentre estes nutrientes pode-se destacar a lactose, as proteínas solúveis (globulina e albumina), lipídeos e sais minerais. Os principais sais minerais presentes são o cloreto de sódio e o cloreto de potássio, os quais representam mais de 50%, além dos sais de cálcio, principalmente na forma de fosfato de cálcio. Além destes componentes, o soro também apresenta ácido lático e ácido cítrico, ureia e ácido úrico, vitaminas do complexo B (B1, B2, B6 piridoxina, B5 e B12) (SISO, 1996).

O soro de leite é considerado o principal subproduto da indústria de laticínios. Representando 80 a 90% do volume total de leite que entra no processo. Para fazer um quilo de queijo são liberados aproximadamente 9 kg de soro (SISO, 1996).

O grande problema ambiental associado ao soro é causado pela elevada concentração de matéria orgânica presente, essencialmente constituída de lactose, proteína e ácido lático, que provoca elevado consumo de oxigênio dissolvido pelos microrganismos (SPERLING, 1997). Assim, este soro deve ser encaminhado às plantas de tratamento de efluentes dos laticínios antes do lançamento em corpos hídricos. Portanto, a geração deste soro representa um custo de produção para as indústrias de laticínios, devido ao tratamento necessário para redução de sua carga orgânica (PRAZERES et al., 2012).

A composição do soro varia de acordo com o procedimento de separação da caseína (Tabela 4) obtendo-se dois tipos de soro: o soro ácido (pH < 5,0) e o soro doce (pH 6,0-7,0). O

soro doce é obtido no processo de coagulação enzimática (enzima quimosina), enquanto o soro ácido resulta da precipitação ácida no pH isoeletrico (pH = 4,6) (SGARBIERI, 2004). Independentemente do tipo, o soro de queijo tem grande capacidade poluidora e por isso é necessária atenção quanto ao seu tratamento e disposição.

Tabela 4. Características físico-químicas de soros de ricota coletados no Vale do Taquari.
Fonte: Bald et al., 2014.

Soro	Umidade (% B.U)	Cinzas (% B.U.)	Proteínas (% B.U.)	Lactose (g/L)	DQO (mg/L)	C total (mg/L)	N total (mg/L)	Acidez (%)	pH
RC	94,45	0,47	0,36	38,1	50.420	24.500	751	1,60	5,24
RL	94,93	0,51	0,49	45,22	53.306	19.079	592	1,99	5,10
RM	94,37	0,52	0,61	45,04	57.721	28.114	664	1,95	5,78

Legenda: RC – soro de ricota (de queijo tipo colonial); RL - soro de ricota (de queijo tipo lanche); RM – soro de ricota (de queijo tipo mussarela); B.U. - Base Úmida; DQO – Demanda Química de Oxigênio.

Além do soro de queijo, existem outras fontes de efluentes líquidos em uma indústria de laticínio, que são oriundas da lavagem e limpeza de produtos remanescentes em caminhões, latões, tanques, linhas, máquinas e equipamentos diretamente envolvidos na produção; dos derramamentos, vazamentos, operações deficientes de equipamentos e transbordamento de tanques; perdas no processo, tais como, em operações de "partida" e de "parada" do pasteurizador, arraste de produtos na evaporação (leite condensado e em pó) e aquelas resultantes do acerto das acondicionadoras no início do processo de embalagem; e do descarte de produtos.

Os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios são constituídos, em geral, por: leite e matérias-primas auxiliares (matérias lácteas geradas e não aproveitadas ao longo dos processos industriais), gordura, sólidos de leite, bem como restos ou pedaços de produtos finais, quando não removidos para reciclagem ou disposição em separado; detergentes e desinfetantes usados nas operações de lavagem de pisos e lavagens gerais; lubrificantes empregados na manutenção de equipamentos; despejos sanitários (MINAS AMBIENTE, 1998).

Tais efluentes apresentam altos teores de óleos e graxas, e se caracterizam pela presença de sólidos suspensos, matéria orgânica expressa como DBO e DQO, e odor originado pela decomposição da caseína. A Tabela 5 mostra as características de efluentes gerados em diferentes indústrias de laticínios. O pH é praticamente neutro, mas tende a acidificar devido ao uso de ácido na limpeza durante o processo denominado *Clean in Place* (CIP) e à fermentação láctea dos resíduos e sua posterior conversão em ácido lático. Normalmente os efluentes de laticínios apresentam os seguintes parâmetros (CETESB, 2006):

- Alto teor de orgânicos;
- Óleos e graxas, devido à gordura do leite e de outros produtos lácteos;
- Altos teores de nitrogênio e fósforo
- Grandes variações no pH, residuais de soluções ácidas e alcalinas, basicamente das operações de limpeza
- Alta condutividade, especialmente na produção de queijos devido ao resíduo de cloreto de sódio da salga;
- Variações na temperatura, provocadas por etapas produtivas específicas.

Tabela 5. Características físico-químicas de efluentes gerados em diferentes indústrias de laticínios. Fonte: Minas Ambiente/CETEC (2000).

Parâmetro	Indústrias			
	1	2	3	4
DBO ₅ (mg O ₂ /L)	2051 - 5269	3637 - 17624	5127 - 5949	18485 - 19755
DQO (mg O ₂ /L)	3005 - 7865	4307 - 20649	5496 - 7709	21277 - 23920
Sólidos totais (mg/L)	1010 - 2107	1567 - 10744	3508 - 4498	8838 - 10052
Nitrogênio orgânico (mg/L)	32,5 - 79,6	74,2 - 297,6	52,7 - 142,7	190,7 - 292,0
Fósforo Total (mg/L)	6,5 - 31,0	2,9 - 131,4	12,4 - 29,2	92,4 - 175,5
Óleos e graxas (mg/L)	227 - 474	90 - 184	37 - 359	75 - 439

Devido às suas características e composição o efluente oriundo da indústria de laticínio possui alta capacidade poluidora, por isso, faz-se necessário o seu tratamento antes da disposição no meio a fim de atingir os parâmetros determinados pelas legislações ambientais.

A resolução 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água. Assim, o lançamento indireto de efluentes no corpo receptor deverá observar o disposto nesta Resolução quando verificada a inexistência de legislação ou normas específicas.

No estado de Minas Gerais, o Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM determina que para o seu lançamento o efluente deve, além de atender às exigências do CONAMA, possuir (COPAM/2008):

- DBO: até 60 mg/L;
- DQO: até 180 mg/L;

- Sólidos em suspensão totais até 100 mg/L, sendo 150 mg/L nos casos de lagoas de estabilização;
- Nitrogênio Amomical Total: 20 mg/L.

Como os efluentes das indústrias de laticínio encontram-se fora dos padrões de lançamento exigidos pelas legislações, é necessário o seu tratamento. E, por isso, a busca de formas alternativas para diminuir os custos desse processo é necessária. Levando em consideração que as microalgas possuem potencial para remover elementos de águas residuais que causam poluição do ambiente e são microrganismo capazes de acumular produtos de interesse comercial, a sua utilização para tratar os efluentes gerados pela indústria de laticínios pode ser uma boa alternativa para viabilizar e tornar o tratamento vantajoso economicamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microalgas e meio de cultivo

Nesse trabalho foram utilizadas as microalgas *Chlorella vulgaris* (BMAKD7) e *Spirulina platensis* (BMAK159) provenientes do Banco de Microrganismos Aidar & Kutner, do Instituto oceanográfico da Universidade de São Paulo (USP). A *C. vulgaris* foi mantida em meio *Bold's Basal Medium* (BBM) modificado (CONNON, 2007). Soluções estoque foram preparadas com água destilada, e mantidas sob refrigeração (4°C). A Tabela 6 apresenta as concentrações das soluções estoque e os volumes que foram adicionados para o preparo de 1L de meio. Em um balão volumétrico colocou-se cerca de 900 mL de água destilada, em seguida foram adicionados os respectivos volumes de soluções estoque dos nutrientes. Por fim, o volume foi acertado para 1L. Então, o meio foi autoclavado por 20 minutos a 1 atm.

Tabela 6. Composição do meio *Bold's Basal Medium*.

Reagentes	Conc. da solução	Vol. de água	Conc. final no
	Estoque (g/L)	Adicionado (mL)	meio (g/L)
NaNO ₃	25,00	30	0,750
K ₂ HPO ₄	7,50	10	0,075
KH ₂ PO ₄	17,50	10	0,175
NaHCO ₃	7,50	10	0,075
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,50	5	0,013
MgSO ₄ .7H ₂ O	10,00	5	0,050
EDTA-Na ₂	25,00	2	0,050
FeCl ₃ .6H ₂ O	2,00		0,004
H ₃ BO ₃	2,00		0,00400
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,75		0,00150
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,12		0,00024
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,12	2	0,00024
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,03		0,00006
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,10		0,00020

Fonte: Connon (2007).

A microalga *S. platensis* foi mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), cujos componentes encontram-se nas Tabelas 7 e 8. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 1 atm.

Tabela 7. Composição do meio Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g/L)
Bicarbonato de sódio	16,8
Fosfato dipotássico	0,5
Nitrato de sódio	2,5
Sulfato de potássio	1,0
Cloreto de sódio	1,0
Sulfato de magnésio	0,2
Cloreto de cálcio	0,04
Sulfato ferroso	0,01
EDTA-Na ₂	0,08
Solução A ₅	1 mL

Tabela 8. Composição da solução A₅ utilizada na produção do meio Zarrouk.

Reagentes	Concentração (g/L)
Ácido bórico	2,860
Cloreto de Manganês	1,810
Sulfato de zinco	0,222
Molibidato de sódio	0,0177
Sulfato de cobre	0,079

4.2 Cultivo do inóculo

Foram realizados repiques a cada 10 dias, em frasco *Erlenmeyer* a fim de se obter uma quantidade satisfatória de microalga para a realização dos experimentos. O procedimento dos subcultivos baseou-se na adição de 50% do volume do meio fresco em 50% da suspensão de algas. Tal procedimento foi realizado no fluxo laminar e as algas foram incubadas em estufa germinadora a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, no caso da *C. vulgaris*, e $28 \pm 1^\circ\text{C}$, no caso da *S. platensis*. Ambas sob um sistema de fotoperíodo de 12 horas.

4.3 Caracterização do efluente da indústria de laticínio

Para a realização desse trabalho foi utilizado um subproduto da indústria de laticínio, o soro de queijo. Este material foi cedido por uma empresa situada na cidade de Uberlândia/MG, o qual foi gerado na fabricação do queijo pelo método de coagulação ácida.

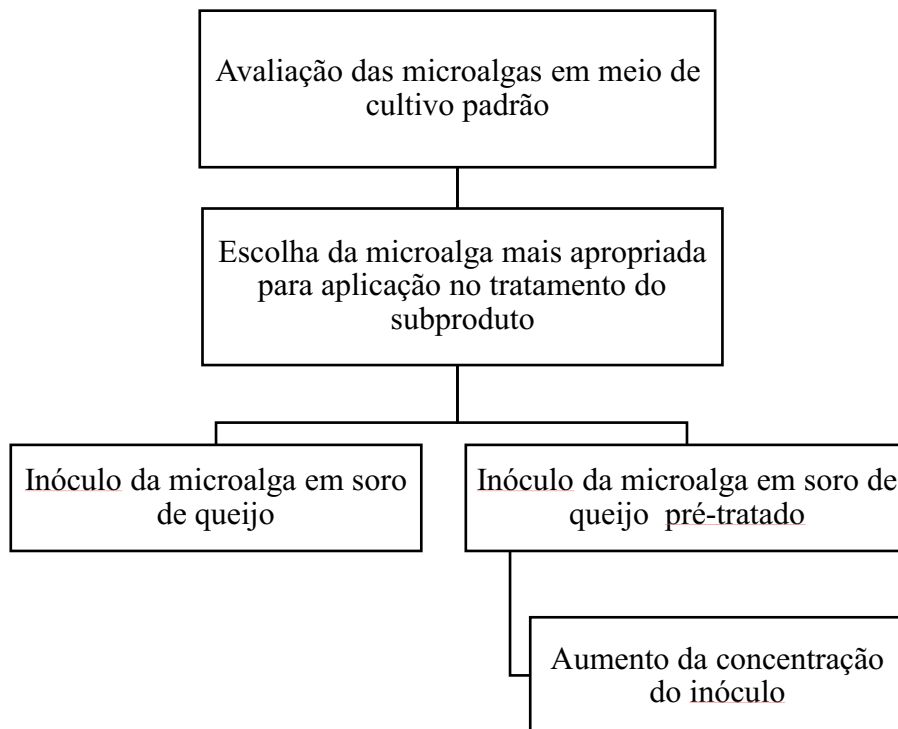
Após a coleta, uma parte do soro sofreu um pré-tratamento para remoção de partículas coloidais e suspensas que promovem turbidez, segundo a metodologia descrita por Rocha, Cardoso e Vieira (2018) e Mendes (2014). O ensaio de coagulação/floculação foi realizado em um equipamento *Jar-Test* Microcontrolado marca Milan (Mod. JT 203) à temperatura ambiente

e com pH ajustado em 8,3 com soluções de H_2SO_4 1 N e NaOH 5 N. Juntamente foi adicionado um grama de tanino Tanfloc SG em pó (TANAC) por litro de soro de queijo, para garantir o processo de coagulação. Em seguida houve a homogeneização a 120 rpm por 1 minuto. Ao final desta etapa, foi empregada a agitação intermitente (15 minutos de agitação a 10 rpm e 45 minutos de repouso) por 6 horas.

O Soro bruto e o soro coagulado foram autoclavados por 20 minutos, a 1 atm e, então, caracterizados quanto aos parâmetros de pH, turbidez, condutividade, carbono, nitrogênio, fósforo, proteína e DQO (Demanda química de oxigênio).

Posteriormente, deu-se início aos ensaios utilizando as microalgas em meios de cultivo padrão e naqueles contendo os soros de queijo bruto e coagulado. O esquema geral desses ensaios encontra-se na Figura 4 e a descrição das etapas está nos tópicos 4.4, 4.5 e 4.6.

Figura 4. Esquema dos ensaios para avaliação do potencial de microalgas no tratamento de efluentes.



4.4 Avaliação do potencial de remoção de nutrientes e carga orgânica do meio de cultivo padrão

Previamente, realizou-se o cultivo das microalgas nos meios padrão (*Zarrouk* para *S. platensis* e *BBM* para *C. vulgaris*), a fim de avaliar a capacidade de remoção de nutrientes e carga orgânica por esses microrganismo sem a presença de interferentes.

Nesse ensaio, as microalgas foram inoculadas em *Erlenmeyers* de vidro de 250 mL (com volume útil de 200 mL) com concentração inicial de 0,1 g/L e mantidas em estufa incubadora à 22 °C com fotoperíodo de 12 h/ 12 h (claro/escuro) e luminosidade média 3000 lux. Foram colhidas amostras dos sobrenadantes e da cultura algal para avaliação dos parâmetros de interesse: biomassa, carbono, nitrogênio, fósforo, proteína e clorofila.

4.5 Cultivo da microalga no soro de queijo bruto e coagulado

Após análise dos primeiros resultados, seguiu-se a avaliação da capacidade de remoção da carga orgânica do soro de queijo pela ação da microalga mais apropriada. Foram realizados ensaios com diferentes concentrações de soro, bruto e coagulado, no meio de cultivo padrão para se obter as melhores condições para o seu tratamento.

Assim como nos ensaios preliminares, foi inoculada 0,1 g/L de biomassa algal em *Erlenmeyers* de vidro de 250 mL (volume útil de 200 mL), em seis cultivos distintos para cada soro: meio padrão de cultivo, soro de queijo puro e soluções de 1%, 10%, 25% 50% de soro diluído no meio de cultivo padrão. As culturas foram mantidas em estufa incubadora a 22 °C, fotoperíodo de 12 h/ 12 h (claro/escuro) e luminosidade média 3000 lux.

Foram colhidas amostras dos sobrenadantes e da cultura algal, no dia do inóculo, no terceiro e no sexto dias, para avaliação dos parâmetros de interesse: carbono, nitrogênio, fósforo, proteína, DQO, clorofila, açúcares, ácidos orgânicos e etanol. Os ensaios e as análises foram feitos em duplicatas.

4.6 Avaliação da superconcentração de inóculo para tratamento do soro de queijo

A fim de se obter um maior desempenho da alga nesse meio quanto à remoção de carga orgânica e metais, fez-se o cultivo utilizando-se maiores concentrações de inóculo (0,2, 0,4 e 1,0 g/L).

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios anteriores, optou-se por utilizar a diluição de 10% do soro no meio de cultivo padrão para avaliar a influência da superconcentração de inóculo. Os ensaios foram realizados nas mesmas condições que os anteriores. Foram colhidas amostras dos sobrenadantes e da cultura algal ao longo dos dias para avaliação dos parâmetros: carbono, nitrogênio, fósforo, proteína, clorofila, DQO, ácidos orgânicos, açúcares, etanol e metais. Os ensaios e as análises foram feitos em duplicatas.

4.7 Metodologia analítica

4.7.1 Contagem biológica de célula

O número de células foi determinado por contagem no microscópio da marca Nikon modelo Eclipse E200-LED, utilizando-se uma câmara de Neubauer, também conhecida como Hemacitômetro ou Câmara de Contagem.

A solução algal foi previamente homogeneizada e diluída em água destilada. Então, a amostra foi introduzida no espaço entre a lâmina e a câmara de Neubauer utilizando uma micropipeta e, em seguida, realizou-se a contagem de células.

4.7.2 Determinação da densidade de biomassa

A densidade (concentração mássica) da microalga foi determinada pelo método gravimétrico, conforme descrito no item 4.8.7. Para a construção da curva de calibração, a análise de absorvância foi efetuada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570 nm para a *S. platensis* (Apêndice 1.1), 760 nm para a *C. vulgaris* (Apêndice 1.2) e, na sequência, convertida em gsv/L pela equação de correlação entre a absorvância e quantidade de sólidos voláteis por litro determinados por gravimetria .

4.7.3 Determinação da clorofila total

A clorofila total foi quantificada através de análise espectrofotométrica, método de Jeffrey e Humphrey (1975). Uma suspensão de 20 mL de algas foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido ressuspenso em acetona (90

%) a um volume de 10 mL. Um processo de abrasão foi, então, realizado em agitador tipo vórtex utilizando esferas de vidro. Acrescentou-se 1,1 g de esfera de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. O tubo foi submetido à agitação em vortex durante 40 minutos, com intervalos de 2 minutos de repouso em banho de gelo a cada 5 minutos de agitação, obtendo-se o extrato bruto com células.

Em seguida, foi realizada a leitura do extrato em espectrofotômetros nos seguintes comprimentos de onda: 664 (DO₆₆₄), 750 (DO₇₅₀), 647 (DO₆₄₇) e 630 (DO₆₃₀) nm. Como branco utilizou-se a solução de acetona a 90 %. As concentrações de clorofila *a*, *b* e *c* foram calculadas de acordo com as Equações 1, 2 e 3, sendo a clorofila total determinada pela soma destas. No caso da *Spirulina platensis*, tem-se a presença apenas da clorofila-*a* (TOMASELLI, 1997). Em que *L* é a espessura da cubeta, *V_e* é o volume de extração e *V_f* o volume de filtrado (suspensão celular).

$$\bullet \text{ clorofila } a \left(\frac{mg}{m^3} \right) = (11,85 * DO_{664} - DO_{750}) - 1,54 * (DO_{647} - DO_{750}) - 0,08 * (DO_{630} - DO_{750}) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \quad (1)$$

$$\bullet \text{ clorofila } b \left(\frac{mg}{m^3} \right) = (-5,43 * (DO_{664} - DO_{750}) + 21,03 * (DO_{647} - DO_{750}) - 2,66 * (DO_{630} - DO_{750})) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \quad (2)$$

$$\bullet \text{ clorofila } c \left(\frac{mg}{m^3} \right) = (-1,67 * (DO_{664} - DO_{750}) - 7,60 * (DO_{647} - DO_{750}) + 24,52 * (DO_{630} - DO_{750})) * \left(\frac{V_e}{L * V_f} \right) \quad (3)$$

4.7.4 Determinação de Fósforo solúvel

A quantificação do fósforo solúvel foi realizada pelo método colorimétrico do fosfato vanadomolibdato (APHA, 2012), que se baseia no seguinte princípio: a solução de ortofosfato reage com o molibdato de amônio e com vanádio para formação do ácido vanadomolibdatofosfórico de coloração amarela. A intensidade da cor amarela é proporcional

à concentração do fósforo. Sendo a faixa de trabalho do método de 1 a 10 mg/L (ppm) de fósforo em comprimento de onda de 420 nm.

Para coloração foi utilizada a solução de vanadomolibdato de amônio preparada através da mistura de duas soluções. A primeira consistiu-se de uma dissolução de 40g de molibdato de amônio, $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em 400 mL de água destilada. A segunda foi realizada dissolvendo 1 g de metavanadato de amônio, NH_4VO_3 , em uma mistura de 300 mL de água destilada e 200 mL de ácido nítrico concentrado. A segunda solução foi adicionada à primeira e, em seguida, completou-se esta mistura a 1000 mL com água destilada.

Para a quantificação do fósforo, 25 mL da solução de vanadomolibdato de amônio foi misturada a 50 mL da amostra, seguido de agitação vigorosa. Após 2 minutos, para desenvolvimento da cor, foi determinada a absorvância das amostras em espectrofotômetro a 420 nm. Utilizou-se água destilada como branco seguindo o mesmo procedimento dos extratos.

A curva de calibração (Apêndice 1.5) foi constituída com os pontos de 1 mg/L; 3 mg/L; 5 mg/L; 7,5 mg/L e 10 mg/L de fósforo seguindo o mesmo procedimento dos extratos líquidos das amostras.

4.7.5 Determinação de Proteína total

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951). Foram utilizados quatro reagentes:

1. Albumina bovina (BSA) – 100 mg/L;
2. Reagente A: 100 mL de solução NaOH 0,1 M, com 2g de Na_2CO_3 e 0,02g de tartarato de sódio e potássio.
3. Reagente B: 100 mL de água destilada com 0,5g de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% e 2 gotas de H_2SO_4 ;
4. Reagente Folin-Ciocalteau 1N.

A albumina sérica foi utilizada como amostra padrão, por ser uma proteína bastante descrita na literatura, assim, duas curvas de calibração (Apêndice 1.3) padrão para a proteína foram construídas: uma de micro concentração (de 10 mg/L a 100 mg/L) e uma macro (de 120 mg/L a 250 mg/L).

Primeiramente uma solução AB, com 50 mL do reagente A e 1 mL do reagente B, foi

preparada. Então, 1 mL da solução proteica foi pipetada em tubos de ensaio. Em seguida, 3 mL da solução AB foram adicionados e os tubos agitados e incubados à temperatura ambiente, no escuro, por 10 min. Após a incubação, 300 µL do reagente Folin foi adicionado às amostras e os tubos foram agitados e incubados novamente, no escuro, por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 760 nm.

4.7.6 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Para determinar a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica e inorgânica oxidável (APHA, 2012) as seguintes soluções foram preparadas:

1. Solução de Digestão - alta concentração:

Pesou 15,0773 g de $K_2Cr_2O_7$ (Dicromato de potássio), que foi levado à estufa por 2 h a 150 °C. Após esse período, o dicromato de potássio foi levado ao dessecador para esfriar. Então, 10,1264 g de dicromato de potássio seco foi pesado e diluído em 500 mL de água destilada em balão volumétrico de 1000 mL. Então, adicionou-se, vagarosamente, pela parede do balão volumétrico 167 mL de ácido sulfúrico concentrado e em seguida 33,3003 g de $HgSO_4$ e completou o volume do balão com água destilada. O procedimento foi realizado na capela e o frasco armazenado em temperatura ambiente.

2. Solução de ácido sulfúrico:

Pesou-se 10,11 g de Ag_2SO_4 , que foi adicionado em 1 L de H_2SO_4 concentrado. Um período de 2 dias de repouso foi realizado para ocorrer a mistura. A solução foi armazenada no próprio frasco de ácido sulfúrico concentrado e mantida em geladeira.

3. Solução de Biftalato de Potássio para a montagem da curva linear de calibração padrão:

Pesou-se 1,5054 g de biftalato de potássio, que foi esmagado levemente e seco na estufa por 24 h a 110 °C. Após esse tempo, preparou-se seis soluções de biftalato de potássio nas concentrações 0,425 g/L, 0,255 g/L, 0,170 g/L, 0,1275 g/L, 0,0855 g/L e 0,0425 g/L para a construção da curva de calibração (Apêndice 1.4).

As análises das amostras em estudos foram realizadas em tubos de vidro de 10 mL com tampa. Foram adicionados, então, 2,5 mL das soluções, 1,5 mL de solução de digestão de alta

concentração (dicromato) e 3,5 mL de solução de ácido sulfúrico com sulfato de prata. A água destilada foi utilizada como branco.

Para que vazamentos não fossem observados, fita veda-rosca foi utilizada nos tubos. Após isso cada tubo foi submetido a um giro da posição de 90° até a posição 180°, retornando a posição de 90° vagarosamente ou até sua homogeneização. Só então, os tubos foram colocados no digestor (a 150 °C), por duas horas na capela de exaustão. Após duas horas, os tubos foram retirados e colocados em um suporte. Os tubos foram mantidos então no escuro a temperatura ambiente por 1 hora. Após arrefecer, as tampas e a fita veda-rosca foram removidas e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm.

4.7.7 Determinação de sólidos totais, fixos e voláteis

Para a determinação de sólidos voláteis (SV), inicialmente a secagem da cápsula de porcelana vazia foi realizada por 30 minutos a 550 °C na mufla. Após isso, a cápsula foi mantida em um dessecador de sílica gel para que após o arrefecimento seu peso (P_1) fosse aferido.

Coletou-se 20 mL (V) de amostra que foram centrifugadas por 20 minutos a 4000 rpm. O precipitado formado no fundo do tubo da centrífuga foi transferido para uma cápsula previamente seca e deixada na estufa por 24 horas a 105 °C. Após 24 horas, a cápsula contendo o sedimento foi retirada da estufa, alocada em um dessecador e sua massa foi aferida (P_2). Na sequência, colocou-se a cápsula na mufla (calcinação) por 30 minutos a 550 °C. Só então, a cápsula foi novamente transferida para um dessecador para esfriar e a massa ser aferida (P_3). Os Sólidos Totais, os Sólidos Fixos e os Sólidos Voláteis foram determinados pelas Equações 4, 5 e 6.

$$ST \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{P_1 - P_2}{V(mL)} * 10^6 \quad (4)$$

$$SF \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{P_3 - P_1}{V(mL)} * 10^6 \quad (4)$$

$$SV = ST - SF \quad (6)$$

4.7.8 Determinação de Metais

As concentrações de sódio, potássio, ferro, cálcio e manganês foram determinadas através da Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (EAAC), Shimadzu modelo AA-7000 Series. Sendo as amostras previamente diluídas em água destilada e filtradas em filtros com porosidade de 0,22 μm .

4.7.9 Determinação de açúcares e etanol

A quantificação de etanol e açúcares presentes no meio foi obtida por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, Shimadzu modelo LC-20A Proeminência, Supelcogel, coluna C-610H), sendo que os compostos de açúcares e etanol foram detectados pelo índice de refração. As amostras foram filtradas (porosidade 0,22 μm) e injetadas no equipamento.

A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido fosfórico a 0,1 % (v/v), a vazão da bomba foi 0,5 mL/min, a temperatura do forno foi 32 °C e o volume de injeção 20 μL . As áreas obtidas nos cromatogramas para cada composto foram convertidas em concentrações em g/L por meio de curvas de calibração previamente estabelecidas.

4.7.10 Determinação da Turbidez

A turbidez foi medida utilizando um turbidímetro da marca TECNOPON TB – 1000. Primeiramente, foi construída uma curva de calibração com amostras de soluções padrão que acompanham o equipamento, e, em seguida, a amostra foi introduzida no equipamento, que indicou o valor do parâmetro em unidades nefelométricas de turbidez (NTU).

4.7.11 Determinação da Condutividade

A condutividade foi medida em um condutivímetro de bancada modelo W12 (BEL ENGINEERING). A medida foi realizada colocando o sensor nas amostras e, com isso, o próprio equipamento indicava o valor desse parâmetro.

4.7.12 Determinação de Carbono e Nitrogênio Total

As medições de nitrogênio total e carbono foram realizadas por meio da técnica de combustão catalítica a alta temperatura, utilizando o aparelho analisador *Total Organic Carbon Analyzer* TOC-L CPH/CPN da Shimadzu. As amostras foram previamente diluídas dez vezes e filtradas (porosidade de 0,22 μm) antes de serem injetadas.

Após a injeção, o equipamento foi capaz de gerar gráficos cujas áreas eram referentes às concentrações dos compostos. Essas áreas foram convertidas em concentrações em g/L por meio de curvas de calibração previamente estabelecidas.

4.7.13 Determinação do pH

O pH foi medido, através do método potenciométrico, utilizando pHmêtro digital de bancada marca Gehaka (Modelo PG2000), devidamente calibrado, conforme o procedimento descrito por APHA (2012). A leitura foi realizada através da introdução do eletrodo nas amostras.

4.8 Determinação de parâmetros cinéticos: máxima taxa específica de crescimento e tempo de duplicação

A máxima taxa específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi determinada durante a fase de crescimento exponencial através do coeficiente angular da reta ajustada para a variação do logaritmo neperiano da densidade celular com o tempo (Equação 7).

$$\ln x = \ln x_0 + \mu_{\text{max}} \cdot t \quad (7)$$

O tempo de duplicação celular (t_d) foi determinado pela razão entre o logaritmo neperiano de 2 e $\mu_{\text{máx}}$, conforme Equação 8.

$$t_d = \ln 2 / \mu_{\text{max}} \quad (8)$$

4.9 Determinação da eficiência de remoção

A eficiência de remoção é dada pela Equação 9, em que C_0 é a concentração inicial e C_f é a concentração final do componente.

$$E (\%) = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100 \quad (9)$$

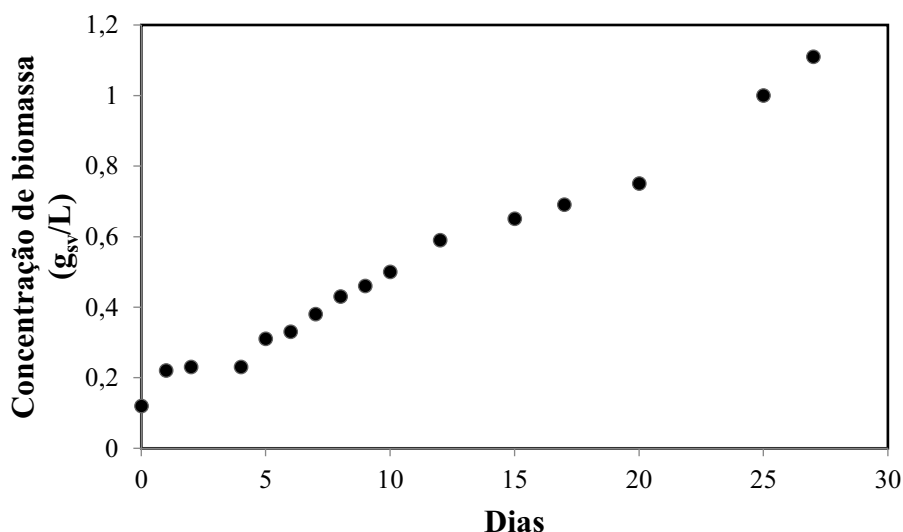
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento e remoção de nutrientes em meio de cultivo padrão

5.1.1 *Spirulina platensis*

Durante 12 dias avaliou-se a cinética de crescimento da *Spirulina platensis* (Figura 5), bem como o acúmulo de metabólitos e o consumo de nutrientes (Tabela 9).

Figura 5. Curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis*.



Através da curva de crescimento, foi possível calcular a taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de geração ou duplicação. Apesar do crescimento da *Spirulina platensis* ter sido, praticamente, constante ao longo dos 27 dias, optou-se por utilizar os pontos entre o 4º e 12º dia para o cálculo de μ , devido ao menor tempo de cultivo. Um tempo de cultivo muito prolongado pode inviabilizar a utilização da microalga. Dessa forma, fez-se o ajuste da curva do logaritmo neperiano da concentração de biomassa *versus* tempo, obtendo a taxa específica de crescimento, conforme mostrado na Equação 8, de 0,105 dias⁻¹. O tempo de duplicação, dado pela Equação 9, foi 6,60 dias.

Houve um aumento de biomassa no período avaliado, atingindo uma concentração de 0,59 gsv/L no 12º dia, em que amostras foram colhidas para análise. Como a curva de crescimento não estava estabilizada realizaram-se as medições de biomassa até o 27º dia. Neste momento a densidade da cianobactéria atingiu 1,11 gsv/L.

Conforme mostrado na Tabela 9, ao longo dos dias houve um aumento no acúmulo de

proteína total e clorofila-a. Além disso, uma redução de carbono, nitrogênio e fósforo do meio.

Tabela 9. Variação da quantidade de carbono, fósforo, nitrogênio do meio de cultivo e acúmulo de clorofila e proteína no interior da célula da microalga *Spirulina platensis*.

Componente	Dia 0	Dia 12
Carbono total (mg/L)	2428*	1830 ± 100
Nitrogênio total (mg/L)	422,0*	122,94 ± 1,68
Fósforo (mg/L)	88,9 ± 15,20	76,4 ± 8,95
Proteína total (mg/L)	-	317,32 ± 22,81
Clorofila-a (mg/L)	1,82 ± 0,21	5,44 ± 0,40

*Valores teóricos calculados baseado na formulação do meio de cultivo

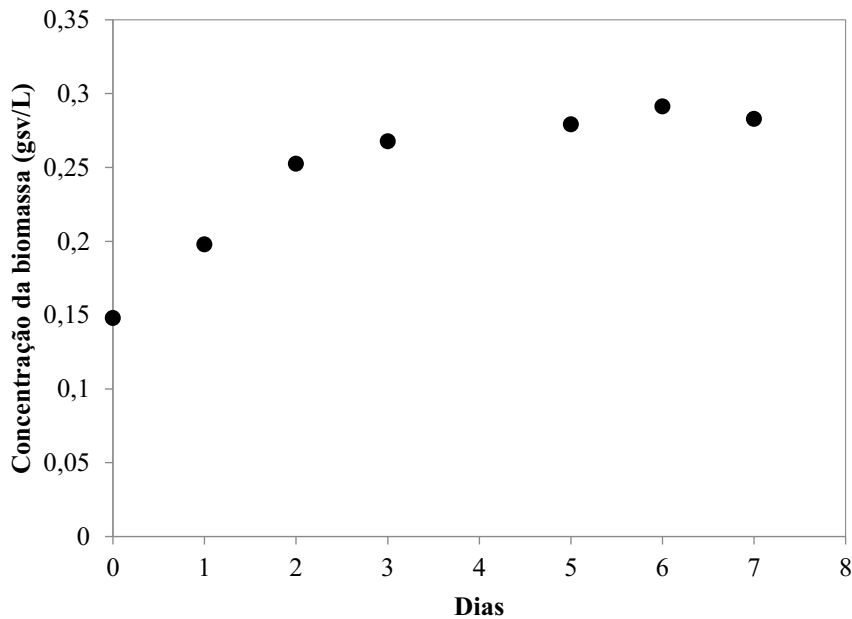
A quantidade removida de carbono, nitrogênio e fósforo foi de 25, 71 e 14%, respectivamente, o que é promissor, pois altos níveis desses elementos nos corpos hídricos podem levar a uma eutrofização do meio (WLEGAND *et al*, 2016). A diminuição desses nutrientes demonstrou que a *Spirulina platensis* possui potencial para ser utilizada no tratamento de efluentes contendo como contaminantes C, N e P.

Durante os 12 dias a cianobactéria foi capaz de acumular 5,44 mg/L de clorofila, que representa um aumento de 299% em relação ao dia zero. No 12º dia a concentração de proteína no meio foi de 317,32 mg/L, o que equivale a 53,7% da biomassa algal. Conforme Becker (2007), a concentração proteica da microalga *Spirulina platensis* pode variar entre 46 a 63%, o que significa que os valores obtidos são coerentes com a literatura.

5.1.2 *Chlorella vulgaris*

Durante sete dias, a cinética de crescimento da alga verde (Figura 6), a remoção e o acúmulo de componentes no meio BBM metabolizados pela *C. vulgaris* (Tabela 10) foram avaliados.

Figura 6. Curva de crescimento da alga verde *Chlorella vulgaris* em meio BBM.



Houve um aumento da biomassa ao longo do tempo, até sua estabilização após 3 dias, sendo obtida a máxima concentração de biomassa de 0,3 g_{sv}/L.

De acordo com as Equações 8 e 9, e considerando os pontos entre os dias 0 e 2, calculou-se a taxa específica de crescimento e o tempo de duplicação. Dessa forma temos que μ foi de 0,27 dias⁻¹ e o tempo de duplicação foi de 2,60 dias. Conforme apresentado por Fonseca et al. (2014) e Mahlmann, Jahnke e Loosen (2008), a *S. platensis* possui um diâmetro celular (11,63 μ m) de quase duas vezes o diâmetro da *Chlorella vulgaris* (6,5 μ m). Segundo estudos realizados por Campos et al. (2010), espécies dotadas de menores biovolumes celulares apresentaram maiores velocidades de crescimento.

Durante o crescimento, a *C. vulgaris* removeu carbono (24%), nitrogênio (64%) e fósforo (70%) do meio, como observado na Tabela 10. Essa capacidade de remoção demonstrou a possibilidade da aplicação dessa microalga no tratamento de efluentes para a remoção de carga orgânica, assim como a *S. platensis*.

Tabela 10. - Variação da quantidade de carbono, fósforo, nitrogênio do meio de cultivo e acúmulo de clorofila e proteína no interior da célula da microalga *C. vulgaris*.

Componentes	Dia 0	Dia 3	Dia 6
Carbono total (mg/L)	27,00*	25,61±0,89	20,48±1,16
Nitrogênio total (mg/L)	127,30*	49,96±0,68	45,45±0,25
Fósforo (mg/L)	53,10*	16,24±0,47	16,12±2,53
Proteína total (mg/L)	47,44±1,79	51,92±2,36	66,79±12,98
Clorofila total (mg/m ³)	2,94±0,10	-	3,37±0,05

**Valores teóricos calculados baseado na formulação do meio de cultivo

Dos principais macronutrientes necessários para o crescimento das algas, o nitrogênio (N) é tido como essencial, por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, sendo que a abundância deste elemento no meio tende a aumentar as quantidades de proteínas e clorofila nas células. Por outro lado, sua carência, tende a diminuir as taxas de crescimento celular (BAUMGARTNER et al., 2013). É o que se pode observar na Tabela 10. Mesmo com um rápido crescimento a *C. vulgaris* foi capaz de aumentar em 15% a quantidade de clorofila, elemento fundamental para realização da fotossíntese, e de acumular proteína, aumentando em 41% a quantidade inicial. Demonstrando com isso uma rápida capacidade de metabolização.

Conforme apresentado, podemos concluir que as duas microalgas possuem potencial para serem utilizadas no tratamento de efluentes e no acúmulo de subprodutos. A *C. vulgaris* apresentou maior taxa de crescimento e menor tempo de duplicação, tornando a sua utilização mais viável. Sendo assim, essa foi a microalga escolhida para dar continuidade nas outras etapas desse trabalho.

5.2 Caracterização do soro de leite

Os parâmetros medidos no soro de queijo bruto e coagulado, assim como os padrões de lançamentos determinados pelas legislações vigentes, encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Caracterização do soro de queijo bruto e coagulado.

Parâmetro	Soro de queijo bruto	Soro de queijo coagulado	Padrões de lançamento
Proteína (mg/L)	6469 ± 127	3412 ± 223	
pH	3,5 – 4,5	6,5 – 7,0	5-9 ⁽¹⁾
DQO (g/L)	49,47 ± 1,06	42,47 ± 1,56	0,18 ⁽¹⁾
Sólidos Totais (g/L)	2,77 ± 0,08	0,95 ± 0,05	0,1 ⁽¹⁾
Sólidos Voláteis (g/L)	2,70 ± 0,13	0,85 ± 0,13	
Sólidos fixos (g/L)	0,075 ± 0,05	0,10 ± 0,08	
Turbidez (NTU)	1000	94	
Condutividade (mS)	1,4 - 3,4	6,0 - 7,27	
Fósforo Total (mg/L)	221,75 ± 3,69	105,06 ± 5,61	
Carbono total (g/L)	43,26	19,34	
Carbono Orgânico Total (g/L)	42,07	18,89	
Carbono inorgânico (g/L)	0,78	0,45	
Lactose (g/L)	21 - 23	10 - 13	
Nitrogênio Total (mg/L)	2016	848	20* ⁽²⁾
Mg (mg/L)	21,69 ± 0,35	20,31 ± 1,73	
K (mg/L)	107,08 ± 0,81	107,43 ± 0,27	
Fe (mg/L)	2,22 ± 0,09	1,75 ± 0,08	
Na (mg/L)	1162,04 ± 0,59	1226,30 ± 4,10	
Ca (mg/L)	144,24 ± 1,52	132,06 ± 0,61	

*Nitrogênio amoniacal total

⁽¹⁾CONAMA (2011)⁽²⁾COPAM (2008)

Conforme observado na Tabela 11, no soro de queijo coagulado há diminuição de quase todos os parâmetros, como proteína, DQO, sólidos, fósforo, carbono, lactose, nitrogênio e de alguns metais. Apesar dessa redução, tanto no efluente bruto quanto no coagulado os valores desses parâmetros estão acima dos padrões de lançamento permitidos pela legislação, conforme mostrado na Tabela 11, para o descarte nos corpos hídricos. Por isso, é proibido o despejo de soro, de forma direta ou indireta, nos cursos de água. Segundo a lei federal nº 9605 de 13 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), os laticínios devem, obrigatoriamente, tratar seus efluentes industriais antes do descarte final.

Com relação à alta carga orgânica, a concentração de lactose e de proteína são os principais responsáveis. Em geral, os valores para o soro de queijo variam entre 50-102 g/L de DQO, indicando uma poluição 100 vezes maior comparada à de um efluente doméstico comum.

A alta salinidade é consequência do tipo de soro produzido no processo e pela adição de NaCl, durante a produção (DRAGONE et al., 2009; VENETSANEAS et al., 2009).

Siso (1996), em seus estudos, encontrou 6 g/L de proteína e 60 g/L de DQO para o soro de queijo. Yang, Yu e Hwang (2003) obtiveram um teor de carbono orgânico total de 35,7 g/L. Tedesco et al. (1995) observaram um teor de 0,9 g/L de nitrogênio e 0,7 g/L de fósforo. Dessa forma, os valores obtidos na Tabela 11 encontram-se de acordo com os da literatura.

5.3 Ensaio com soro de queijo bruto

Conforme pôde ser observado na caracterização, os soros de queijo bruto e coagulado necessitam de tratamento. Realizou-se, primeiramente, ensaios com o soro sem pré-tratamento.

As quantidades de clorofila no início e ao final do ensaio com soro de queijo bruto constam na Tabela 12. É possível observar que houve um acúmulo de clorofila quando a microalga foi cultivada em meio BBM e em meio contendo 1% de soro. Nas demais concentrações desse subproduto a quantidade de clorofila dos dias zero e seis permaneceram dentro da mesma faixa de valores.

Tabela 12. Concentração de clorofila no primeiro e último dia do ensaio de *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de leite em diferentes concentrações.

	Clorofila Total (mg/m ³)					
	BBM	1%	10%	25%	50%	Soro
Dia 0	2,51 ± 0,22	3,19 ± 0,21	3,14 ± 0,47	3,77 ± 0,12	2,53 ± 0,10	2,8 ± 0,10
Dia 6	3,75 ± 0,34	6,37 ± 0,41	3,68 ± 0,49	3,61 ± 0,46	2,35 ± 0,17	3,5 ± 0,20
Aumento	49%	100%	-	-	-	-

Segundo Seyfabadi et al. (2010), a irradiância influencia no crescimento celular, atividades metabólicas e no acúmulo de subprodutos nas microalgas. O aumento da luminosidade tende a aumentar a biomassa da microalga. Dessa forma, quanto menor a concentração de soro no meio de cultivo, maior será a quantidade de luz penetrando, favorecendo o crescimento da alga. Além disso, a presença de nutrientes em quantidades adequadas no meio favorece o acúmulo de bioprodutos. A literatura sugere que o aparato fotossintético na alga verde *Chlorella* pode ser perturbado pela presença de substratos orgânicos, resultando em uma diminuição da produção de pigmentos fotossintéticos (YANG et al., 2000). Dessa forma, a condição mais propícia para o crescimento e produção de clorofila foi no meio contendo 1% de soro, conforme demonstra os resultados obtidos.

Conforme reportado por Abreu et al. (2012), a *Chlorella vulgaris* tem um melhor crescimento da biomassa em cultivos mixotróficos com substratos orgânicos do que no cultivo com meio inorgânico. Bracher et al. (2015) demonstraram que a presença de efluente de laticínios no meio de cultivo contribui para o aumento da biomassa em relação ao meio padrão.

Ao longo dos dias a microalga *C. vulgaris* foi capaz de produzir e acumular proteína no seu interior quando cultivada em meio BBM e nos meios contendo 1 e 10% de soro. Em seis dias a microalga produziu 8,24, 4,07 e 86,87 miligramas de proteína por litro de solução, respectivamente. Nas demais diluições e no soro puro a quantidade de proteína se manteve constante ao longo dos dias.

No cultivo contendo 10% de soro de queijo houve a maior produção de proteína. Isso pode ser justificado pelo alto teor de nitrogênio contido nesse meio em comparação com o meio BBM e o meio contendo 1% de soro, já que esse é um elemento essencial à constituição desse bioproduto pelas algas (HU, 2004). Segundo Martinez et al. (2000), a abundância de nitrogênio no meio induz a produção de proteína pelas células das algas. Porém, conforme estudos realizados por Chen et al. (2011b), o alto teor de nitrogênio presente no meio pode inibir o desenvolvimento da microalga. O que pode ter ocorrido neste trabalho para as condições com concentrações de soro de mais de 10%.

Para o estudo com a microalga *C. protothecoides*, realizado por Li et. al (2015), o conteúdo de proteína ao final do cultivo heterotrófico foi maior do que no cultivo autotrófico, semelhante ao encontrado no presente trabalho, em que o teor de proteína acumulado no meio com 10% de soro foi superior ao do meio BBM. Estudos realizados por Matos et. al (2015) utilizando a *Chlorella* sp. mostraram que essa espécie foi capaz de acumular 0,71 g/L de proteína em sete dias de cultivo, representando 46% da biomassa. O alto teor de proteína encontrado por Matos, valor superior ao obtido nesse trabalho, pode ser devido a grande quantidade de biomassa que eles obtiveram (1,55 g/L) ao final do ensaio e também pelo cultivo aerado utilizado por eles. Ji et al. (2014) também demonstraram que a variação do meio de cultivo possui grande influência na produção de proteína pelas microalgas. Eles demonstraram que na presença de qualquer quantidade de compostos orgânicos a proteína acumulada é superior ao meio inorgânico.

A *Chlorella vulgaris* foi capaz de produzir, também, etanol (Tabela 13). ao longo do ensaio nos meios com 25, 50 e 100% de soro. Com um aumento, para o primeiro caso, de cerca de duas vezes em relação ao teor de etanol inicial.

Tabela 13. Produção de etanol (g/L) pela microalga *Chlorella vulgaris* em meio suplementado com soro de queijo.

	1% de soro	10% de soro	25% de soro	50% de soro	Soro puro
Dia 0	-	-	0,46	0,53	0,38
Dia 6	-	-	0,92	0,88	0,67

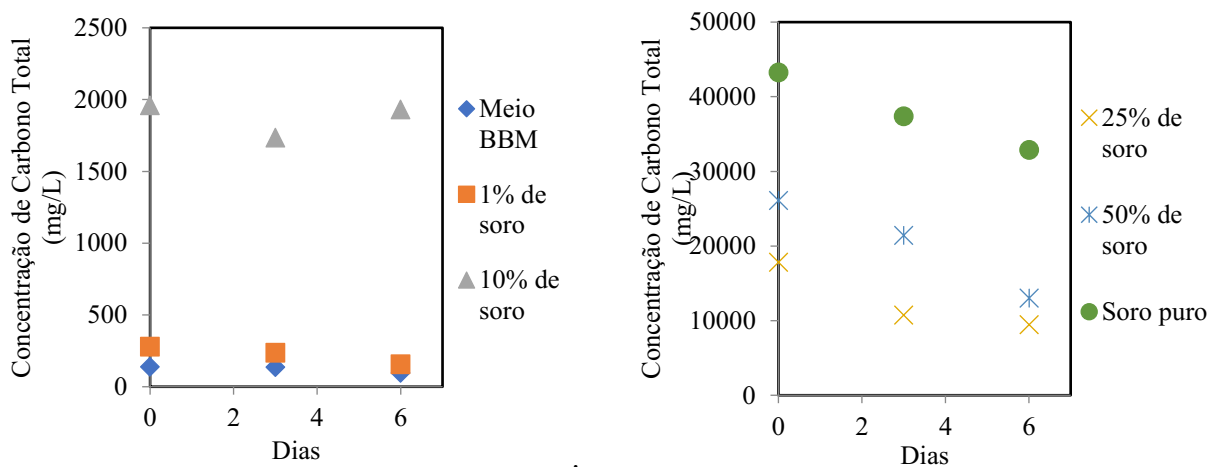
Trabalhos encontrados na literatura sugerem que é possível produzir etanol a partir do metabolismo de microalgas cultivadas em meio basal suplementado com a fonte de carbono (COSTA et al., 2014). O metabolismo das microalgas é complexo, incluindo uma ampla variedade de subprodutos finais resultantes da fermentação em diferentes condições de crescimento. O processo de fermentação ocorre em ambientes escuros e anaeróbicos ou à luz após a depleção de enxofre. Esses subprodutos são dióxido de carbono, hidrogênio, acetato, formato, etanol, lactato, glicerol, malato e succinato (Philipps et al., 2011, Mus et al., 2007). Segundo Gfeller e Gibbs (1984), acetato, formato e etanol são os principais compostos anaeróbicos produzidos por culturas repletas de enxofre.

Costa et al. (2015) constataram que a adição de certas fontes de nutrientes no meio de cultivo promove a produção de etanol pela microalga. Obtendo uma concentração de 9,64, 13,11 e 14,94 g/L desse biocombustível na presença de acetato de sódio, permeado de soro de leite e na presença de ambos, respectivamente, na concentração de 1,0 g/L, quando a alga verde *C. reinhardtii* foi utilizada.

Conforme mostrado na Figura 7, houve uma redução da concentração de carbono total no meio de cultivo ao longo dos dias. As remoções foram de 31, 44, 1, 47, 50 e 24% e ocorreram no meio BBM, naqueles com 1, 10, 25 e 50% de soro, e no meio contendo apenas o soro bruto, respectivamente.

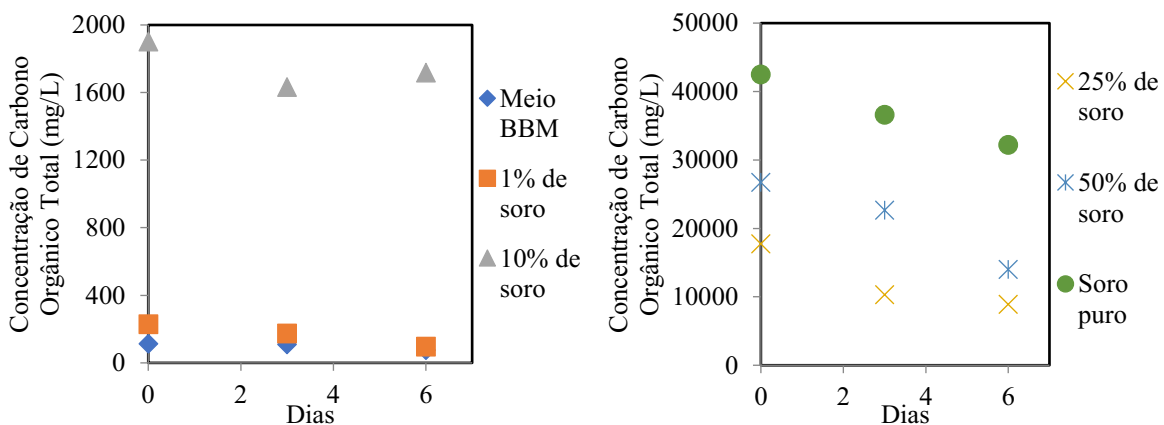
Para o meio contendo 10% de soro (Figura7), a concentração de carbono aumentou do dia 3 para o dia 6. Isso pode ter ocorrido devido a lise celular. Além disso, nessa condição, houve a menor remoção de carbono do meio, indicando que a microalga seguiu uma rota metabólica diferente nesse caso.

Figura 7. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo bruto.



A remoção de carbono orgânico total ocorreu em todos os ensaios (Figura 8). Os ensaios com as maiores remoções foram para os meios com 1, 25 e 50% de soro, em que as reduções foram de 58, 50 e 48%, respectivamente.

Figura 8. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo bruto.

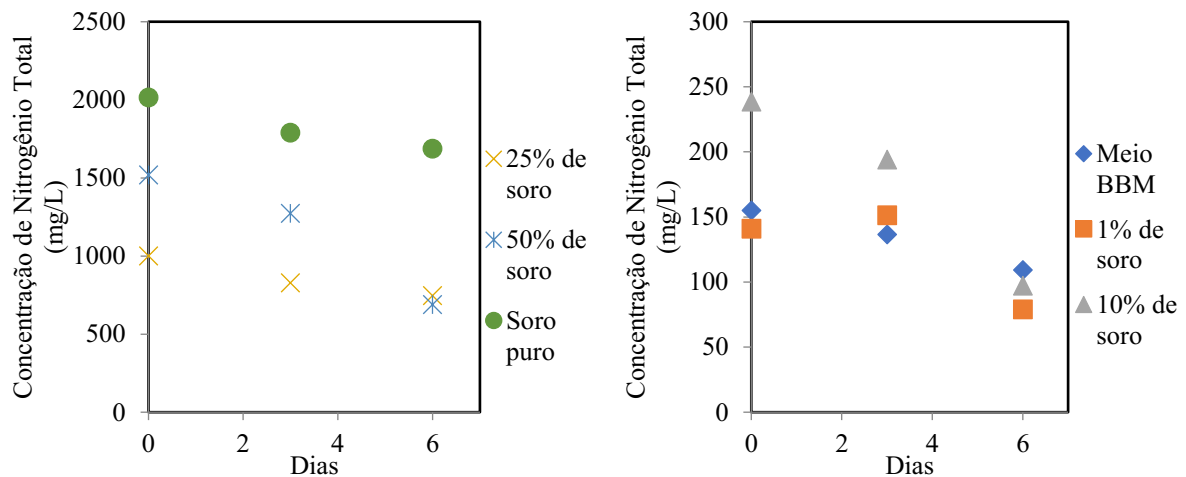


Posadas et. al. (2013) conseguiram uma remoção de COT de 91% em biorreator algal-bacteriano após 10 dias de tratamento de esgoto doméstico, com concentração inicial de COT de 172 mg/L. A eficiência média de remoção de COT de 85,3% foi obtida por Shen et al. (2015) utilizando *S. obliquos* em efluente municipal. Tal resultado é semelhante ao encontrado por Zhu et al. (2013) e Posadas et al. (2013).

A remoção de carbono orgânico pode ser explicada pela habilidade de algumas espécies de crescerem com metabolismo heterotrófico, assimilando compostos orgânicos imediatamente quando transferidas para o escuro (QUEIROZ et al., 2001).

Com relação ao teor de nitrogênio, houve redução em todos os meios de cultivo (Figura 9). As remoções foram de 30, 44, 59, 25, 55 e 16% e ocorreram no meio BBM, naqueles com 1, 10, 25 e 50% de soro, e no meio contendo apenas o soro bruto, respectivamente. A maior remoção foi de 59% para o ensaio com 10% de soro de queijo, confirmando que o maior acúmulo de proteína nessa condição é derivado do maior consumo de nitrogênio pela microalga.

Figura 9. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo.



Em cultivos da *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* em meio *obliquus Wright's Cryptophyte* (WC) foram obtidos remoções de nitrogênio de 85 e 100% (BEUCKELS; SMOLDERS; MUYLAERT, 2015). Valores maiores que os encontrados nesse trabalho, demonstrando que, dependendo das condições de cultivo, é possível aumentar a eficiência da microalga para redução desse componente.

De forma complementar, a determinação da DQO no meio de cultivo ao longo dos dias foi realizada, conforme apresentado na Tabela 14. Em todos os ensaios houve uma significativa remoção desse parâmetro, que variou de 17%, para o ensaio contendo 10% de soro, a 91% de remoção para o cultivo da microalga em soro puro. Indicando que a microalga foi capaz de remover carga orgânica do meio.

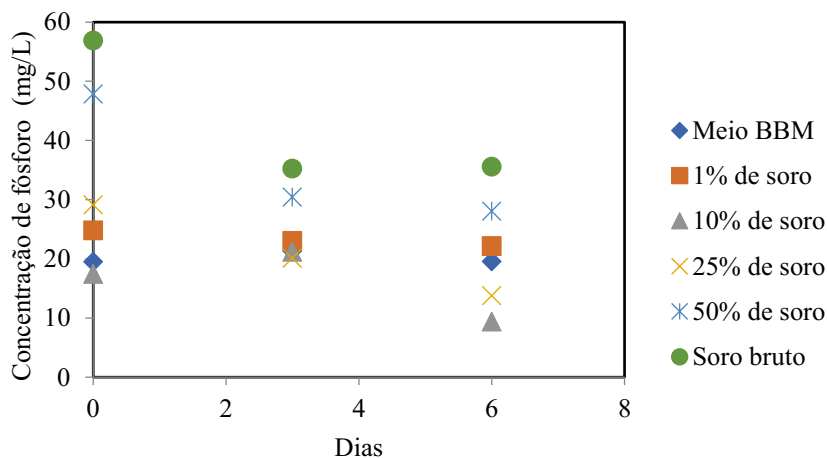
Tabela 14. Variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) do meio, dada em g/L, ao longo dos dias de cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo soro de queijo.

	BBM	1%	10%	25%	50%	Soro
Dia 0	0,18 ± 0,12	0,46 ± 0,05	4,85 ± 0,17	17,85 ± 2,27	31,65 ± 0,05	40,38 ± 3,54
Dia 3	0,07 ± 0,03	0,43 ± 0,11	4,68 ± 2,34	5,08 ± 2,81	25,5 ± 4,01	4,69 ± 2,35
Dia 6	0,05 ± 0,02	0,2 ± 0,09	4,01 ± 2,01	9,64 ± 4,91	18,29 ± 1,6	3,52 ± 1,78
Redução	72%	57%	17%	46%	40%	91%

Zhu et al. (2013) verificaram que 74,29%, 78,18%, 79,84%, 76,46%, 65,81% e 67,25% da DQO foram removidos das concentrações de 3,5; 2,5; 1,9; 1,3; 0,8 e 0,4 g/L de DQO pela *Chlorella zofingiensis* cultivada em efluente de suinocultura. Esses valores foram inferiores ao obtido no presente trabalho para o meio contendo soro puro (91% de remoção). Isso pode ter ocorrido devido à maior DQO do soro de queijo ou pela maior capacidade de remoção de carga orgânica pela espécie de microalga utilizada.

A remoção de fósforo ao longo dos seis dias de cultivo, conforme a Figura 10, foram de 0, 11, 46, 53, 41 e 37% e ocorreram no meio BBM, naqueles com 1, 10, 25 e 50% de soro, e no meio contendo apenas o soro bruto, respectivamente. Houve um aumento da porcentagem de remoção com a elevação do teor de soro de queijo no meio de cultivo até a diluição de 25%. O aumento da concentração de soro a partir desse valor levou a uma diminuição no teor de remoção. Apesar disso, ainda foi possível obter reduções significativas nessas condições .

Figura 10. Variação da concentração de fósforo do meio ao longo dos dias de cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo soro de queijo.



Aravantinou, Theodorakopoulos e Manariotis (2013) perceberam em seus ensaios que a concentração total de fósforo foi significativamente diminuída (abaixo de 1,8 mg/L) para as espécies de água doce, *B. braunii*, *S. rubescens*, *Chlorococum spec.*, *N. vigensis* e *C. protothecoides* durante a primeira semana, obtendo 96, 94, 94, 82% de remoção, respectivamente. Em contraste, a concentração de fósforo não foi significativamente diminuída pelas espécies marinhas: *P. tricomutum*, *D. tertiolecta* e *N. gaditana*. Além desses microrganismos, eles avaliaram a capacidade da *Chlorella vulgaris*, espécie de água doce, que removeu 47% de fósforo do meio. Tal valor está próximo aos maiores resultados obtidos no presente trabalho.

A Tabela 15 apresenta os valores de lactose obtidos ao longo do ensaio. Assim como o carbono e a DQO, houve uma redução no teor de lactose em todos os ensaios, indicando o consumo desse componente pela microalga. Resende et al. (2018) conseguiram uma remoção de mais de 90% de lactose pela *C. vulgaris* em efluente contendo 34% de soro.

Tabela 15. Variação do teor de lactose (g/L) no meio de cultivo com soro de queijo utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*.

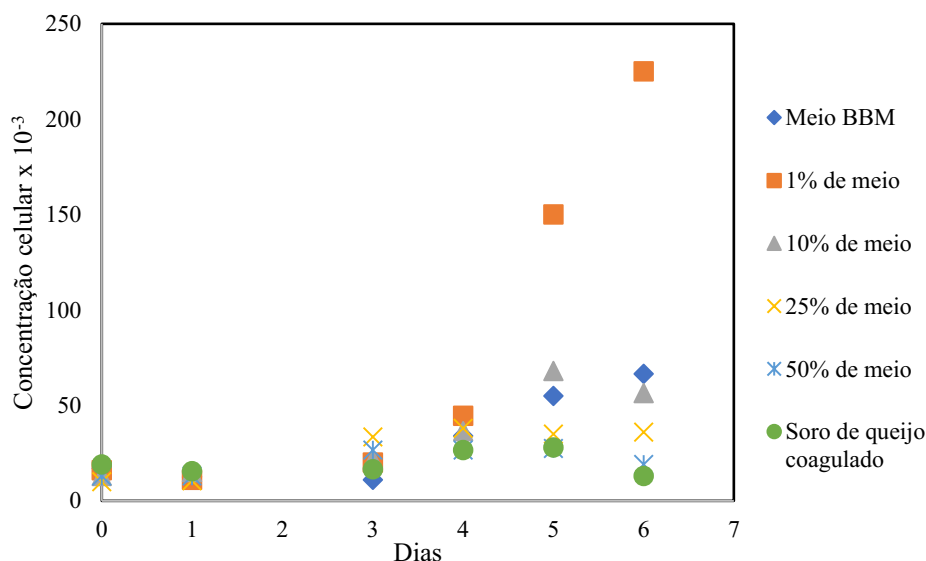
	1% de soro	10% de soro	25% de soro	50% de soro	Soro puro
Dia 0	0,13	2,52	10,81	10,69	21,92
Dia 6	0,07	1,36	2,57	4,59	16,08
Redução	46%	46%	76%	57%	27%

5.4 Ensaio com soro de queijo coagulado

Conforme mostrado na Tabela 11, o soro de queijo possui uma alta quantidade de sólidos suspensos e apresenta alta turbidez. Esses fatores podem interferir no metabolismo da microalga por impedir a passagem de luz, dificultando a fotossíntese. Por isso, optou-se por avaliar se um pré-tratamento desse subproduto aumentaria a capacidade de remoção de nutrientes e carga orgânica pela *C. vulgaris* e se aumentaria a síntese dos produtos de alto valor comercial pela microalga. Sendo assim, o soro passou por uma etapa de coagulação antes de sua utilização nos seguintes ensaios.

Ao longo dos dias, foi realizada a contagem de células a fim de se obter uma curva de crescimento da microalga *C. vulgaris* para o soro coagulado e suas respectivas diluições e em meio BBM, a qual está representada na Figura 11. Em todos os ensaios a concentração celular aumentou ao longo dos dias. O crescimento mais significativo ocorreu quando o meio continha 1% de soro, havendo um aumento de 14 vezes em relação à biomassa inicial. Para as condições com maior percentual de soro, quanto maior foi a concentração desse subproduto no meio de cultivo, menor foi o aumento do número de células.

Figura 11. Curva de crescimento celular da *Chlorella vulgaris* ao longo dos dias de cultivo em meio BBM e meio contendo soro de queijo coagulado.



A diferença entre o alto crescimento no meio com 1% de soro em relação ao que continha apenas meio BBM demonstra a grande influência da suplementação no aumento da biomassa. A utilização de um subproduto de baixo valor para produção de microalga é uma alternativa para diminuição dos custos de cultivo desse microrganismo, auxiliando na viabilidade da elaboração dos diversos produtos de origem microalgal como biodiesel e bioetanol (SALLA et al., 2016; MAIRET et al., 2011).

O acúmulo de clorofila, conforme mostrado na Tabela 16 ocorreu nas condições de cultivo com meio BBM e no meio com 1% de soro. Nos demais casos o teor permaneceu o mesmo ao longo dos dias de cultivo. O maior aumento, 2,3 vezes, se deu na condição de 1% de soro. Tal resultado é coerente com os valores de concentração celular obtidos, pois a maior quantidade de biomassa tende a fornecer maiores quantidades de clorofila. Com o soro coagulado houve um aumento na produção de clorofila em comparação com os ensaios utilizando soro bruto.

Tabela 16. Concentração de clorofila total no primeiro e último dia do ensaio de *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado em diferentes concentrações.

	Clorofila Total (mg/m ³)					
	BBM	1%	10%	25%	50%	Soro
Dia 0	2,52	2,78 ± 0,09	3,15 ± 0,31	3,54 ± 0,06	3,11 ± 0,21	1,78 ± 0,02
Dia 6	3,09 ± 0,15	6,44 ± 0,75	3,73 ± 0,22	3,31 ± 0,09	2,96 ± 0,31	2,88 ± 0,15
Aumento	23%	132%	-	-	-	62%

Diferente do ocorrido com o soro bruto, o acúmulo de proteína se deu em todas as diluições (Tabela 17). Ao longo dos dias de cultivo a microalga *C. vulgaris* foi capaz de acumular altos teores de proteína, variando em aumentos de 48 a 131%, para as condições com 50 e 10% de soro coagulado, respectivamente. O alto acúmulo faz dessa microalga uma potencial fonte proteica. A biomassa de *Chlorella* é geralmente reconhecida como seguro - GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, considerada um suplemento alimentar sem causar risco à saúde humana (COSTA et al., 2006).

Tabela 17. Concentração de proteína (mg/L) ao longo do ensaio com *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo em soro de queijo coagulado em diferentes concentrações.

Dia	BBM	1%	10%	25%	50%	Soro
0	34,75 ± 1,00	78,67 ± 1,65	562,50 ± 12,50	1250,00 ± 63,74	1300,00 ± 175,00	1358,33 ± 193,00
3	40,62 ± 2,38	117,00 ± 7,38	1141,67 ± 187,36	1621,87 ± 119,37	1841,70 ± 200,35	3018,75 ± 180,00
6	59,25 ± 8,25	131,42 ± 9,63	1300,00 ± 184,56	1896,87 ± 150,62	1925,00 ± 338,65	3062,50 ± 219,00
Aumento	71%	66%	131%	52%	48%	125%

A produção de etanol pela microalga (Tabela 18) ocorreu nos ensaios com 25, 50 e 100% de soro, sendo na primeira condição a produção mais expressiva, com um aumento de mais de cinco vezes em relação ao teor de etanol inicial. Para o ensaio com soro de queijo bruto, a produção de etanol ocorreu nessas mesmas condições, porém, atingiu um aumento de duas vezes e não de cinco como nesse ensaio.

Tabela 18. Produção de etanol (g/L) pela microalga *Chlorella vulgaris* em meio suplementado com soro de queijo coagulado.

	1% de soro	10% de soro	25% de soro	50% de soro	Soro puro
Dia 0	-	-	0,29	0,76	0,22
Dia 6	-	-	1,62	1,21	0,23

Observou-se remoção de carbono total e carbono orgânico total em todas as condições de cultivo da *C. vulgaris* em soro de queijo coagulado (Figura 12 e 13). As maiores reduções de CT, 42 e 20%, ocorreram nas condições com 1 e 10% de soro. Quando o efluente bruto foi utilizado, a remoção de carbono foi superior, chegando a 50%. Isso pode ter ocorrido devido à maior quantidade desse elemento no meio de cultivo. As maiores remoções de COT foram de 64 e 19%, para essas mesmas condições.

Figura 12. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.

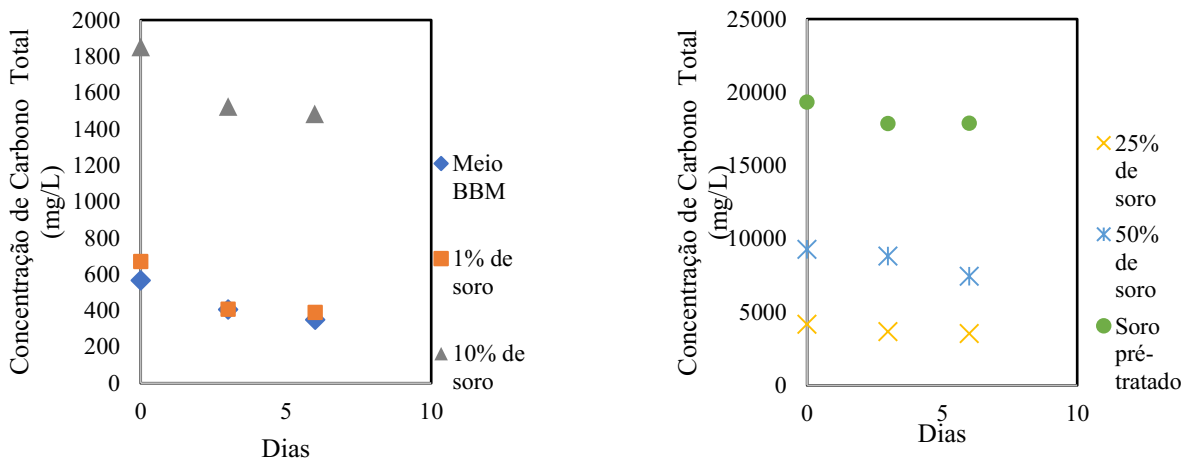
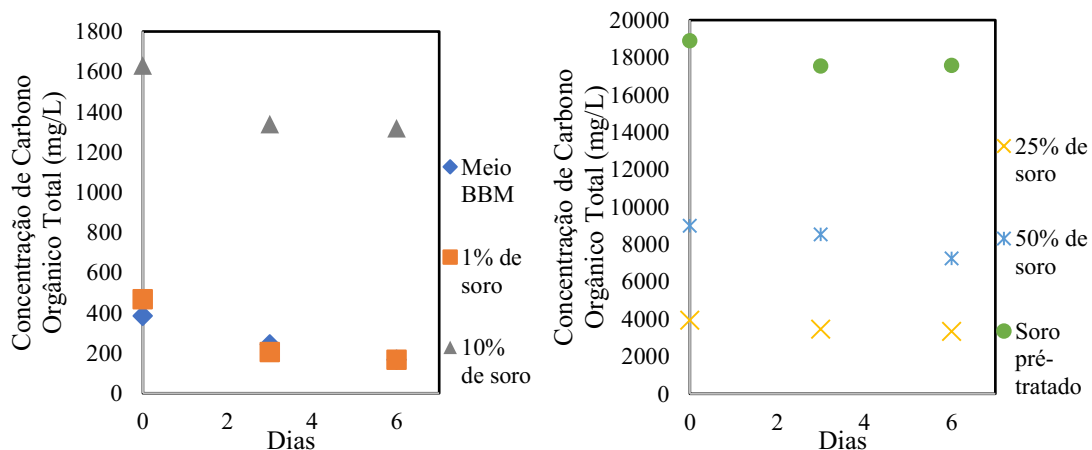
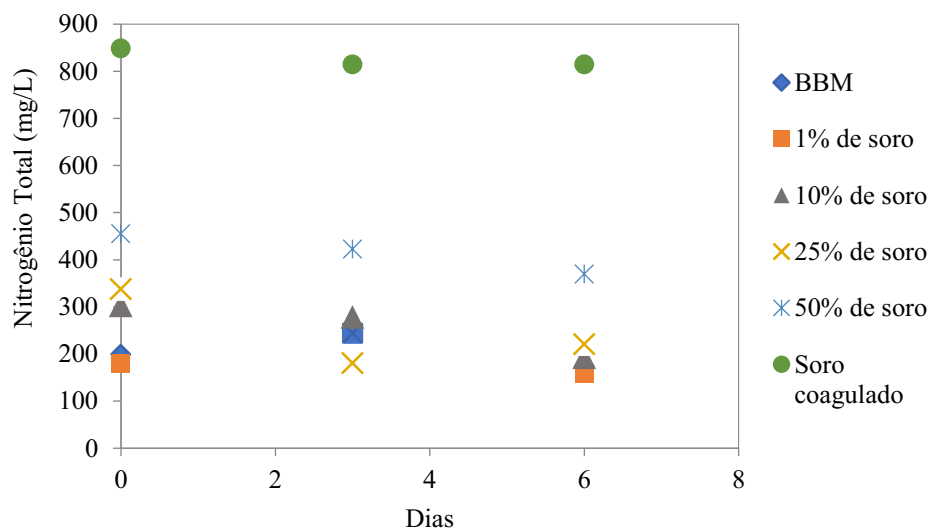


Figura 13. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.



Em todas as condições houve, também, redução do teor de nitrogênio ao longo dos dias de cultivo (Figura 14), exceto para o ensaio com 100% de soro. A maior redução foi de 36% no ensaio com 10% desse subproduto. Tal resultado pode justificar a presença do alto teor de proteína nessa condição, pois as microalgas utilizam o nitrogênio do meio para produção deste bioproduto.

Figura 14. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.



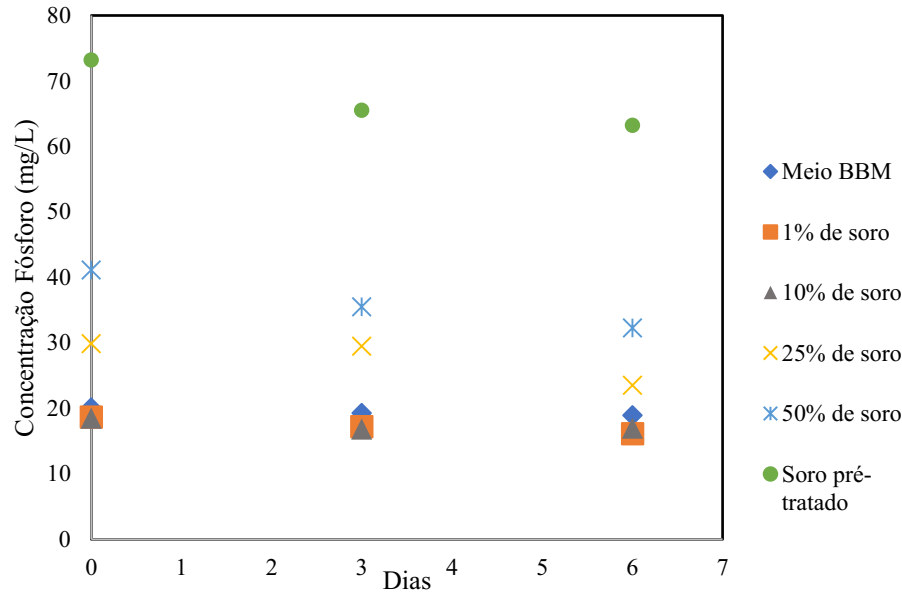
A variação da DQO pode ser observada na Tabela 19. Tem-se uma redução em todos os ensaios, sendo a maior (78%) obtida no cultivo com 1% de soro.

Tabela 19. Variação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) longo dos dias de cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.

	BBM	1%	10%	25%	50%	Soro
Dia 0	0,48 ± 0,01	0,58 ± 0,01	3,83 ± 0,03	8,65 ± 1,25	23,32 ± 1,43	39,6 ± 0,78
Dia 3	0,07 ± 0,02	0,17 ± 0,03	3,17 ± 0,28	6,94 ± 0,2	18,59 ± 3,62	32,57 ± 0,26
Dia 6	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,09	2,9 ± 0,13	6,86 ± 0,25	14,79 ± 1,25	24,75 ± 1,3
Redução	85%	78%	24%	21%	37%	38%

A remoção de fósforo também pode ser verificada (Figura 15), variando de 6 a 25% para os cultivos em meio BBM e com 50% de soro, respectivamente. Portanto, nos cultivos contendo soro de queijo bruto as remoções de nitrogênio, que chegaram a 55%, e fósforo, 53%, foram superiores aos dos ensaios com soro coagulado.

Figura 15. Variação da concentração de Fósforo ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* mantida em meio contendo soro de queijo coagulado.



Com relação ao teor de lactose, uma redução em todos os ensaios, conforme observado na Tabela 20 foi verificada. Assim como os teores de carbono, as maiores remoções de lactose, 100 e 97%, se deram nos cultivos com 1 e 10% de soro.

Tabela 20. Variação do teor de lactose (g/L) no meio de cultivo contendo soro de queijo coagulado utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*.

	1% de soro	10% de soro	25% de soro	50% de soro	Soro puro
Dia 0	0,15	1,12	2,82	8,22	10,83
Dia 6	0	0,03	1,62	3,58	10,79
Redução	100%	97%	43%	56%	-

Em todos os ensaios com soro bruto e coagulado avaliou-se a capacidade da remoção Na, Ca, K, Fe e Mg do meio pela *Chlorella vulgaris*. No entanto, não foi possível a remoção desses metais pela microalga.

A partir dos resultados apresentados e conforme as Figuras 16, 17, 18, 19, 20 e 21, ao utilizar o soro de queijo bruto houve, em geral, maior remoção de carbono, nitrogênio, fósforo e DQO. Porém, com o soro coagulado houve, maior acúmulo de clorofila proteína e etanol.

Figura 16. Aumento do teor de clorofila na microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.

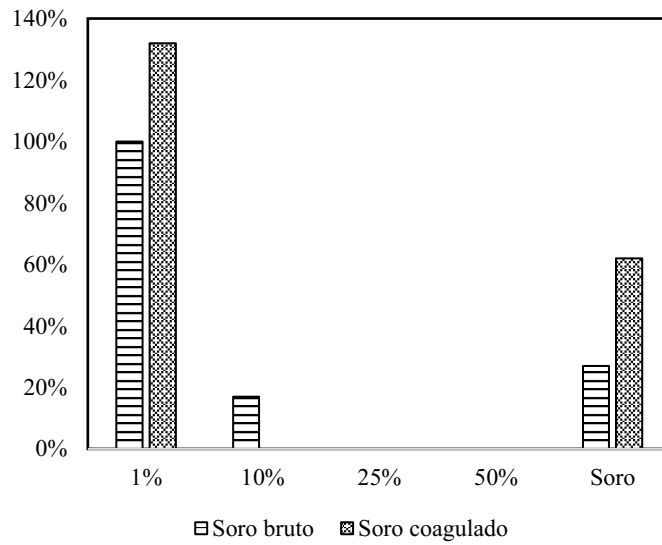


Figura 17. Aumento do teor de proteína na microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.

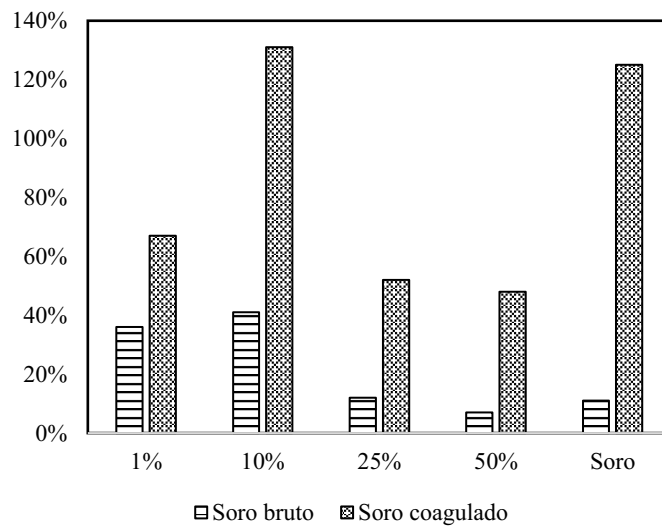


Figura 18. Redução do teor de carbono pela microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.

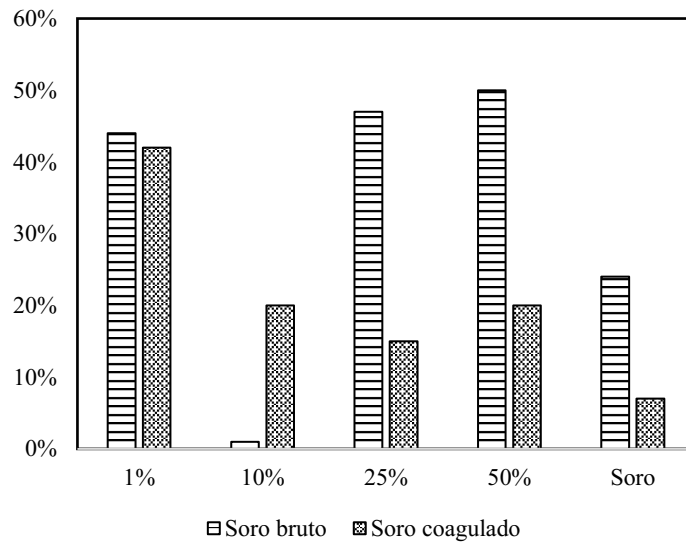


Figura 19. Redução do teor de nitrogênio pela microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado

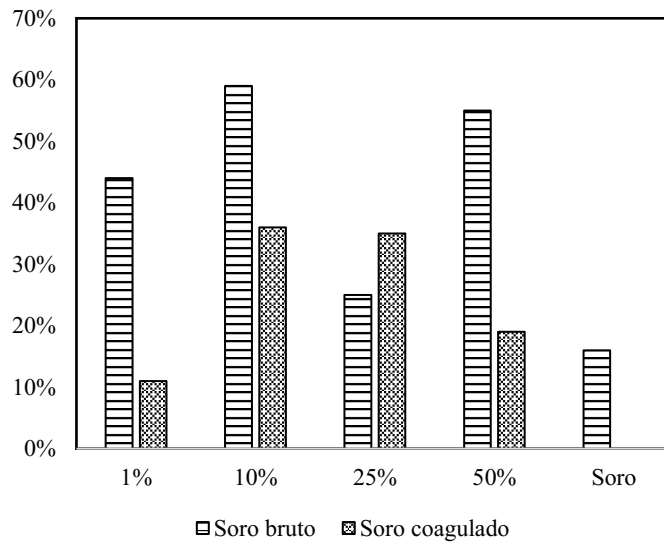


Figura 20. Redução do teor de fósforo pela microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.

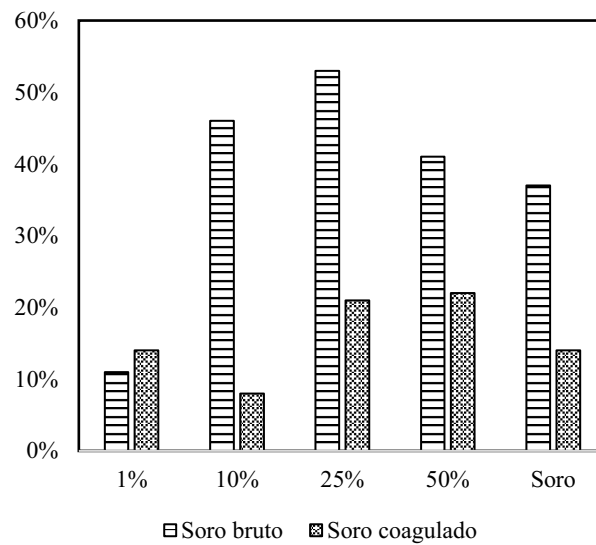
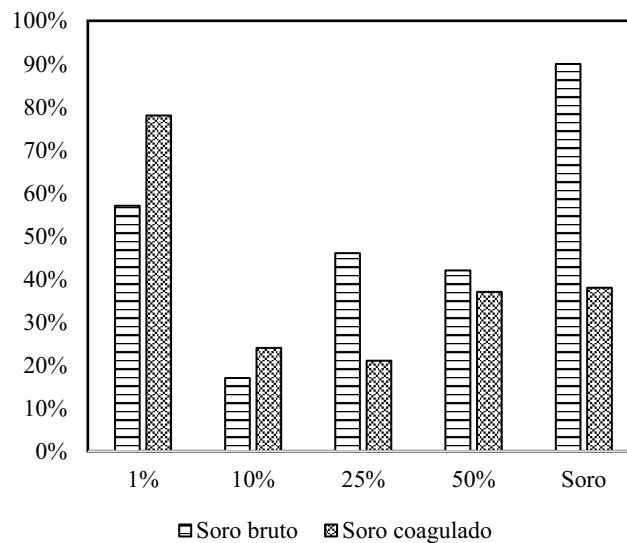


Figura 21. Redução da demanda química de oxigênio pela microalga *Chlorella vulgaris* em seis dias de ensaio em meios com diferentes diluições de soro bruto e soro coagulado.



5.5 Ensaio com aumento de inóculo

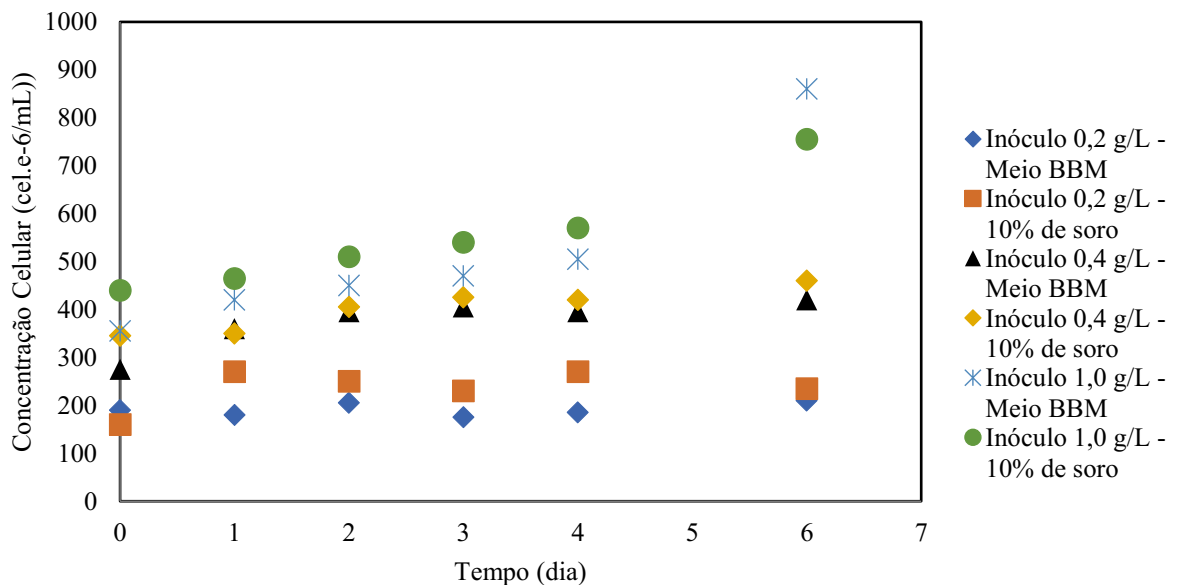
A fim de aumentar a capacidade do tratamento do efluente pela microalga avaliou-se o aumento da concentração de inóculo. A alta concentração inicial de inóculo é benéfica para a sobrevivência das células algais na presença de compostos tóxicos e severas condições, que pode ocorrer ao utilizar efluentes como meio de cultivo (BOHUTSKYI et al., 2016). O tamanho

do inóculo afeta significativamente a fase *lag*, a taxa máxima de crescimento específico, o acúmulo final de biomassa e a produção de metabólitos (RICHMOND, 2004).

Optou-se por usar o meio com uma concentração com 10% de soro coagulado, pois nessa condição os valores de carga orgânica (DQO em torno de 3,0 g/L) se assemelham ao do efluente final da indústria de laticínios (COSTA et al., 2016). Além disso, conforme os resultados obtidos anteriormente, nessa diluição a microalga foi capaz de remover quantidades significativas de carbono, nitrogênio, fósforo e DQO.

Ao longo dos dias a concentração celular foi medida para obtenção das curvas de crescimento (Figura 22). Em todas as condições houve aumento do número de células, sendo que, os maiores aumentos ocorreram com o inóculo de 1,0 g/L. Em geral, o tamanho do inóculo está relacionado com o número de células que participarão da reprodução, resultando em uma maior produção de biomassa (RICHMOND, 2004).

Figura 22. Curva de Crescimento Celular da *Chlorella vulgaris* em meio BBM e em meio contendo 10% de soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.



Observou-se o acúmulo de clorofila e proteína em todos os ensaios (Tabelas 21 e 22), sendo que os maiores aumentos se deram nos cultivos com 0,2 e 0,4 g/L de inóculo em meio contendo 10% de soro. Isso pode ser reflexo da maior quantidade de nutrientes, devido a presença de soro, em relação a quantidade de microalgas no cultivo. Por isso, também, no cultivo com inóculo de 1,0 g/L a quantidade de bioprodutos acumulados foi inferior.

Lekshmi et al. (2015) observaram que o aumento do inóculo leva à diminuição da clorofila, o que pode ser devido ao fato da menor disponibilidade de relação C:N, já que o nitrogênio é uma fonte importante para o acúmulo de clorofila.

Tabela 21. Concentração de clorofila (mg/m^3) no primeiro e último dia do ensaio de *Chlorella vulgaris* em soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.

Dia	0,2 g/L		0,4 g/L		1,0 g/L	
	BBM	10%	BBM	10%	BBM	10%
0	6,01 ± 1,48	6,26 ± 0,05	13,56 ± 0,67	11,79 ± 1,82	37,41 ± 0,70	33,66 ± 0,23
6	8,40 ± 0,16	10,56 ± 1,19	20,71 ± 0,70	22,66 ± 0,62	38,01 ± 0,62	35,51 ± 1,46
Acúmulo	40%	69%	53%	92%	-	-

Tabela 22. Concentração de proteína (mg/L) ao longo do cultivo de *Chlorella vulgaris* em soro de queijo em diferentes concentrações de inóculo.

Dia	0,2 g/L		0,4 g/L		1 g/L	
	BBM	10%	BBM	10%	BBM	10%
0	85,00 ± 10,00	245,83 ± 62,36	106,67 ± 8,25	406,25 ± 18,75	165,00 ± 10,00	527,50 ± 10,21
3	96,67 ± 1,18	533,33 ± 25,69	169,17 ± 11,25	778,13 ± 89,43	233,75 ± 14,31	562,50 ± 3,95
6	97,50 ± 14,72	454,17 ± 62,36	173,75 ± 1,25	875,00 ± 182,22	242,50 ± 21,21	645,63 ± 19,64
Acúmulo	15%	85%	63%	115%	47%	22%

Não foi observado o aumento da concentração de etanol nos cultivos com aumento de inóculo. Em estudos realizados por Costa et al. (2015), a produção de etanol não mostrou relação direta com a variação da concentração celular. O maior teor de etanol obtido por eles foi utilizando inóculo de 0,05 g/L, em comparação aos ensaios com inóculo de 0,1 e 0,2 g/L. Os resultados indicaram que sob baixa densidade de inóculo de células a *C. reinhardtii* utilizou os nutrientes disponíveis, sob condições operacionais específicas de cultura, para a produção de etanol em vez de crescimento celular. Por outro lado, quando se utilizou maior densidade, as rotas metabólicas favoráveis ao crescimento foram preferenciais.

Conforme mostrado nas Figuras 23 e 24, o aumento da concentração de inóculo propiciou uma alta remoção de carbono total e carbono orgânico total. Para o inóculo de 0,2 g/L, teve-se uma maior remoção em meio contendo 10% de soro em comparação com o ensaio com apenas meio BBM. Em contrapartida, para os inóculos de 0,4 e 1,0 g/L as remoções de CT e COT foram maiores no meio de cultivo sem adição de soro. Sendo que os maiores percentuais de redução (89% para o CT e 93% para o COT) ocorreram no cultivo com inóculo de 1,0 g/L em meio BBM.

Figura 23. Variação da concentração de carbono total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.

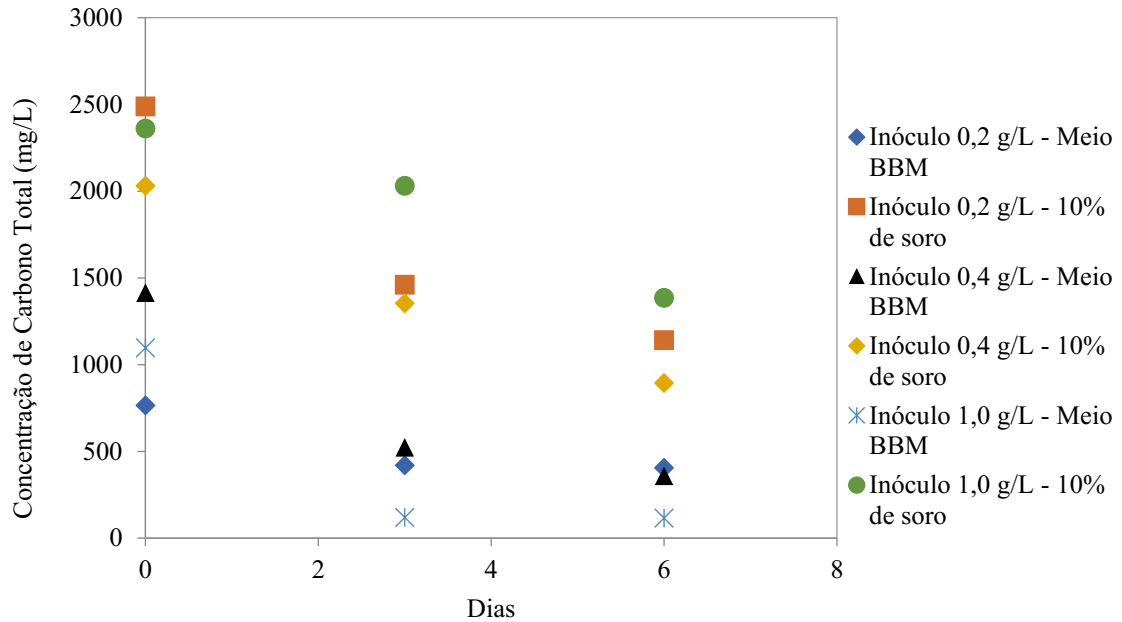
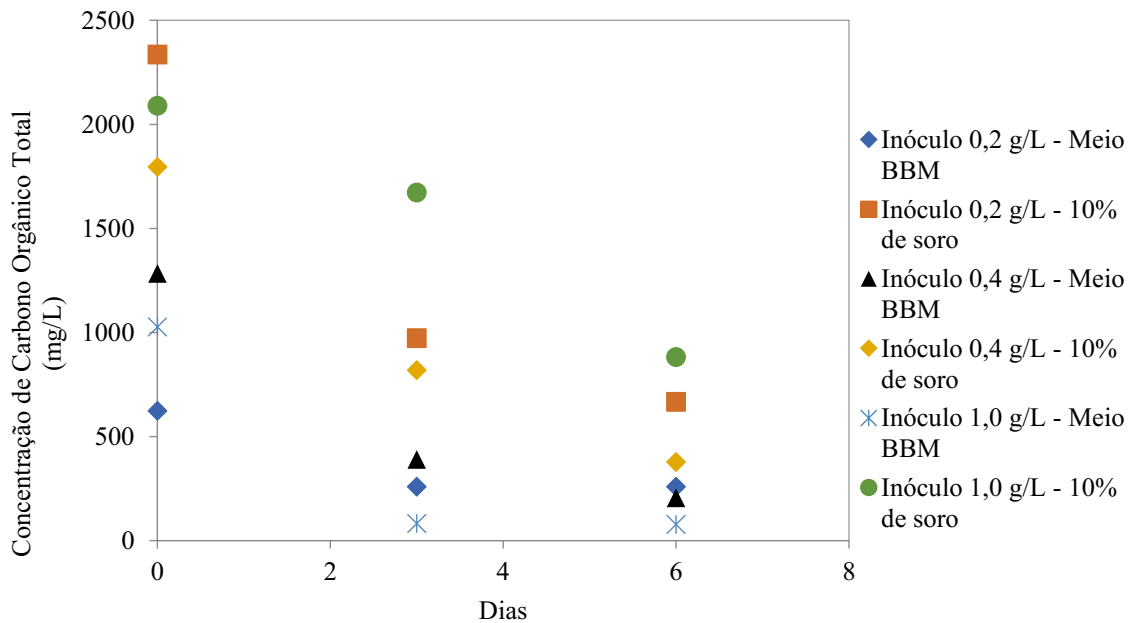


Figura 24. Variação da concentração de carbono orgânico total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.

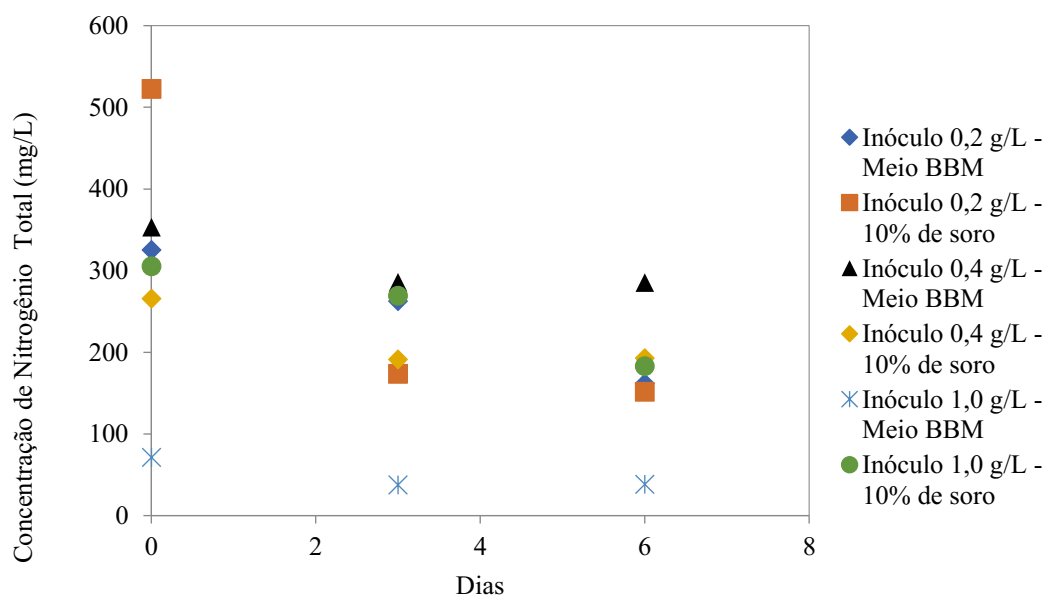


Em estudos realizados por Li et al. (2017) a concentração de inóculo da *Chlorella vulgaris* afetou a taxa de remoção de nutrientes do meio de cultivo. Eles conseguiram reduzir

as concentrações de COT em 58,7% e 57, 23% para os inóculos de 0,103 e 0,135 g/L. Tal resultado foi maior que nas concentrações de inóculo mais baixas utilizadas por eles. Esses valores são menores do que aqueles encontrado neste trabalho (93% de remoção) , em que a concentração de inóculo foi maior (1,0 g/L). Abinandan e Shanthakumar (2016) observaram que o aumento do inóculo levou a diminuição da concentração de bicarbonato de sódio no meio, ajudando a aumentar a absorção de CO₂ pela microalga. Eles conseguiram a máxima absorção de CO₂ no cultivo com maior concentração de inóculo (30% v/v)

A remoção de nitrogênio (Figura 25) foi bastante significativa nos ensaios com alta concentração de inóculo. As reduções mais expressivas (71 e 78%) ocorreram com 0,2 g/L de inóculo em meio com 10% de soro e com inóculo de 1,0 g/L em meio BBM. Nos cultivos com inóculo de 0,4 g/L ocorreu o menor consumo de nitrogênio pela microalga.

Figura 25. Variação da concentração de nitrogênio total ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e diferentes concentrações de inóculo.



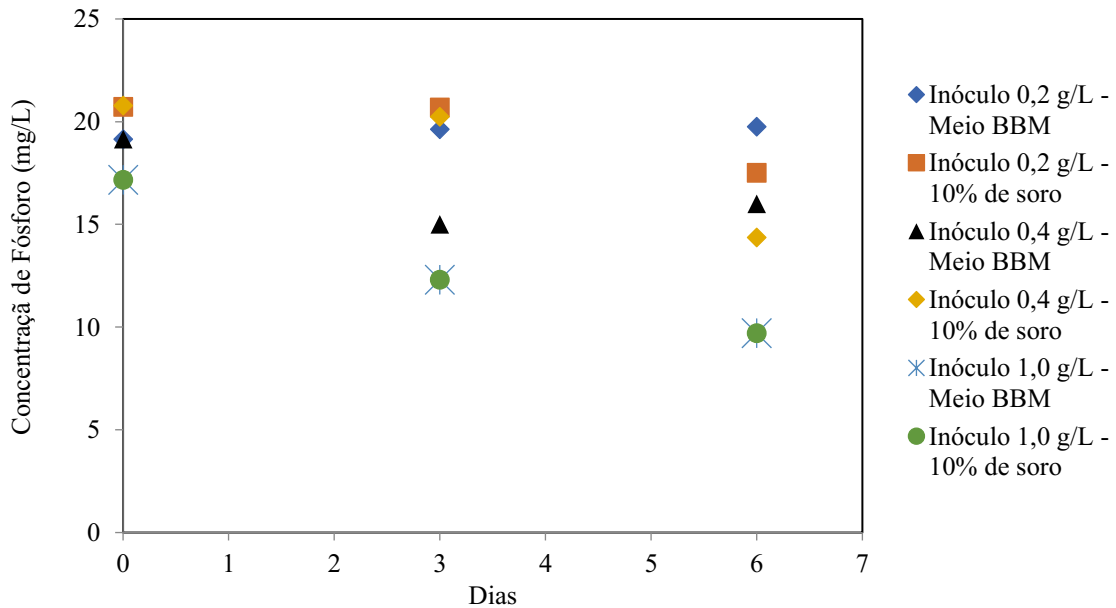
A Tabela 23 mostra os valores da DQO ao longo dos dias de cultivo. Temos que, em todos os casos obteve-se alta redução desse parâmetro, sendo que os resultados mais promissores ocorreram para o inóculo de 0,4 g/L, seguido pelo 0,2 e 1,0 g/L.

Tabela 23. Variação da Demanda Química de Oxigênio do meio ao longo dos dias de cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.

	Inóculo 0,2 g/L		Inóculo 0,4 g/L		Inóculo 1,0 g/L	
	BBM	10%	BBM	10%	BBM	10%
Dia 0	0,07 ± 0,00	3,56 ± 0,01	0,09 ± 0,01	2,68 ± 0,00	0,11 ± 0,00	3,28 ± 0,05
Dia 3	0,03 ± 0,01	1,85 ± 0,42	0,05 ± 0,03	1,74 ± 0,18	0,07 ± 0,03	2,76 ± 0,07
Dia 6	0,03 ± 0,01	1,52 ± 0,08	0,02 ± 0,01	0,66 ± 0,13	0,05 ± 0,02	1,84 ± 0,07
Redução	53%	57%	81%	75%	56%	44%

Em relação à remoção de fósforo (Figura 26), as altas concentrações de inóculo proporcionaram uma maior remoção desse elemento. Nos ensaios realizados, observou-se que a medida que a concentração de inóculo aumentou a capacidade de remoção do fósforo pela microalga também aumentou. Dessa forma, os maiores percentuais de redução, 35 e 46%, ocorreram nos ensaios com 1,0 g/L de inóculo em meio BBM e com 10% de soro, respectivamente.

Figura 26. Variação da Concentração de Fósforo ao longo do cultivo da *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% soro de queijo coagulado e em diferentes concentrações de inóculo.



Além da capacidade de remoção de carga orgânica, ensaios para a verificação do efeito da densidade de inóculo da alga na remoção de metais também foram avaliados. Foi possível observar a redução das concentrações de metais (Tabela 24) do meio de cultivo, o que não ocorreu nos ensaios anteriores com inóculo de 0,1 g/L.

Tabela 24. Remoção de metais, em seis dias de cultivo, em ensaios com diferentes concentrações de inóculo da microalga *Chlorella vulgaris* em meio contendo 10% de soro de queijo coagulado.

	0,2 g/L		0,4 g/L		1,0 g/L	
	BBM	10%	BBM	10%	BBM	10%
Cálcio	9%	34%	13%	28%	65%	34%
Ferro	-	28%	-	25%	13%	22%
Magnésio	11%	58%	50%	56%	61%	37%
Potássio	-	4%	15%	1%	35%	8%
Sódio	-	1%	3%	-	81%	-

Conforme mostrado na Tabela 24, foi possível remover cálcio e magnésio em todos os ensaios, sendo que as maiores remoções desses dois elementos (65 e 61%, respectivamente) ocorreram com o inóculo de 1,0 g/L em meio BBM. Por outro lado, nos ensaios com inóculo de 0,2 e 0,4 g/L as maiores remoções se deram nos meios contendo 10% de soro.

Para os ensaios com 0,2 e 0,4 g/L de inóculo a remoção do ferro ocorreu apenas nos meios contendo 10% de soro. Com a utilização de 1,0 g/L a remoção foi verificada tanto no meio com apenas BBM quanto no meio contendo 10% de soro.

A remoção de potássio (15 e 35%) ocorreu mais significativamente nos ensaios com inóculo de 0,4 e 1,0 g/L em meio BBM. A redução de sódio foi verificada com mais intensidade apenas no cultivo com inóculo de 1,0 g/L em meio BBM, sendo 81%.

Segundo Mehta e Gaur (2005), o aumento na concentração de biomassa causa uma maior remoção de metais do meio. Mehta e Gaur (2001) mostraram que o aumento da concentração de biomassa aumentou a remoção de Ni e Cu de 13 para 65% e 10 a 85%, respectivamente, a partir de soluções contendo 5 mg.L⁻¹ de Ni ou Cu. O aumento da remoção de metal em maior concentração de biomassa é devido à maior disponibilidade de locais de ligação de metal (METHA; GAUR, 2001).

A acumulação de metais por microrganismos, incluindo algas, é conhecida há algumas décadas, mas tem recebido maior atenção apenas nos últimos anos devido ao seu potencial para aplicação na proteção ambiental ou recuperação de metais preciosos ou estratégicos (TSEZOS, 1986; VOLESKY, 1987, MALIK, 2004). As algas acumulam altas concentrações de metais dependendo de sua concentração no meio. A capacidade inerente de acumulação de algas pode

ser usada para aliviar o peso da carga de metal tóxica e para recuperar metais preciosos (por exemplo, ouro e prata) das águas residuais (METHA; GAUR, 2005).

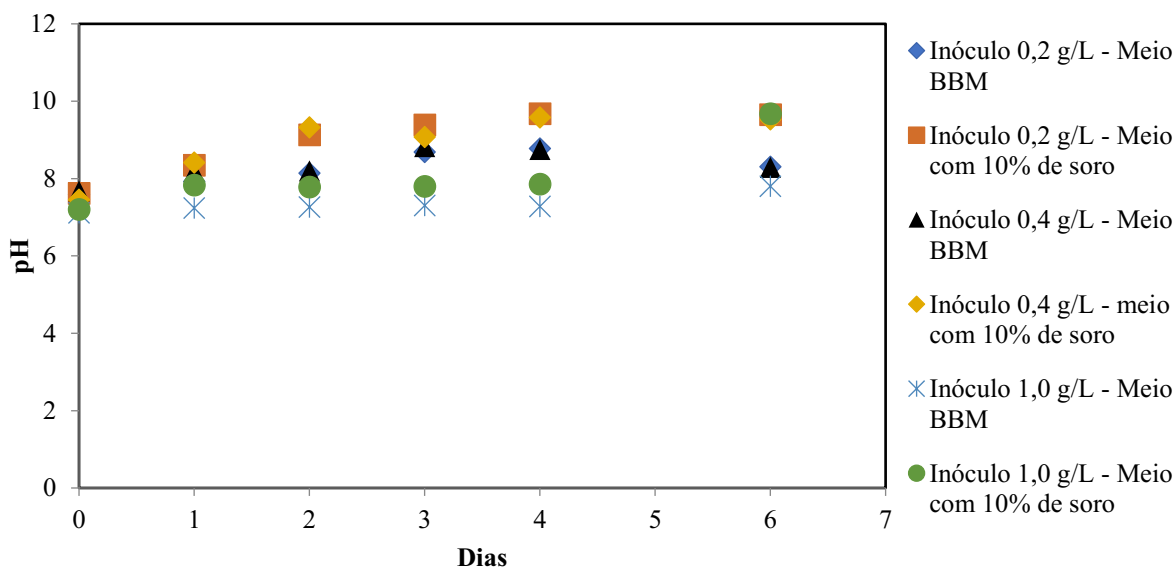
Outro fator que interfere na remoção de metais pelas microalgas é o pH do meio. Talvez o parâmetro mais importante que influencia no processo de bioadsorção (WILDE; BENEMANN, 1993). De acordo com Pino e Torem (2011),

“A influência do mesmo na bioadsorção de íons metálicos se dá pela competição entre os íons do metal e os íons H^+ presentes em solução pelos sítios ativos da superfície da biomassa. A dependência da captura de íons pela biomassa em função do pH pode justificar-se pela associação e dissociação de alguns grupos funcionais presentes. É conhecido que em baixos valores de pH, a maioria dos grupos carboxila não se encontram dissociados, não podendo unir-se aos íons dos metais em solução, embora possam participar de reações de complexação. Quando o valor do pH aumenta uma maior quantidade de grupos funcionais (carboxilas) encontra-se com cargas negativas e podem atrair os íons de carga positiva.”

Cada metal possui um pH de remoção ótimo devido à natureza variável de sua interação química com a célula de algas (METHA; GAUR, 2005). Segundo Jayakumar, Rajasimman, Karthikeyan (2014), em pH's mais elevados pode ocorrer a precipitação do metal, devido à redução da sua solubilidade. Dessa forma, o valor de pH ideal para a adsorção dos metais depende do tipo de alga estudada e do íon metálico em questão (TRAN et al., 2016).

A Figura 27 mostra a variação do pH do meio durante o cultivo. Em todos os casos houve um aumento desse parâmetro ao longo do processo, sendo que, para o meio suplementado com soro, o aumento (30%, em média) foi maior em comparação ao meio BBM (9%, em média). O aumento do pH pode ocorrer devido à fixação do dióxido de carbono (CO_2) que está presente no efluente, por meio da respiração das microalgas que proporcionam uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH^-) no meio, acarretando um aumento do pH (MOTA; VON SPERLING, 2009; LI et al., 2011).

Figura 27. Variação do pH dos meios de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* com aumento de inóculo e contendo 10% de soro de queijo.



A Tabela 25 mostra a variação do teor de lactose do meio ao longo dos dias de cultivo. Nos ensaios com inóculo de 0,2, 0,4 g/L e 1,0 g/L observou-se 35, 66 e 40% de remoção desse componente do meio.

Tabela 25. Variação do teor de lactose em g/L nos cultivos da microalga *Chlorella vulgaris* em meio com 10% de soro.

	Inóculo 0,2 g/L	Inóculo 0,4 g/L	Inóculo 1,0 g/L
Dia 0	1,43	1,03	1,54
Dia 3	1,19	1,05	1,53
Dia 6	0,94	0,35	0,93
Redução	34%	66%	40%

Conforme os resultados apresentados neste trabalho, os ensaios com aumento de inóculo demonstraram maior capacidade na remoção de elementos que causam poluição ambiental. Sendo as melhores condições para tratar efluentes os ensaios com inóculo de 0,4 e 1,0 g/L.

Para outras aplicações, como aproveitamento de bioprodutos gerados pelas *C. vulgaris*, a utilização da concentração de 0,1 g/L de inóculo e meio contendo soro de queijo coagulado é mais interessante. Para acúmulo de clorofila, proteína e etanol as melhores condições foram para os meios contendo 1, 10 e 25% de soro de queijo coagulado, respectivamente, e inóculo de 0,1 g/L.

6 CONCLUSÃO

A partir desse estudo foi possível concluir que as microalgas *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris* têm potencial para aplicação no tratamento de efluentes de laticínios. Ambas foram capazes de remover carbono, nitrogênio e fósforo de forma geral. Além disso, estas microalgas mostraram-se capazes de acumular clorofila e proteína, o que faz com essas espécies possam ser aplicadas para elaboração de diversos produtos, como corantes e ração.

Quando cultivadas em meio contendo soro de queijo bruto ou coagulado, a *C. vulgaris* foi capaz de acumular biomassa e aumentar os teores de clorofila para os ensaios com até 10% de soro. A partir dessa diluição, os altos níveis de compostos orgânicos prejudicaram o crescimento da microalga. Nos ensaios com soro de queijo bruto, a microalga acumulou proteína até a diluição de 10%. Por outro lado, houve acúmulo proteico em todas as condições de cultivo com soro de queijo coagulado. Além disso, a *C. vulgaris* foi capaz de produzir etanol nos ensaios contendo 25, 50 e 100% de soro, chegando a produzir 1,33 g/L em seis dias de cultivo.

A remoção de Carbono Total, Carbono Orgânico Total, Nitrogênio total, DQO, Fósforo e lactose pela *C. vulgaris* foi observada em praticamente todos os ensaios. Observou-se que a remoção de nitrogênio esteve diretamente associada ao acúmulo de proteína, demonstrando a importância desse elemento para a síntese proteica pela microalga.

A utilização do pré-tratamento do soro de queijo não proporcionou melhora na atividade de remoção de carga orgânica pela *C. vulgaris*. Houve, porém, uma maior produção de clorofila, proteína e etanol.

O aumento da concentração de inóculo da *Chlorella vulgaris* fez aumentar as remoções de Carbono Total, Carbono Orgânico Total, Nitrogênio Total, DQO e Fósforo. A maior quantidade de microrganismos no meio fez com que o consumo da carga orgânica e nutrientes fossem maiores. Além disso, com o aumento do inóculo foi possível remover metais do meio como cálcio, magnésio, sódio, ferro e potássio. Porém, devido à baixa disponibilidade de nutrientes em relação à biomassa, o acúmulo de clorofila e proteína diminuiu.

Sendo assim, a *Chlorella vulgaris* apresentou capacidade de remoção de carga orgânica e metais, mostrando que essa microalga possui alto potencial para ser utilizada no tratamento de efluentes de laticínio. Através dos resultados obtidos, as melhores condições para este fim são utilizando concentrações de inóculo de 0,4 e 1,0 g/L.

7 ETAPAS FUTURAS

Apesar da *Chlorella vulgaris* ter se mostrado capaz de remover carga orgânica e metais do meio é interessante realizar estudos para aumentar a eficiência dessa microalga para altas concentrações de soro de queijo. Nesse sentido sugere-se:

- Avaliar a aclimação da microalga no efluente antes da sua utilização no ensaio;
- Verificar ensaios com agitação do meio de cultivo;
- Aumentar o tempo de cultivo;
- Testar diluições em água ao invés de utilizar meio BBM a fim de diminuir os custos do processo;
- Verificar a acumulação de outros componentes como amido e lipídios para aproveitamento da biomassa, tornando o processo ainda mais vantajoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOM AidAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257-275, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Evaluation of photosynthetic efficacy and CO₂ removal of microalgae grown in an enriched bicarbonate médium. **Biotech**, v 6, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s13205-015-0314-5>
- ABIA. Números do Setor – Faturamento. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, 2017. Disponível em: <<https://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2017.pdf>>. Acesso em: 4 dez. 2018.
- ABREU, A. P.; FERNANDES, B.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; DRAGONE, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 61–66, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. **Renew Sustain Energy**, v. 15, n. 5, p. 85-93, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- ANSILAGO, M., OTTONELLI, F., CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 603–608, 2016.
<https://doi.org/10.1590/S1413-41522016124295>
- APHA, 2012. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 22 ed.: Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association. 2012.
- AQUINO, S. F.; STUCKEY, D. Bioavailability and toxicity of metal nutrients during anaerobic digestion. **Journal of Environmental Engineering**, v. 133, p. 28-35, 2007.
[https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2007\)133:1\(28\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2007)133:1(28))
- ARAVANTINO, A. F.; THEODORAKOPOULOS, M. A.; MANARIOTIS, I. D. Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 130-134, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.024>
- AZAB, M., S. Waste-waste treatment technology and environmental management using sawdust bio-mixture. **Journal of Taibah University for Science**, v. 1, p.12–22, 2008.
[https://doi.org/10.1016/S1658-3655\(12\)60029-6](https://doi.org/10.1016/S1658-3655(12)60029-6)
- BAKUEI, N.; AMINI, G.; NAJAFPOUR, G.D.; JAHANSHAHI, M.; MOHAMMADI, M. Optimal cultivation of *Scenedesmus* sp. microalgae in a bubble column photobioreactor. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 22, p. 20-25, 2015.
- BALD, J. A.; VINCENZI, A.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no vale do taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, n. 1, p. 90-99, 2014.
<https://doi.org/10.17058/rjp.v4i3.4602>
- BATISTA, A. P.; AMBROSANO, L.; GRAÇA, S; SOUSA, C; MARQUES, P. A. S. S.; RIBEIRO, B.; BROTEL, E. P.; CASTRO NETO, P.; GOUVEIA, L. Combining urban wastewater treatment with

biohydrogen production - An integrated microalgae-based approach. **Bioresour Technol**, v. 184, p. 230–235, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.064>

BAUMGÄRTNER, T. R. D. S., BURAK, J. A. M., ZANIN, G. M., BAUMGÄRTNER, D., SÉBASTIEN, N. Y., ARROYO, P. A. Different methods for extracting oil from the microalga *Scenedesmus accuminatus* for biodiesel production. **Br J Anal Chem**, v. 10, p. 441-445, 2013.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207-210, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

BECKER, E. W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. New York: Cambridge University Press. 293 p, 1994.

BECKER, W. *Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology*. Londres: Blackwell science. 2004.

BEHRENS, P. W. *Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae. Algal Culturing Techniques*. Elsevier/Academic Press, 2005.

<https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50014-7>

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, n.14, p.377-387, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2003.07.001>

BEUCKELS, A; SMOLDERS, E; MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. **Water Research**, v. 77, p. 98-106, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>

BOHUTSKYI, P.; KLIGERMAN, D. C.; BYERS, N.; NASR, L. K.; CUA., C.; CHOW, S.; SU, C.; TANG, Y.; BETENBAUGH, M. J.; BOUWER, E. J. Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. **Algal research**, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.09.010>

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. *Biotecnologia Industrial. Fundamentos*, 1ª edição. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

BRACHER, E. H.; CASSURIAGA, A. P A.; NUNES, G. B., HENRARD, A. A.; COSTA, J. A. V. Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella minutissima* e *Spirulina* sp. Leb 18 utilizando soro de leite como fonte de carbono. In: V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia. Londrina, 2015. Anais... 2015.

BRASIL, B., S., A., F; GARCIA, L., C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria, **Agroenergia em revista**, n 10, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Valor Bruto da Produção Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/valor-bruto-da-producao-agropecuaria>>. Acesso em: 4 dez. 2018.

BRENNAN L, OWENDE P. Biofuels from microalgae – a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sustain Energy Rev**, v. 14, p. 557–577, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

BRONZATO, G., R., F. Seleção de linhagens de microalgas para a produção de biodiesel. Monografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012

CAI, T., PARK, S. Y., LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000009>

CARDOSO, A., S., VIEIRA, G., E., G., MARQUES, A., K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos (série P+L). São Paulo: CETESB, 2006. 89 p.

CHAVES, A. J.; DEL BIANCHI, V. L.; RIBEIRO, E. R.; BUENO, G. F. Tratamento de efluente da indústria de laticínios utilizando a microalga *Spirulina platensis*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, São Paulo, 2012, Anais... 2012.

CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 71–81, 2011a.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649-1655, 2011b.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>

CHERNICHARO, C. A. L. Reatores Anaeróbios. 2 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG, 1997.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294– 306. 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>

CHO, S.; LUONG, T.T.; LEE, D.; OH, Y.K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production, **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8639–8645, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.037>

CHOJNACK, K; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometrics relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 21-34, 2004.
<https://doi.org/10.3923/biotech.2004.21.34>

CHONG, A.; WONG, Y.; TAM, N. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. **Chemosphere**, v. 41, p. 251-257, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00418-X)

COCA, M.; BARROCAL, V. M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍACUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse supplemented cultura media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>

CONNON, R. Culturing of *Chlorella vulgaris* – Standard Operating Procedure, SOP on how to prepare Bold's Basal Medium (BBM), 2007. University of Reading. Disponível em: <https://www.reading.ac.uk/web/files/biosci/Culturing_Chlorella_156KB.pdf>. Acesso em: 17 dez 2018.

CONAMA - Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução 430/2011. Brasil, 2011.

COPAM – Conselho Estadual de Política Ambiental. 2008. Disponível em <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=8151>>. Acesso em 22 de jan. de 2019.

COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n.4, p.429-436, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.090>

COSTA, J. V.; MOREIRA, D. A.; SOUZA, J. A. R.; RIBEIRO, S.; COSTA, L. G.; SOARES, J. M. C. Redução da carga orgânica do efluente de laticínios usando o processo feton. In V Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica do IF Goiano, 2016, Iporá. Anais... 2016.

COSTA, R. L.; OLIVEIRA, T. V.; FERREIRA, J. S.; CARDOSO, V. L.; BATISTA, F. R. X. Prospective technology on bioethanol production from photofermentation. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 330-337, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.090>

COSTA, R. L.; OLIVEIRA, T. V.; SANTOS, L. D.; FERREIRA, J. S.; BATISTA, F. R. X. Potential renewable biofuel production by *Chlamydomonas reinhardtii*. In: 12th International Chemical and Biological Engineering Conference (CHEMPOR), 2014, Porto. Anais... 2014.

COUTO, R., M.; SIMÕES, P., C.; REIS, A.; SILVA, T., L.; MARTINS, V., H.; SÁNCHEZVICENTE, Y. Supercritical fluid extraction of lipids from the heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii*. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, p. 158–164, 2010.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200900074>

CRAIGIE, J. S. Cell walls. In: Cole K, Sheath R (eds) Biology of the red algae. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 221–257, 1990.

CRESPILHO, F. N.; SANTANA, C. G.; REZENDE, M. O. O.. Tratamento de efluentes da indústria de processamento de coco utilizando eletroflotação. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p.387-392, 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300005>

DANESHVAR, E.; ZARRINMEHR, M. J.; HASHTJIN, A. M.; FARHADIAN, O.; BHATNAGAR, A. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption. **Bioresource Technology**, 268, 523–530, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.032>

DASGUPTA, C.N., GILBERT, J.J., LINDBLAD, P., HEIDORN, T., BORGVANG, S.A., SKJANES, K. & DAS, D. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, p. ,10218-10238, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.06.029>

DE LA NOUE, J. AND DE PAUW, N. The Potential of Microalgal Biotechnology. A Review of Production and Uses of Microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 725-770, 1988.

[https://doi.org/10.1016/0734-9750\(88\)91921-0](https://doi.org/10.1016/0734-9750(88)91921-0)

DELRUE, F.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; FON-SING, S.; FLEURY, G.; SASSI, J. The Environmental Biorefinery: Using Microalgae to Remediate Wastewater, a Win-Win Paradigm. *Energies*, v. 9, n. 132, 2016.

<https://doi.org/10.3390/en9030132>

DING, J.; ZHAO, F.; CAO, Y.; XING, L.; LIU, W.; MEI, S.; LI, S. Cultivation of Microalgae in Dairy Farm Wastewater Without Sterilization. *International Journal of Phytoremediation*, v. 17, n. 3, p. 222–227, 2014.

<https://doi.org/10.1080/15226514.2013.876970>

DINIS, M., A., P.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. *Revista da faculdade de ciência e tecnologia. Universidade Fernando Pessoa*, v. 1, p. 41-54, 2004.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3331–3335, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.03.012>

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chemistry*, v. 112, p. 929–935, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.005>

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technol. Biotechnol.*, v.44, p. 313-321, 2006.

EL-SHEEKH, M.; FARGHL, A., A.; GALAL, H., R.; BAYUMI, H., S. Biorremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rend. Fis. Acc. Lincei*, 2015.

<http://doi.org/10.1007/s12210-015-0495-1>

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Gado do Leite – Importância Econômica. Disponível em <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/importancia.ht>> Acesso em 24 jun 2016.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Dairy Production and Products – Milk Production. Disponível em

<<http://www.fao.org/agriculture/dairygateway/milk-production/en/#.V3AZwbgrLIV>> Acesso em 24 jun. 2016.

FIESP. Conservação e reuso de Água: Manual de orientações para o setor industrial. v. 1, 2008.

FONSECA, B. M.; FERRAGUT, C.; TUCCI, A.; CROSSETTI, L. O.; FERRARI, F.; BICUDO, D. C.; SANT'ANNA, C. L.; BICUDO, C. E. M. Biovolume de cianobactérias e algas de reservatórios tropicais do Brasil com diferentes estados tróficos. *Hoehnea*, v. 41, n. 1, p. 9–30, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S2236-89062014000100002>

FONTOURA, J. T. Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e utilização da biomassa residual. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers. 2000.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Dairy Chemistry and Biochemistry. 1 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998.

FRANCO, A.L.C.; LÔBO, I.P.; CRUZ, R.S. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 437-448; 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300015>

GARCIA, M., C., C. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005. <https://doi.org/10.9790/3008-10114853>

GARNHAM, G., W. The use of algae as metal biosorbents. **Biosorbents for metal ions**, p. 11-38, 1997.

GFELLER, R. P.; GIBBS, M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii* I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. **Plant Physiol.**, v. 75, p. 212-218, 1984.

<https://doi.org/10.1104/pp.75.1.212>

GOUVEIA, L. Microalgae as a feedstock for biofuels. Springer, Heidelberg, 2011. 68 p.

<https://doi.org/10.1007/978-3-642-17997-6>

GROBBELAAR, J., U. Algal nutrition: mineral nutrition. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology, 2015.

HAANDEL, A. C. V; LETTINGA, G. Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate. J. Wiley, 1994.

HAMEED, M. S. A.; EBRAHIM, H. O. Biotechnological potential of immobilized algae.

International Journal of Agriculture and Biology, v. 9, n. 1, p. 183- 192, 2007.

HARUN, I.; YAHYA, L.; CHIK, M. N.; KADIR, N. N. A.; MAM, A. P. Effects of natural light dilution on microalgae growth. **Int J Chem Eng Appl**, v. 5, p. 112–116, 2014.

<https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.362>

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Res.**, v. 25, p. 247-257, 1996.

<https://doi.org/10.3109/10715769609149050>

HIROOKA, T.; AKIYAMA, Y.; TSUJI, N.; NAKAMURA, T.; NAGASE, H.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Removal of Hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions.

J. bioscience and bioeng., v. 2, p. 200-203, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80130-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80130-5)

HU, Q. Environment effects on cell composition. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Iowa: Blackwell Publishing Ltd., p 83–93, 2004.

JAYAKUMAR, R.; RAJASIMMAN, M.; KARTHIKEYAN, C. Sorption of hexavalent chromium from aqueous solution using marine green algae *Halimeda gracilis*: Optimization, equilibrium, kinetic, thermodynamic and desorption studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 3, p. 1261–1274, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.05.007>

JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem Physiol Pflanz**, v. 167, p. 191–194, 1975.

[https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)

JI, Y.; HU, W.; LI, X.; MA, G.; SONG, M.; PEI, H. Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 471–476, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.047>

JIA, Q.; XIANG, W.; YANG, F.; HU, Q.; TANG, M.; CHEN, C.; WANG, G.; DAI, S.; WU, H.; WU, H. Low-cost cultivation of *Scenedesmus sp.* with filtered anaerobically digested piggery wastewater: biofuel production and pollutant remediation. **J. Appl Phycol**, v. 28, p. 727–736, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0610-9>

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 186–193, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>

KANG, R.; WANG, J.; SHI, D.; CONG, W.; CAI, Z.; OUYANG, F. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus sp.* **Biotechnol Lett**, v. 26, p. 1429–1432, 2004.

<https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000045646.23832.a5>

KIMURA, S.; YAMADA, T.; BAN, S.; KOYAMA, M.; TODA, T. Nutrient removal from anaerobic digestion effluents of aquatic macrophytes with the green alga, *Chlorella sorokiniana*. **Biochemical Engineering Journal**, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.001>

KNOTHE, G. “Designer” biodiesel: Optimizing fatty ester (composition to improve fuel properties). **Energy Fuels**, v. 22, p. 1358 – 1364, 2008.

<https://doi.org/10.1021/ef700639e>

KNOTHE, G. A technical evaluation of biodiesel from vegetable oils vs. Algae: Will algae-derived biodiesel perform. **Green Chemistry**, v. 13, p. 3048 – 3065, 2011.

<https://doi.org/10.1039/c0gc00946f>

KÖNIG, R. B.; SALES, R.; ROSELET, F.; ABREU, P. A. Harvesting of the marine microalga *Conticribra weissflogii* (Bacillariophyceae) by cationic polymeric flocculants. **Biomass and bioenergy**, v. 68, p. 1–6, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.001>

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361, Rome, 1996.

LEE, Y. K. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004.

LEHNINGER, A. L. PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA. São Paulo: Sarvier, 532 p, 1990.

LEKSHMI, B.; JOSEPH, R. S.; JOSE, A.; ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Studies on reduction of inorganic pollutants from wastewater by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans*. **Alexandria Engineering Journal**, v. 54, n 4, p. 1291–1296, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.aej.2015.09.013>

LI, C., YANG, H., XIA, X., LI, Y., CHEN, L., ZHANG, M., WANG, W. High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 248–255, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.074>

LI, Y., XU, H., HAN, F., MU, J., CHEN, D., FENG, B., ZENG, H. Regulation of lipid metabolism in the green microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophy– photoinduction cultivation regime.

Bioresource Technology, v. 192, p. 781-791, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.028>

LI, Y.; CHEN, Y.F.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalgae *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater in nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p. 5138–5144, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.091>

LI, Z.; HAIFENG, L.; ZHANG, Y.; SHANSHAN, M.; BAOMING, L.; ZHIDAN, L.; NA, D.; MISHENG, L.; BUCHUN, S.; JIANWEN, L. Effects of strain, nutrients concentration and inoculum size on microalgae culture for bioenergy from post hydrothermal liquefaction wastewater. **Int J Agric & Biol Eng**, v. 10, n. 2, p. 194-204, 2017.

<https://doi.org/10.25165/ijabe.v10i2.2882>

LIMA, S., A., C.; RAPOSO., M., F., J.; CASTRO, P., L.; MORAIS, R., M. Biodegradation of p-chlorophenol by a microalgae consorptium. **Water research**, v. 38, p. 97-102, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.005>

LIU, J.; HUANG, J.; SUN, Z.; ZHONG, Y.; JIANG, Y.; CHEN, F. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 106–110, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.017>

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 588 p.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the FolinPhenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p; 265-276, 1951.

LUQUE, R.; LOVETT, J., C.; DATTA, B.; CLANCY, J.; CAMPELO, J., M.; ROMERO, A., A. Biodiesel as feasible petrol fuel replacement: a multidisciplinary overview. **Energy Environmental Science**, v. 3, p. 1706–1721, 2010.

<https://doi.org/10.1039/c0ee00085j>

MAHBOOB, S.; RAUF, A.; ASHRAF, M.; SULTANA, T.; JABEEN, F. High density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. **Aquaculture International**, p. 455-466, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s10499-011-9477-1>

MAHLMANN, D. M.; JAHNKE, J.; LOOSEN, P. Rapid determination of the dry weight of single, living cyanobacterial cells using the Mach-Zehnder double-beam interference microscope. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 355-364, 2008.

<https://doi.org/10.1080/09670260802168625>

MAIRET, F.; BERNARD, O.; MASCI, P.; LACOUR, T.; SCIANDRA, A. Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis aff. galbana* under nitrogen limitation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 142-149, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.138>

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environ. Int.**, v. 30, p. 261–278, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>

MARGARITES, A., C., F.; COSTA, J., A., V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **Journal of Engineering Research and Applications** v. 4, p.80-86, 2014.

MARTINEZ, M., SÁNCHEZ, S., JIMENEZ, J., EL YOUSFI, F., E MUNOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00121-2)

MARTINS NETO, H. Tratamento de efluentes nas indústrias de laticínios. Revista TAE, 2014. Disponível em <<http://www.revistatae.com.br/8245-noticias>>. Acesso em 7 dez 2018.

MATOS, A. P.; MORIOKAI, L. R.; SANT'ANNAI, E. S.; FRANÇA, K. B. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.2, p.364-370, 2015.

<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20121104>

MENDES, A. A. Avaliação da biodegradabilidade de efluentes com alto teor de lipídios previamente tratados com enzimas hidrolíticas. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena. 2014. 135f.

MEHTA, S. K.; ANDGAUR, J. P. Removal of Ni and Cu from single and binary metal solutions by free and immobilized *Chlorella vulgaris*. **Eur. J. Protistol.**, v. 37, p. 261–271, 2001.

<https://doi.org/10.1078/0932-4739-00813>

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 113–152, 2005.

<https://doi.org/10.1080/07388550500248571>

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841-846, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.04.008>

MINAS AMBIENTE/CETEC. Pesquisa tecnológica para controle ambiental em pequenos e médios laticínios Minas Gerais: Alternativas Tecnológicas. V. 2. Belo Horizonte: Minas Ambiente/CETEC, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA - PORTARIA Nº 146, DE 7 DE MARÇO DE 1996.

MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 93, p. 625- 634, 1964.

[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90345-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90345-9)

MOLINA GRIMA, E.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; GARCIA, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231-247, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00078-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00078-4)

JEFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ e c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochem. Physiol.**, v. 167, p. 191-194, 1975.

[https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. Nutrientes de Esgoto Sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES, 2009. 428p.

MUS, A. DUBINI, M.; SEIBERT, M.C.; POSEWITZ, A.R. Grossman Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii* anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 25475-25486, 2007.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M701415200>

NAKANISHI, K. Chlorophyll rich and salt resistant *Chlorella*. European Patent 1, 142,985, 2001.

NETO, M. S. A. Tratamento e águas residuárias de suinocultura em reator anaeróbio compartimentado seguido de reator UASB. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

NEVES, F.F.; JERÊMIAS, M.L.; LOPES, R.G.; SARDÁ, A. Efeito do uso de efluente doméstico tratado, como meio de cultura, sobre o crescimento e produtividade no cultivo de *Chlamydomonas* sp. isolada de lixiviado de aterro sanitário. **TECNO-LÓGICA**, v.17, n.1, p.30-37, 2013.

NG, D. H. P.; NG, Y. K.; GHEN, H.; LEE, Y. K. Microalgal biotechnology: the way forward. In KIM, S. Handbook of Marine Microalgae - Biotechnology Advances. Busan: Elsevier, 2015, cap. 6.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R.A. **Algal biodiversity**. **Phycologia** v. 35, p. 308–326, 1996.

<https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-4-308.1>

OHSE, S.; DERNER, R., B.; OZÓRIO, R., A.; CUNHA, P., C., R.; LAMARCA, C., P.; SANTOS, M., E.; MENDES, L., B., B. Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula Revista de botânica** , v. 36, p. 39-74, 2007.

OLIVEIRA, C. A. Caracterização da produção de pigmentos e da atividade antioxidante de *Nostoc* ssp. Sob diferentes intensidades luminosas. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. **Micro-algal Biotechnology**. 2^a ed., Sydney, 1988.

OSWALD, W.J.; GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. **Transactions of the American Society of Civil Engineer**, v. 122, p. 73-105. 1957.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y. Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Biorefining: From Metabolic Routes to Techno-economics. **The Bashan Institute of Science**, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3

PHILIPPS, G.; KRAWIETZ, D.; HEMSCHMEIER, A.; HAPPEA, T. Pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae. **Plant J.**, v. 66, p. 330-340, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04494.x>

PINO, G. H.; TOREM, M. L. Aspectos fundamentais da bio sorção de metais não ferrosos – estudo de caso. **Tecnol. Metal. Mater. Miner**, v. 8, n. 1, p. 57-63, jan.-mar, 2011.

<https://doi.org/10.4322/tmm.2011.010>

POSADAS, E.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; SOLTAU, A.; DOMÍNGUEZ, A.; DÍAZ, I.; MUÑOZ, R. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal–bacterial biofilm bioreactors. **Bioresour. Technol.**, v. 139, p. 50-58, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.008>

POWELL, N.; SHILTON, A.; CHISTI, Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae – defining the polyphosphate dynamics. **Water research**, v. 43, p. 42017-4213, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIBAS, J. Cheese whey management: a review. **Journal of environmental management**, v. 133, p. 48-69, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

PRIYA, M.; GURUNG, N.; MUKHERJEE, K.; BOSE, S. Microalgae in Removal of Heavy Metal and Organic Pollutants from Soil. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, p. 519–537, 2014.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00023-6>

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>

PUOTINEN, C. J. Herbs for detoxification. **McGraw-Hill Professional**, p. 25, 1999.

QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. **Applied Energy**, v. 88, p. 3438-3443, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.047>

QUEIROZ, M. I.; JACOB, E.; ZEPKA, L. Q.; BASTOS, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cianobacteria in a stirred batch reactor. **Bioresour. Technol.**, v.98, p. 2163-2169, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.034>

QUEIROZ, M. I.; KOETZ, P. R.; TREPTOW, R. O. The Nagele microscocal *Aphanothece* potential in the production of the single-cell protein from the remaining water. In: *International Congress on Engineering and Food (ICEF 8)*, 2001, Pennsylvania. Anais... Lancaster: Technomic Publishing Co, 2001, p. 2027-2031.

RAWAT, I.; KUMAR, R.R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 207–219, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s11120-013-9828-z>

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

REDAELLI, C.; KOCHEM, L., H.; DIERINGS, T.; JARENKOW, A.; ROMAN, G., M.; MARCILIO, M., R.; RECH, R. Influência da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em *Chlorella minutissima*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

RESENDE, A. R.; CASTRO, G. P.; DE PAULA Jr., P. H.; OLIVEIRA Jr., E. N. Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando efluente de laticínio como meio de cultivo alternativo. In XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química., 2018, São Paulo. Anais... São Paulo: Blucher, 2018, p. 3192-3195.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ames: Iowa State Press, a Blackwell Publishing Company, 2004.

ROCHA, A. C.; CARDOSO, V. L.; VIEIRA, P. A. Avaliação da eficiência de diferentes coagulantes naturais no pré-tratamento de soro de queijo bruto. In: Simpósio de Tecnologia Ambiental e de Biocombustíveis, Jaboticabal, 2018.

RUKMINASARI, N. Effect of Temperature and Nutrient Limitation on the Growth and Lipid Content of Three Selected Microalgae (*Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis* sp. and *Scenedesmus* sp.) for Biodiesel Production. **International Journal of Marine Science**, v. 3, p. 135-144, 2013.
<https://doi.org/10.5376/ijms.2013.03.0017>

SACRISTÁN DE ALVA, M.; LUNA-PABELLO, V. M.; CADENA, E.; ORTÍZ, E. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 146 p. 744–748, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.061>

SALES, R.; ABREU, P. A. Use of natural pH variation to increase the flocculation of the marine microalgae *Nannochloropsis oculata*. **Appl Biochem Biotechnol.**, p.1-8, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1412-2>

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina platensis* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.069>

SANTOS, F., M., L., F. Crescimento de microalgas e remoção de nutrientes em ambientes poluídos com metais pesados. Dissertação de mestrado. Universidade do Porto, Porto, 2017.

SANTOS, G., M.; MACEDO, R., V., T.; ALEGRE, R., M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 17-21, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000400004>

SAXEMA, P.; MISRA, N. Remediation of heavy metal contaminated tropical Land. **Soil Biology**, v. 19, p. 431 – 477, 2010.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-02436-8_19

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; KHOEYI, Z. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v 23, p. 721-726, 2010.
<https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8>

SGARBIERE, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr.**, vol.17, no. 4, Oct./Dec, 2004

<https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000400001>

SHEN, Q. H.; JIANG, J. W.; CHEN, L. P.; CHEN, L. H.; XU, X. H.; CHEN, H. L. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. **Bioresource Technology**, v.190, p. 257-263, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.053>

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos: Editora RiMa, 2001.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)

SOARES, D. A aliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo. 2010. 107 f. Tese (doutorado) - curso de bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217–224, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.005>

SPERLING, M. V. Lodos ativados. 2 ed., Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997.

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

<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemo diversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483–501, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>

TALBOT, P.; DE LA NÖUE, J. J. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. **Algal Biotechnology**, v. 27, p. 153-159, 1988.

[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90206-W](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90206-W)

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F. L.; STENSEL, H. D. Wastewater engineering: treatment and reuse: 4ª ed. Boston: McGraw-Hill, 2003.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p. Boletim Técnico, 1995.

TOBIN, J. M.; WHITE, C.; GADD, C. M. Metal accumulation by fungus: applications in environment biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 126-130, 1994.

<https://doi.org/10.1007/BF01584110>

TOMASELLI, I. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira platensis*. In: VONSHAK, A, ed. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, p. 79-99, 1997.

TONON, A. P.; OLIVEIRA, M. C.; SORIANO, E. M.; COLEPICOLO, P. Absorption of metals and characterization of chemical elements present in three species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) Greville: a genus of economical importance. **Revista brasileira de farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 355-360, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000058>

TORRES, H. S. J. CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTE DE TRATAMENTO ANAERÓBIO DE ESGOTO. Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo. VITÓRIA – ES, 2014. 187 f.

TSEZOS, M. Adsorption by microbial biomass as a process for removal of ions from process or waste solutions. 1986. In: Immobilization of Ions by Bio-Sorption. p. 201–218. Chichester, UK, 1986.

VOLESKY, B. Biosorbents for metal recovery. **TIBTECH**, v. 5, p. 96–101, 1987

[https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90027-8)

VON SPERLING, M. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG; Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. v. 1, p. 452.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LON, C. Q. CO₂ biomitigation using microalgae. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, p. 707-718, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 3307–3329, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s12010-014-0729-1>

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; SEALOCK, A.; CHEN, Y.; RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v.101, n. 8, p.2623–2628, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.062>

WILDE, E. W.; BENEMANN, J. R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotech**, v. 11, p. 781-812, 1993.

[https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6)

WLEGAND, M. C.; PLEDRA, J. I. G.; ARAÚJO, J. C. Vulnerabilidade à eutrofização de dois lagos tropicais de climas úmido (Cuba) e semiárido (Brasil). **Eng Sanit Ambient**, v. 21, n. 2, p. 415-424, 2016.

<https://doi.org/10.1590/s1413-41522016139527>

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 15, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00080-2)

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; QIANG, HU.; SOMMERFIELD, M.; CHEN, Y. Lifecycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159–165, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.017>

YANG, K.; YU, Y.; HWANG, S. Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: partial acidification and methanation. **Water Research**, v. 37, p. 2467-2477, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00006-X)

YUAN-KUN, L.; HUI, S. Basic culturing techniques. In RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **England: Blackwell Publishing**, p. 40-56, 2004.

ZAMALLOA, C., VULSTEKE, E., ALBRECHT, J. & VERSTRAETE, W. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1149-1158, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.017>

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina máxima*. 1966. Tese (Ph.D) – Universidade de Paris, Paris, 1966.

ZHENG, H.; WU, X.; ZOU, G.; ZHOU, T.; LIU, Y.; RUAN, R. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 203–211, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.019>

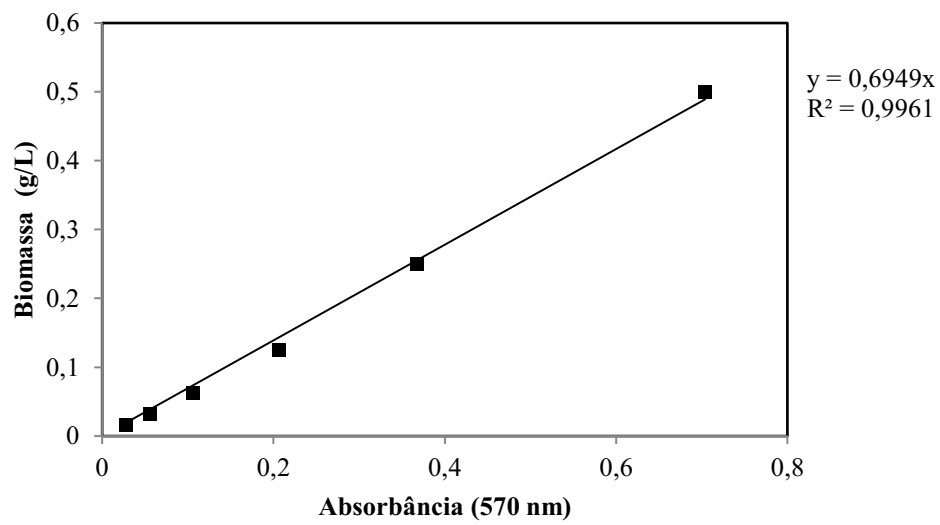
ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z.. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Res.**, v. 47, p. 4294-4302, 2013.

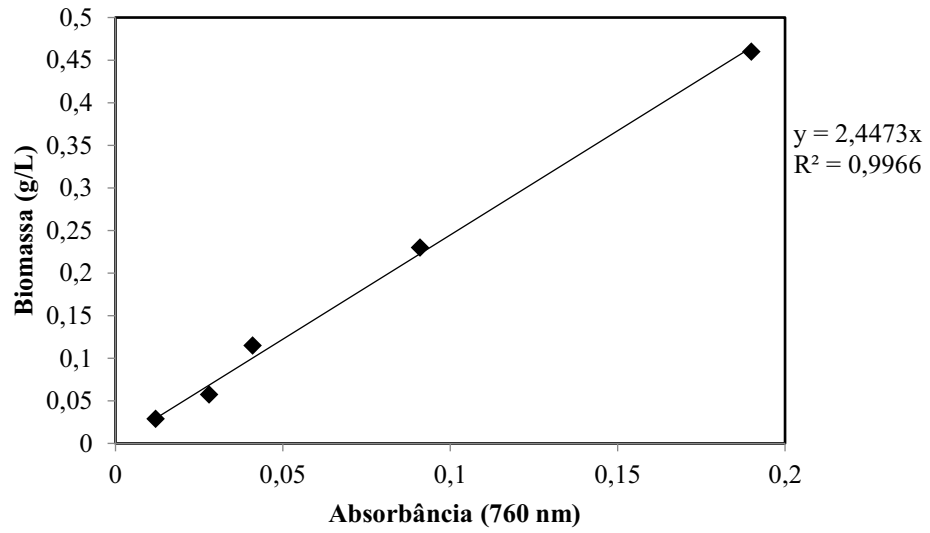
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>

ZOCCAL, R. Indicadores da produção mundial de leite – Anuário Leite 2018. Disponível em < embrapa.br/gado-de-leite>. Acesso em 4 dez. 2018.

APÊNDICE 1

Curvas de calibração

Apêndice 1.1 Curva de calibração da microalga *Spirulina platensis*Figura 28. Curva de Calibração da microalga *Spirulina platensis*.

Apêndice 1.2 Curva de calibração da microalga *C. vulgaris*Figura 29. Curva de Calibração da microalga *Chlorella vulgaris*.

Apêndice 1.3 Curvas de calibração para análise de proteína

Figura 30. Curva de calibração para baixas concentrações de proteína.

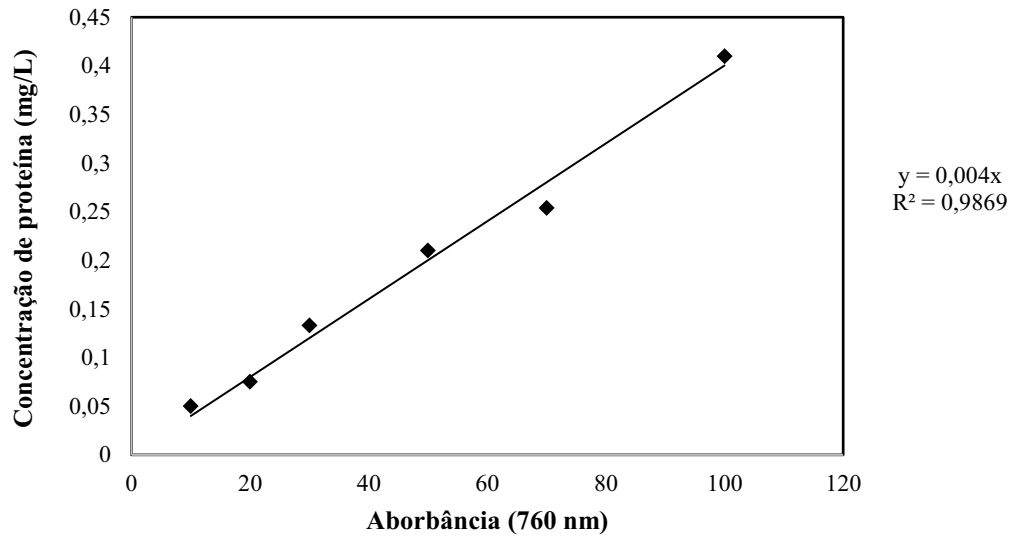
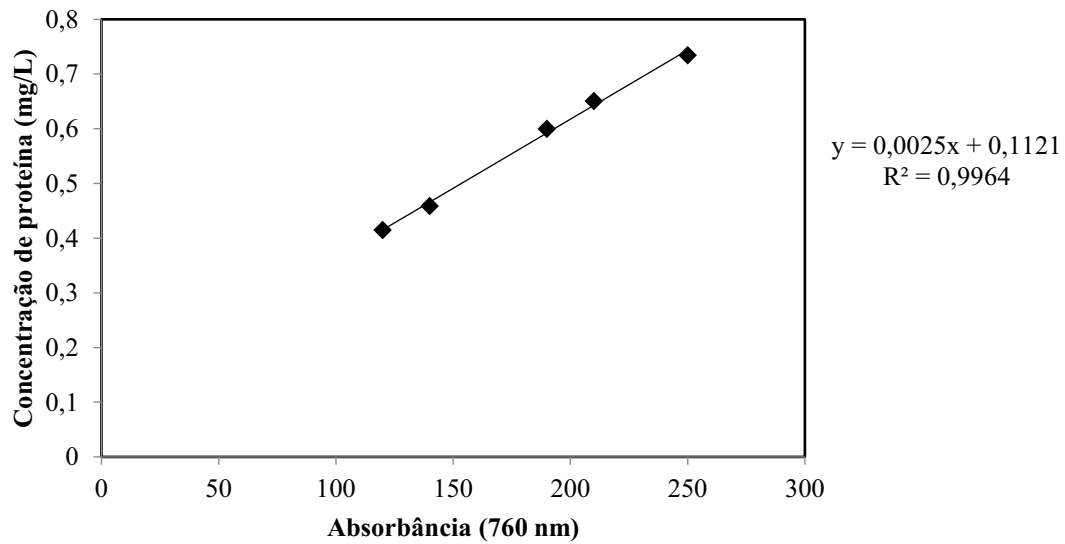
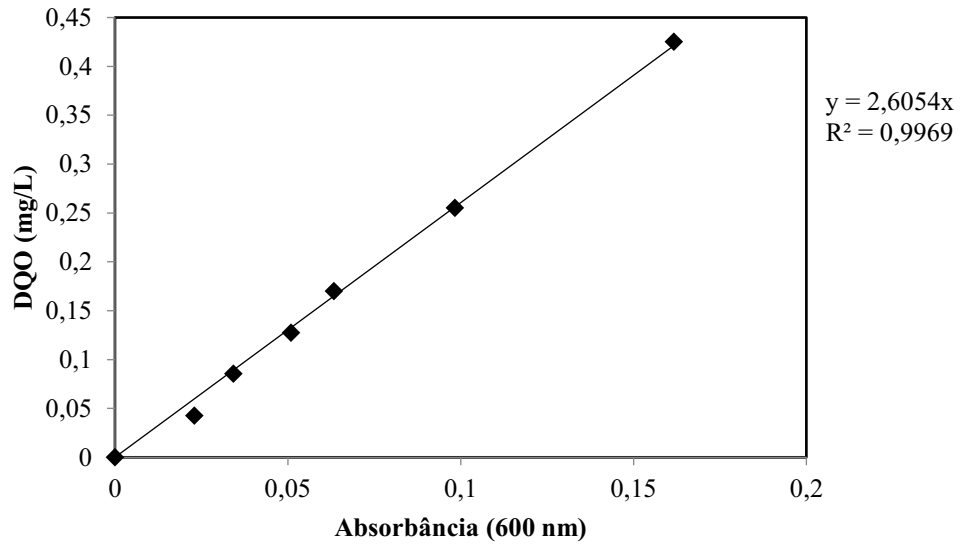


Figura 31. Curva de calibração para altas concentrações de proteína.



Apêndice 1.4 Curva de calibração para análise de Demanda Química de Oxigênio

Figura 32. Curva de calibração da Demanda Química de Oxigênio.



Apêndice 1.5 Curva de calibração para análise de fósforo

Figura 33. Curva de Calibração da concentração de Fósforo.

