



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

MARCOS GOMES MACHADO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA MÉDIA DE
BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana* E *Scenedesmus sp.* NO CULTIVO
COM DIGESTATO LÍQUIDO: UMA ABORDAGEM VIA DCCR**

**Ouro Branco -
MG 2025**

MARCOS GOMES MACHADO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA MÉDIA DE
BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana* E *Scenedesmus sp.* NO CULTIVO
COM DIGESTATO LÍQUIDO: UMA ABORDAGEM VIA DCCR**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao
Curso de Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del-Rei,
Campus Alto Paraopeba, como parte das
exigências para a obtenção do título de Bacharel
em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira
Júnior.

**Ouro Branco -
MG 2025**

MARCOS GOMES MACHADO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA MÉDIA DE
BIOMASSA DE *Chlorella sorokiniana* E *Scenedesmus sp.* NO CULTIVO
COM DIGESTATO LÍQUIDO: UMA ABORDAGEM VIA DCCR**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao
Curso de Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João del-Rei,
Campus Alto Paraopeba, como parte das
exigências para a obtenção do título de Bacharel
em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira
Júnior.

Ouro Branco, Dezembro de 2025.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Ana Maria de Oliveira – UFSJ.

BSc. Marcos Júnior Coelho de Souza – UFSJ

Prof. Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior - Orientador

RESUMO

O digestato líquido (DL), coproduto da biodigestão anaeróbica, apresenta elevada carga de nitrogênio amoniacal, fósforo e matéria orgânica, o que exige tratamento adequado antes de seu descarte, mas também o caracteriza como um substrato promissor para aplicações biotecnológicas. Nesse contexto, o uso de microalgas surge como alternativa sustentável para a valorização deste resíduo, promovendo simultaneamente biorremediação e geração de biomassa de interesse industrial. Este trabalho teve como objetivo otimizar a produtividade volumétrica média (PV_{med} , $g\ L^{-1}\ dia^{-1}$) das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* cultivadas em DL, empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR). Os cultivos foram conduzidos por 21 dias em Erlenmeyers de 250 mL (100 mL de volume útil), sob agitação, luz e temperatura controladas. As concentrações de DL (0–18% v/v) e de meio mineral Inthorn (MMI, 0–81% v/v) foram definidas pelo DCCR, e a biomassa foi monitorada diariamente por densidade óptica (DO_{600nm}), convertida para concentração de biomassa seca (CBS, $g\ L^{-1}$) por curva analítica previamente estabelecida. A PV_{med} foi calculada a partir da variação de CBS no período total de cultivo e utilizada como variável resposta para as análises estatísticas via análise de variância (ANOVA). Além disso, avaliou-se o ganho estratégico teórico do processo otimizado, considerando redução de meio sintético e diminuição do tempo necessário para obtenção da biomassa destinada às análises do grupo PET BioSus. A microalga *C. sorokiniana* apresentou o melhor desempenho, atingindo PV_{med} experimental máxima de 190,78 $mg\ L^{-1}\ dia^{-1}$ no ensaio contendo 18% de DL e 40,5% de MMI. O modelo estatístico mostrou-se significativo ($p < 0,001$) para a microalga *C. sorokiniana*, permitindo prever um ponto ótimo de cultivo com PV_{med} de 222,55 $mg\ L^{-1}\ dia^{-1}$ em 18% de DL e 66,5% de MMI. A microalga *Scenedesmus sp.* não apresentou um modelo estatisticamente significativo, sugerindo maior sensibilidade à amônia livre, portanto, não foi possível gerar um modelo matemático preditivo. Para a microalga *C. sorokiniana*, os resultados do modelo otimizado representam um aumento teórico de até 781,73% na PV_{med} em relação ao MMI puro, além de uma possível redução de 26,11% no uso de MMI e uma diminuição de 88,66% no tempo necessário para acumular a biomassa seca necessária para análises elementares em reatores de 5 L. Os resultados indicam o DL como um substrato eficiente para o cultivo microalgal e demonstram o forte potencial de integração entre as linhas de pesquisa do grupo PET BioSus, contribuindo para estratégias de economia circular e valorização de resíduos agroindustriais.

Palavra chaves: Microalgas. Biodigestão. Digestato líquido. Otimização de bioprocessos. Valorização de resíduos.

ABSTRACT

Liquid digestate (DL), a co-product of anaerobic biodigestion, has a high ammoniacal nitrogen, phosphorus, and organic matter content, which requires adequate treatment before disposal, but also characterizes it as a promising substrate for biotechnological applications. In this context, the use of microalgae emerges as a sustainable alternative for the valorization of this waste, simultaneously promoting bioremediation and the generation of biomass of industrial interest. This study aimed to optimize the average volumetric productivity (PV_{med} , $g\ L^{-1}\ day^{-1}$) of the microalgae *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus sp.* cultivated in DL, using a central rotational composite design (DCCR). Cultivation was conducted for 21 days in 250 mL Erlenmeyer flasks (100 mL useful volume), under controlled agitation, light, and temperature. The concentrations of DL (0–18% v/v) and Inthorn mineral medium (MMI, 0–81% v/v) were defined by the DCCR, and biomass was monitored daily by optical density (OD_{600nm}), converted to dry biomass concentration (CBS, $g\ L^{-1}$) by a previously established analytical curve. PV_{med} was calculated from the variation in CBS over the total cultivation period and used as a response variable for statistical analysis via analysis of variance (ANOVA). In addition, the theoretical strategic gain of the optimized process was evaluated, considering the reduction in MMI and the decrease in the time required to obtain the biomass for analysis by the PET BioSus group. The microalga *C. sorokiniana* showed the best performance, reaching a maximum experimental PV_{med} of $190.78\ mg\ L^{-1}\ day^{-1}$ in the test containing 18% DL and 40.5% MMI. The statistical model proved significant ($p < 0.001$) for the microalga *C. sorokiniana*, allowing the prediction of an optimal cultivation point with PV_{med} of $222.55\ mg\ L^{-1}\ day^{-1}$ at 18% DL and 66.5% MMI. The microalga *Scenedesmus sp.* did not present a statistically significant model, suggesting greater sensitivity to free ammonia, therefore, it was not possible to generate a predictive mathematical model. For the microalga *C. sorokiniana*, the results of the optimized model represent a theoretical increase of up to 781.73% in PV_{med} compared to pure MMI, in addition to a possible reduction of 26.11% in the use of MMI and a decrease of 88.66% in the time required to accumulate the dry biomass necessary for elemental analysis in 5 L reactors. The results indicate liquid digestate as an efficient input for microalgal cultivation and demonstrate the strong potential for integration between the PET BioSus group's lines of research, contributing to circular economy strategies and the valorization of agro-industrial waste.

Keywords: Microalgae. Biodigestion. Liquid digestate. Bioprocess optimization. Waste valorization.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – análise de variância

BA – biodigestão anaeróbica

CBS – concentração de biomassa seca

DCCR – delineamento central composto rotacional

DL – digestato líquido

DOE – planejamento experimental

MMI – meio mineral Inthorn

PET BioSus – Programa de Educação Tutorial, Biotecnologias para Sustentabilidade

PV_{med} – produtividade volumétrica média

RSM - metodologia de superfície de resposta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos	9
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1	Microalgas	10
3.2	Digestato líquido	11
3.3	Planejamento experimental	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1	Digestato líquido (DL)	13
4.2	Cepas-mãe de microalgas utilizadas	13
4.3	Condições de cultivo	14
4.4	Planejamento experimental	15
4.5	Monitoramento de crescimento microalgal e determinação da produtividade média para análise estatística (DCCR)	16
4.6	Cálculos de potenciais ganhos estratégicos: operacional e econômico	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1	Crescimento microalgal	18
5.2	Análise estatística da produtividade média PV_{med} via DCCR	21
5.3	Análise do ganho estratégico para o PET BioSus	26
6	CONCLUSÃO	28
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
8	APÊNDICE A – VARIAÇÃO DE PH, <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>.	31

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, com 36,5 milhões de toneladas em 2023 (FAOSTAT, 2023). Essa produção gera volumosas quantidades de esterco bovino, que podem ser aproveitadas para geração de bioenergia via biodigestão anaeróbica (BA) (SILVA et al., 2021). A biodigestão anaeróbica é um processo de tratamento biológico de resíduos orgânicos capaz de gerar biogás que então pode ser convertido a bioenergia. Para isto, diversos resíduos podem ser utilizados como substrato, a exemplo do estrume bovino (PAPADOPOULOS et al., 2023).

O digestato é coproduto da BA e pode ser separado em fração sólida e líquida. A fração sólida é frequentemente compostada e utilizada como fertilizante; já a fração líquida (digestato líquido — DL) requer tratamento adicional devido à elevada carga orgânica, de nitrogênio amoniacal, fósforo e potássio. Essa alta concentração de nutrientes é um fator determinante no seu uso como fertilizante devido ao alto potencial de impacto ambiental derivado das transformações e perdas desses nutrientes no solo. O nitrogênio, em especial, pode favorecer as emissões de N_2O (potencial de aquecimento global 265 vezes maior que o CO_2) no solo quando manejado na forma de DL (KUNZ et al., 2019).

Atualmente, as formas mais utilizadas de tratamento do DL são osmose reversa, coagulação e oxidação avançada. No entanto, esses métodos apresentam desafios que os tornam menos atraentes para novos investimentos, como alto custo, baixa eficiência e geração adicional de efluentes. Portanto, se faz necessário buscar formas alternativas de tratamento do DL para reduzir sua carga poluente, ao mesmo tempo que se gere valor para o mercado (RUDE et al., 2022; ZHANG et al., 2024). Uma abordagem promissora é a integração do uso de microalgas nesse processo.

Microalgas são microrganismos fotossintéticos que possuem a capacidade de serem cultivados em uma variada gama de substratos. Sua adaptabilidade permite que esses organismos sejam utilizados como forma de biorremediação de efluentes. Além disso, sua biomassa pode ser utilizada como matéria-prima em diversos processos de transformação para produção de biocombustíveis, biofertilizantes e produtos de alto valor agregado como proteínas, pigmento e ácidos graxos poli-insaturados (SRIMONGKOL et al., 2022).

Nesse contexto, integrar o processo de cultivo de microalgas com a biodigestão anaeróbica surge como uma alternativa eficaz aos processos tradicionais de tratamento do DL. Esta abordagem não só contribui para a remoção de nutrientes, como também resulta na produção de biomassa microalgal que pode ser convertida a uma série de produtos, como

biocombustíveis, ração animal ou fertilizantes (YAN et al., 2022).

Diante disso, este trabalho propõe a otimização das condições de cultivo das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* no DL, utilizando o planejamento experimental (DOE) mais especificamente design composto central rotacional (DCCR). O objetivo é modelar o bioprocesso para identificar a concentração ótima que maximize a produtividade volumétrica média (PV_{med}) de biomassa de ambas as espécies de microalga.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar e otimizar a PV_{med} das microalgas *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus sp.*, cultivadas no DL.

2.2 Objetivos específicos

1. Aplicar o DCCR para otimizar a PV_{med} das espécies *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.*;
2. Determinar a espécie com maior adaptabilidade e eficiência na utilização de DL;
3. Avaliar o ganho estratégico teórico do processo otimizado, quantificando o aumento da produtividade de biomassa em relação ao meio sem DL e redução de tempo do processo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas

Microalgas são microrganismos fotossintéticos unicelulares capazes de converter energia luminosa em biomassa rica em compostos de interesse biotecnológico, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos. A elevada eficiência fotossintética e a capacidade de cultivá-las em diferentes condições ambientais tornam esses organismos estratégicos para processos sustentáveis, incluindo produção de biocombustíveis, biorremediação de efluentes e recuperação de nutrientes (SRIMONGKOL et al., 2022). Entre as espécies mais estudadas destacam-se *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus sp.*, amplamente reconhecidas pela robustez metabólica, crescimento rápido e versatilidade fisiológica. A espécie *Chlorella sorokiniana* apresenta alta taxa de crescimento, elevada tolerância térmica e grande capacidade de utilizar diversas fontes nitrogenadas, incluindo amônia e nitrato, características que a tornam adequada para cultivo em efluentes ricos em nutrientes (ZHANG et al., 2024). Já a microalga *Scenedesmus sp.* destaca-se pela eficiência na remoção de nitrogênio e fósforo, além de sua capacidade de acumular lipídios sob condições específicas de estresse, sendo amplamente explorada em estudos voltados à biorremediação e produção de biomassa para fins energéticos e alimentares (YAN et al., 2022).

O cultivo microalgal em efluentes agroindustriais apresenta vantagens significativas, pois esses meios costumam fornecer macro e micronutrientes essenciais, reduzindo ou eliminando a necessidade de meios minerais sintéticos. Porém, há desafios na utilização desses efluentes como variações de pH, presença de sólidos suspensos, alta carga orgânica e toxicidade associada à amônia livre. Cada espécie responde de forma diferente a utilização desses efluentes como substrato, portanto o entendimento do comportamento de diferentes microalgas nas distintas características do efluente é fundamental para o sucesso do bioprocessamento (LEDDE et al., 2016). Além da capacidade de acumular biomassa, microalgas podem contribuir para processos de economia circular, uma vez que utilizam resíduos como fonte de nutrientes, transformando passivos ambientais em produtos de alto valor agregado. Nesse contexto, cultivos integrados com digestato líquido são particularmente promissores, especialmente em sistemas de produção animal como a bovinocultura, nos quais há geração contínua de resíduos orgânicos ricos em nutrientes como o estrume bovino (PAPADOPOULOS et al., 2023).

3.2 Digestato líquido

O DL é a fração líquida do biodigestato, um coproduto resultante da BA, processo no qual microrganismos anaeróbios convertem matéria orgânica em biogás. A composição do DL varia conforme o tipo de resíduo utilizado, mas frequentemente apresenta elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, fósforo, potássio e matéria orgânica solúvel (KUNZ et al., 2019). Em resíduos provenientes de estrume bovino, a carga de nitrogênio total pode ultrapassar 12 g L⁻¹ e fósforo, 5 g L⁻¹, dependendo das condições operacionais da BA (BAUER et al., 2021). Embora seja rico em nutrientes, o DL geralmente requer tratamento antes do descarte, devido ao seu potencial poluidor. Sua utilização na fertirrigação pode promover eutrofização em corpos hídricos e emissões de óxido nitroso (N₂O), gás com elevado potencial de aquecimento global por seu alto teor de nitrogênio amoniacal. Métodos tradicionais de tratamento como osmose reversa, coagulação-floculação e processos oxidativos apresentam custos elevados e podem gerar resíduos adicionais, dificultando sua ampla aplicação (RUDE et al., 2022; ZHANG et al., 2024).

Nesse contexto, o uso de microalgas surge como alternativa sustentável para o tratamento e valorização do DL. Esses microrganismos assimilam nitrogênio e fósforo, reduzindo a carga poluente enquanto produzem biomassa rica em lipídios, proteínas e pigmentos (SRIMONGKOL et al., 2022). Estudos mostram que espécies do gênero *Chlorella* apresentam grande afinidade pela amônia (NH₄⁺), considerada a forma de nitrogênio mais facilmente assimilável.

No entanto, o equilíbrio entre amônia ionizada (NH₄⁺) e não ionizada (NH₃) é dependente DO pH do meio, onde, em pH elevado, há maior proporção de NH₃, que é tóxica para diversas microalgas, especialmente *Scenedesmus sp.* (LEDDA et al., 2016). Outro desafio na utilização do DL é sua turbidez, que pode limitar a penetração de luz e prejudicar o crescimento fotossintético. Estratégias como diluição, decantação ou filtração podem ser aplicadas, embora possam reduzir a concentração de nutrientes disponíveis, afetando a viabilidade do processo (SEELAM et al., 2022). Apesar desses obstáculos, estudos recentes têm demonstrado que a integração entre DL e cultivo microalgal é tecnicamente viável e oferece benefícios ambientais e econômicos significativos, permitindo transformar um coproduto da BA em insumo valioso para bioprocessos.

3.3 Planejamento experimental

O planejamento experimental (do inglês, *design of experiments* – DOE) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de bioprocessos, especialmente em áreas em que vários fatores atuam ao mesmo tempo e podem influenciar diretamente o desempenho do sistema. Em vez de testar cada variável isoladamente, o que pode consumir tempo e diminuir a chance de revelar como elas interagem, o DOE oferece uma forma organizada e inteligente de investigar o processo como um todo. Essa abordagem integrada permite compreender relações que não seriam percebidas por métodos tradicionais e contribui para reduzir custos, tempo de trabalho e incertezas experimentais (BOX et al., 2005). Entre as ferramentas do DOE, a metodologia de superfície de resposta (RSM) ocupa um lugar de destaque. Ela combina estatística e modelagem matemática para ajudar a visualizar como diferentes fatores influenciam uma variável resposta. Em bioprocessos, isso é especialmente útil, pois parâmetros como nutrientes, pH, intensidade luminosa e temperatura raramente agem de forma isolada (MYERS et al., 2016). A RSM permite não apenas entender essas interações, mas também prever cenários e localizar regiões de operação mais favoráveis, ou pontos ótimos.

Dentro dessa metodologia, o DCCR tem sido amplamente adotado por sua capacidade de ajustar modelos quadráticos, ou seja, modelos que capturam tanto efeitos lineares quanto curvaturas na superfície de resposta. Ele combina pontos fatoriais, axiais e repetições no ponto central, criando um conjunto equilibrado e estatisticamente robusto de experimentos. Uma das grandes vantagens do DCCR é que ele oferece boa qualidade de predição mesmo com um número relativamente pequeno de ensaios, algo extremamente valioso em estudos de laboratório, onde tempo e recursos são limitados (RODRIGUES et al., 2014). Por essa razão, o uso do DCCR permite não só explorar o potencial do digestato como fonte de nutrientes utilizando o menor número de ensaios possível, mas também encontrar condições otimizadas para obtenção da maior PV_{med} possível.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Digestato líquido (DL)

O DL utilizado foi obtido a partir de bateladas em biodigestores de bancada (volume útil 400 mL) contendo 10% (v/v) de soro de leite, 15% (m/v) de estrume bovino como inóculo e o restante sendo água destilada; operado a $38 (\pm 2)$ °C por 8 dias (Figura 1). Após a conclusão das bateladas, o material foi centrifugado a 12.100 rpm por 30 min; a fração líquida foi armazenada a 4 °C até utilização nos ensaios experimentais. Mais detalhes sobre a batelada podem ser obtidos no trabalho de MACHADO et al. (2023).

Figura 1 - Aparato experimental utilizado nos ensaios de biodigestão anaeróbica



Fonte: MACHADO, et al. (2023).

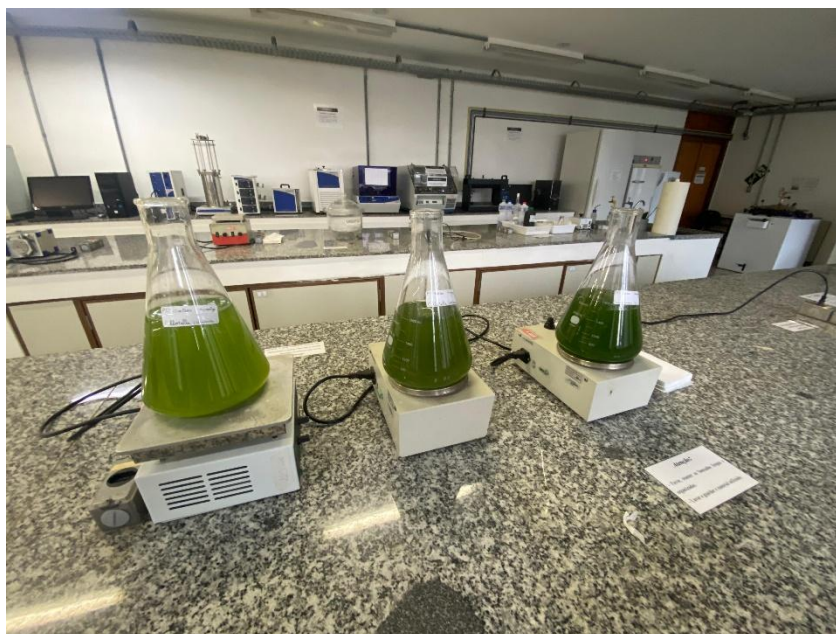
4.2 Cepas-mãe de microalgas utilizadas

As microalgas avaliadas para o cultivo em DL foram as espécies *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus sp.*. Essas microalgas foram originalmente doadas pela UFSM e suas cepas-mãe (Figura 2) foram preservadas em meio mineral Inthorn (INTHORN et al., 2002) no laboratório Biotecnológico da UFSJ, Ouro Branco – MG, Brasil.

O meio mineral Inthorn (MMI) é composto por (por litro): 1,50 g NaNO_3 , 380 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 120 mg K_2HPO_4 , 110 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 70 mg NaCl , 10 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 9 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 mg H_3BO_3 , 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 mg

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, e 0,04 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Esse meio foi utilizado como referência e base para os cálculos de ganho estratégico.

Figura 2 – Cepas-mãe das microalgas *C. sorokiniana*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus sp.* preservadas em meio mineral Inthorn pelo grupo de pesquisa PET BioSus no laboratório Biotecnológico da UFSJ, Ouro Branco, MG, Brasil



Fonte: banco de fotos de autoria própria (2024).

4.3 Condições de cultivo

Os ensaios foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 ml com volume final de 100 ml. 10 % (v/v) de suspensão microalgal de *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* foram inoculados para cada ensaio respectivo à espécie de microalga utilizada. As variações de volumes de DL e Inthorn que foram utilizados estão descritos na Tabela 1. Um controle contendo apenas MMI foi realizado em duplicata para fins de comparação em um crescimento na ausência de DL. Todos os ensaios foram incubados em *shaker* com condições controladas de agitação (150 rpm), temperatura (25 °C) e iluminação (1400 lux) (Figura 3). Os experimentos foram realizados durante 21 dias e o pH de cada ensaio foi aferido diariamente para posterior avaliação. O procedimento de cultivo foi adaptado de PSACHOULIA et al. (2022).

Figura 3 – Cultivo das microalgas *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* com controle de agitação (150 RPM), temperatura (25°C) e iluminação (1400 lux)



Fonte: banco de fotos de autoria própria (2024).

4.4 Planejamento experimental

Um DCCR com pontos axiais e quadruplicata no ponto central foi desenvolvido para avaliação e otimização do crescimento das espécies de microalga *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* em DL descrito na Tabela 1. Além disso, um controle contendo apenas MMI foi realizado em duplicata para fins de comparação em um crescimento na ausência de DL. As variações de DL (0-18% v/v) e MMI (0-81% v/v) foram baseados em estudos utilizando *C. sorokiniana* em DL obtido a partir de biodigestor de bancada (MACHADO et al., 2025). Para totalizar o valor de 100% do volume de trabalho, água destilada foi adicionada aos ensaios que se fizeram necessário previamente à adição do inóculo. Os resultados obtidos ao final dos ensaios foram utilizados para análise de variância (ANOVA) no *software* STATISTICA versão 7.0 e foi adotado um nível de significância de $p < 0,05$.

Tabela 1 - Planejamento composto central rotacional utilizado para o cultivo das duas espécies de microalga *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* em DL e MMI. Onde, E: ensaio; C: controle.

Ensaio	DL (% v/v)	MMI (% v/v)
E1	2,6	12,0
E2	2,6	69,0
E3	15,4	12,0
E4	15,4	69,0
E5	0,0	40,5
E6	18,0	40,5
E7	9,0	0,0
E8	9,0	81,0
E9	9,0	40,5
E10	9,0	40,5
E11	9,0	40,5
E12	9,0	40,5
C1	0,0	90,0
C2	0,0	90,0

Fonte: autoria própria (2024).

4.5 Monitoramento de crescimento microalgal e determinação da produtividade média para análise estatística (DCCR)

A cinética de crescimento das microalgas foi monitorada diariamente por meio da leitura da densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}), utilizando um espectrofotômetro. A concentração de biomassa seca (CBS), expressa em $mg\ L^{-1}$, foi determinada indiretamente a partir da DO_{600nm} por meio de uma curva analítica de calibração linear DO_{600nm} vs. CBS, previamente estabelecida e validada pelo grupo de pesquisa PET BioSus. A partir dos dados diários de CBS, foi calculado o principal parâmetro de desempenho para cada condição experimental: a PV_{med} , expressa em $g\ L^{-1}\ dia^{-1}$. A PV_{med} foi definida como a variável resposta para a análise estatística de otimização via DCCR, por ser a métrica mais representativa do rendimento total de biomassa no tempo de cultivo total (t_{final}). O cálculo da PV_{med} foi realizado de acordo com a Eq. 1.

$$PV_{med} = \frac{X_{final} - X_{inicial}}{t_{final} - t_{inicial}} \quad (Eq. 1)$$

Onde $X_{inicial}$ e X_{final} são as CBS ($mg\ L^{-1}$) calculadas a partir de correlação com curva analítica de biomassa seca x DO_{600nm} nos tempos inicial ($t_{inicial} = 0$ dias) e final ($t_{final} = 21$ dias), respectivamente.

4.6 Cálculos de potenciais ganhos estratégicos: operacional e econômico

Para quantificar o potencial do impacto da otimização do bioprocesso, foram realizados dois cálculos de ganho estratégico, utilizando o ponto ótimo predito pelo modelo estatístico e a concentração de MMI do ensaio controle.

A redução no volume utilizado do MMI foi calculada a partir da Eq. 2.

$$R_{MMI} (\%) = \left(\frac{V_{MMI,controle} - V_{MMI,otimizado}}{V_{MMI,controle}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde R_{MMI} : redução percentual de MMI (%); $V_{MMI,controle}$: concentração de MMI no ensaio controle (% v/v); $V_{MMI,otimizado}$: concentração MMI encontrada nas condições teóricas de otimização pelo modelo (% v/v);

O cálculo de eficiência operacional teórica focou na redução do tempo de cultivo necessário para atingir o objetivo de 2 g de biomassa seca, volume mínimo requerido para análises na instituição parceira do grupo PET BioSus. Utilizando os reatores de 5 L atualmente empregados pelo grupo para acumulação de biomassa, a concentração alvo para análise foi estabelecida em 400 mg L⁻¹ referente a 2 g em 5 L. A Eq. 3 foi empregada para encontrar o tempo necessário para atingir o objetivo de biomassa seca.

$$T_{obj}(\text{horas}) = \left(\frac{C_A}{PV_{med}} \right) * 24 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde T_{obj} : tempo necessário para atingir o objetivo de biomassa seca (horas); C_A : concentração alvo no biorreator de acumulação de biomassa (mg L⁻¹); PV_{med} : produtividade volumétrica média encontrada na condição ótima do modelo estatístico ou ensaio controle (mg L⁻¹ dia⁻¹).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento microalgal

De acordo com os dados apresentados nas Tabela 2 e Tabela 3, é possível observar que a microalga *C. sorokiniana* teve um melhor desempenho de PV_{med} quando comparada a microalga *Scenedesmus sp.*.

Tabela 2 - CBS final e PV_{med} por ensaio da microalga *C. sorokiniana* em diferentes concentrações de DL e MMI. Onde, E: ensaio; MC: média do controle.

Ensaio	CBS final (mg L ⁻¹)	PV_{med} (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
E1 (2,6% DL; 12,0% MMI)	2642	115,69
E2 (2,6% DL; 69,0% MMI)	2259	96,64
E3 (15,4% DL; 12,0% MMI)	2454	105,86
E4 (15,4% DL; 69,0% MMI)	4063	182,36
E5 (0,0% DL; 40,5% MMI)	2370	103,67
E6 (18,0% DL; 40,5% MMI)	4239	190,78
E7 (9,0% DL; 0,0% MMI)	1137	44,37
E8 (9,0% DL; 81,0% MMI)	2393	103,58
E9 (9,0% DL; 40,5% MMI)	3554	158,70
E10 (9,0% DL; 40,5% MMI)	3551	158,54
E11 (9,0% DL; 40,5% MMI)	3343	148,46
E12 (9,0% DL; 40,5% MMI)	3225	143,33
MC (0,0% DL; 90,0% MMI)	545 ± 39	25,24 ± 2,54

Fonte: autoria própria (2025).

Os maiores valores de PV_{med} e CBS final observados para *C. sorokiniana* foram de 4239 mg L⁻¹ e 190,78 mg L⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, e eles foram resultados do ensaio 6, contendo 18% de DL e 40,5% de MMI. Quando comparados a média do controle (MC, ausência de DL), os valores de CBS final e PV_{med} do ensaio 6 representam um ganho de 644% e 655%, respectivamente. Estudos de Wang et al. (2010) cultivaram *Chlorella sp.* em

DL diluído em 10 vezes e filtrado em filtros de microfibra. Esse DL foi advindo de biodigestão de estrume bovino e o cultivo teve duração de 21 dias resultando em uma PV_{med} de $74,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Apesar de reduzir a turbidez do meio facilitando a penetração de luminosidade ao realizar a filtração, estudos de Seelam et al., (2022) com diferentes tipos de filtração de DL demonstraram a redução da concentração de nitrogênio e fósforo de até 12,5% e 83% quando comparados ao DL que não passou por nenhum processo de filtração. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores obtiveram uma PV_{med} de $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ no cultivo de cultura mista de *Desmodesmus sp.* e *Chlorella vulgaris* em DL filtrado em papel filtro de $10\mu\text{m}$ e fator de diluição de 10x em fotobiorreator de 5L. Esses fatores podem ser uma das causas para que os resultados de PV_{med} obtidos no presente trabalho sejam 155,2% superiores ao de Wang et al., (2010).

Tabela 3 – CBS final e PV_{med} por ensaio (E) da microalga *Scenedesmus sp.* em diferentes concentrações de DL e MMI.

Ensaio	CBS final (mg L^{-1})	PV_{med} ($\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)
E1 (2,6% DL; 12,0% MMI)	1406	69,33
E2 (2,6% DL; 69,0% MMI)	1448	71,75
E3 (15,4% DL; 12,0% MMI)	2029	103,94
E4 (15,4% DL; 69,0% MMI)	1663	82,86
E5 (0,0% DL; 40,5% MMI)	1258	61,59
E6 (18,0% DL; 40,5% MMI)	1593	79,50
E7 (9,0% DL; 0,0% MMI)	1505	75,26
E8 (9,0% DL; 81,0% MMI)	1220	59,02
E9 (9,0% DL; 40,5% MMI)	1699	85,58
E10 (9,0% DL; 40,5% MMI)	1556	77,72
E11 (9,0% DL; 40,5% MMI)	1285	62,61
E12 (9,0% DL; 40,5% MMI)	1372	67,56

Fonte: autoria própria (2025).

No presente trabalho a redução do número de operações unitárias do processo foi

realizada com o objetivo de reduzir custos e perdas operacionais durante o processo. Apenas com a etapa de diluição já foi possível observar uma diminuição da turbidez aparente do DL e portanto reduzindo a etapa de filtração quando comparado aos trabalhos citados anteriormente.

De acordo com a Tabela 3, os maiores valores de PV_{med} e CBS final observados para a microalga *Scenedesmus sp.* foram de 2029 mg L⁻¹ e 103,94 mg L⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, e eles foram resultados do ensaio 3, contendo 15,4% de DL e 12,0% de MMI. Por questões de tempo e disponibilidade de equipamentos não foi possível realizar o ensaio de controle para a *Scenedesmus sp.*. Porém, ao comparar com os resultados do ensaio 5, onde havia ausência de DL e Inthorn diluído (40,5%), o ensaio 3 obteve um aumento de CBS final e PV_{med} de 61,29% e 68,76%, respectivamente. Estudos de Rude et al., (2022) obtiveram valores de PV_{med} de 34,00 ($\pm 1,90$) e 21,80 ($\pm 2,20$) mg L⁻¹ dia⁻¹ para culturas de *Scenedesmus acutus f. alternans* e *Scenedesmus obliquus*, respectivamente. Ambos os cultivos foram realizados em 250 ml de volume útil de DL (10%, obtido a partir de biodigestão de resíduos de comida) ultrafiltrado com duração de 18 e 30 dias, respectivamente. Os valores do presente estudo representam um aumento de 205,70% e 376,79% quando comparados ao estudo de (Rude et al., 2022).

Os dados de caracterização do DL desse trabalho ainda serão analisados pelo grupo de pesquisa PET BioSus, porém, já é relatado que digestatos líquidos advindos da biodigestão de esterco bovino contém altas cargas de nitrogênio (valores podendo acumular até 12 g/L) e fósforo (valores podendo acumular até 5,8 g/L) que propiciam o crescimento das microalgas (Bauer et al., 2021). O acúmulo de nitrogênio em forma de amônia (NH₄⁺) facilita o crescimento das microalgas por ser a forma mais facilmente assimilável por elas. No trabalho de Wang et al., (2010), o acúmulo de amônia no DL foi de 1782 mg N/L para 2232 mg N/L após a biodigestão do estrume bovino, enquanto que fósforos totais tiveram uma pequena redução de 266,0 mg PO₄⁺/L para 249,7 mg PO₄⁺/L e o carbono orgânico total (COD) reduziu de 38230 mg/L para 23760 mg/L como esperado de um processo de biodigestão. Esses valores corroboraram para que o DL fosse considerado um bom suplemento para o crescimento algal devido aos nutrientes críticos ainda estarem presentes no DL após a biodigestão (Wang et al., 2010).

O balanço ideal da razão carbono, nitrogênio, fósforo (C:N:P) é um dos principais fatores que promovem o maior crescimento, e nesse trabalho esse balanço foi realizado de forma exploratória com as diferentes diluições de DL no DCCR. Outros parâmetros (temperatura, densidade de inóculo inicial, luminosidade e aeração) que afetam o

crescimento microalgal foram controlados para todos os ensaios de acordo com a metodologia descrita no tópico acima.

5.2 Análise estatística da produtividade média PV_{med} via DCCR

A análise estatística foi realizada a partir do software STATISTICA versão 7.0, e seus resultados são apresentados a seguir. De acordo com a tabela resumida da ANOVA (Tabela 4), é possível observar que o modelo para a PV_{med} a partir das variações de DL (% v/v) e MMI (% v/v) se mostra estatisticamente significativo e preditivo a 95% de confiança para o cultivo com a microalga *C. sorokiniana*. Esse fato se deve ao valor p ser menor que 0,001 e a razão $F_{calculada}$ ser 5 vezes maior que o $F_{crítico}$ tabelado com o grau de liberdade do modelo (dFmodelo) igual a 5, grau de liberdade do resíduo (dFresíduo) igual a 6 e nível de significância (α) igual a 0,05 ou nível de confiança a 95%. Além disso, o modelo apresentou valores de 94,98% e 90,80% para os coeficientes R^2 e R de ajuste, respectivamente, o que fortalece ainda mais os resultados estatístico.

Tabela 4 – Tabela resumida da ANOVA com a PV_{med} como variável dependente para a microalga *C. sorokiniana*. SS: soma dos quadrados; dF: graus de liberdade; MS: quadrado médio.

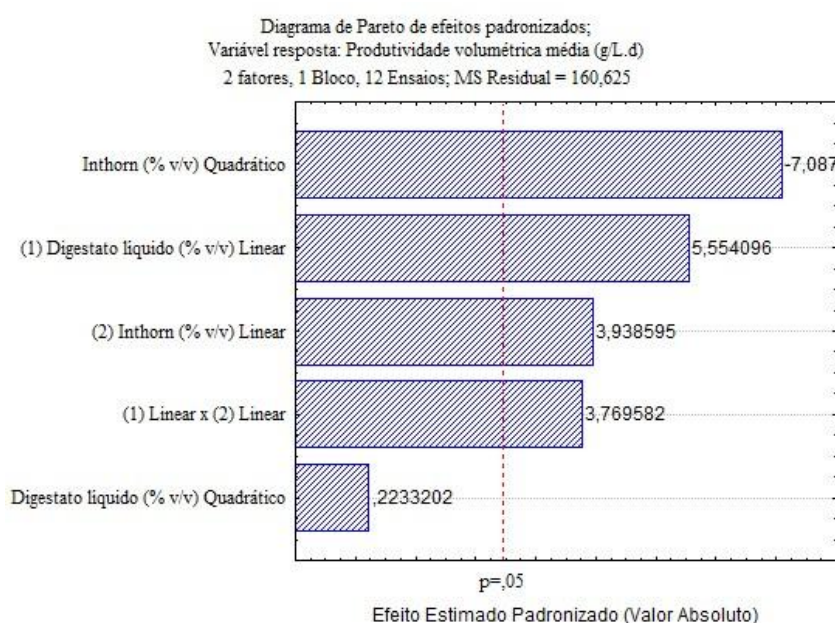
Fonte de variação	SS	df	MS	Razão F	Valor p
Modelo	17806,57	5	3561,31	22,17	< 0,001
Resíduo	963,75	6	160,63	-	-
Total	18770,32	11	-	-	-

Fonte: autoria própria (2025).

A partir da comprovação do modelo estatisticamente significativo e preditivo, foi possível realizar as análises dos efeitos de cada variável evidenciados na Figura 4. De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 4), a maioria dos termos exerceu uma influência significativa sobre a PV_{med} para o cultivo da *C. sorokiniana*. O termo com maior efeito e, portanto, a maior barra no diagrama, é a variável Inthorn (% v/v) quadrática. Isso indica que a concentração do MMI (% v/v) não possui uma relação linear simples com a produtividade, mas sim uma curvatura acentuada que é fundamental para a otimização, apontando para um

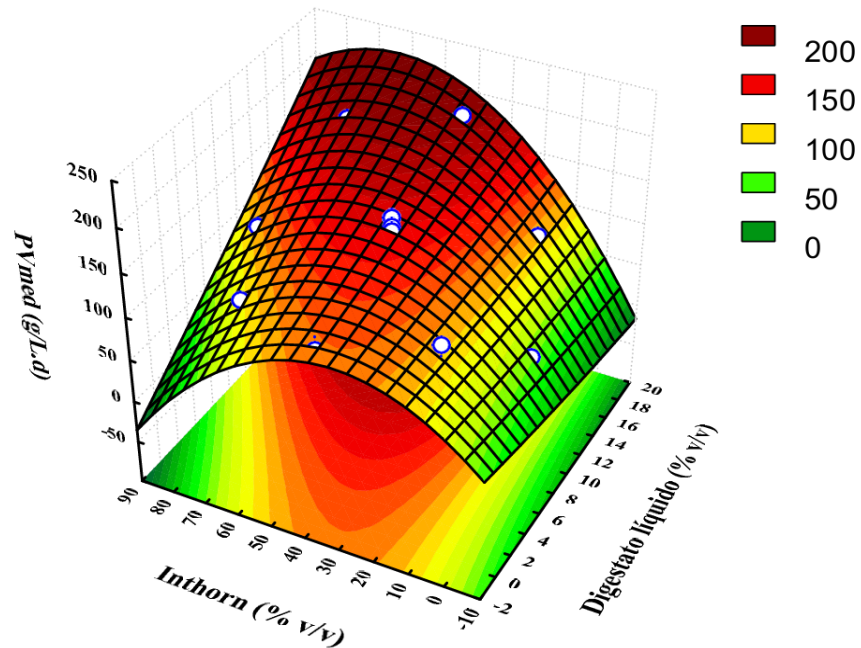
valor ideal de concentração. Por outro lado, o único termo que não apresentou influência significativa (ficando abaixo da linha de $p = 0,05$) foi o DL (% v/v) quadrático. Este resultado sugere que, dentro do intervalo experimental testado, a relação entre a concentração do DL (% v/v) e a produtividade da *C. sorokiniana* é mais próxima de uma relação linear do que de uma parábola acentuada. Isso significa que a produtividade continua a aumentar ou diminuir de forma quase constante com a mudança na concentração de DL, justificando a busca do ponto ótimo nas fronteiras do planejamento experimental.

Figura 4 - Diagrama de Pareto de efeitos padronizados com a PV_{med} como variável dependente para a microalga *C. sorokiniana*



Fonte: autoria própria (2025).

A superfície de resposta apresentada na Figura 5 é uma representação gráfica do modelo matemático (Equação 3), permitindo a identificação da região máxima de PV_{med} e facilitando o entendimento da otimização do bioprocessos. A superfície de resposta demonstrou que o ponto de máxima produtividade (o topo da superfície) não se encontra no centro da região testada, mas sim na fronteira do planejamento, especificamente em um ponto de alta concentração de DL. Este resultado reforça a observação feita no diagrama de Pareto, onde o termo DL (% v/v) Quadrático não foi significativo, indicando que a produtividade continua a aumentar com a concentração de DL dentro do intervalo testado. A partir da análise estatística foi possível obter um modelo matemático (Eq. 4) capaz de prever a produtividade volumétrica média (PV_{med} , $mg\ L^{-1}\ dia^{-1}$) da microalga *C. sorokiniana* a ser produzida a partir da variação do DL (% v/v) e MMI (% v/v) dentro da faixa do planejamento experimental e com 95% de confiança.

Figura 5 - Superfície de resposta - *C. sorokiniana*

Fonte: autoria própria (2025).

Utilizando o software STATISTICA versão 7.0 foi possível determinar o ponto de máxima eficiência para a PV_{med} alcançar seu valor máximo teórico. Esse ponto ocorre na combinação 18,0 (% v/v) de DL e 66,5 (% v/v) de MMI. Nesta condição, a PV_{med} máxima predita pelo modelo é de $222,55 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

Este resultado indica o sucesso de modelar o bioprocesso com um DCCR e em encontrar uma condição teórica mais eficiente do que qualquer ensaio individual realizado, onde o máximo experimental foi de $190,78 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, fornecendo a base para o protocolo de cultivo mais eficiente a ser validado experimentalmente.

$$PV_{med}\left(\frac{\text{mg}}{\text{L} \cdot \text{dia}}\right) = 70,42 - 1,91 * DL + 0,03 * DL^2 + 2,98 * MMI - 0,04 * MMI^2 + 0,13 * DL * MMI \quad (\text{Eq. 4})$$

Os dados da tabela resumida da análise de variância (Tabela 5) mostraram que o modelo não foi estatisticamente significativo e preditivo a 95% de confiança para o cultivo com a microalga *Scenedesmus sp.*. Isso se deve ao fato do valor p ser maior que 0,05 e o valor da razão $F_{calculada}$ ser 2,41 vezes menor que a razão $F_{crítico}$ tabelado com o grau de liberdade do modelo (df_{modelo}) igual a 5, grau de liberdade do resíduo ($df_{resíduo}$) igual a 6 e nível de significância (α) igual a 0,05 ou nível de confiança a 95%. Já era esperado uma menor PV_{med} da microalga *Scenedesmus sp.* quando comparado a *C. sorokiniana* devido a

estudos prévios em MMI (dados não disponíveis), porém, a variação na PV_{med} entre os tratamentos da microalga *Scenedesmus sp.* também foi mais afetada pelo erro experimental do que pela variação das concentrações do digestato e/ou Inthorn como reforçado na Tabela 5.

Tabela 5 - Tabela resumida da ANOVA com a PV_{med} como variável dependente para a microalga *Scenedesmus sp.* SS: soma dos quadrados; df: graus de liberdade; MS: quadrado médio.

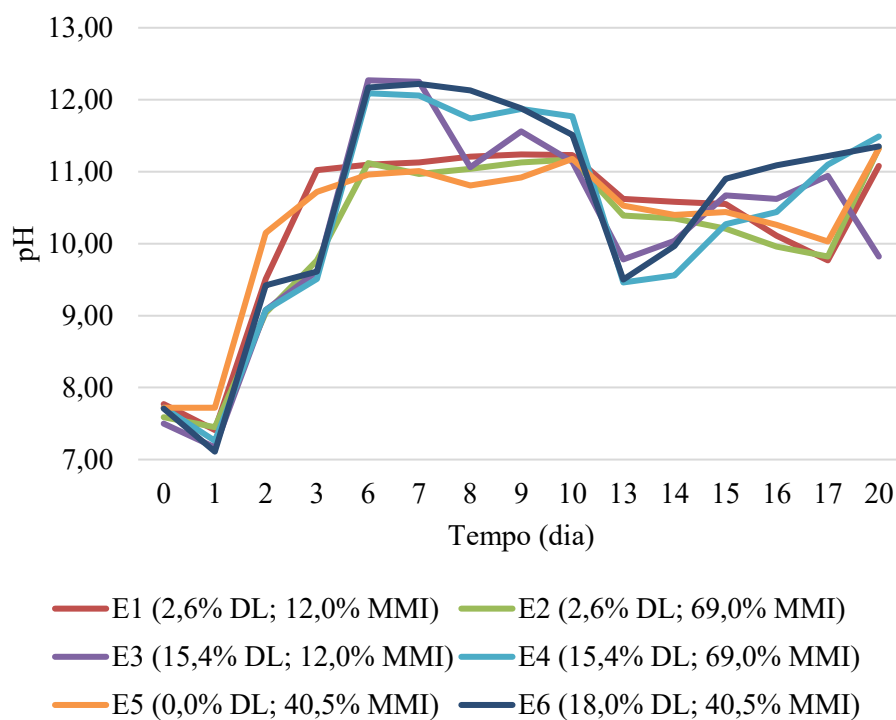
Fonte de variação	SS	df	MS	Razão F	Valor p
Modelo	1088,33	5	217,67	1,82	> 0,05
Resíduo	716,70	6	119,45	-	-
Total	1805,03	11	-	-	-

Fonte: autoria própria (2025).

A falha de modelagem da *Scenedesmus sp.* pode ser atribuída à sua menor tolerância à amônia livre (NH_3) presente no digestato. O aumento do pH (Figura 6 e Figura 7) durante o cultivo pode ter convertido o N-amoniacal em NH_3 em níveis que excederam o limite de tolerância da *Scenedesmus sp.* precocemente, induzindo um efeito de toxicidade generalizado (Ledda et al., 2016). Já para a microalga *C. sorokiniana*, o aumento do pH (Figura apêndice A 1 e Figura apêndice A 2) também ocorreu mas provavelmente não foi um fator a ser tão impactante no crescimento quanto para a *Scenedesmus sp.*. A microalga *Scenedesmus sp.* ainda deverá ser estudada em diferentes regiões de tratamento com concentrações de DL e MMI haja vista que as concentrações definidas em estudos prévios foram testadas apenas para a microalga *C. sorokiniana* e assim não foram suficientes para gerar um modelo estatisticamente significativo a 95% de confiança.

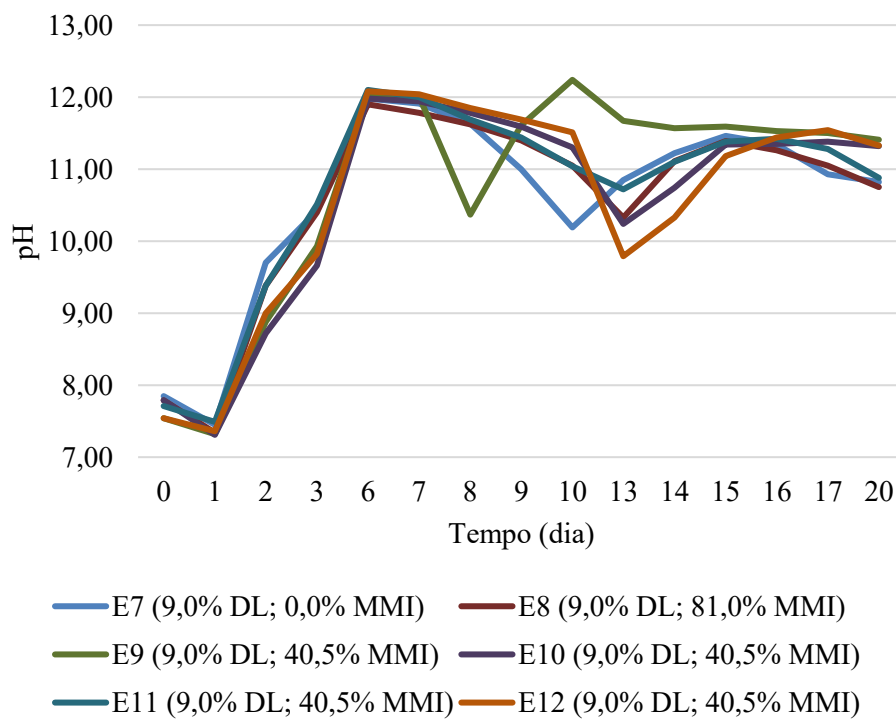
Com esses resultados, é possível observar um grande potencial das microalgas *C. sorokiniana* e *Scenedesmus sp.* serem cultivadas nesse meio de cultivo alternativo contendo DL. O maior crescimento pode ter sido causado pela maior disponibilidade de nutrientes no meio contendo maior concentração de DL, haja vista que, de todos os ensaios o que apresentou maiores parâmetros de crescimento foi aquele em que maior concentração de DL foi utilizado para o caso do cultivo com *C. sorokiniana*.

Figura 6 - Variação de pH nos ensaios E1, E2, E3, E4, E5 e E6 com *Scenedesmus sp.*



Fonte: autoria própria (2025).

Figura 7 - Variação de pH nos ensaios E7, E8, E9, E10, E11 e E12 com *Scenedesmus sp.*



Fonte: autoria própria (2025).

5.3 Análise do ganho estratégico para o PET BioSus

O potencial do ganho estratégico do processo é quantificado na Tabela 6, que compara o desempenho do protocolo otimizado com o controle sintético e valores da literatura. O resultado de PV_{med} máximo predito pelo modelo estatístico representa um ganho de 781,73 % quando comparado ao cultivo da microalga *C. sorokiniana* em meio Inthorn puro. O valor predito supera em 197,69 % e 122,55% os valores obtidos por estudos de Seelam et al., (2022) e Wang et al., (2010), respectivamente, validando a alta eficiência da formulação otimizada desenvolvida neste trabalho. Além disso, o ponto ótimo encontrado pelo modelo DCCR necessita de uma concentração de 18% v/v de DL, o que pode proporcionar um ganho econômico significativo (Tabela 7).

Tabela 6 – Comparativo do aumento percentual de PV_{med} para cada condição de cultivo desse trabalho e seus comparativos com a literatura.

Condição de cultivo	Espécie	PV_{med} (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)	Aumento percentua l	Referência
Controle (meio Inthorn puro)	<i>C. sorokiniana</i>	25,24 ± 2,54	Referência	Esse trabalho
DL 10% filtrado	<i>Chlorella sp.</i>	74,76	196,20 %	(Wang et al., 2010)
	<i>Desmodesmu</i>			
DL 10% filtrado (papel filtro 10 µm)	<i>s sp. e Chlorella vulgaris</i>	100,00	296,20 %	(Seelam et al., 2022)
Máximo experimental (E6 - 18,0% DL; 40,5% MMI)	<i>C. sorokiniana</i>	190,78	655,86 %	Esse trabalho
Modelo otimizado com DCCR (valor teórico)	<i>C. sorokiniana</i>	222,55	781,73%	Esse trabalho

Fonte: autoria própria (2025).

Enquanto o ensaio controle exigia 90,0 % v/v de MMI para o cultivo, o ponto ótimo exige apenas 66,5 % v/v de MMI. Considerando que o DL é um resíduo de custo zero para

a aquisição (no contexto da integração das linhas de pesquisa de biodigestores e microalgas do PET BioSus), esta substituição volumétrica representa uma redução de 26,11 % no volume de meio sintético necessário para cada batelada caso uma modelo se mostre válido.

O ponto ótimo do modelo otimizado indica uma teórica diminuição do tempo necessário para alcançar a biomassa seca mínima (2 g) nos reatores (5 L) de acúmulo de biomassa utilizados atualmente pelo grupo PET BioSus para realização de análises elementares na instituição parceira. Utilizando as condições de máximo predito pelo modelo estatístico, teoricamente, pode-se reduzir em 88,66% o tempo necessário para atingir a biomassa objetivo. Este resultado demonstra o potencial da estratégia de biotecnologias para sustentabilidade e economia circular do Grupo PET BioSus, onde o resíduo deixa de ser um passivo ambiental para se tornar um insumo de alto valor, fundamental para a alta produtividade.

Tabela 7 – Comparação dos ganhos estratégicos em redução de MMI (% v/v) e redução do tempo necessário para alcançar a biomassa seca objetivo (T_{obj}).

Condição de cultivo	MMI (% v/v)	RMMI (% v/v)	T _{obj} (horas)
Controle (meio Inthorn puro)	90,0	Referência	380,35
Máximo experimental (E6)	40,5	55,0	50,32
Modelo otimizado com DCCR (valor teórico)	66,5	26,11	43,14

Fonte: autoria própria (2025).

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que o DL proveniente da biodigestão anaeróbica apresentou grande potencial para o cultivo microalgal, destacando-se o desempenho superior da microalga *Chlorella sorokiniana* em comparação a microalga *Scenedesmus sp.* Essa superioridade foi refletida pela sua maior PV_{med} e comportamento estatisticamente modelável na faixa de concentrações de DL e MMI delineadas, permitindo a obtenção de um modelo significativo via DCCR. A condição ótima identificada para o valor máximo da variável resposta, composta por 18% de DL e 66,5% de MMI, resultou em uma PV_{med} predita de $222,55 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, superando o máximo valor experimental ($190,78 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e valores de referência na literatura ($100,00$ e $74,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$). Por outro lado, a microalga *Scenedesmus sp.* não apresentou resposta modelável nessa faixa de variação de DL e MMI, indicando uma provável maior sensibilidade às condições amoniacais e às variações de pH do digestato.

A otimização do bioprocesso indica prováveis ganhos operacionais significativos, incluindo uma estimada redução de 26,11% no consumo de meio mineral sintético e uma estimada diminuição de 88,66% no tempo necessário para atingir a biomassa seca nos fotobiorreatores de 5 L do PET BioSus suficiente para ser utilizada em análises elementares. Esta abordagem indica o papel do DL como um possível insumo de alto valor, transformando um passivo ambiental em fonte nutricional para processos de cultivo sustentáveis, em total alinhamento com a economia circular. Futuros estudos devem focar na eficiência de remoção de nutrientes, a caracterização bioquímica da biomassa e a validação do processo em escalas maiores, de forma a apoiar sua transição para aplicações industriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, L. et al. Digestate as sustainable nutrient source for microalgae—challenges and prospects. **Applied Sciences**, v. 11, 1056, 2021.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**. 2. ed. Wiley, 2005.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Ranking by commodity. 2023. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 12 fev. 2025.

GUERRA, M.; BÁNKUTI, F.; SILVA, A. Agroecological practices and the typology of milk production systems in brazilian rural settlements. **Journal of Sustainability Research**, v. 6, n. 2, 2024.

INTHORN, D. et al. Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. **ScienceAsia**, v. 28, p. 253-261, 2002.

KUNZ, A.; STEINMENTZ, R. L. L.; AMARAL, A. C. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato**. Sbera: Embrapa Suínos e Aves, 2019. ISBN: 978-85-93823-01-5.

LEDDA, C. et al. Integration of microalgae production with anaerobic digestion of dairy cattle manure: An overall mass and energy balance of the process. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 103–112, 2016.

MACHADO, M. G. et al. An evaluation and optimization of anaerobic digestate as a nutrient source for microalgae *chlorella sorokiniana* growth. In: VILALTA-ALONSO, G. et al. **Advances in Sciences Behind Food, Energy, and Innovation: Selected Contributions to the 10th International Congress on Agroindustrial Engineering, CIIA-2024**. Springer Nature Switzerland AG, 2025. Lecture Notes on Multidisciplinary Industrial Engineering (ed 1), p. 33-40, 2025.

MACHADO, M. G. et al. Monitoramento da produção de biogás a partir de diferentes concentrações de soro de leite e estrume bovino em biodigestores. Anais do III Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-Line, **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 4, n. 2, p. 124-129, 2023.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments**. 4. ed. Wiley, 2016.

PAPADOPOULOS, K. P. et al. Vitamin B12 bioaccumulation in *Chlorella vulgaris* grown on food waste-derived anaerobic digestate. **Algal Research**, v. 75, 103290, 2023.

PSACHOULIA, P. et al. Assessment of nutrients recovery capacity and biomass growth of four microalgae species in anaerobic digestion effluent. **Water (Switzerland)**, v. 14, n. 2, 221, 2022.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Casa do Pão, 2005. 325 p.

RUDE, K. et al. Growth potential of microalgae on ammonia-rich anaerobic digester effluent for wastewater remediation. **Algal Research**, v. 62, 102613, 2022.

SEELAM, J. S. et al. Maximizing nutrient recycling from digestate for production of protein-rich microalgae for animal feed application. **Chemosphere**, v. 290, 133180, 2022.

SILVA, G. H. et al. Shifts of acidogenic bacterial group and biogas production by adding two industrial residues in anaerobic co-digestion with cattle manure. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 56, n. 14, p. 1503–1511, 2021.

SRIMONGKOL, P. et al. Microalgae-based wastewater treatment for developing economic and environmental sustainability: current status and future prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

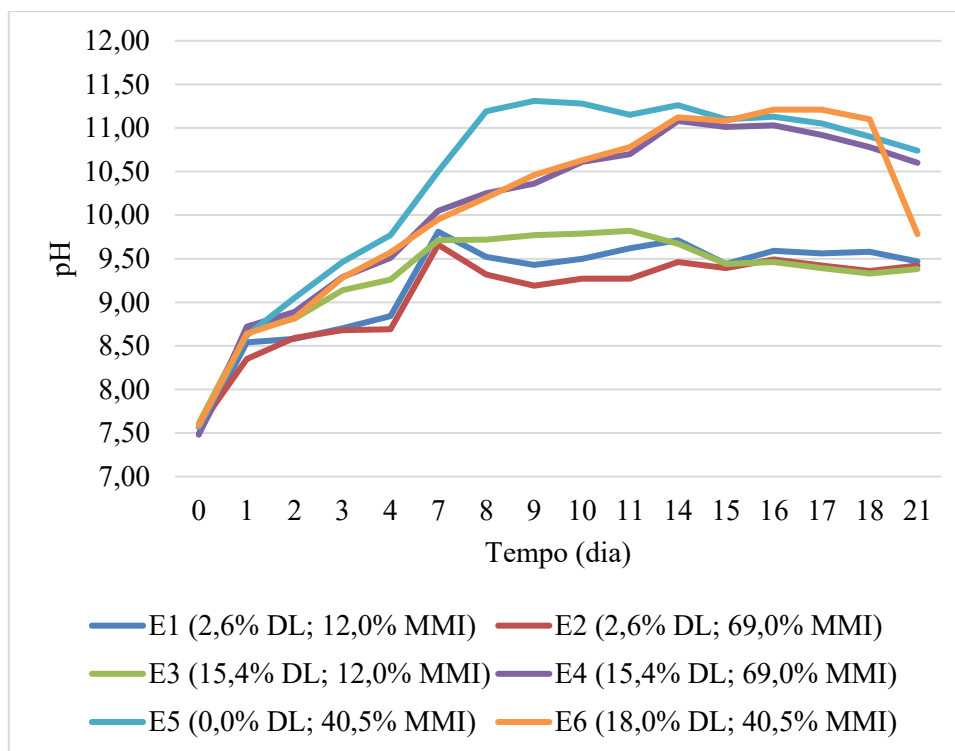
YAN, H. et al. Development of microalgae-bacteria symbiosis system for enhanced treatment of biogas slurry. **Bioresource Technology**, v. 354, 127187, 2022.

ZHANG, Y. et al. Efficient treatment of actual biogas slurry by *Chlorella sorokiniana*: Nutrient recovery and biomass production. **Journal of Water Process Engineering**, v. 66, 106007, 2024.

WANG, L. et al. 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.

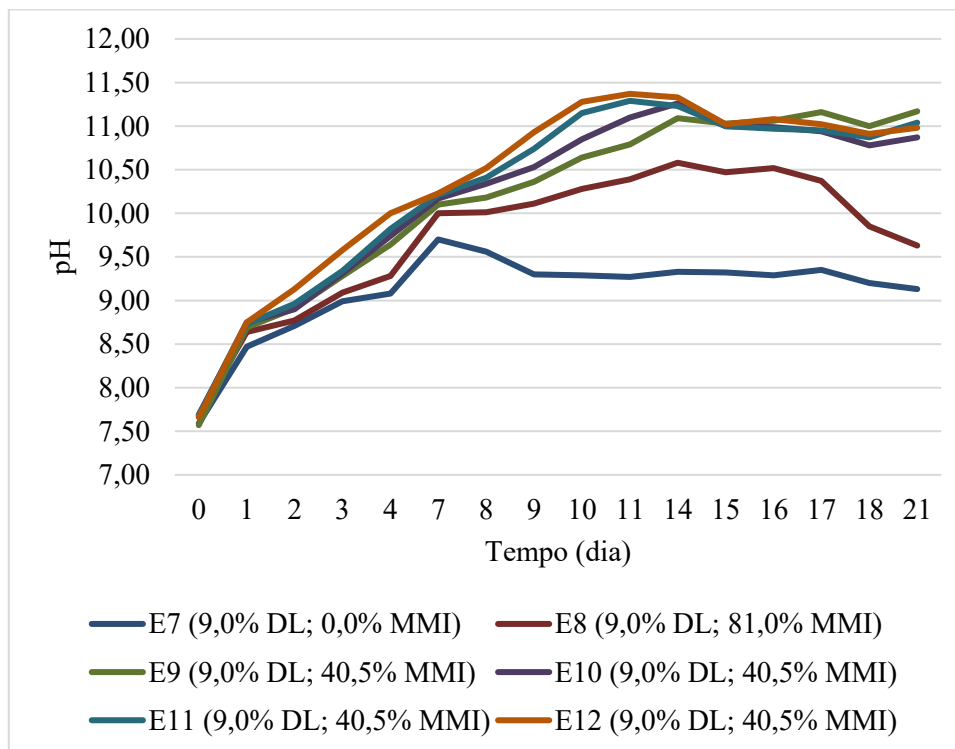
APÊNDICE A – VARIAÇÃO DE PH, *Chlorella sorokiniana*.

Figura apêndice A 1 - Variação de pH nos ensaios E1, E2, E3, E4, E5 e E6 com *C. sorokiniana*



Fonte: autoria própria (2025).

Figura apêndice A 2 - Variação de pH nos ensaios E7, E8, E9, E10, E11 e E12 com *C. sorokiniana*



Fonte: autoria própria (2025).